

Potencial Fungicida, Alelopático, Antioxidante e Citotóxico das Folhas de *Pouteria ramiflora*

Fungicidal, Allelopathic, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Leaves of *Pouteria ramiflora*

Patrícia Daniele Matos Ferreira Gomes^a; Felipe Cesar Veloso de Oliveira^a; Emilia Alibio Opplinger^a; Bianca Obes Correa^{ab}; José Antonio Maior Bono^{ab}; Higo José Dalmagro^{ab}

^aUniversidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. MS, Brasil.

^bUniversidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação em Agronegócio Sustentável. MS, Brasil;

Resumo

Objetivou-se realizar a análise fitoquímica, atividade antioxidante e potencial antifúngico, alelopático e citotóxico de *Pouteria ramiflora*, uma espécie arbórea importante. O extrato etanólico (Ex_{EtOH}), obtido das folhas secas, coletadas na região do Taboco, Mato Grosso do Sul, foi sequencialmente particionado com hexano (F_{Hex}), acetato e etila (F_{Acet}) e solução hidrometanólica (F_{HMeOH}), os quais foram submetidos à análise fitoquímica clássica e utilizados para determinação de fenóis totais (Folin-Ciocalteu), flavonoides (AlCl₃) e atividade antioxidante (DPPH), citotóxica (*Artemia salina*) e alelopática (*Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*), em diferentes concentrações. Os bioensaios com *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. foram realizados apenas com Ex_{EtOH}, que apresentou a maior diversidade de metabólitos secundários e teores de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante em relação às frações. Ex_{EtOH} não apresentou atividade alelopática e potencial antifúngico para *Trichoderma* sp., porém foi eficaz contra o fungo *Aspergillus* sp. Em relação à citotoxicidade, apenas F_{Hex} foi ativa contra *A. salina* (CL₅₀ = 376,00 µg/mL). Conclui-se que as folhas de *P. ramiflora* apresentam a maior diversidade dos fitoconstituintes nas frações polares, responsáveis pela atividade antioxidante e fungicida. Nos ensaios alelopáticos se evidenciou que a fração polar e apolar não provocaram a inibição da germinação de sementes de alface e tomate nas concentrações testadas, características estas, importantes para arbóreas nativas utilizadas em recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Figo do Cerrado. Fitoquímica. Aleloquímicos. Polifenóis. *Aspergillus* sp.

Abstract

The objective was to carry out the phytochemical analysis, antioxidant activity and antifungal, allelopathic and cytotoxic potential of *Pouteria ramiflora*. The ethanolic extract (ExEtOH), obtained from dry leaves, collected in the Taboco region, Mato Grosso do Sul, was sequentially partitioned with hexane (FHex), acetate and ethyl (FAcet) and hydromethanolic solution (FH/MeOH), which were submitted to classical phytochemical analysis and used to determine total phenols (Folin-Ciocalteu), flavonoids (AlCl₃), antioxidant (DPPH), cytotoxic (*Artemia salina*) and allelopathic (*Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*) activity, at different concentrations. Bioassays with *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. were carried out only with ExEtOH, which showed the greatest diversity of secondary metabolites and total phenols, flavonoids and antioxidant activity in relation to the fractions. This extract did not show allelopathic activity and antifungal potential for *Trichoderma* sp., but it was effective for *Aspergillus* sp. Only FHex was active against *A. salina* (LC₅₀ = 376.00 µg/mL). It is concluded that the leaves of *P. ramiflora* have the greatest diversity of phytoconstituents in the polar fractions, responsible for the antioxidant and fungicidal activity. In the allelopathic assays, it was shown that the polar and non-polar fraction did not inhibit the germination of lettuce and tomato seeds at the tested concentrations, characteristics that are important for native trees used in the recovery of degraded areas.

Keywords: Cerrado Fig. Phytochemistry. Allelochemicals. Polyphenols. *Aspergillus* sp.

1 Introdução

Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk. (Sapotaceae), popularmente conhecida como curriola, brasa-viva ou fruta-de-veado (Lorenzi, 2002) e figo do cerrado, por apresentar um fruto comestível (Coelho *et al.*, 2009), sendo encontrada na região Amazônica e Centro-Sul do Brasil, no bioma Cerrado (Lorenzi, 2002). Sua altura varia entre 6 a 10 metros, dependendo do solo em que se encontra e, por apresentar pequeno crescimento, é indicada para arborização de ruas e parques, possuindo copa de formação uniforme, casca do tronco com fissuras, folha dura e flores pequenas (Gama *et al.*, 2011; Lorenzi, 2002).

A espécie possui uso medicinal e é rica em compostos

fenólicos e flavonoides (Corrêa *et al.*, 2022; Gomes, 2013), com sua entrecasca utilizada na medicina popular para o tratamento da obesidade e hiperlipidemias (Silva *et al.*, 2010). Suas raízes são empregadas para tratar verminoses, disenteria, dor e inflamação (Condessa, 2011), além de exercer atividade antimicrobiana (bactérias e fungos) (Nogueira, 2012). Estudos validaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da planta (Fontes Júnior, 2009) e seu potencial antioxidante e fotoprotetor (Silva *et al.*, 2009). O extrato hidroetanólico das folhas foi ativo no tratamento de ratos diabéticos, além de já ter sido determinado o efeito citotóxico de suas folhas em testes citológicos (Tuttis *et al.*, 2018).

Nesse mesmo sentido, o extrato etanólico de folhas

coletadas em Mato Grosso do Sul demonstraram atividade analgésica e anti-inflamatória, em experimentos conduzidos com modelos experimentais (Gomes, 2013), enquanto a formulação a base do extrato etanólico foi eficaz na cicatrização de feridas induzidos em ratos a diabetes tipo 2 (Corrêa *et al.*, 2022).

Em relação aos experimentos realizado com o extrato etanólico e frações das folhas de *P. ramiflora*, coletadas no estado de São Paulo, foi observado potencial alelopático para *Lactuca sativa* L. (Silva *et al.*, 2006), resultados similares aos encontrados para folhas de exemplares da região de Mogi-Guaçu-SP, Brasília-DF (Condessa, 2011) e Mato Grosso do Sul (Fernandes *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014). Quanto ao potencial fungicida, o extrato e frações das folhas foram ativos para *Lasiodiplodia theobromae* (Oliveira *et al.*, 2014).

Apesar dos estudos que descrevem as propriedades bioativas dos extratos e frações de *P. ramiflora* de exemplares de diferentes regiões do Cerrado, ainda há uma lacuna em experimentos que possam apontar o potencial desta arbórea, pouco explorada para fins comerciais, em especial pela presença dos polifenóis, classe de metabólito secundário associada as propriedades antioxidantes da planta. Além disso, é conhecido o papel dos fitoconstituintes na resistência de doenças e pragas, o que merece uma investigação com outros patógenos ainda não registrados em ensaios com a planta, como *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. em função da diversidade de metabólitos secundários registrados para o extrato etanólico da planta

Por isso, objetivou-se avaliar o potencial fungistático do extrato etanólico e atividade alelopática, antioxidante e a classe de metabólitos secundários do extrato etanólico e frações das folhas da *Pouteria ramiflora*.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta das folhas de *pouteria ramiflora*, análise fitoquímica e formulação dos extratos e frações

As folhas de *P. ramiflora* foram coletadas na região do Taboco (20°03'39.9"S 55°38'37.7"W), distrito de Corguinho, Mato Grosso do Sul, acondicionadas em sacos de polietileno e transportadas, em forma de câmara úmida ao laboratório. Posteriormente um exemplar foi herborizado, com a exsiccata enviada ao Herbário do Laboratório de Morfologia Vegetal da Universidade, sendo catalogado, registrado com número 7829 e incorporado ao acervo, sendo registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número ADB46FD.

As folhas (508 g), após secagem a 45°C em estufa de ventilação de ar (Marconi®, MA35) e trituração em moinho elétrico (Marconi®, MA048), foram tamisadas (malha n° 60). A extração ocorreu em banho de ultrassom por 60 minutos (Unique®, 1450) seguido por maceração à temperatura ambiente, repetindo-se este procedimento por 10 dias. O solvente foi evaporado em rotaevaporador (Tecnal®, MA120),

sob pressão reduzida, obtendo-se 19,8 g de extrato bruto etanólico (Ex_{EtOH}). Parte do extrato bruto ($Ex_{EtOH} = 15,0$ g) foi dissolvido em metanol/água 1:1 (150 mL) e particionado sucessivamente em hexano e acetato de etila. O solvente foi removido, obtendo-se as frações hexânica ($F_{Hex} = 8,4$ g), acetato de etila ($F_{Acet} = 2,9$ g) e hidrometanólica ($F_{H/MeOH} = 3,9$ g). Ex_{EtOH} e o extrato seco foram utilizados para a análise fitoquímica, assim como as frações (F_{Hex} , F_{Acet} e $F_{H/MeOH}$) (Matos, 2009; Wagner; Bladt, 2009). As análises foram executadas em triplicata e os resultados foram comparados e contrastados, observando a alteração de cor e precipitação com o extrato e frações originais, sendo a leitura dos resultados adaptada de Fontoura *et al.* (2015), como: alta intensidade (+++= 100%), fortemente positivo (++±= 75%), positivo (+= 50%), parcialmente positivo (±= 25%), fracamente positiva (±= 10%), discreto (turbidez) (±= 5%) e reação negativa (-).

2.2 Determinação de fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante

Ex_{EtOH} e as frações (F_{Hex} , F_{Acet} e $F_{H/MeOH}$) foram submetidos à quantificação dos fenóis totais, utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Sousa *et al.*, 2007), empregando como padrão o ácido gálico ($y = 0,02 x + 0,042$; $r^2 = 0,9994$). Para quantificação de flavonóides, foi utilizado o método descrito por Peixoto Sobrinho *et al.* (2008) e como padrão, a quercetina ($y = 0,3769 x - 0,0124$; $R^2 = 0,9949$).

A atividade antioxidante de Ex_{EtOH} e frações, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 250, µg/mL, foi determinada utilizando uma solução de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em metanol (24 mg/100mL de metanol). O controle negativo foi a solução de DPPH/metanol e o controle positivo o BHT (butilhidroxitolueno), ácido gálico e quercetina nas mesmas concentrações usadas nas amostras, como controle negativo foi preparado misturando DPPH (2 mL) com metanol (1 mL) (Thaipong *et al.*, 2006). A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = (A_0 - A) / A_0 \times 100$, em que A_0 é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH (Sousa *et al.*, 2007). O valor EC_{50} , foi obtida a partir da linearidade regressão das concentrações de DPPH e da porcentagem média da atividade antioxidante contra a concentração do extrato e frações (µg/mL) obtidos em triplicatas (Brand-Williams *et al.*, 1995).

2.3 Avaliação citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade foram desenvolvidos utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; McLaughlin; Saizarbitori; Anderson, 1995). Dez larvas (2° estágio) foram testadas nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e, 10 µg/mL, contendo Ex_{EtOH} e as frações. Os tubos de ensaios foram mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 horas, com controle negativo desenvolvido com solução salina. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e analisados por meio do método

de *Probit* (Finney, 1962) e expressos como CL_{50} (Quadro 1). As concentrações letais de $10^3 \mu\text{g/mL}$ não indicaram atividade tóxica.

Quadro 1 - Teor de fenóis totais e flavonoides, índice de atividade antioxidante e ensaios de letalidade com *Artemia salina* realizados com o Ex_{EtOH} e frações (F_{Hex} , F_{Acoet} e $F_{H/MeOH}$), folhas *Pouteria ramiflora*

Parâmetros	Extrato/Frações			
	ExEtOH	FHex	FAcoet	FH/MeOH
Fenóis totais (mg/equivalente ácido gálico)	498,5 ± 0,09 _a	285,4 ± 0,06 _b	247,6 ± 0,10 _c	130,0 ± 0,12 _d
Flavonoides (mg/equivalente quercetina)	275,6 ± 0,04 _a	194,2 ± 0,97 _b	63,6 ± 0,80 _c	44,1 ± 0,09 _d
CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	5,03 ± 0,07 _a	10,6 ± 0,40 _b	45,6 ± 0,10 _c	35,7 ± 0,50 _d
<i>Artemia salina</i> ($\mu\text{g/mL}$)	-	376,00	-	-

Legenda: ExEtOH = Extrato etanólico; FHex = Fração hexânica; FAcoet = Fração acetato de etila; FH/MeOH = Fração hidrometanólica. EC_{50} = Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH. Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes.

Fonte: dados da pesquisa.

2.4 Atividade antifúngica ‘in vitro’

A atividade antifúngica foi realizada apenas com Ex_{EtOH} , por apresentar maior conteúdo de fenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante (Quadro 1). O extrato foi diluído em 100 mL do meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) nas concentrações de 40, 80, 160, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$. As colônias puras dos fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. foram previamente repicadas para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA e mantidas em câmara tipo B.O.D à temperatura de 23°C. Foi utilizado na preparação da solução estoque 0,05 g.100mL⁻¹ contendo 5 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), e como testemunha foram utilizadas placas contendo apenas BDA e disco de micélio do fungo. Após os experimentos, foi calculado, a partir dos dados de crescimento micelial, a porcentagem e inibição do crescimento (PIC) para cada amostra em relação à testemunha (Menten; Machado; Minussi, 1976).

2.5 Atividade alelopática

Foram utilizados Ex_{EtOH} e F_{Hex} , ambos com a maior diversidade de constituintes químicos e, especificamente, F_{Hex} pela atividade citotóxica (Quadro 1). Foi preparado uma solução estoque hidroalcolica resuspendida com DMSO (5 $\mu\text{L/mL}$) e 2,5 $\mu\text{L/mL}$ de uma solução tampão (ácido cítrico/citrato de sódio).

Para o bioensaio de germinação foram utilizados 5 mL das soluções estoque de Ex_{EtOH} e F_{Hex} nas diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 g/100mL), além do controle água destilada, controle etanol/DMSO/solução tampão e controle hexano/DMSO/solução tampão, sobre duas folhas de papel *germitest* em placas Petri de 7 cm de diâmetro, com

quatro repetições com 25 sementes de *L. sativa*, variedade “maravilha quatro estações” e 25 sementes de *L. esculentum* Mill. “Santa Clara”, não sendo molhadas novamente durante o experimento (sete dias).

A observação das sementes germinadas foi feita a cada 24 horas, em que eram consideradas germinadas apenas as sementes que apresentassem 2 mm de protusão de raiz primária, ou seja, considerando-se o critério morfológico de germinação (emergência da raiz primária). Para a análise dos resultados, foi calculada a porcentagem de germinação (G) e o vigor da germinação, avaliados indiretamente pelo tempo médio de germinação em dias (TMG) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (Ferreira; Borghetti, 2004).

Para os bioensaios de crescimento, foram utilizados 10 mL da solução estoque de Ex_{EtOH} e F_{Hex} , nas mesmas concentrações do teste de germinação, sobre duas folhas de papel *germitest*, em caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm), lacradas com papel filme, além do controle água destilada, controle etanol e controle hexano. O experimento foi realizado com quatro repetições com 10 sementes pré-germinadas (± 2 mm de raiz primária) para cada teste, sendo a avaliação feita após 10 dias (não ocorreu umedecimento posterior do papel). Os bioensaios foram mantidos em câmaras tipo B.O.D. na temperatura constante de 20 °C (alface) e 25 °C (tomate), com fotoperíodo de 12 horas de luz branca (quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W).

A medição da raiz primária foi feita do colo da plântula até o ápice meristemático do sistema radicular (mm) e da parte aérea (mm), do colo da planta até ápice do meristema apical, com auxílio de paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (2 espécies x 6 extratos).

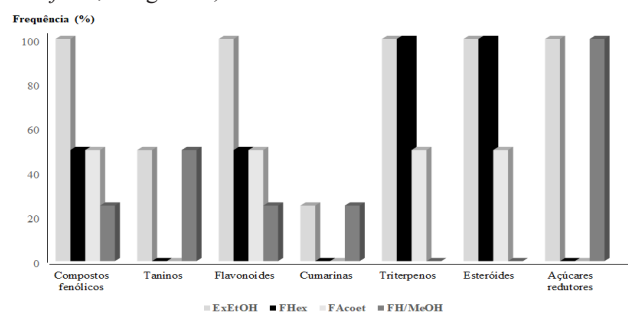
2.6 Análise estatística

A análise estatística foi feita através do programa estatístico *Bioestat 5.0* (Ayres *et al.*, 2007) em nível de 5% de probabilidade e quando houve significância, foi feita a comparação das médias pela ANOVA e teste de *Tukey*, em nível de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

O Ex_{EtOH} das folhas de *P. ramiflora* apresentou sete classes de metabólitos secundários, com predominância dos compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides e açúcares redutores. Nas frações F_{Hex} e F_{Acoet} foram detectadas as mesmas classes de metabólitos, diferenciando-se apenas na intensidade para F_{Hex} (maior intensidade). A análise fitoquímica da $F_{H/MeOH}$ indicou cinco classes de metabólitos, porém com menor intensidade em relação a Ex_{EtOH} e frações (F_{Hex} e F_{Acoet}), com predominância dos açúcares redutores (Figura 1).

Figura 1 - Classes de metabólitos secundários detectada em Ex_{EtOH} e frações (F_{Hex} , F_{AcOEt} e $F_{H/MeOH}$) obtidos das folhas *Pouteria ramiflora*, Corguinho, Mato Grosso do Sul



Resultados: 100%= +++ (alta intensidade), 75%= +++± (fortemente positivo), 50%= ++ (positivo), 25%= ++± (parcialmente positivo), 10%= + (fracamente positiva) e 5%= ± (discreto, turbidez).

Fonte: dados da pesquisa.

Estudos com exemplares da família indicaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos, saponinas, taninos, açúcares redutores e óleos essenciais (Medeiros; Walter, 2012; Silva *et al.*, 2009). Com menor frequência são encontrados também alcaloides, benzenoides e fenilpropanoides (Montenegro *et al.*, 2006). Para as espécies de *Pouteria* do bioma Cerrado já foram relatadas a ocorrência de hidrocarbonetos de cadeia longa, álcoois, ácidos e ésteres (Silva *et al.*, 2009).

Em relação às cumarinas, já encontrada por Oliveira *et al.* (2014) no extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* coletadas na mesma região (Corguinho), este grupo possui a função de proteção para as plantas (Gutierrez *et al.*, 1995) e atividade biológica como anticoagulante, imunossupressor, relaxante vascular e vasodilatador, entre outros (Navarro; Sênior, 2006). Entretanto, esta classe de metabólito não é comum em espécies do gênero (Fitriansyah *et al.*, 2021) e em outras amostras obtidas de exemplares de regiões de Cerrado não foi registrada sua presença (Gouveia *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2017). Logo, é possível inferir que os fatores ambientais e sazonalidade pode interferir na produção deste fitoconstituente. De acordo com Verma e Shukla (2015), os fatores abióticos e a sazonalidade possuem grande influência na produção dos metabólitos secundários, em especial as cumarinas.

Já os triterpenos, um metabólito que pode auxiliar na saúde do ser humano, em função de sua capacidade de interceptar os radicais livres (potencial antioxidante) (Carvalho *et al.*, 2009) e esteroides, já foram encontrados em outras espécies do gênero, como em flores e frutos de *P. torta* (Mart.) Radlk. (David, 1993) e folhas de *P. torta* (Silva *et al.*, 2009), *P. salicifolia* (Spreng.) Radlk (Bertucci *et al.*, 2008) e *P. ramiflora* (Gomes, 2013). Os taninos, outro grupo com atividade antioxidante, já foram identificados nos frutos de *P. gardneriana* e cascas de outras espécies do gênero (Rocha *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos, outro importante grupo, já foram identificados em *P. campechiana* (Kunth) Baehni (Ma *et al.*,

2004), *P. caimito* (Ruiz & Pav.) Radlk. (Canuto *et al.*, 2010) e *P. gardneriana* (A.DC.) Radlk. (Rocha *et al.*, 2011). Esta classe de metabólitos está dividida em dois grandes grupos: flavonoides e ácidos fenólicos (Soares, 2002), sendo comum encontrar flavonoides no gênero *Pouteria* (Silva *et al.*, 2009). Esta classe de metabólito é responsável por inúmeras propriedades biológicas, podendo agir como antitumorais, antiulcerogênica e anti-inflamatórios (Coutinho *et al.*, 2009).

O conteúdo médio de fenóis totais de Ex_{EtOH} foi superior e, estatisticamente, diferente da média das frações, F_{Hex} , F_{AcOEt} e $F_{H/MeOH}$, com os flavonoides seguindo o mesmo perfil dos fenóis totais, com estes resultados podendo ser relacionados com a atividade antioxidante (Quadro 1). A maior capacidade de sequestrar radicais livres é atribuída a Ex_{EtOH} ($EC_{50} = 5,03 \mu\text{g/mL}$), com F_{AcOEt} sendo a menos ativa ($EC_{50} = 45,6 \mu\text{g/mL}$). Os resultados da Concentração que inibe 50% da concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}) (Quadro 1) foram comparados com os padrões BHT (butilhidroxitolueno) ($EC_{50} = 1,4 \pm 1,1 \mu\text{mL}$), ácido gálico ($EC_{50} = 2,17 \pm 0,19 \mu\text{m}$) e quercetina ($EC_{50} = 1,92 \pm 0,84 \mu\text{mL}$), com base nestes dados e os resultados das amostras (Quadro 1), a atividade antioxidante apresentou a seguinte ordem decrescente: BHT > quercetina > ácido gálico > Ex_{EtOH} > F_{Hex} > $F_{H/MeOH}$ > F_{AcOEt} .

A atividade antioxidante para outras espécies de *Pouteria* foi registrada por Castro *et al.* (2006) em testes com os extratos etanólico e aquoso das folhas de *P. torta* e extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora*, confirmando que *P. ramiflora* possui potencial antioxidante. Já estudos realizados por Condessa (2011) com *P. ramiflora* constataram que extrato etanólico e hexânico das folhas apresentaram valores de 1,5 vezes maior que o BHT (2,6-di-t-butil-4-metilfenol), com o extrato hexânico de *P. torta* sendo aproximadamente duas vezes maior.

A atividade antioxidante é atribuída à presença de compostos fenólicos e derivados, relacionada tanto às propriedades redutoras quanto à estrutura química, pois ambas trabalham ativamente na neutralização dos radicais livres, agindo na iniciação até a propagação do processo oxidativo (Sousa *et al.*, 2007).

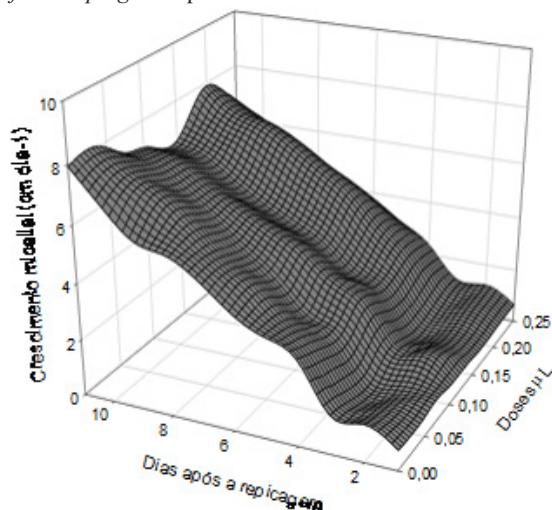
Em relação à atividade citotóxica, apenas F_{Hex} foi ativo contra *A. salina* ($CL_{50} = 376,00 \mu\text{g/mL}$), enquanto Ex_{EtOH} e as frações (F_{AcOEt} e $F_{H/MeOH}$) apresentaram $CL_{50} \gg 10^3 \mu\text{g/mL}$, sugerindo baixa atividade (Quadro 1). A atividade citotóxica também foi encontrada para outras espécies de *Pouteria*, sendo que para as folhas de *P. torta*, extratos etanólico, hexânico e aquoso e, frações, apenas o extrato aquoso e uma fração obtida do extrato etanólico apresentaram toxicidade (280 $\mu\text{g/mL}$ e 270 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Perfeito *et al.*, 2005). Já Silva *et al.* (2009) constatou que o extrato aquoso ($DL_{50} = 491,6 \mu\text{g/mL}$), fração de acetato de etila do extrato hexânico ($DL_{50} = 528,3 \mu\text{g/mL}$) e fração Hex:AcOEt (hexânico:acetato de etila) do extrato etanólico ($DL_{50} = 320,5 \mu\text{g/mL}$) das folhas de *P. gardnerii*, apresentaram atividade citotóxica para *A. salina*.

Com base nos resultados de toxicidade frente a *A. salina* e considerando as informações registradas como altamente tóxicas (CL_{50} menor que 80 mg/L), moderadamente tóxicas (com CL_{50} entre 80 a 250 mg/L) e atóxicas (com CL_{50} maior que 250 mg/L) apresentado por Amarante *et al.* (2011), é possível apontar que Ex_{EtOH} e F_{Acet} e $F_{H/MeOH}$ apresentaram baixa toxicidade para *A. salina* ($DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), exceto a fração F_{Hex} (Quadro 1), sugerindo que o uso tópico de extratos polares das folhas possui baixa toxicidade. Por outro lado, a fração F_{Hex} merece investigação em ensaios antitumorais. Os ensaios de citotoxicidade são um teste eficiente e de baixo custo (Meyer *et al.*, 1982), com o emprego desta técnica possibilitando fornecer informações valiosas ao trabalho na área de produtos naturais, indicando fontes vegetais importantes para as atividades biológicas (Zuque *et al.*, 2004) como atividade antitumoral (McLaughlin; Saizarbitori; Anderson, 1991, 1993).

Com relação à atividade antifúngica frente a *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp, a análise estatística indicou tripla interação entre crescimento micelial dias após a repicagem e as doses testadas apenas para *Aspergillus* sp., o extrato etanólico demonstrou ser ativo com relação ao crescimento micelial, a partir da concentração de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, seguindo um padrão constante nas concentrações subsequentes (Figura 2).

Com relação ao fungo *Trichoderma* sp. não houve ajuste significativo, visto que em 72 horas ocorreu crescimento significativo dos micélios. A atividade antifúngica para extratos e frações de espécies do gênero *Pouteria* são ainda incipientes e, especificamente, para *P. ramiflora*, Nogueira (2012) relata que o extrato etanólico das folhas apresentou potencial antifúngico, *in vitro*, contra *Candida albicans*, com a concentração inibitória mínima de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$. Este extrato também inibiu o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella setubal*.

Figura 2 - Atividade antifúngica de Ex_{EtOH} das folhas de *P. ramiflora* *Aspergillus* sp



Fonte: dados da pesquisa.

Na fitopatologia, os fungos são considerados os principais agentes causadores de doenças nas plantas e para reduzir o problema, pesquisas desenvolvidas com extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais, são realizadas, indicado seu potencial no controle de fitopatógenos (Stangarlin *et al.*, 1999). Tais ações são necessárias, pois os fungos acarretam perdas significativas na produção, com a destruição de grãos durante a estocagem, diminuição do valor nutritivo e, algumas vezes, produção de micotoxinas prejudiciais ao homem e aos animais (Velluti *et al.*, 2004). Para combater estes fitopatógenos de forma equilibrada, extratos de folhas de *P. ramiflora* podem ser adequados, pois favorecem a inibição do *Aspergillus* sp. significando uma utilização sustentável da espécie e podendo resultar em ganhos ambientais e comerciais.

Em relação aos testes alelopáticos, os resultados obtidos demonstram que em relação à percentagem de germinação, foram obtidas taxas de germinação acima de 94% para todos as concentrações utilizadas (Ex_{EtOH} e F_{Hex}), IVG entre 16,7 e 17,7 (Ex_{EtOH}) e 15,8 a 16,8 (F_{Hex}) e TMG, 1,5 a 1,7 dias (Ex_{EtOH} e F_{Hex}), não ocorrendo diferenças estatísticas significativas entre testemunha e as diferentes concentrações. Resultados similares foram obtidos em relação ao crescimento das plântulas, entre 1,7 e 1,9 cm (Ex_{EtOH}) e 1,8 e 2,1 cm (F_{Hex}), em que não existiram diferenças estatísticas significativas para testemunha e as diferentes concentrações utilizadas, demonstrando que o crescimento não foi afetado, negativamente ou positivamente. Logo, é possível inferir que apesar da diversidade dos constituintes detectados no extrato e frações, os aleloquímicos não foram capazes de inibir a germinação e o crescimento das plântulas, o que é importante para o uso desta arbórea frutífera para projetos de recuperação de áreas degradadas.

Entretanto, estudos realizados com o extrato etanólico e as frações das folhas, coletadas na região de Cerrado de Mogi-Guaçu indicaram inibição da germinação das sementes de *L. sativa* (Silva *et al.*, 2006). Condessa (2011) avaliou o potencial alelopático de extratos das folhas de exemplares coletados em Brasília sobre sementes de *L. sativa* e *L. esculentum* com efeito inibitório dos extratos sobre a germinação e crescimento da radícula, em comparação ao grupo controle.

Os resultados discrepantes, provavelmente, estão relacionados aos diferentes fatores ambientais, como tipo de solos nos locais da coleta, época do ano ou idade das plantas coletadas, por exemplo, entre outros fatores, que podem interferir na diversidade e concentração dos fitoconstituintes, alterando seu modo de ação. Desse modo, estes resultados são importantes na compreensão das interações vegetais em ambientais naturais e agroecossistemas (Fritz *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, para o uso das espécies na recomposição de áreas degradadas (Lorenzi, 2002) e na implantação de sistemas silvipastoris. Por outro lado, *P. ramiflora* possui substâncias que agregam valor biológico (presença de

flavonoides e derivados) no auxílio para tratamento de diferentes enfermidades (anti-inflamatória, por exemplo), possuindo baixa citotoxicidade (Gomes, 2013).

4 Conclusão

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides do extrato etanólico foi superior as frações e demonstrou ser um eficiente inibidor do crescimento de *Aspergillus* sp., além de ter uma atividade antioxidante superior as frações, sem apresentar efeito citotóxico frente a *Artemia salina*.

Pode-se concluir que existem evidências que apoiam a eficiência e segurança do extrato etanólico bruto nas concentrações avaliadas como potencial de um antioxidante natural, pode ser explorado como uma alternativa para uso no controle de *Aspergillus* sp. Este trabalho abre a perspectiva de estudar a bioatividade de compostos individuais evidenciados nas análises, como os polifenóis.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); ao Instituto Nacional de Áreas Úmidas (INAU), ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).

Referências

AMARANTE, C.B.D. et al. Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiplasmodial activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*), *Acta Amaz.*, v.41, n.3, p.431-434, 2011. doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>

AYRES, M. et al. BioEstat 5.0 - aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BERTUCCI, A. et al. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. *Rev. Bras. Farmac.*, v.18, n.1, p.21-25, 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100006>

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, v.28, n.1, p.25-30, 1995. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

CARVALHO, C.A. et al. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. *Rev. Bras. Farmac.*, v.19, p.592-598, 2009. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400015>

CASTRO, C.F.S. et al. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006, Águas de Lindóia. Anais [...] Águas de Lindóia: SBQ, 2006.

CANUTO, G.A.B. et al. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e correlação com a sua atividade anti-radical livre. *Rev. Bras. Fruticult.*, v.32, n.4, p.1196-1205, 2010. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000122>

CONDESSA, M.B. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais. Brasília: UnB, 2011.

COELHO, A.A.M.; PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S. Efeito

de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster máxima* (Uhler) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Entomol.*, v.53, n.3, p.444-451, 2009. doi: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262009000300020>

CORRÊA, A.C.L. et al. *Pouteria ramiflora* leaf extract on emulgel in wound healing activity in diabetic rats. *Braz. J. Biol.*, v.82, 2022. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.239378>

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev. Virtual Quím.*, v.1, n.3, p.241-256, 2009. doi: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090024>

DAVID, V. Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores, frutos e xilopódio de *Pouteria torta*. São Carlos: UFSCar, 1993.

FERNANDES, R.M. et al. Ação alelopática dos galhos de *Pouteria ramiflora* (mart.) Radlke na germinação de *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicon esculentum* (tomate). *Cad. Agroecol.*, v.9, n.4, 2014.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. Cambridge: Cambridge University Press. 1962.

FITRIANSYAH, S.N.; FIDRIANNY, I.; HARTATI, R. Pharmacological activities and phytochemical compounds: Overview of *Pouteria* Genus. *Pharm. J.*, v.13, n.2, p.577-584, 2021. doi: <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.72>

FONTES JÚNIOR, E.A. et al. Antinociceptive and Antiinflammatory Properties of the Ethanolic Extract of *Pouteria ramiflora* Roots. *Latin Am. J. Pharm.*, v.28, n.6, p.812-818, 2009.

FRITZ, D. et al. Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthum* extracts on *Lactuca sativa* L. *Braz. J. Pharm.*, v.17, n.1, p.44-48, 2007. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100010>

GAMA, L.U.; BARBOSA, A.A.; OLIVEIRA, P.E.A.M. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *Pouteria torta* (Sapotaceae). *Rev. Bras. Bot.*, v.34, n.3, p.375-387, 2011. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042011000300011>

GOMES, P.D.M.F. Atividade biológica do extrato etanólico das folhas de *Pouteria ramiflora* (mart.) radlk e estudo químico. Campo Grande: Uniderp, 2013.

GOUVEIA, N.M. et al. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v.85, n.3, p.1141-1148, 2013. doi: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000300016>

GUTIERREZ, M.C. et al. EDWARDS, R. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry*, v.38, p.1185-1191, 1995. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00808-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00808-7)

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MA, J. et al. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agricul. Food Chem.*, v.52, p.5873-5872, 2004. doi: <https://doi.org/10.1021/jf049950k>

MATOS, J.F.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 2009.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an

- update. In: RAHMAN, A. Studies in natural product chemistry 9. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.383-409.
- MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants. New York: Kinghorn & Balandrini, 1993.
- MCLAUGHLIN, J.L.; SAIZARBITORI, T.C; ANDERSON, J.E. Três bioensaios químicos simples de produtos naturais. Rev. Soc. Venez. Quim., v.18, p.13-18. 1995.
- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. 'in vitro'. Fitopatol. Bras., v.1, p.57-66, 1976.
- MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. Planta Med., v.45, n.5, p.31-34, 1982. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- MEDEIROS, M.B.D.; WALTER, B.M.T. Composition and structure of the woody cerrado stricto sensu in northern Tocantins and southern Maranhão. Rev. Árvore, v.36, n.4, p.673-683, 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622012000400009>
- MONTENEGRO, L.H.M. et al. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). Rev. Bras. Farmacog., v.16 p.611-617, 2006. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500005>
- NOGUEIRA, L.G. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametideos com enfoque no *Helicobacter pylori*. Araraquara: UNESP, 2012.
- NAVARRO, V.; SÊNIOR, J. Drug-related hepatotoxicity. New Engl. J. Med., v.354, p.731-739, 2006. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra052270>
- OLIVEIRA, A.K.M. et al. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. Horticult. Bras., v.32, p.41-47, 2014.
- PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. Rev. Bras. Ciênc. Farm., v.44, n.4, p.683-689, 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400015>
- PERFEITO, J.P. et al. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. Rev. Bras. Farmac., v.15, n.3, p.183-186, 2005. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000300002>
- ROCHA, W.S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. Rev. Bras. Fruticultura, v.33, n.4, p.1215-1221, 2011. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021>
- RODRIGUES, P.M. et al. Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. leaves (Sapotaceae). Food Chem. Toxicol. v.109, p.1063-1068, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.026>
- SILVA, G.B. et al. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. Hoehnea, v.33, n.3, p.331-338, 2006.
- SILVA, C.A.M; SIMEONI, L.A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. Rev. Bras. Farmac., v.19, p.501-509, 2009. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300025>
- SILVA, M.A.B.D. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina - MT, Brasil. Rev. Bras. Farmac. v.20, p.549-562, 2010. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400014>
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como Antioxidantes. Rev. Nutr., v.15, n.1, p.71-81. 2002. doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>
- SOUSA, C.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím. Nova, v.30, n.2, p.351-355, 2007. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>
- STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. Biotecnol. Ciênc. Desenvol., n.11, p.16-21, 1999.
- THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. J. Food Comp. Anal., v.19, n.6, p.669-675, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- TUTTIS, K.C. et al. *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. extract: Flavonoids quantification and chemopreventive effect on HepG2 cells. J. Toxicol. Environ., v. 81, n.6, p.792-804, 2018. doi: <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1491911>
- VELLUTI, A. et al. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. J. Appl. Microbiol., v.96, n. 4, p.716-724, 2004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02212.x>.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. J. Appl. Res. Med. Aromatic Plants, v.2, n.4, p.105-113, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- ZUQUE, A.L.F. et al. Avaliação das atividades antioxidantes, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). Rev. Bras. Farmacog., v.14, n.2, p.129-136, 2004. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000200006>
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. New York: Springer Verlag, 2009.