

## Eficiência dos extratos de *Hymenaea* sp. (jatobá) contra microrganismos de interesse agrícola

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes frações obtidas do resíduo madeireiro de *Hymenaea* sp. Os resíduos florestais das árvores de jatobá foram provenientes de uma área de manejo florestal de Santarém, Pará, Brasil. As serragens obtidas foram secas em estufa a 40 °C por 96 horas, os metabólitos secundários foram extraídos com etanol (via Soxhlet), adicionado água (7:3) e particionado líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) e a Concentração Fungicida/Bactericida Mínima (CFM) contra *Fusarium oxysporum* (F101), *Macrophomina phaseolina* (MP4 e MP5) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SS3). Para *Fusarium oxysporum*, as frações de acetato de etila e aquosa/etanólica apresentaram ação fungicida nas concentrações de 250 µg.mL<sup>-1</sup>. A fração diclorometânica foi mais ativa para *Macrophomina phaseolina* (MP4) (62,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e *Sclerotinia sclerotiorum* (125 µg.mL<sup>-1</sup>) indicando que as frações obtidas de *Hymenaea* sp. apresentam grande potencial no controle de fungos fitopatogênicos.

**Palavras-chave:** Partição líquido-líquido, Fitopatógenos, Controle alternativo

## Efficiency of extracts of *Hymenaea* sp. (jatobá) against microorganisms of agricultural interest

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different fractions obtained from the wood residue of *Hymenaea* sp. The forest residues of jatobá trees came from a forest management area in Santarém, Pará, Brazil. The obtained sawdust was oven dried at 40 °C for 96 hours. The secondary metabolites were extracted with ethanol (via Soxhlet) and water (7:3), and the liquid-liquid boundary was partitioned with the solvents: hexane, dichloromethane, and ethyl acetate. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Fungicidal/Minimum Bactericidal Concentration (CFM) against *Fusarium oxysporum* (F101), *Macrophomina phaseolina* (MP4 and MP5), and *Sclerotinia sclerotiorum* (SS3) were determined. For *Fusarium oxysporum*, ethyl acetate and aqueous/ethanolic fractions presented fungicidal action at concentrations of 250 µg.mL<sup>-1</sup>. The dichloromethane fraction was more active for *Macrophomina phaseolina* (MP4) (62.5 µg.mL<sup>-1</sup>) and *Sclerotinia sclerotiorum* (125 µg.mL<sup>-1</sup>), indicating that the fractions obtained from *Hymenaea* sp. present great potential in the control of phytopathogenic fungi.

**Keywords:** Liquid-liquid partition, Phytopathogens, Alternative control

## 1. INTRODUÇÃO

O setor madeireiro é expressivo na Amazônia, sendo extraídos aproximadamente 14 milhões de m<sup>3</sup> de madeira em tora, no entanto, o rendimento operacional ainda é considerado baixo (aproximadamente 41%) neste bioma, produzindo assim resíduos, o que torna impedimento ao desenvolvimento sustentável das indústrias (Ramos et al., 2017)

Entre as madeiras comercializada no bioma Amazônia destaca-se o Jatobá (*Hymenaea* sp.), que pertence à família Fabaceae. Estudos farmacológicos tem revelado as atividades anestésica, analgésica e anti-inflamatória do extrato do caule do Jatobá. Outras atividades como ação antibacteriana, antifúngica, moluscocidas, miorrelaxante, antiespasmódicas, antioxidante também já foram descritas (Cipriano et al., 2014 e Miranda et al., 2014). Mors (2000) indica que o líquido de cor vermelha que é coletado do tronco através de furos é considerado fortificante, cicatrizante e

ainda é usado para tratar cistites, retenção de urina, anemia, prostatites, blenorragia e bronquite crônica.

As classes de compostos frequentes em *Hymenaea* são os flavonoides, compostos fenólicos e terpenoides, e possivelmente estes são os responsáveis pelas atividades biológicas do gênero (Costa, 2012). Ácido copálico e uma mistura de sesquiterpenos do tipo bisaboleno são os constituintes da resina conhecida como copal, além de que sesqui e diterpenos também são encontrados nesta resina (Maranhão, 2009).

Com isso, objetivou-se analisar fitoquimicamente e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações do resíduo de *Hymenaea* sp., visando promover estratégias de aproveitamento de substâncias bioativas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização da área de estudo e coleta do material vegetal**

O material utilizado na pesquisa é proveniente de uma área de manejo da Empresa Rondobel Florestal, próximo à comunidade de Cachoeira do Aruã (3°03'50.29"S e 56°02'33.17"O), localizado no município de Santarém, Pará.

Coletou-se resíduos florestais de galhos de três indivíduos de *Hymenaea* sp., sendo o material posteriormente desdobrado em plaina devidamente higienizada, visando a coleta de serragem. As amostras foram secas em estufa (40 °C por 96 horas), e posteriormente extraídas no Laboratório de Pesquisa & Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos (P&DBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

### **2.2 Obtenção dos extratos**

Utilizou-se 50 g de serragem seca para a extração em etanol 92,8 ° INPM, sendo o solvente tratado antes com hidróxido de sódio (NaOH) e destilado. A extração com etanol foi realizada em triplicata em aparelho de Soxhlet por 8 h. O solvente foi evaporado em pressão reduzida a 50°C em evaporador rotativo Fisatom, modelo 801 com sistema de refrigeração acoplado. Após a evaporação do solvente, as amostras foram pesadas, armazenadas em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração (10 °C) (Taube JR et al., 2014). Após a remoção total do solvente, foram obtidos os rendimentos dos extratos pela seguinte equação 1:

$$(1)$$

### 2.3 Partição líquido-líquido do extrato etanólico de jatobá

Para a partição líquido-líquido foram necessárias duas fases: a aquosa e a orgânica. Para criar a fase aquosa, a amostra foi diluída no sistema etanol água. No fracionamento utilizou-se 3 g de extrato etanólico obtido via sohxlet e solubilizado em 150 mL de etanol e adicionado água (7:3). A solução foi transferida para um funil de separação, e procedida a partição líquido-líquido pela ordem dos solventes conforme a sua polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila (3 x 30 mL cada) (Taube JR et al., 2014)

Ao final, as soluções foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo a pressão reduzida. Após esses processos, as frações foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) pelo método Cumarú (coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), temperatura do injetor de 250 °C, temperatura do detector de 300 °C, temperatura da coluna de 80 °C, gás de arraste He 1,0 mL.min<sup>-1</sup>), no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O equipamento utilizado para Cromatografia Gasosa foi o Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Agilent, modelo: HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas. Os espectros de massa gerados foram comparados com os disponibilizados pela biblioteca NIST05 e bibliografia Adams (2007).

### 2.4 Atividade biológica

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizados os microrganismos *Fusarium oxysporum* (F101), *Macrophomina phaseolina* (MP4), *Macrophomina phaseolina* (MP5) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SS3) pertencentes da Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

Para a determinação da CMI, foram utilizadas Microplacas de Elisa de 96 poços, sendo realizado a microdiluição em meio líquido Batata-Dextrose (BD). Foram ajustadas suspensões microbianas na escala de 0,5 MacFarland equivalente a 1,5x10<sup>4</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> e testadas as concentrações do extrato entre 1000 – 15,625 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo o ensaio realizado durante 96 h, e após este período, foi adicionado em cada poço da placa teste 10 µL de resazurina a 0,01% como um indicador colorimétrico de viabilidade celular. Posteriormente, foi determinado a concentração fungicida pela subcultura de uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços correspondente a CMI, e após o período de incubação foi verificado a inibição do crescimento microbiano.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Rendimento

Partindo-se de 50 g de resíduo madeireiro de *Hymenaea* sp., foi obtido rendimento médio do extrato etanólico de 16,09%. Os rendimentos da partição líquido-líquido do extrato etanólico foram: fração hexânica (1,93%), diclorometânica (76,84%), Acetato de etila (15,08%) e Aquosa (16,50%).

#### 3.2 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

No extrato etanólico constatou-se a presença do Éster metílico do ácido 5,5,8a-betadecahidrotetrametil-2-metileno-1-naftalenopentanoico e do Éster metílico do ácido 2-hidroxibetadecahidro-2,5,5,8a-pentametil naftalenopentanoico. Já Na fração hexânica do Jatobá verificou-se substâncias de características apolares e embora tenham sido identificados poucos compostos, foi possível observar um padrão no perfil de massas moleculares, indicando as possíveis classes as quais esses metabólitos pertencem, sendo constatados alguns ácidos graxos (Éster etílico do ácido palmítico, Éster etílico do ácido linoleico, Éster etílico do ácido oleico), diterpenos (Óxido de epimanoil) e um fitoesteroide (Beta-sisterol (stigmasterol-22,23-dihidro)).

Não foi possível identificar nenhum composto nas frações diclorometânica e Acetato de etila, sendo necessário o uso de outras técnicas de identificação de substâncias, pois pela a CG-EM é possível identificar compostos voláteis.

#### 3.3 Atividade biológica

Após o fracionamento foi verificado a atividade biológica, sendo encontrado os seguintes valores para as diferentes frações, conforme a Tabela 1:

**Tabela 1.** Concentração mínima inibitória (CMI) das frações de *Hymenaea* sp.

Fitopatógeno	Concentração Mínima Inibitória ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )				
	Extrato etanólico	Hexânica	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	Aquosa
<i>F. oxysporum</i> (F101)	125	250	250	250	250
<i>S. sclerotiorum</i> (SS3)	125	125	62,5	125	125
<i>M. phaseolina</i> (MP4)	15,625	125	125	125	125
<i>M. phaseolina</i> (MP5)	125	250	250	250	250

Verificou-se que tanto o extrato bruto como as frações apresentaram atividade antifúngica sobre os fitopatógenos testados. O extrato etanólico foi mais ativo para *M. phaseolina*

(MP4) (15,625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Sobre as frações, verifica-se que a fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foi a mais ativa frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, com a menor concentração inibitória de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (fungicida), provavelmente pela presença de classes de compostos, como os flavonóides que já foram descritos como possuindo atividade biológica contra fungos fitopatogênicos (Tabela 2).

A fração acetato de etila do extrato de Jatobá teve efeito inibitório na concentração de até 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* (MP4). Já na fração aquosa:etanólica, o maior efeito foi na concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* (MP4).

**Tabela 2.** Concentração fungicida mínima (CFM) das frações de *Hymenaea* sp.

Fitopatógeno	Extrato etanólico	Concentração Fungicida mínima ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
		Frações			
		Hexânica	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	AcOEt	Aquosa
<i>F. oxysporum</i> (F101)	*	500	500	250	250
<i>S. sclerotiorum</i> (SS3)	*	125	62,5	250	250
<i>M. phaseolina</i> (MP4)	500	250	125	250	250
<i>M. phaseolina</i> (MP5)	250	250	250	250	250

\*Funsgistático

#### 4. DISCUSSÃO

Verificou-se que o rendimento da fração diclorometânica (76,84%) foi muito superior ao rendimento das demais frações, sugerindo que os compostos de polaridade intermediária presentes no extrato etanólico bruto possuem maior afinidade com o solvente diclorometano.

Neste trabalho, foi constatado o rendimento médio de 15,08% para a fração Acetato de etila. Maranhão (2009) verificou valor inferior para este extrato (AcOEt), sendo encontrado rendimento relativo de 12,7%.

Algumas classes de compostos foram detectadas nos extratos de Jatobá, como ácidos graxos, diterpeno e fitoesteroide. Maranhão (2009) ao realizarem abordagens fitoquímica do cerne da madeira de *Hymenaea stignorcapa*, também verificaram a presença significativa de flavonoides, esteroides e terpenos. Valentim (2006) ao analisar os constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Jatobá) constatou a presença de flavonoides, esteroides e triterpenóides; além de identificar compostos como hexadecanoato de metila, ácido hexadecanóico, ácido 9-ocadecenoico, ácido octadecanoico quando foi possível também comprovar atividade antimicrobiana de extratos em cicloexano, acetato de etila e etanol deste gênero, através do método de microdiluição.

Verificou-se que na concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  o extrato etanólico de jatobá inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Maranhão (2009) ao avaliar via CMI o efeito do extrato de

*Hymenaea stigonocarpa* frente ao gênero *Fusarium* spp., constatou inibição do crescimento fúngico na concentração de 4500 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo superior ao encontrado neste trabalho.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram que as diferentes frações obtidas do extrato etanólico do resíduo madeireiro de *Hymenaea* sp. possui atividade antimicrobiana, mostrando que, os extratos obtidos do resíduo desta madeira são fontes alternativas de moléculas antifúngicas no controle de fitopatógenos como *F. oxysporum*, *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum*, podendo esta atividade estar relacionada às diferentes classes de metabólitos.

Destaca-se que a maior atividade biológica foi para os fungos *M. phaseolina* (MP4) e *S. sclerotiorum* (SS3), a qual foi possível constatar ação fungicida nas concentrações de 15, 625 µg.mL<sup>-1</sup> e 62,5 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados demonstram que os resíduos florestais podem ser efetivos no controle de microrganismos, sendo constatado ação fungicida para os patógenos testados.

## 6. REFERÊNCIAS

- Adams RP. Identification of the essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4 ed., Illinois/USA: Allured Publish Corporation, 2007, 798 p.
- Cipriano J, Martins L, Deus MSM, Peron AP. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. Caderno de Pesquisa 2014; 26 (2): 41-51.
- Costa MP. Atividade biológica da seiva e de compostos extraídos da seiva de *Hymenaea courbaril* sobre leveduras e fungos filamentosos [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Goiânia; 2012.
- Mors W, Rizzini CT, Pereira NA., Medicinal Plants of Brazil, Reference publ., Inc. USA(2000).
- Maranhão CA. Estudo químico, antimicrobiano, larvicida e antitermítico do cerne da madeira de lei *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2009.
- Miranda AR, Castro, CFS, Silvério MDO. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (2014); 16 (3): 693-699.
- Ramos WF, Ruivo MLP, Jardim MAG, Porro R, Castro RMS, Sousa L. Análise da indústria madeireira na Amazônia: Gestão, uso e armazenamento de resíduos. Revista Brasileira de Ciências Ambientais (2017); 1 (43): 1-16.
- Taube JPS, Castro KCF, Barata LES. Experimentos de Química. 1 rd ed. Santarém: UFOPA; 2014.
- Valentim APT. Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá) [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.