



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais**

MICHELINE DE FÁTIMA VALLE MAFALDA

**Rendimento e ação fungitóxicos dos extratos de folhas e cascas da
*Guazuma ulmifolia***

**GURUPI – TO
2017**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais**

MICHELINE DE FÁTIMA VALLE MAFALDA

**Rendimento e ação fungitóxica dos extratos de folhas e cascas da
*Guazuma ulmifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Renato da Silva Vieira

Co-orientador: Prof. Dra. Vanessa Coelho Almeida

**GURUPI - TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi

Cutter

Mafalda, Micheline Valle

Título: Rendimento e ação fungitóxica dos extratos de folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia* Micheline de Fátima Valle Mafalda- Palmas, 2017. 47f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestais, 2017.

Linha de pesquisa: Manejo, silvicultura e tecnologia florestal.

Orientador: Prof. Dr. Renato da Silva Vieira

1. Guazuma ulmifolia. 2. Extratos. 3. Rendimentos I. Vieira, Renato da Silva. (Orientador) II. Universidade Federal do Tocantins. III. Título.

CDD 2017

Bibliotecária: Emanuele Santos

CRB-2 / 1309 **TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.**

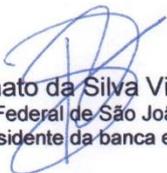


Defesa nº 046/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MICHELINE DE FÁTIMA VALLE MAFALDA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 02 dias do mês de maio do ano de 2017, às 14 horas, na sala 15, do edifício BALA II, do Campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins - UFT, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. RENATO DA SILVA VIEIRA da Universidade Federal de São João Del Rei, Prof^a Dr^a VANESSA COELHO ALMEIDA da Universidade Federal do Tocantins e Prof Dr AUGUSTUS CAESER FRANKE PORTELLA da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MICHELINE DE FÁTIMA VALLE MAFALDA, intitulada "**Rendimento e ação fungitóxica dos extratos de folhas e cascas de *Guazuma ulmifolia***". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas ressalvas e correções apontadas pela banca examinadora, habilitando-a ao título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

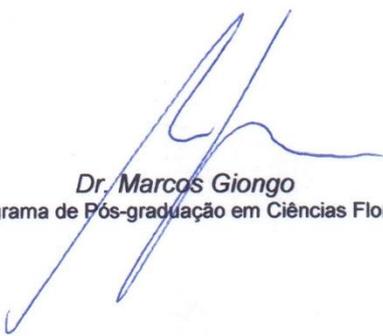
Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Dr. Renato da Silva Vieira
Universidade Federal de São João Del Rei
Orientador e presidente da banca examinadora


Dr^a. Vanessa Coelho Almeida
Universidade Federal do Tocantins
Primeira examinadora


Dr. Augustus Caeser Franke Portella
Universidade Federal do Tocantins
Segundo examinador

Gurupi, 02 de maio de 2017.


Dr. Marcos Giongo
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Theobaldo e Elza Mafalda, pelos princípios e valores transmitidos que me norteiam nos caminhos da vida, e por todo apoio, carinho, dedicação, amor e compreensão.

Às minhas irmãs, meus sobrinhos, familiares e amigos pelo incentivo.

À minha amada filha Mariana, razão do meu viver.

Ao Prof. Dr. Renato da Silva Vieira, meu orientador, pela credibilidade na minha capacidade, pelo incentivo e principalmente pela confiança em proporcionar autonomia para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

À Prof. Dra. Vanessa Coelho Almeida, minha co-orientadora, pela amizade, carinho, preocupação, auxílio, apoio, conselhos, e prontidão em todos os momentos. Gratidão.

Ao Prof. Dr. Augustus Portella, pela participação na banca.

Ao Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar, pela compreensão e permitir o desenvolvimento de todo o meu trabalho no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Gratidão.

Aos alunos e amigos do Laboratório MIP que me receberam com carinho. Gratidão por todos os momentos, tanto nas horas de trabalho, quanto nos momentos descontração.

A Prof. Dra. Talita pela atenção, carinho e disposição em me auxiliar. Imensamente grata.

Aos alunos do Laboratório do Prof. Dr. Gil Rodrigues, em especial a Dalmarcia.

Ao meu amigo César Guimarães, pelo apoio, paciência e auxílio nos momentos que precisei.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Análises de Solos pela colaboração no empréstimo dos materiais.

Aos funcionários, servidores e vigilantes da Universidade, sempre dispostos em nos auxiliar nos momentos de experimento.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestais e Ambientais.

Ao Programa CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo, determinar o rendimento dos extratos de folhas e cascas da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*, identificar os principais componentes químicos dos extratos obtidos, e analisar a ação fungitóxica ao fitopatógeno *Fusarium sp.* Para a determinação da umidade, inseriu-se as amostras em formas de alumínio, posteriormente colocadas na estufa a 50°C por 4 dias. Para avaliar o rendimento das amostras na extração com Soxhlet, utilizou-se os cones de filtros secos em estufa a 50°C, e na maceração à frio avaliou-se o peso dos recipientes. Na representatividade das extrações, o álcool etílico apresentou maior rendimento para amostras de folhas e cascas. No bioensaio com o fitopatógeno, foram selecionados os extratos de folhas e cascas em hexano e acetato de etila, nas concentrações de 50.000µL/mL à 1.000µL/mL. As análises fitoquímicas foram realizadas em CG(M-S), utilizando o gás hélio (He), e os principais componentes detectados nos extratos em acetato de etila foram: Fitol, Esqualeno, Tetracontano, Lupeol e Tocoferol (Vitamina E) para as folhas, e Ácido Linolênico, Tocoferol, Esqualeno, Estigmasterol e o Fucosterol, para as cascas.

Palavras-chave: Mutamba; Extração soxhlet; Maceração a frio; Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the yield of leaves and bark extracts of the *Guazuma ulmifolia* forest species, to identify the main chemical components of the extracts obtained, and to analyze the fungitoxic action of the phytopathogen *Fusarium* sp. For the determination of the humidity, the samples were inserted in aluminum forms, later placed in the oven at 50°C for 4 days. In order to evaluate the yield of the samples in the Soxhlet extraction, the greenhouse filter cones were used at 50°C, and in the cold maceration, the weight of the containers was evaluated. In the representativity of the extractions, ethyl alcohol presented higher yields for leaf and bark samples. In the phytopathogen bioassay, extracts of leaves and bark were selected in hexane and ethyl acetate at concentrations of 50,000 µL / mL at 1,000 µL / mL. The phytochemical analyzes were performed in CG (MS), using helium gas (He), and the main components detected in ethyl acetate extracts were: Fitol, Esqualeno, Tetracontano, Lupeol and Tocoferol (Vitamin E) for the leaves, and Linolenic Acid, Tocopherol, Squalene, Estigmasterol and Fucosterol, for bark

Keywords: Mutamba; Soxhlet extraction; Cold maceration; Gas chromatography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
3. CAPÍTULO I	18
4. INTRODUÇÃO.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Coleta e Identificação botânica.....	21
5.2 Local de Execução do Experimento	21
5.3 Preparação do material vegetal	21
5.4 Extrações pelo método Soxhlet.....	21
5.5 Extração pelo método de maceração a frio	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
9. CAPÍTULO II	30
10. INTRODUÇÃO	32
11. MATERIAL E MÉTODOS	34
11.1 Local de execução dos experimentos	34
11.2 Obtenção dos extratos da <i>Guazuma ulmifolia</i>	34
11.3 Caracterização química dos extratos em Cromatografia Gasosa - MS	34
11.4 Protocolo do meio de cultura “Batata, Dextrose e Ágar” (BDA).....	35
11.5 Protocolo de diluições dos extratos com hexano e acetato de etila.....	35
11.6 Procedimentos para execução do Bioensaio.....	36
11.7 Análise de dados.....	36
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
13. CONCLUSÃO.....	42
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Capítulo I: Procedimento de extração em Soxhlet e extratos.....	13
Figura 2: Extração por Maceração à Frio em Mesa Agitadora Orbital e extratos após 8 dias.....	14
Figura 3: Rendimento de extrato de <i>Guazuma ulmifolia</i> nos diferentes solventes utilizados na extração.....	15
Figura 1 Capítulo II: Escala de diluição seriada de 50.000µL a 1.000µL dos extratos utilizados no Bioensaio.....	16
Figura 2: Bioensaio de extratos de acetato de etila e hexano x <i>Fusarium sp.</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Capítulo I: Resumo da análise de variância para obtenção do rendimento de extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i>	13
Tabela 2: Teste de médias de rendimento de extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> em função do tipo de solvente utilizado.....	14
Tabela 3: Teste de médias de rendimento de extrato da <i>Guazuma ulmifolia</i> em função ao método de extração.....	15
Tabela 1: Capítulo II: Resumo da análise de variância.....	16
Tabela 2: Testes de médias produzidos do bioensaio a partir dos desdobramentos dos efeitos das diluições nos solventes e das diluições com o tipo de material utilizado.....	33
Tabela 3: Testes de médias do bioensaio a partir dos desdobramentos do efeito do material utilizado com os solventes aplicados para produção do extrato.....	38
Tabela 4: Composição química do extrato das folhas da <i>G.ulmifolia</i> por meio de CG –MS.....	40
Tabela 5: Composição química do extrato das cascas da <i>G.ulmifolia</i> por meio de CG –MS.....	41

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Guazuma ulmifolia* Lam, pertence à família Sterculiaceae, à classe das Magnoliophyta (Angiospermae), a ordem das Malvales (CARVALHO, 2007). Segundo as análises de Vieira (1968), essa espécie florestal é conhecida popularmente como mutamba, sendo uma espécie de grande abrangência no bioma Cerrado, e de elevada importância na recuperação de áreas degradadas. As árvores atingem cerca de 10 m de altura, as folhas são simples com filotaxia alterna dística, as flores são actinomorfas, com cálice trilobulado e corola pentâmera amarela a amarela-esverdeada. O fruto é verde em formato de cápsula e quando maduro, apresenta coloração preta ou cinza-escuro, de consistência rígida, lenhosa e com uma média de 64 sementes por fruto. (LORENZI, 1992; ALMEIDA et al., 1998).

O fitopatógeno, *Fusarium solani*, identificado e caracterizado primeiramente por Roy et al., (1989) e Rupe, (1999), é o principal agente causador da síndrome-da-morte-súbita-da-soja (sudden death syndrome – SDS). Após a análise das características morfológicas, o fitopatógeno foi classificado como *Fusarium solani*, *Fusarium sp.* Glycines (FSG). Posteriormente, com base nas observações das análises moleculares, características morfológicas e o comportamento do fungo em sua patogenicidade, realizadas por Aoki et al. (2005), foram identificadas quatro espécies de *Fusarium*: *Fusarium brasiliense sp. nov.*, *Fusarium cuneirostrum sp. nov.*, *Fusarium tucumaniae sp. nov.*, na América do Sul e *Fusarium virguliforme sp. nov.*, na América do Norte. Atualmente, em virtude da variabilidade fenotípica encontrada não apresentar conformidade com a caracterização molecular, e as espécies brasileiras não estarem devidamente atualizadas, foi considerado neste trabalho a denominação *Fusarium sp.*

Conforme as análises de Nakajima et al., (2005), o *Fusarium* possui um crescimento micelial extenso, primeiramente branco, posteriormente cor rosa, púrpura ou amarelo e com textura algodonosa em cultura. Os conídeos do esporodóquio apresentam três a cinco septos, curvados, levemente pontiagudos no ápice, e os clamidósporos possuem formato ovóide, isolados ou em correntes. A invasão oportunista do fitopatógeno é responsável pelas doenças em plantas cultivadas, raiz e em grãos de milho, sendo os colmos e as espigas os mais afetados, ressalta Munkvold et al., (1997), ocasionando podridões radiculares, murchas vasculares,

podridões de sementes, síntese de micotoxinas, enfraquecimento do caule e tombamento de plântula (BOOTH, 1971). Devido ao uso constante e excessivo de produtos químicos no manejo de doenças em plantas cultivadas, e levando em consideração os impactos causados no meio ambiente, o comprometimento da saúde humana e a resistência adquirida pelos patógenos, torna-se necessário a inserção de um manejo mais sustentável, onde os extratos e óleos oriundos dos metabólitos primários ou secundários das espécies vegetais, possam minimizar o uso de grupos químicos. (LAMICHHANE et al., 2016).

As espécies florestais, sintetizam compostos orgânicos localizados ao longo da sua estrutura denominados metabólitos primários e secundários. No grupo dos metabólitos primários estão os carboidratos, lipídeos, proteínas, nucleotídeos, aminoácidos, e no grupo dos metabólitos secundários estão os alcalóides, terpenóides e os compostos fenólicos (BUCHANAN et al., 2000). Segundo Barbosa et al., (2015), estudos preliminares realizados “in vitro”, indicaram que alguns produtos oriundos de plantas, possuem elevado potencial no controle de fitopatógenos, o que reforça a afirmação de Cowan (1999), quando afirma que os produtos naturais são fonte de substâncias biologicamente ativas que possuem elevado potencial para realização de uma investigação científica, pela capacidade em sintetizar metabólitos primários e secundários. As espécies vegetais sintetizam metabólitos que podem apresentar atividade direta por meio dos extratos ou óleos essenciais, atuando em microorganismos como bactérias, nematoides, fungos, insetos e pragas, ou simplesmente ativando os seus mecanismos de defesa frente aos patógenos e agentes externos (FRANZENER et al., 2007). A planta contém vários fitoconstituintes como alcalóides, terpenóides, saponinas, taninos, flavonóides, esteróides, além dos triterpinóides.

A extração, o fracionamento e o isolamento dos metabólitos secundários das espécies vegetais, aliada a análise da atividade biológica das moléculas existentes nos complexos compostos dos metabólitos secundários, contribuem com informações para esclarecer questionamentos, ampliar conhecimentos e reforçar a hipótese da sua utilização como um método alternativo no biocontrole de doenças de plantas. (STANGARLIN et al., 1999).

Este trabalho teve como finalidade, determinar o rendimento de extrações das folhas e cascas da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*, por meio do Soxhlet e Maceração à Frio, sob a ação de diferentes polaridades de solventes como hexano,

clorofórmio, álcool etílico e acetato de etila, e realizar as análises fitoquímicas dos compostos do extrato. Também realizar bioensaios para verificar a ação fungitóxica dos extratos obtidos frente ao fitopatógeno *Fusarium sp.*

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, T., O'DONNELL, K., & SCANDIANNI, M. M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, 46, 162–183.
- AIMEIDA, E. M. & ALVES, M. A. S. 2000. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de floresta atlântica no sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 14: 335-346.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. & RIBEIRO, J. F. 1998. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Brasília, Embrapa CPAC, 464 pp.
- ARAÚJO, G. M.; RODRIGUES, L. A. & IVIZI, L. 1997. Estrutura fitossociológica e fenologia de espécies lenhosas de mata decídua em Uberlândia, MG. In: Leite, L. L. & Saito, C. H. (Ed.). **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. Brasília, Universidade de Brasília, pp. 22-28.
- ARAÚJO NETO, J. C. 1997. **Caracterização e germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.
- BARBOSA, J. M. & MACEDO, A. C. 1993. **Essências florestais nativas de ocorrência no estado de São Paulo: informações técnicas sobre sementes, grupos ecológicos, fenologia e produção de mudas**. São Paulo, Instituto de Botânica e Fundação Florestal, 125 pp.
- BARBOSA, M. S.; VIEIRA, G. H. C.; TEIXEIRA, A. V. Atividade biológica in vitro de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa* spp.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu-SP, v. 17, n. 2, p. 254-261, 2015.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew, Surrey, CMI, 1971, 237p.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W; JONES, R.H. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CAMPORESE, A. et al. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **J. Ethnopharmacol** 87: 103-107, 2003.
- CARRÉ, V. et al. Controle pós colheita de *Colletotrichum musae* em banana (*Musa* sp.) por cânfora (*Artemisia camphorata*) e quitosana. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2006.

CARVALHO, J. B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CARVALHO, P. E. R. Mutamba – *Guazuma ulmifolia*. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil** – 2007. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste: ESALQ, 2006. 199p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 1).

CARVALHO, P. E. R. **Mutamba – *Guazuma ulmifolia***. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Review**, v.12, p.564 – 582, 1999.

COHEN, L.E. (2008). **The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype**. *Nature* 6, 187-198.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

LAMICHHANE, J. R. et al. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**, St. Paul, v. 100, n. 1, p. 10-24, 2016.

MUNKVOLD, G. P., MCGEE, D. C., CARLTON, W. M., Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St Paul, v.87, n.2, p.209-217, 1997.

LORENZI, H. 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Plantarum, v. 1, 368 pp.

MANTOVANI, W. & MARTINS, F. R. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Mogi Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, 11: 101-112.

MARJORE M.C., plant product as antimicrobial agent. **Clinical microbiology reviews**, 1999, 12(4) 564.

NUNES, Y. R. F. et al. **Atividades fenológicas de Guazuma ulmifolia Lam. (Malvaceae) em uma floresta estacional decidual no norte de Minas Gerais.** Lundiana, Belo Horizonte, v. 6, n. 2, p. 99-105, 2005.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**,v.16, p.265-304, 2008.

VIEIRA, J.E.V. Pharmacologic screening of plants from northeast Brazil.II. **Revista Brasil Farm**, 49: 67-75, 1968.

3. CAPÍTULO I

RESUMO

Título: Rendimento de folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia* por métodos extrativos Soxhlet e Maceração à Frio, sob a ação de diferentes polaridades de solventes

Este trabalho teve como objetivo determinar o rendimento de extratos das folhas e cascas da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*, popularmente conhecida como mutamba, pelo método de extração com Soxhlet e maceração à frio, sob a ação de diferentes polaridades de solventes. Os solventes utilizados para as folhas e cascas das árvores selecionadas da *Guazuma ulmifolia* foram, Hexano, Clorofórmio, Álcool Etílico e Acetato de Etila. Os métodos de extrações utilizados foram Soxhlet e maceração à frio. Para folhas e cascas o processo de preparação e execução consistiu em coleta, pesagem do material fresco, lavagem do material com água destilada e hipoclorito a 2%, seguida de secagem na estufa a 50°C por 4 dias. Posteriormente as cascas foram submetidas ao triturador em moinho de facas e as folhas maceradas manualmente. Nas extrações pelo método com Soxhlet, utilizou-se 200mL dos solventes selecionados para cada cone de papel filtro contendo as amostras de folhas e cascas. Nas extrações de maceração à frio, utilizou-se frascos de vidros com a mesma quantidade de solvente, onde as amostras permaneceram em contato com os solventes por oito dias em recipientes fechados e sob agitação constante de 50rpm no agitador mecânico. Foram utilizadas seis repetições de folhas e de cascas, para cada tratamento. Os resultados obtidos mostram que o solvente álcool etílico apresentou maior eficiência em rendimento para extrato, independente da matéria-prima. Observou-se uma tendência de aumento no rendimento do extrato com o aumento da polaridade do solvente.

Palavras-chave: Espécie florestal; Métodos de extrações; Diferentes solventes; Análise rendimentos.

ABSTRACT

Title: Yield of leaves and barks of *Guazuma ulmifolia* by Soxhlet and Cold Maceration extractive methods, under the action of different solvent polarities

The objective of this work was to determine the yield of extracts of the leaves and bark of the forest species *Guazuma ulmifolia*, popularly known as mutamba, by the method of Soxhlet extraction and cold maceration, under the action of different solvent polarities. The solvents used for the leaves and barks of the selected *Guazuma ulmifolia* trees were Hexane, Chloroform, Ethyl Alcohol and Ethyl Acetate. The extraction methods used were Soxhlet and cold maceration. For leaves and barks the preparation and execution process consisted of collection, weighing of fresh material, washing of the material with distilled water and 2% hypochlorite, followed by drying in the oven at 50 ° C for 4 days. Afterwards, the husks were submitted to the mill in a knife mill and the leaves were macerated manually. In the extractions by the Soxhlet method, 200mL of the selected solvents were used for each cone of filter paper containing the leaves and bark samples. In the extraction of cold maceration, glass vials with the same amount of solvent were used, where the samples remained in contact with the solvents for eight days in closed containers and under constant stirring of 50rpm in the mechanical stirrer. Six replicates of leaves and bark were used for each treatment. The results show that the ethyl alcohol solvent presented higher yield efficiency for extract, independent of the raw material. A tendency to increase the yield of the extract was observed with increased polarity of the solvent.

Keywords: Forest species; Extraction methods; Different solvents; Analysis of yields.

4. INTRODUÇÃO

Os extratos vegetais são misturas complexas compostas por variadas classes de produtos naturais e por diferentes grupos funcionais, onde a separação desses compostos biologicamente ativos ocorre primeiramente na extração da matéria-prima, seguida do fracionamento do extrato ou óleo, e finalmente na purificação do princípio ativo obtido (SIMÕES, 2001). Existem diversos métodos de extração de compostos de origem vegetal que utilizam solventes orgânicos ou água, sendo que o método mais adequado pode estar diretamente ligado com as características das substâncias da espécie escolhida.

Estudos realizados com as cascas e as folhas da *Guazuma ulmifolia*, detectaram a presença de ligninas, além de alcaloides, flavonoides, taninos, sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos, β -sitosterol e glicosídeos cianogênicos, como metabólitos secundários (EIGLER, 2005; SILVA, 2006; LOPES, 2009), que segundo as análises fitoquímicas de extratos etanólicos e metanólicos realizadas por Camporese, 2003, as folhas revelaram a presença de óleos voláteis e proantocianidinas nas cascas. No método de extração em Soxhlet obtém-se maior quantidade de material e óleo em relação a outros métodos pelo fato da amostra permanecer em contato com o solvente pela evaporação e condensação do mesmo sobre a amostra. Este método é ideal para pequenos volumes de material.

Na maceração, o material é colocado em um recipiente, em contato direto com o solvente por um tempo que varia entre horas ou dias, sendo o solvente removido por filtração (JONES e KINGHORN, 2006).

Os compostos presentes em extratos apresentam grande interesse e importância na indústria farmacêutica, além de outras aplicações como na área agrônômica, pois, segundo Silva et al., (2010), as substâncias bioativas presentes nos metabólitos secundários de produtos naturais, como os óleos essenciais e os extratos apresentam relevância em estudos desta natureza, porque possibilita descobertas de novos compostos que podem trazer avanços para sociedade, principalmente nos tratamentos de males provocados por diversos microorganismos.

Por esse motivo este estudo teve como objetivo determinar rendimento do extrato das folhas e cascas da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*, popularmente conhecida como mutamba, pelo método de extração com Soxhlet e pela técnica de Maceração à frio, sob a ação de diferentes polaridades de solventes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e Identificação botânica

As amostras da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*, foram coletadas nas dependências da Universidade Federal do Tocantins, sob as coordenadas (11° 44' 47.005" S, 049° 03' 03.513 W) e (11° 44' 28.409" S, 49° 03' 05.665" W), no período de Maio a Setembro de 2016, no município de Gurupi – TO. Foram coletadas folhas e cascas da espécie florestal escolhida para a realização do experimento. A exsicata confeccionada foi enviada ao herbário da Universidade Federal do Tocantins, campus de Porto Nacional para assegurar a identificação botânica dos espécimes coletados.

5.2 Local de Execução do Experimento

A execução dos experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais, ambos localizados no campus de Gurupi da Universidade Federal do Tocantins.

5.3 Preparação do material vegetal

Para a execução das extrações adotou-se a metodologia adaptada da Farmacopéia Brasileira V edição (2010) e Santos et.al (2007).

As folhas e as cascas coletadas e selecionadas, foram colocadas separadamente em sacos plásticos, identificadas, pesadas na condição fresca em seguida imersas em água destilada e hipoclorito a 2% por 15 minutos no primeiro ciclo, mais 15 minutos em imersão somente com água destilada no segundo ciclo da lavagem. As folhas e as cascas foram colocadas na estufa à 50°C por 4 dias, para a secagem do material. Após a secagem as folhas foram maceradas manualmente e as cascas trituradas em moinho de facas.

Foi determinado o teor de umidade base úmida das folhas e cascas.

5.4 Extrações pelo método Soxhlet

Para a realização da extração (Figura 1), foram utilizados cones de papel filtro de tamanho médio para acondicionar o material de folhas e cascas de cada solvente utilizado no processo extrativo. Os cones de filtro foram colocados na estufa de circulação de ar à 50°C por duas horas, para diminuir a umidade do papel. Após esse procedimento, foram pesados vazios em balança analítica de precisão, preenchidos

com o material de folhas e cascas para cada solvente, sendo seis tratamentos para cada amostra e solvente, e por fim pesados novamente.



Figura 1: Procedimento de extração em Soxhlet e extratos. (Fonte: Autora)

Os balões volumétricos de 250mL que compõem o aparelho, foram preenchidos com 200mL de cada solvente (Hexano, Clorofórmio, Álcool Etílico e Acetato de Etila). Os cones de papel filtro foram colocados no aparelho para o início da extração por um tempo de aproximadamente 4 a 6 horas. Após o ciclo da extração, colocou-se os cones com as amostras úmidas na estufa a 50°C, e realizou-se pesagens diárias por um período de 4 a 5 dias, para a verificação da estabilidade do peso dos cones em relação ao material seco, obtendo assim os valores para calcular o rendimento.

5.5 Extração pelo método de maceração a frio

Na realização da extração por maceração à Frio, os procedimentos foram os mesmos descritos acima para verificação do teor de umidade das folhas e cascas. A dinâmica no método de maceração à frio, implica inserir diretamente as amostras de folhas e cascas em vidros ou erlemmeyers, previamente secos em estufa a 50°C por 4 horas, para diminuir a umidade e viabilizar as pesagens dos recipientes secos e vazios, secos e com as amostras, e por fim adicionar 200mL dos solventes selecionados. Os recipientes com as amostras e os solventes, permaneceram oito dias sob agitação contínua de 50rpm na mesa agitadora orbital (Figura 2).



Figura 2: Extração por Maceração à Frio em Mesa Agitadora Orbital e extratos após 8 dias - (Fonte: Autora)

Após esse período, realizou-se a separação dos solventes e amostras por meio de funil e papel filtros.

Os recipientes contendo as amostras de folhas e cascas foram colocados na estufa a 50°C por um período de 4 a 5 dias, onde realizou-se pesagens diárias do material para a verificação da estabilidade do peso dos vidros em relação ao material seco, obtendo assim os valores para calcular o rendimento.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados baseou-se na análise das diferenças entre os métodos de extração, tipo de matéria-prima e solventes utilizados para obtenção do extrato.

Na tabela 1, estão apresentados o resumo da análise de variância do efeito método, tipo de matéria-prima e solvente na obtenção do rendimento em extrato da *Guazuma ulmifolia*.

Tabela 1: Resumo da análise de variância para obtenção do rendimento de extrato da *Guazuma ulmifolia*.

Fonte de variação	GL	QM	F
Método de extração	1	154,457634	10,475 *
Matéria-prima	1	81,604376	5,534 NS
Solvente	3	439,989145	29,839**
Erro	90	14,745395	

NS: não significativo; * significativo, a 5% de probabilidade; ** significativo, a 1% de probabilidade.

De acordo com a análise de variância, o efeito do método e solvente foram significativos, embora o tipo de matéria-prima, casca ou folhas, não ter apresentado diferença. Houve uma tendência de aumento do rendimento em extrato com o aumento da polaridade dos solventes, conforme pode ser observado na tabela 2, onde são apresentados o teste de médias para as fontes de variação que apresentaram significância. As letras iguais significam que não houve diferença estatística nos valores determinados, e as letras diferentes significam que diferem entre si.

Tabela 2: Teste de médias de rendimento de extrato da *Guazuma ulmifolia* em função do tipo de solvente utilizado.

Solvente	Rendimento de extrato (%)	
Hexano	5,11	A
Acetato de etíla	5,64	A
Clorofórmio	6,05	A
Álcool etílico	14,13	B

Na tabela 3, está representado o teste de médias para o método de extração, Soxhlet ou Maceração à Frio.

Tabela 3: Tabela teste de médias de rendimento de extrato da *Guazuma ulmifolia* em função ao método de extração.

Método de extração	Rendimento de extrato (%)	
Soxhlet	6,47	A
Maceração à Frio	9,00	B

Neste resultado apresentado na tabela 3, podemos observar que o método de Maceração à Frio foi mais eficiente com uma média de rendimento 30% maior que o método Soxhlet. Essa constatação apresenta grande vantagem em razão da simplicidade do método, menor consumo de energia que ele necessita, trazendo assim maior facilidade para obtenção do extrato. Outro fator que pode ser considerado é o tempo de contato, interação e adesão entre solvente e amostra que é maior na Maceração à Frio, possibilitando assim um maior rendimento.

Conforme citado e observado na figura 3, pode ser constatada a tendência do aumento do rendimento do extrato em função da polaridade dos solventes, isso nos leva a concluir que as substancias integrantes deste extrato apresentam característica de materiais hidrofílicos, uma vez que quanto mais polar é o solvente maior o rendimento em extrato.

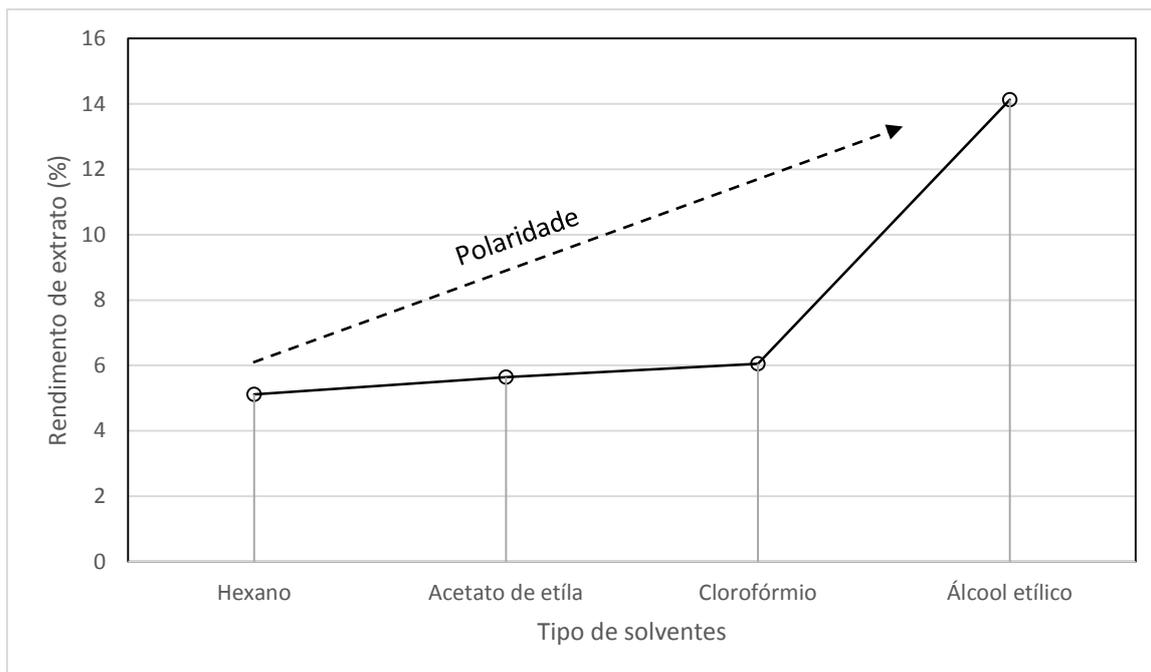


Figura 3: Rendimento de extrato de *Guazuma ulmifolia* nos diferentes solventes utilizados na extração.

Essa tendência de aumento do rendimento em função da polaridade está ligada a natureza do composto extraído da *Guazuma ulmifolia*. De acordo com a literatura, estudos fitoquímicos realizados por Camporese et al., (2003), em extratos etanólicos e metanólicos de *Guazuma ulmifolia*, revelaram a presença de óleos voláteis nas folhas e proantocianidinas na casca. No entanto, a estabilidade, o rendimento e a viabilidade dos constituintes no extrato de *Guazuma ulmifolia* dependem de vários fatores como pH, armazenamento, temperatura, concentração, luz, oxigênio, solventes, flavonoides, proteínas, íons metálicos e a presença de enzimas (CASTAÑEDA-OVANDO, et al., 2009).

7. CONCLUSÃO

Para a obtenção de extratos da *Guazuma ulmifolia*, o método de maceração à frio revelou-se mais eficiente, supostamente pelo maior tempo de contato dos solventes com as amostras.

Dentre os solventes utilizados, o álcool etílico alcançou maior rendimento em extrato.

Não houve diferença entre folhas e casca no rendimento de extrato.

Houve uma tendência de aumento do rendimento de extrato com o aumento da polaridade dos solventes utilizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P., C. E. B. Proença, S. M. Sano & J. F. Ribeiro. 1998. Cerrado. **Espécies Vegetais Úteis**. Embrapa. Planaltina, DF. 464p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT. **Ensaio físicos e mecânicos da madeira** - MB-26/40. Rio de Janeiro, 1940. 16p.

BAUER, A.W; KIRBY, W. M. M.; SERRIS, J. C.; TURCK, M.; **Amer. J. Clin. Pathol.** 1966, 45, 493.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W; JONES, R.H. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Maryland:** American Society of Plant Physiologists, 2000.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009

CAMPORESE, A. et. al. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **J. Ethnopharmacol** 87: 103-107, 2003.

A. CASTAÑEDA-OVANDO, M. D. L.; et al. **“Chemical studies of anthocyanins: a review,”** Food Chemistry, vol. 113, no. 4, pp. 859–871, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et. al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**, Editora da UFC: Fortaleza, 1981.

MENDONÇA, R. C. et. al. **Flora vascular do Cerrado**. Pp. 289-556. In: Sano, S.M. & Almeida, S.P. Cerrado, Ambiente e Flora. EMBRAPA CPAC, Planaltina-DF, Brasil, 1988.

CECHINEL, F. V.; **Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais correlação estrutura química-atividade farmacológica**. Tese de Doutorado em Química, UFSC, Florianópolis, SC, 1995.

CECHINEL, F.; V.; **Modificação da estrutura molecular da Xantoxilina e estudo da atividade farmacológica dos derivados**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, 1991.

EMBRAPA. **Óleos essenciais: aspectos gerais da extração**. Pelotas, 2011

HOSTETTMAN, K. et. al. **Princípios ativos de plantas superiores**. Ed. UFSCAR, SP: 2003 pg 65.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. **Extraction of plant secondary metabolites**. In: Methods in biotechnology, v. 20, Natural products isolation, 2nd ed. Eds. SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Humana Press Inc., Totowa, p. 323-351, 2006.

MIGUEL, O. G.; **Componentes químicos de Sebastiania schottiana Muell.Arg.; Hipoteses sobre a correlação entre estrutura a atividade farmacológica**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, SC 1987.

SANTOS, A. S. et. al. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**, v. 28, n. 2, p. 127-130, 1998.

SILVA, M. B.; **Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas**. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento** 5ªed UFSC pg. 315, 221-224.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2001.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

MMA - Ministério do Meio Ambiente (BRASIL), Secretaria de Biodiversidade e Florestas. **Áreas Prioritárias para Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira: Atualização** - Portaria MMA nº9, de 23 de janeiro de 2007. Brasília: MMA. 2007. (Série Biodiversidade, 31).

9. CAPÍTULO II

RESUMO

Título: Caracterização química e avaliação dos extratos de folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia* com possível ação fungitóxica para o fitopatógeno *Fusarium sp.*

Este capítulo aborda a análise da possível ação fungitóxica dos extratos de folhas e cascas da espécie vegetal *Guazuma ulmifolia*, no bioensaio realizado com o fitopatógeno *Fusarium sp.*, um microorganismo responsável pela doença em plantas cultivadas, raiz e grãos de milho, ocasionando a podridão, o enfraquecimento, e comprometendo o desenvolvimento de diversas partes da planta, a produtividade e o rendimento. Após obter os extratos de folhas e cascas por meio de extração com o Soxhlet, utilizando os solventes hexano e acetato de etila, os extratos foram evaporados, secos e posteriormente utilizados nas diluições seriadas, que consistiu em uma solução estoque, partindo de uma concentração máxima de 50.000 μ L, contendo 0,5gr do extrato seco, 0,5gr de DMSO em 9mL de água destilada e esterilizada, sendo as próximas diluições, de 25.000 μ L, 10.000 μ L, 5.000 μ L e 1.000 μ L. Para a realização do bioensaio, verteu-se 20mL do meio BDA em placas Petry, 100 μ L de cada diluição e/ou tratamento, e discos de 0,3cm do fitopatógeno depositados no centro da placa. Para as testemunhas, adicionou-se no meio BDA, 0,5gr de DMSO em 9,5mL de água destilada, e o disco do fitopatógeno. As placas foram depositadas na Câmara Incubadora para BOD por 8 dias, com medições dos halos de crescimento de 2/2 dias. Nos resultados do bioensaio, a diluição de 50.000 μ L/mL do extrato de folhas em acetato de etila, apresentou melhor resultado na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno, considerando a menor média de crescimento. Na análise com o solvente hexano não existe diferença entre as médias obtidas com relação ao crescimento micelial do fitopatógeno. As análises fitoquímicas dos extratos de folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia*, foram realizadas em espectrofotômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (CG-MS), utilizando o hélio (He). O tipo de ionização foi de Impacto de Elétrons, e a energia de impacto eletrônico (EI) utilizada foi de 70eV. Os componentes detectados nos extratos das folhas com acetato de etila em maior evidência, de acordo com os picos e retenção da amostra, foram: Fitol, o Squaleno, Tetracontano, Lupeol e Tocoferol (Vitamina E), e nos extratos das cascas com acetato de etila foram: Ácido Linolênico, Tocoferol, Squaleno, Estigmasterol e o Fucosterol.

Palavras-chave: Análise fitoquímica; Bioensaio; Inibição micelial; Fungitoxicidade.

ABSTRACT

Title: Chemical characterization and evaluation of shells and leaves extracts from *Guazuma ulmifolia* with possible fungi toxic action for phytopatogeno *Fusarium sp.*

This chapter deals with the analysis of the possible fungitoxic action of leaf and bark extracts of the *Guazuma ulmifolia* plant species in the bioassay carried out with the phytopathogen *Fusarium sp.*, A microorganism responsible for the disease in cultivated plants, roots and corn, causing rot, Weakening, and compromising the development of various parts of the plant, productivity and yield. After obtaining extracts of leaves and barks by extraction with the Soxhlet using hexane and ethyl acetate solvents, the extracts were evaporated, dried and subsequently used in the serial dilutions, which consisted of a stock solution, starting from a maximum concentration Of 50,000 μ L, containing 0.5g of the dry extract, 0.5g of DMSO in 9mL of distilled and sterilized water, the next dilutions being 25,000 μ L, 10,000 μ L, 5,000 μ L and 1,000 μ L. To perform the bioassay, 20mL of the BDA medium was poured into Petry dishes, 100 μ L of each dilution and / or treatment, and 0.3cm disks of the phytopathogen deposited in the center of the plate. For the controls, 0.5 g of DMSO in 9.5 ml of distilled water and the phytopathogen disc were added to the BDA medium. Plates were deposited in the Incubator Chamber for BOD for 8 days, with growth halo measurements of 2/2 days. In the results of the bioassay, the dilution of 50,000 μ L / mL of the extract of leaves in ethyl acetate presented better results in the inhibition of the mycelial growth of the phytopathogen, considering the lower average of growth. In the analysis with the solvent hexane there is no difference between the means obtained in relation to the mycelial growth of the phytopathogen. The phytochemical analyzes of leaf and bark extracts of *Guazuma ulmifolia* were carried out using a mass spectrometer coupled to a gas chromatograph (GC-MS) using helium (He). The Ionization type was of Impact of Electrons, and the electronic impact energy (EI) used was 70eV. The components detected in the extracts of the leaves with ethyl acetate in evidence, according to the peaks and retention of the sample, were: Fitol, Squalene, Tetracontan, Lupeol and Tocoferol (Vitamin E), and extracts of the shells with acetate Were: Linolenic Acid, Tocopherol, Squalene, Estigmasterol and Fucosterol.

Keywords: Phytochemical analysis; Bioassay; Mycelial inhibition; Fungitoxicity.

10. INTRODUÇÃO

Com o uso indiscriminado de produtos químicos e defensivos agrícolas, facilitando a ocorrência da resistência de fitopatógenos como insetos, pragas, fungos, e contribuindo para o alto impacto da contaminação ambiental, surge a necessidade em explorar recursos naturais que possuam atividades biológicas nos compostos químicos, produzidos pelo metabolismo secundário das espécies vegetais, com possível ação herbicida ou fungitóxica (SINGH et al., 2003; ISMAN, 2006).

Segundo Silva et al, (2005), a análise de diversos compostos presentes no extrato bruto, ou em óleos vegetais dos metabólitos secundários de plantas, torna-se promissora para o controle de doenças em plantas cultivadas. Em seus estudos, Di Stasi, (1996), relata que esses compostos pertencem a diversas classes de substâncias químicas, tais como, os alcaloides, terpenos, lignanas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas, esteróides, fenóis e saponinas.

Castro et al., (2010), a biossíntese desses compostos pode ocorrer por todos os órgãos das plantas, com finalidades bioativas diferentes e concentrações variadas, sendo os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em maior frequência.

Entre as diversas doenças resultante da invasão de insetos, pragas e fungos que acometem as plantas cultivares, a podridão vermelha da raiz, causada pelo fungo *Fusarium solani* revela elevados índices como agente causador da doença (EMBRAPA SOJA, 2006). Segundo Nazareno, (1989), a relação do comportamento das plantas afetadas e à podridão do colmo estão diretamente ligadas às condições ambientais, a variabilidade do patógeno com relação a virulência, a heterogeneidade do patógeno no solo, a uniformidade genética das cultivares, a concentração de nutrientes no solo, entre outros fatores externos.

Pesquisas com extratos e óleos essenciais oriundos dos metabólitos secundários de espécies vegetais desperta interesse no controle de fitopatógenos, pelos resultados positivos de determinados componentes com capacidade fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a esporulação de fungos patogênicos, e pela capacidade fungitóxica indireta, induzindo a síntese de fitoalexinas e outros compostos de defesa da planta (MOTA et al., 2002).

Estudos realizados por Eigler, (2005) e Lopes, (2009), com as folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia* apresentaram alcalóides, flavonóides, taninos, sesquiterpenos,

triterpenos, diterpenos, β -sitosterol, e glicosídeos cianogênicos, e Roese, (2011), ressalva que as proantocianidinas são os polifenóis mais abundantes nas cascas. Assim, este trabalho objetivou a análise dos extratos obtidos com hexano e acetato de etila, das folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia*, popularmente conhecida como mutamba, com possível ação fungicida e/ou fungitóxica para o fitopatógeno *Fusarium sp.*

11. MATERIAL E MÉTODOS

11.1 Local de execução dos experimentos

A execução dos experimentos foram desenvolvidos no Laboratório Integrado de Pragas (MIP) e no Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais, ambos localizados no campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins,

11.2 Obtenção dos extratos da *Guazuma ulmifolia*

Os extratos de folhas e cascas obtidos, utilizou-se do método em Soxhlet e por meio de Maceração à Frio, sendo que no segundo método, as amostras permaneceram em contato direto com os solventes por 8 dias. Em ambas as técnicas, o material de folhas e cascas foram submetidos aos solventes hexano e acetato de etila.

11.3 Caracterização química dos extratos em Cromatografia Gasosa - MS

O princípio básico da cromatografia é a separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquido ou sólido), e uma fase móvel (líquido ou gás). Na caracterização fitoquímica de produtos naturais, a cromatografia é uma técnica utilizada para o isolamento dos metabólitos secundários (PEREIRA; AQUINO-NETO, 2000).

A caracterização química dos extratos de folhas e cascas da *Guazuma ulmifolia* para hexano e acetato de etila, foi realizada em espectrofotômetro de massas acoplado a cromatógrafo gasoso (CG-MS), marca Shimadzu, modelo QP2020, de acordo com as condições operacionais: coluna capilar RTX-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 um), temperatura do injetor 320°C, linha de transferência, 320°C, 60°C por 1 minuto, 10°C/min até 280°C, permanecendo por 10 minutos, 50°C/min até 320°C permanecendo por 15 minutos. Split de 5 e fluxo da coluna de 2,5mL/min, utilizando o hélio (He), como gás de arraste. A coluna foi de 30 metros e a fase estacionária é de 5% fenil em metilsiloxano. O tipo de Ionização foi de Impacto de Elétrons, e a energia de impacto eletrônico (EI) utilizada foi de 70eV. A identificação dos compostos presente nos extratos de folhas e cascas da espécie vegetal *Guazuma ulmifolia*, obteve-se através da análise dos espectros de massa (EI, 70 eV), comparados com os espectros de massa provenientes do banco de dados do equipamento analítico,

consulta à biblioteca NIST14, Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology), pelo índice de Kovats, e com base na literatura.

11.4 Protocolo do meio de cultura “Batata, Dextrose e Ágar” (BDA)

O meio de cultura BDA é ideal para favorecer o crescimento de fungos, onde a batata serve como fonte de nutrientes, a Dextrose como açúcar e o Ágar para solidificar o meio (PITT & HOCKING, 1997). O BDA foi preparado e esterilizado conforme indicação do fabricante: 01 litro de água destilada, 200gr de amido (batata), 15gr de ágar e 20gr de dextrose, sendo todos os ingredientes pesados em balança analítica de precisão. Após a preparação do meio BDA, foi adicionado 1mL de ácido láctico com intenção de prevenir o crescimento bacteriano, e por fim o meio foi esterilizado em autoclave.

11.5 Protocolo de diluições dos extratos com hexano e acetato de etila

No preparo das concentrações dos extratos de hexano e acetato de etila, foram realizadas diluições seriadas, tanto para as folhas, como para as cascas. Primeiramente foi pesado na balança de precisão, 0,5gr dos extratos secos, 0,5gr de DMSO (Dimetilsulfóxido), ambos adicionados em 9mL de água destilada, esterilizada, e acondicionada em frasco âmbar. Para a conversão da primeira concentração, denominada solução estoque, de 50.000ppm para 50.000 μ L utilizou-se a fórmula: $C = M / V$ (C = concentração; M = massa; V = volume), e para realizar as demais diluições (25.000 μ L, 10.000 μ L, 5.000 μ L e 1.000 μ L), utilizou-se a fórmula: $C_1.V_1 = C_2.V_2$ (Figura 1).

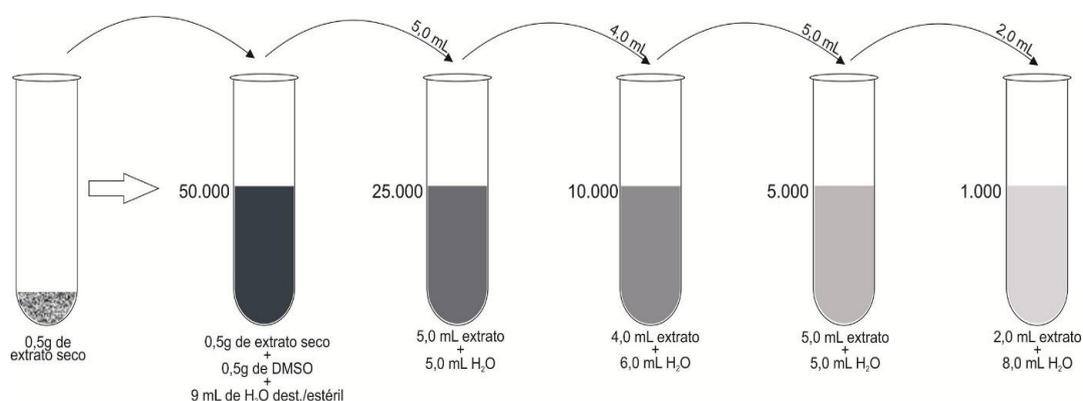


Figura 1: Escala de diluição seriada de 50.000 μ L a 1.000 μ L dos extratos utilizados no Bioensaio. (Fonte: Autora)

11.6 Procedimentos para execução do Bioensaio

As placas Petry foram esterilizadas em autoclave e colocadas na estufa à 100°C por 1 hora. Na capela de fluxo laminar, verteu-se 20mL do meio BDA nas placas identificadas para cada extrato/concentração/diluição. A concentração definida para os 4 tratamentos testemunhas do bioensaio, consistiu em 0,5mL de DMSO, adicionado em 9,5mL de água destilada e esterilizada. O frasco foi homogeneizado em agitador Vórtex, em seguida, pipetou-se 100uL da solução homogeneizada na placa contendo apenas o meio BDA, espalhando uniformemente com o auxílio da alça de Drigalski. O disco de 0,3cm de diâmetro, de micélio do *Fusarium sp.*, foi depositado com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada e flambada, no centro da placa. Este procedimento repetiu-se em todas as diluições. Realizou-se 4 tratamentos para cada diluição (50.000µL, 25.000uL, 10.000µL, 5.000µL e 1.000µL), com extratos de folhas e cascas do hexano e acetato de etila. Os discos de 0,3cm de diâmetros do micélio do fitopatógeno foram extraídos a partir de colônias com 8 dias de idade. Ao término do procedimento do bioensaio, as placas Petry foram vedadas com filme plástico e acondicionadas na Câmara Incubadora para BOD, com fotoperíodo, a uma temperatura em torno de 26°C, por um período de 8 dias.

Para a avaliação do crescimento micelial das colônias, realizou-se medições do crescimento radial das colônias de cada tratamento em dois eixos ortogonais para viabilizar o cálculo da média. (STANGARLIN et al., 1999).

11.7 Análise de dados

Na análise de dados foi realizada uma análise de variância e o teste de médias para identificar as diferenças entre os tratamentos avaliados. O teste de média aplicado foi o Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, segue os resultados da análise de variância do bioensaio.

Tabela 1: Resumo da análise de variância.

Variável	Fonte Variação					
	Solvente (S)	Diluição (D)	Material (M)	S x D	S x M	D x M
Crescimento Micelial	1227,3541**	1479,7303**	2585,0013**	562,6813	397,7856*	297,5856**

Para as fontes de variação apresentadas houveram diferenças significativas, no solvente, diluição e material utilizado, ainda essa significância foi retratada também nas interações, conforme pode ser observado na tabela 1. Dessa forma podemos destacar que o crescimento micelial determinado no bioensaio apresenta reações frente a mudança de diluição, solventes e material utilizado para produção do extrato (amostras).

Na tabela 2, são apresentados os resultados dos desdobramentos das interações, bem como, os testes de médias do desdobramento do material utilizado e dos solventes aplicados, onde as letras maiúsculas mostram a comparação na linha e as letras minúsculas mostram a comparação nas colunas.

Tabela 2: Testes de médias produzidos do bioensaio a partir dos desdobramentos dos efeitos das diluições nos solventes, e das diluições com o tipo de material utilizado.

Diluições	Solvente	
	Acetato de etíla (mm)	Hexano (mm)
50.000 µL/MI	44,0 (aA)	65,9 (aB)
25.000 µL/MI	62,6 (bA)	66,3 (aA)
10.000 µL/MI	62,2 (bA)	62,7 (aA)
5.000 µL/MI	59,8 (bA)	62,7 (aA)
1.000 µL/MI	63,1 (bA)	64,4 (aA)
Testemunha	75,8 (cA)	75,8 (bA)

Diluições	Material	
	Casca (mm)	Folha (mm)
50.000 µL/mL	62,5 (aA)	47,4 (aB)
25.000 µL/mL	66,3 (aA)	62,6 (bA)
10.000 µL/mL	66,2 (aA)	58,7 (bB)
5.000 µL/mL	68,3 (aA)	54,2 (bB)
1.000 µL/MI	65,6 (aA)	64,4 (bA)
Testemunha	75,8 (bA)	75,8 (cA)

Nos resultados apresentados na tabela 2, é possível concluir que a diluição de 50.000 µL/mL apresentou melhor resultado na inibição do crescimento micelial, tendo em vista a menor média de crescimento. Entretanto, na interação desta fonte de variação com os reagentes utilizados, somente quando utilizado o solvente extrator acetato de etila essa diferença é destacada. Quando se faz essa mesma análise com o solvente hexano não existe diferença entre as médias obtidas com relação ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Outra análise que se pode destacar é com relação ao material utilizado, folhas ou cascas, que neste caso aponta não haver diferença para as cascas entre as médias de crescimento, independente das diluições aplicadas, e também independente do solvente extrator aplicado, conforme observado na Tabela 3. No entanto, ao analisar o desdobramento dessa interação material versus diluição na tabela 2, identificou-se que quando se trata do extrato das folhas, a diluição de 50.000 µL/mL apresenta uma maior inibição ao crescimento micelial, se destacando das demais com um crescimento na ordem de 47,5 mm.

Tabela 3: Testes de médias do bioensaio a partir dos desdobramentos do efeito do material utilizado com os solventes aplicados para produção do extrato.

Material	Solvente	
	Acetato de etila (mm)	Hexano (mm)
Casca	66,3 (aA)	68,5 (aA)
Folha	56,1 (aB)	64,1 (bB)

Ainda na tabela 3, podemos também concluir com a análise dessa interação, que o extrato obtido por meio do solvente acetato de etila é mais eficiente na inibição do crescimento micelial, quando comparado com o solvente hexano.

Os resultados apresentados sugerem que, nos extratos de folhas da *Guazuma ulmifolia*, obtidos por meio do solvente acetato de etila e sob concentração de 50.000 $\mu\text{L/mL}$, apresentam componentes bioativos que afetam o desenvolvimento micelial do fitopatógeno *Fusarium sp.* Isso nos leva a inferir que provavelmente os compostos presentes no extrato apresentam características fungitóxicas para este gênero estudado, isso pode ser observado na Figura 2.

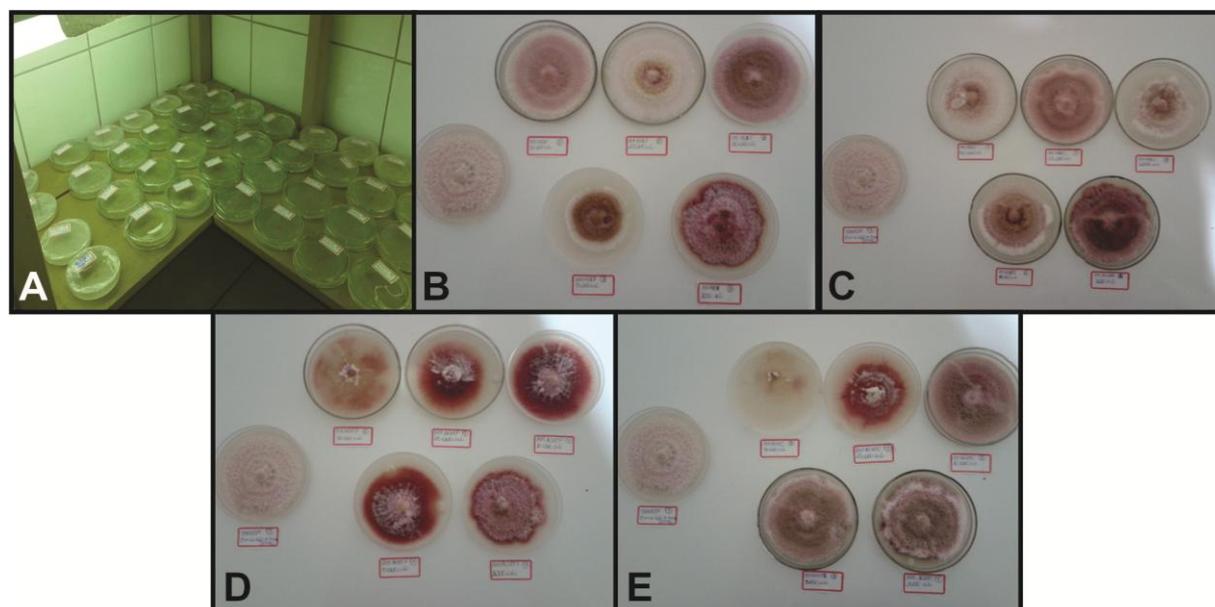


Figura 2: Bioensaio de extratos de acetato de etila e hexano x *Fusarium sp.*

A – Primeiro dia bioensaio na BOD. B – Testemunha e diluições extrato hexano folhas. C – diluições extrato hexano cascas. D – diluições extrato acetato de etila folhas. E – diluições extrato acetato de etila cascas X fitopatógeno após 8 dias na BOD. (Foto: Autora), Gurupi – TO, 2017.

Na tabela 4, apresenta a composição química e percentual do extrato de acetato de etila das folhas da *Guazuma ulmifolia*, detectados por meio da análise

fitoquímica em Cromatografia Gasosa (CG-MS), que supostamente determine a característica de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Tabela 4: Composição química do extrato das folhas da *G. ulmifolia* por meio de CG -MS

NC	Compounds	RT	CRI	(%)
1	Neophtadiene	15.161	15.125	2.38
2	Fitol	17.834	17.792	10.20
3	Ácido Linolênico	18.076	18.042	1.39
4	Kodaflex DOTP	22.936	22.883	15.36
5	Esqualeno	23.527	23.483	5.11
6	Tetracontano	24.021	23.967	7.45
7	Tocoferol (Vitamina E)	26.779	26.717	8.08
8	Dotriacontane	29.034	28.967	5.92
9	gamma.-Sitosterol	29.858	29.792	5.43
10	Lupeol	31.558	31.492	4.85
11	1-Hentetracontanol	33.551	33.500	2.97
Total (%)				100.00

NC = Number of compounds; RT = Retention time; CRT = Calculated retention index

De acordo com a tabela 4, observa-se os componentes da caracterização fitoquímica, para o extrato de folhas em acetato de etila da *Guazuma ulmifolia*, sendo o Fitol, o Esqualeno, Tetracontano, Lupeol e o Tocoferol (Vitamina E), os componentes em evidência.

Seguindo as análises de Stangarlin et al. (1999), trabalhos que utilizam extratos vegetais revelam seu potencial no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e também pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas. Sugere-se que o efeito de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno frente ao extrato de folhas em acetato de etila, seja oriundo de um ou mais componentes detectados na análise fitoquímica, em especial atenção ao esqualeno, pois, de acordo com as análises de Petranyi e Ryder, (1984), antifúngicos de pele como as alilaminas, exerce seu poder de ação inibindo o ciclo da epoxidação do esqualeno, levando à acumulação deste precursor no interior da célula fúngica. A acumulação de esqualeno afeta naturalmente a estrutura e a função da membrana plasmática das células fúngicas.

Tabela 5: Composição química e percentual do extrato de acetato de etila das cascas da *Guazuma ulmifolia*.

Tabela 5: Composição química do extrato das cascas da *G. ulmifolia* por meio de CG -MS

NC	Compounds	RT	CRI	(%)
1	Neophtadiene	15.158	15.117	1.43
2	Ácido Palmítico	16.381	16.333	5.31
3	Ácido Linolênico	18.015	17.967	2.72
4	Ácido Vacênico	18.059	18.033	6.34
5	Ácido Octadecanóico	18.242	18.150	1.22
6	Ácido Benzenodicarboxílico	22.936	22.883	34.47
7	Equaleno	23.523	23.475	2.43
8	17-Pentatriacontene	26.155	26.100	2.05
9	alpha.-Tocoferol (Vitamina E)	26.768	26.717	1.73
10	Estigmasterol	28.810	28.750	2.24
11	Fucosterol	29.863	29.750	20.21
12	Friedelan	33.908	33.842	17.94
Total (%)				100.00

NC = Number of compounds; RT = Retention time; CRT = Calculated retention index.

Na tabela 5, apresenta o número de componentes encontrados no extrato de cascas para o solvente acetato de etila, sendo o Ácido Linolênico, Tocoferol, Esqualeno, Estigmasterol e o Fucosterol, os mais evidenciados de acordo com os picos e tempo de retenção da amostra.

13. CONCLUSÃO

As folhas apresentaram-se como o material de melhor eficiência para a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium sp.*, provavelmente devido aos metabólitos secundários produzidos e concentrados neste local da espécie florestal *Guazuma ulmifolia*.

Deve-se levar em consideração que os metabólitos secundários das espécies vegetais, apresentam concentrações diferenciadas dos seus compostos nas folhas, cascas, raízes, caules e sementes, mediante estímulos externos e época da coleta. O solvente utilizado, a volatilização dos compostos durante a execução do experimento, e o método de extração aplicado, podem influenciar diretamente nos resultados.

O extrato de acetato de etila apresentou maior eficiência no quesito inibição do crescimento micelial em comparação aos extratos do solvente hexano.

A diluição indicada para a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno consiste na maior concentração de 50.000 µL/mL.

O composto presente no extrato da *Guazuma ulmifolia* que possivelmente contribuiu para a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Fusarium sp.*, é o esqualeno.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, RP. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4ª ed. Illinois, EUA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ALBUQUERQUE, F.C. et al. doenças da bananeira. In:DUARTE, M.L.R., ed **Doenças no tropico úmido Brasileiro**. Belém-PA: embrapa informação tecnológica, 2003.

AQUINO, C. F. et. al. Composição química e atividade in vitro de três óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu-SP, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 329-336, 2014.

BARNETT, H.L, HUNTER, B.B, **Illustrated genera of imperfect fungi**. Internacional standard book, 1998.

BERNARDI WENZEL, Juliana. ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.l.], v. 7, n. 3, dez. 2012. ISSN 1980-0002. Disponível em: <<http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1343>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

BOOTH, C.; WATERSON, J. M. **Fusarium solani**. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N. 29, p. 1-2, 1964.

BOOTH, C. **The genus Fusarium**. kew: Commonwealth Micological Institute,1971.

CÁCERES, A. L. M.; GIRÓN, S. R. Alvarado & M.F. Torres (1987) **J. Ethnopharmacol**. 20: 223-37.

CASTRO, H. G. et. al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2 p. 308-314, 20.

CARVALHO, P. E. R. **Mutamba – Guazuma ulmifolia**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**. 1999.

DI STALSI, L. C., (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar.** São Paulo: Ed. Universidade Paulista, 1996. 215p.

BARNETT, H.L, HUNTER, B.B, **Illustrated genera of imperfect fungi.** Internacional standard book, 1998.

DINIZ, S.P.S.S. (2002), **Micotoxinas**, 1ºed, Livraria e Editora Rural, Campinas, 181 p.

EDWARDS, S. G. (2004), **Influence of agricultural practices on Fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins.** Toxicology Letters, 153, 29–35.

EIGLER, D. S. et al. **Cyanogenic glycosides and menisdaurin from Guazuma ulmifolia, Ostrya virginiana, Tiquilia plicata, and Tiquilia canescens.** Phytochemistry 66 (2005) 1567–1580.

GALINA, K. J. **Contribuição ao Estudo Farmacognóstico da mutamba (Guazuma ulmifolia - Sterculiaceae).** Acta Farm Bonaerense. 2005

HARTMAN, G. L. et al. **Compendium of soybean diseases.** Fourth Edition. American Phytopathological Society. 1999. 100p.

HERSHMAN, D. E. et al. **Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky.** Plant Disease, v. 74, p. 761-766, 1990.

HOFFMANN, L. L. **Controle de oídio e doenças de final de ciclo em soja.** Passo Fundo: 2002. 68p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade de Passo Fundo, 2002.

JUNIOR, M. L. **Manejo cultural e biológico de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, na cultura do feijoeiro comum.** EMBRAPA Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil. Suplemento BH, 2008.

KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; BERGAMIN FILHO, **AS doenças das cucurbitáceas.** In: GALLI, F., ed. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. Piracicaba: Ceres. 1980. v.2.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopatology** 31:127-150. 1993.

LOPES, G.C.; BRUSCHI M. L.; MELLO, J. C. P. **Condensed Tannins from the Bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae).** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, No. 6, 1103-1109, 2009

MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes- fundamentos e aplicações.** MEC/ESAL/FAEP, Brasília-DF. 1988. 106p.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS: UFLA, FAEPE, 2000. 138p.

MARTINS, J. A. et al. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal.** Uberlândia, v.27, n.1, p.49-51, Jan/Feb. 2010.

MASSOLA JÚNIOR, NELSON, S.; KRUGNER, TASSO, L. **Fungos Fitopatogênicos.** In: AMORIM, Lilian.

MOTA, Joacida C. O.; PESSOA, Maria Nenmaura G.; VIANA, Francisco M. P.; NETO, Manoel Andrade. **Efeito de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais no controle in vitro de *Lasiodiplodiatheobromae*.** Fitopatologia Venez. Fortaleza (CE) v. 15, n. 1, p.

NAKAJIMA, T.; MITSUEDA, T.; CHARCHAR, M. J. D. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. **Japanese Agricultural Research Quarterly**, v. 30, n.1, p. 31-34, 1996.

NAVARRO, V.; VILLAREAL, M. L.; ROJAS, G. & Lozoya (1996) **J. Ethnopharmacol.** 53:143-7.

G.PETRANYI, N.S. RYDER e A. STUTZ, **Science**, 224, (1984).123-9.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos patogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v.30, p.129-137, 2000.

NAZARENO, N. R. X., Avaliação de perdas por podridão de colmo em milho (*Zea mays*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 82-84, 1989.

O' DONNEL, K. **Progress Towards a phylogenetic classification of Fusarium.** *Sydowia* 48: 57-70. 1996.

ROESE, F. M. **Efeito da espécie Guazuma Ulmifolia (Sterculiaceae) no peso corporal e no perfil sérico de ratos wistar induzidos à obesidade.** 2011. 82 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 2011.

SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SINGH, Rajesh; RAI, Bharat. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios** 2000, [s.i.], v. 102, n. 403, p.165-173, 1998.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extrato de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolados de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, Brasília, n.11, p.16-21, 1999.

PRAKASH, B.; SINGH, P.; KEDIA, A.; SINGH, A. AND DUBEY, N.K. Efficacy of essential oil combination of *curcuma longa* L. and *zingiber officinale* rosc. as a postharvest fungitoxicant, aflatoxin inhibitor and antioxidant agent. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 3, p. 279-288, 2012a.

