

Análise de metabólitos e atividade antifúngica *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss

Analysis of metabolites and *in vitro* antifungal activity of the ethanolic extract of the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss

Análisis de metabolitos y actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Azadirachta indica* A. Juss

Recebido: 19/10/2025 | Revisado: 31/10/2025 | Aceitado: 01/11/2025 | Publicado: 03/11/2025

Estanley Rolim Souza

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3524-5742>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: estanleyrolim@gmail.com

David de Oliveira Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3234-4305>
Universidade Federal de Viçosa, Brasil
E-mail: david.o.medeiros@ufv.br

Priscila Arruda de Morais

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2589-2936>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: pria.morais12@gmail.com

Maria Eduarda de Souza Diniz

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-5904-0819>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: eduardaflorestal24@gmail.com

Luana Maria Sales de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7032-417X>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: luana.maria@estudante.ufcg.edu.br

Ana Livia Barroso Muniz

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0400-6579>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: analiviamuniz8@gmail.com

Letícia Carvalho Benitez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5900-1193>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: leticia.carvalho@professor.ufcg.edu.br

Resumo

As doenças em plantas são causadas por uma variedade de organismos. Dentre estes, os fungos destacam-se como o mais diverso grupo de fitopatógenos. A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. configura-se como um dos principais agentes etiológicos da antracnose, fitopatologia que afeta uma vasta quantidade de plantas ao redor do mundo, especialmente as de interesse agrônomico. O emprego de produtos à base de plantas, tem sido o foco de diversas pesquisas nos últimos anos, devido aos seus benefícios em relação aos agroquímicos. Diante disso, o presente estudo objetivou verificar a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss no crescimento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Além disso, determinou-se, também, os teores de clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos totais do mesmo e das amostras secas e in natura. Para a análise *in vitro*, incorporou-se ao meio de cultura BDA, quatro concentrações definidas do extrato etanólico e verteu-se tais misturas em placas de Petri com cinco repetições para cada tratamento. Ademais, também foram utilizados tratamentos controle. Na presente pesquisa, constatou-se, quanto a análise dos metabólitos, que a extração destes foi mais eficaz no extrato etanólico em comparação com as demais amostras, para todas as variáveis, indicando que a utilização de álcool etílico como solvente fornece uma extração mais completa. E quanto a atividade do extrato sobre a espécie fúngica, os resultados apontam que este não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento e desenvolvimento *in vitro* do mesmo nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; Extrato etanólico; Metabólitos.

Abstract

Plant diseases are caused by a variety of organisms. Among these, fungi stand out as the most diverse group of phytopathogens. The species *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. is one of the main etiological agents of anthracnose, a phytopathology that affects a vast number of plants worldwide, especially those of agronomic interest. The use of plant-based products has been the focus of several studies in recent years due to their benefits compared to agrochemicals. Therefore, the present study aimed to verify the antifungal activity of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss leaves on the *in vitro* growth of *C. gloeosporioides*. Furthermore, the levels of chlorophylls, carotenoids, flavonoids, anthocyanins, and total phenolic compounds were determined in the extract and in the dried and fresh samples. For *in vitro* analysis, four defined concentrations of the ethanolic extract were added to the PDA culture medium and poured into Petri dishes with five replicates for each treatment. Control treatments were also used. In this study, metabolite extraction was more effective in the ethanolic extract than in the other samples for all variables, indicating that the use of ethyl alcohol as a solvent provides a more complete extraction. Regarding the extract's activity on the fungal species, the results indicate that it did not inhibit their *in vitro* growth and development at the concentrations tested.

Keywords: Antifungal activity; Ethanolic extract; Metabolites.

Resumen

Las acciones en las plantas son causadas por una variedad de organismos. Entre estos, los hongos destacan como o más diversos grupos de fitopatógenos. Una especie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sac. configure-se como um dos principais agentes etiológicos da antracnosis, fitopatología que afecta una vasta cantidad de plantas ao redor do mundo, especialmente como de interés agronómico. El empleo de productos a base de plantas, tem sido o foco de diversas pesquisas en los últimos años, debido aos seus benefícios em relação aos agroquímicos. Diante disso, o presente estudio objetivou verificar a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss no crescimento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Além disso, determinou-se, também, os teores de clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos totais do mesmo e das amostras secas e *in natura*. Para un análisis *in vitro*, incorporou-se ao meio de cultura BDA, quatro concentrações definidas do extrato etanólico e verteu-se tais misturas em placas de Petri con cinco repetições para cada tratamiento. Además, también se utilizan tratamientos controlados. Na presente pesquisa, constatou-se, quanto a análise dos metabólitos, que a extração destes foi mais eficaz no extrato etanólico em comparação com as demais amostras, para todas as variáveis, indicando que a utilização de álcool etílico como solvente fornece uma extração mais completa. Y cuanto a actividad del extrato sobre una especie fúngica, os resultados apontam que este não apresentou efeito inibitório sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* do mesmo nas concentrações testadas.

Palabras clave: Actividad antifúngica; Extracto etanólico; Metabolitos.

1. Introdução

As doenças em plantas podem ter origem de diferentes agentes, tais como vírus, bactérias ou fungos, variando quanto a sua gravidade e podendo apresentar desde danos sutis às folhas ou frutos, até causar a morte do indivíduo (Kumar, 2020). Dentre tais agentes, os fungos representam o maior e mais diversificado grupo de organismos fitopatogênicos, de modo que podem associar-se a praticamente qualquer grupo vegetal e, conseqüentemente, vir a desenvolver algum tipo de patologia (Morandi *et al.*, 2009).

O gênero *Colletotrichum* é considerado como um dos principais grupos de patógenos fúngicos de plantas, compreendendo espécies amplamente distribuídas e responsáveis por causar danos em diversos cultivos agrícolas de importância econômica, a exemplo de leguminosas, cereais, hortaliças, frutas e plantas ornamentais (Dean *et al.*, 2012).

A antracnose é uma fitopatologia que afeta diferentes órgãos vegetais, sendo consideravelmente severa nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil pelo fato do clima ser favorável para o seu desenvolvimento. Um dos seus principais agentes etiológicos é a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, que se prolifera em condições de alta temperatura e umidade, especialmente em épocas de chuva (Sousa, 2004).

Estudos genéticos recentes revelam que o complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides* contém dezenas de representantes filogeneticamente distintos, sendo o complexo mais rico em número de espécies do gênero *Colletotrichum*, o que amplia tanto sua amplitude de hospedeiros quanto a dificuldade de manejo (Ma *et al.*, 2025; Thao *et al.*, 2024).

Colletotrichum gloeosporioides provoca infecções quiescentes, de forma que o fungo associa-se aos tecidos do hospedeiro numa etapa em que apresentam resistência à colonização necrotrófica devido, especialmente, a presença de compostos antifúngicos pré-formados ou a ausência dos nutrientes fundamentais para o seu crescimento, fazendo com que o patógeno realize a colonização somente quando os frutos amadurecem ou os tecidos iniciem a senescência, visto que nessas etapas estes compostos apresentam-se em menor quantidade e os nutrientes se fazem disponíveis (Prusky, 1996).

A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* manifesta-se tipicamente como lesões necróticas em frutos e folhas, começando como pequenas manchas aquosas que evoluem para áreas deprimidas e enegrecidas com esporulação visível em condições úmidas, sintomas que podem permanecer latentes em tecidos aparentemente saudáveis e agravar perdas pós-colheita se o manejo não for imediato (Dofuor *et al.*, 2023; Peralta-Ruiz *et al.*, 2023).

Análises funcionais identificaram genes específicos, a exemplo de genes reguladores de secreção e fatores de resposta ao estresse, que modulam a capacidade de infectar tecidos vegetais e tolerar pressões ambientais; mutações ou regulação diferencial desses loci alteram significativamente a virulência em modelos experimentais (Guo *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2025). Em conformidade a isso, estudos de filogenômica e comparativos genômicos no complexo de espécies de *C. gloeosporioides* revelam expansão de elementos transponíveis, variação em famílias de enzimas degradativas e genes de efeito que explicam plasticidade adaptativa e especialização a diferentes hospedeiros (Wu *et al.*, 2025).

O emprego de fungicidas provenientes de plantas é uma prática realizada há muito tempo, mas somente nos últimos anos observa-se uma crescente nas pesquisas que têm por objetivo a verificação da atividade antifúngica de extratos vegetais, as quais consideram a diversidade de substâncias existentes nas plantas, o seu potencial biológico e possibilidade de utilização (Celoto *et al.*, 2008). Este fato alinha-se com os princípios da agricultura sustentável, a qual tem por objetivo mitigar o uso e, consequentemente, os efeitos de fungicidas sintéticos, bem como de outros tipos de tratamentos químicos, através de alternativas ambientalmente seguras (Worku; Alemu; Tsedaley, 2025).

Os produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, são biodegradáveis e apresentam propriedades biológicas conferidas pelos metabólitos secundários, os quais, por possuírem variedade estrutural são de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica (Kasper *et al.*, 2018). Os metabólitos secundários tratam-se de um grupo de biocompostos fundamentais para a sobrevivência das plantas, pois estão envolvidos na proteção a estresses bióticos e abióticos (Borges; Amorim, 2020). Pesquisas aplicadas mostram eficácia promissora de óleos essenciais, recobrimentos alimentares e antagonistas microbianos para reduzir desenvolvimento de antracnose em frutos durante armazenamento, oferecendo alternativas sustentáveis ao uso exclusivo de fungicidas sintéticos (Andrade-Hoyos *et al.*, 2025; Peralta-Ruiz *et al.*, 2023).

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como “Nim”, é uma planta arbórea, nativa da Índia e pertencente à família Meliaceae. Em virtude de suas aplicações como planta medicinal, repelente e praguicida, bem como por ser considerada uma fonte rica em compostos bioativos, tem sido amplamente estudada em inúmeras áreas e para variados fins, a exemplo do controle de fitopatógenos (Corrêa *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2012).

O Nim dispõe de mais de 140 compostos biologicamente ativos, isolados de diferentes partes da planta e que são quimicamente diversos e estruturalmente variáveis (Mahmoud *et al.*, 2011). Os metabólitos secundários fornecidos pelo Nim, além de apresentarem atividade biológica, mostram-se seletivos, não mutagênicos, com baixa toxicidade e geram pouco impacto no ecossistema, destacando-se a azadiractina como o composto mais estudado devido a sua eficiência no controle de pragas (Brasil, 2013).

Os extratos de folhas e de sementes de Nim, bem como o seu óleo, têm sido testados com o propósito de controlar fungos fitopatogênicos, apresentando resultados favoráveis para vários cultivos (Carneiro; Pignoni; Gomes, 2008). Na

literatura, também se encontram descritas outras propriedades dos compostos presentes no Nim, podendo-se mencionar, principalmente, a atividade antimicrobiana e antiviral (Guedes *et al.*, 2022).

Assim, em face do que foi exposto, o presente estudo objetivou quantificar os níveis de clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos presentes no extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss, bem como analisar a atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato sobre o crescimento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

2. Metodologia

Realizou-se uma pesquisa experimental, laboratorial de natureza quantitativa (Pereira *et al.*, 2018) por meio de estatística descritiva simples com uso de gráficos, valores de média e desvio padrão (Shitsuka *et al.*, 2014).

2.1 Local da pesquisa

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Botânica e Química da Unidade Acadêmica de Ciências Exatas e da Natureza – UACEN do Centro de Formação de Professores – CFP da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, *campus* Cajazeiras, Paraíba, Brasil.

2.2 Preparação do material vegetal

Foram coletadas, no período chuvoso e nas primeiras horas da manhã, entre 06h e 08h, folhas maduras de 10 indivíduos de *Azadirachta indica*, distribuídos na área interna do *campus*, de maneira a promover uma boa representatividade amostral. Em laboratório, as folhas coletadas foram higienizadas em água corrente e, posteriormente, submetidas à secagem em estufa de circulação de ar fechada, regulada à temperatura de 40 ± 2 °C, até estarem completamente secas. Em seguida, sucedeu-se o processo de trituração das folhas com a utilização de um triturador industrial e, logo após, a separação das partículas menores, com a utilização de uma peneira de aço.

2.3 Obtenção do extrato etanólico

O extrato etanólico foi produzido a partir da biomassa seca. Para tal foram utilizados 150g de material vegetal e 400mL do solvente (álcool etílico P. A. – 99,5%), em uma proporção de 0,375g por 1mL. A mistura do material vegetal com o solvente foi posta em agitador magnético por 60 minutos e, posteriormente, armazenada em ambiente refrigerado e isolado de luz durante 24 horas. Após esse período de repouso, iniciou-se a etapa de filtração, na qual utilizou-se uma bomba de vácuo, de maneira que aos resíduos filtrados resultantes foram acrescidos a mesma proporção de solvente, submetidos a agitação, repouso e filtração, sendo este processo repetido, ao todo, três vezes.

Posteriormente à terceira filtração, a massa foi descartada e o filtrado submetido à técnica de extração de solvente em aparelho *Soxhlet*. Por fim, o filtrado foi direcionado a secagem em estufa de circulação de ar fechada, regulada a temperatura de 40 ± 2 °C, até a obtenção do extrato bruto, devido a completa evaporação do solvente.

2.4 Rendimento do extrato

O cálculo do rendimento do extrato bruto foi realizado por meio da relação entre a massa do extrato e a massa seca das amostras, conforme Sousa *et al.* (2007), representado na equação abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do extrato}}{\text{massa da amostra seca}} \times 100$$

2.5 Quantificação de metabólitos do extrato

2.5.1 Clorofilas e Carotenoides Totais

Para a determinação dos teores de Clorofilas e Carotenoides Totais foi utilizado o método descrito por Lichtenthaler (1987) com adaptações de Silva (2017). Assim, foram maceradas, separadamente, 0,009g da amostra seca e da amostra *in natura*, juntamente com 0,2g de carbonato de cálcio (CaCO₃) e 5mL de acetona (C₃H₆O) 80%, em ambiente com baixa luminosidade. A mistura resultante desse processo foi transferida para tubos de centrifuga envolvidos com papel alumínio e submetidas a centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm.

Alíquotas foram obtidas a partir do sobrenadante de cada amostra, postas em cubetas e lidas, as absorvâncias, em espectrofotômetro ajustado para os comprimentos de onda de 470, 646 e 663nm. O extrato etanólico foi submetido a mesma metodologia supracitada, diferenciando somente na massa utilizada, sendo esta de 0,001g. Foram realizadas análises em triplicata e, a partir das medidas obtidas na espectrofotometria, foram calculados os teores de Clorofilas e Carotenoides Totais.

2.5.2 Flavonoides e Antocianinas

A determinação dos teores de Flavonoides e Antocianinas seguiu o método de Francis (1982) com adaptações de Silva (2017). Para tal, foram macerados em almofariz 0,009g das amostras seca e *in natura*, e 0,001g do extrato etanólico, em 10mL de uma solução de etanol (C₂H₅OH)/ácido clorídrico (HCl) preparada na proporção de 85:15 (v/v), durante 1 minuto, em ambiente com baixa luminosidade. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga envoltos por papel alumínio e acondicionados em refrigerador por um período de 24 horas. Após isso, foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm e filtradas. Transferiu-se para cubetas uma alíquota de cada amostra e, seguidamente, sucedeu-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 375nm e 535nm. Foram realizadas análises em triplicata e, a partir das medidas resultantes na espectrofotometria, calculou-se os quantitativos de Flavonoides e Antocianinas.

2.5.3 Compostos Fenólicos Totais

Para determinação dos Compostos Fenólicos Totais utilizou-se o método *Folin Ciocalteu*, segundo Waterhouse (2006). Elaborou-se, inicialmente, uma curva padrão de ácido gálico (C₇H₆O₅), partindo das concentrações 4,5µg, 9µg, 13,5µg, 18µg e 22,5µg do ácido e dos valores das leituras de absorvância no comprimento de onda de 765 nm, resultando na equação da reta ($y = 0,048x - 0,0509$, $R^2 = 0,9987$), a qual foi utilizada para calcular os compostos fenólicos totais nas amostras.

A princípio, definiu-se as quantidades das massas, sendo 0,1g das amostras seca e *in natura* e 0,05g do extrato etanólico. Em seguida, macerou-se, em separado, cada uma das amostras, adicionando-se água destilada, com exceção do extrato etanólico, o qual foi macerado em 5mL de álcool etílico absoluto. Os produtos do processo de maceração foram direcionados para balões volumétricos e completou-se o volume total para 25mL com água destilada.

Transcorrido o período de 30 minutos de repouso, as soluções passaram por um processo de filtração e foram retiradas alíquotas de 90µL da amostra seca, 135µL do extrato e 180µL da amostra *in natura*. Estas foram, por sua vez, depositadas em tubos de ensaio e adicionou-se 2.035µL de água destilada à amostra seca, 1.990µL ao extrato e 1.945µL na amostra *in natura*. Acrescentou-se, também, 125µL do reagente *Folin Ciocalteu* em todas as amostras, seguido de agitação por 5 minutos. Após isso, às amostras foram acrescidos 250µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃), seguida de nova agitação e repouso em banho-maria durante 30 minutos, regulado a temperatura de 40±2 °C. Após o resfriamento, foi realizada a leitura de absorvância em

espectrofotômetro ajustado a 765nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100g da amostra.

2.6 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov para determinação do padrão de normalidade. Atendendo a estes padrões ($p \geq 0,05$), os valores foram sujeitos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. Todos os testes supracitados foram realizados utilizando-se o *software* R.

2.7 Análise da atividade antifúngica do extrato

A avaliação do potencial antifúngico do extrato etanólico foi realizada *in vitro*, utilizando a cepa do fitopatógeno 3331 de *Colletotrichum gloeosporioides*, adquirido da coleção de fungos da Professora Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

Os procedimentos para realização deste teste seguiram as metodologias descritas em Sousa, Serra e Melo (2012) e Júnior, Sales e Martins (2009), com adaptações de Santos (2021). As cepas de *C. gloeosporioides* foram replicadas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidas em estufa do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D), regulada a temperatura de 30 °C, até o desenvolvimento satisfatório das colônias, caracterizado pelo preenchimento total das placas.

Os meios de cultura foram preparados em Erlenmeyers de 250mL, submetidos ao processo de esterilização e, em seguida, levados para câmara de fluxo laminar, onde adicionou-se o extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica* nas concentrações de 0.25%, 0.5%, 1.0% e 1.5% (correspondentes, respectivamente, a 0,25, 0,50, 1,0 e 1,5 g/100mL de meio) diluídos em 10mL de tween 80%. Posteriormente, os meios de cultura fundentes, adicionados do extrato, foram vertidos em placas de Petri de 80mm de diâmetro, de modo que foram elaboradas 5 placas (repetições) para cada concentração de extrato (tratamentos). Nesta mesma etapa também foram preparadas 5 placas de Petri contendo o meio de cultura BDA com o tween 80% e o fitopatógeno, e mais 5 placas somente com o meio de cultura BDA e o fitopatógeno, para efeito de controle ou parâmetro de crescimento das colônias, totalizando 30 placas.

Microdiscos de 8mm de diâmetro, contendo micélios ativos, foram retirados das bordas das placas nas quais ocorreu a replicação do fungo e introduzidos, de maneira invertida, no centro de cada placa de Petri com os meios de cultura, que continham diferentes concentrações do extrato. Todas as placas preparadas foram identificadas, envoltas por plástico filme e direcionadas para B.O.D, regulada a temperatura de 30 °C para incubação. O crescimento micelial foi diariamente verificado, em um período de 7 dias, através das medidas do diâmetro das colônias. O diâmetro correspondeu-se à média de duas medidas perpendiculares entre si, que foram realizadas com o uso de uma régua milimetrada. Os resultados foram analisados de maneira descritiva.

3. Resultados e Discussões

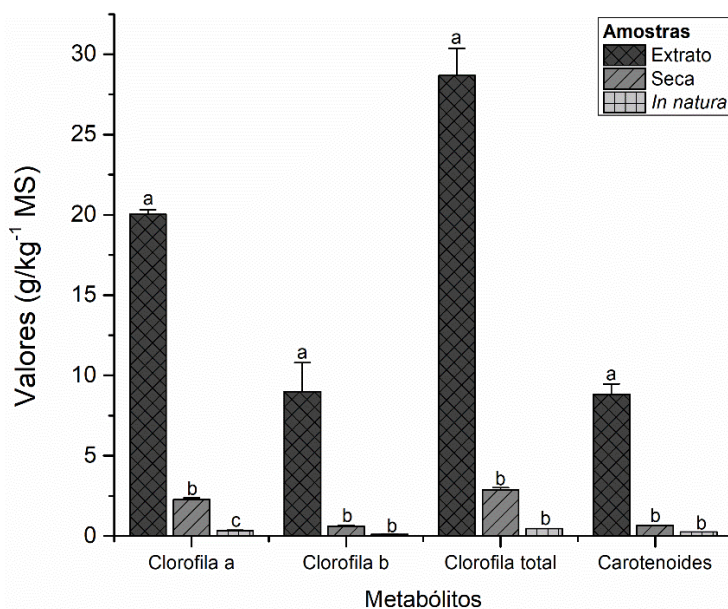
3.1 Rendimento e quantificação de metabólitos do extrato

O cálculo do rendimento do extrato bruto foi efetuado a partir da equação proposta por Sousa *et al.* (2007), resultando em um valor de 6%. Já os resultados obtidos com os ensaios realizados para a determinação dos teores dos pigmentos fotossintéticos do extrato etanólico e das amostras seca e *in natura* podem ser observados na Figura a.

Analisando os valores entre as amostras (Figura 1), observa-se que o processo de extração dos pigmentos fotossintéticos foi mais eficiente no extrato etanólico, a partir do qual se obtiveram os maiores valores médios para todos os

pigmentos quantificados. Além disso, os valores das amostras seca e *in natura* das variáveis clorofila *b*, clorofila total e carotenoides não apresentaram diferença estatística entre si.

Figura 1. Teores de clorofilas e carotenoides encontrados no extrato etanólico e nas amostras seca e *in natura* de *Azadirachta indica*.



Fonte: Autores (2023).

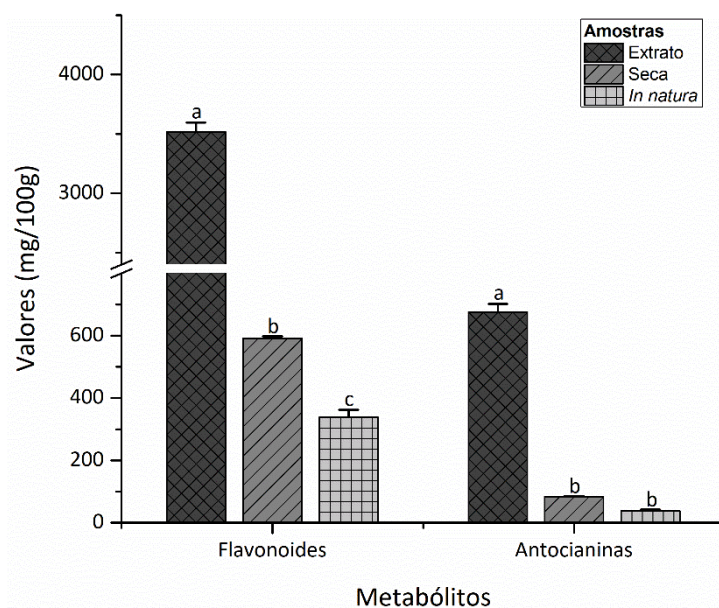
O principal pigmento fotossintético natural presente nas plantas são as clorofilas, as quais se encontram nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, estando diretamente relacionadas com a atividade fotossintética e estado nutricional das plantas (Von Elbe, 2000). Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são a clorofila *a*, clorofila *b* e os carotenoides, de modo que os dois últimos são chamados de pigmentos acessórios (Taiz; Ziegler, 2004).

A extração deste tipo de composto é diretamente influenciada pela escolha do solvente. Assim como os carotenoides, as clorofilas são solúveis em lipídeos e em solventes orgânicos como acetona, etanol, metanol, e insolúveis em água (Rocha; Reed, 2014; Sangaletti *et al.*, 2019). Os solventes orgânicos de caráter polar promovem uma extração mais completa e eficaz das clorofilas (Streit *et al.*, 2005) e dos carotenoides (Morais, 2006). O grau de solubilidade das substâncias orgânicas possui direta correlação com a sua estrutura molecular, principalmente no que diz respeito a polaridade das ligações e a espécie química, em geral. Assim, compostos apolares ou de baixa polaridade são solúveis em solventes com essas mesmas características, do mesmo modo, compostos altamente polares são solúveis em solventes polares (Martins; Lopes; Andrade, 2013).

Estudos relacionando o conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas superiores com ações biológicas ainda são escassos. Porém, na literatura, é relatado que os altos conteúdos de clorofilas e carotenoides em algas marinhas atuam como um potencial Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA), sendo comprovada a correlação entre o conteúdo destes pigmentos e a ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Othman *et al.*, 2018). Desta forma, pesquisas que visem estudar o conteúdo de clorofilas e carotenoides de plantas superiores como potenciais produtos naturais para a indústria agrícola devem ser incentivadas.

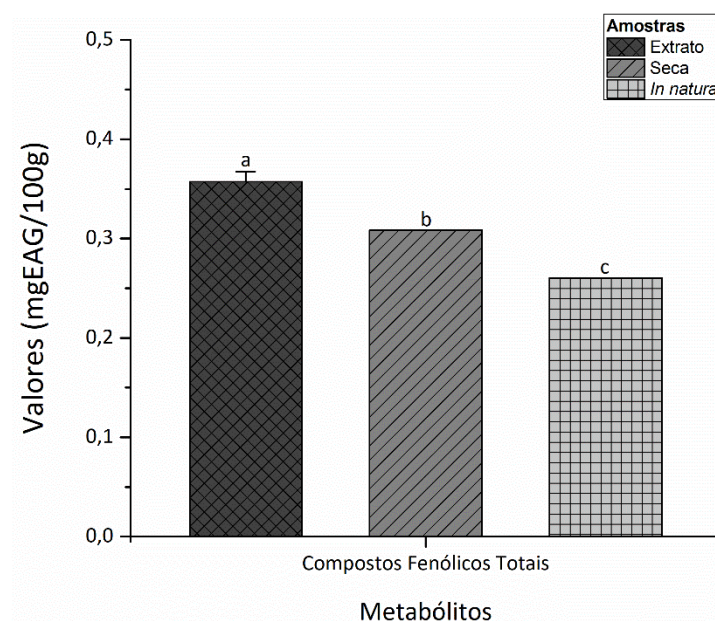
Quanto aos teores de flavonoides e antocianinas (Figura 2) e compostos fenólicos totais (Figura 3) das amostras seca e *in natura*, os resultados foram semelhantes aos de clorofilas e carotenoides, no que tange a eficácia do processo de extração, visto que é possível verificar que as amostras do extrato etanólico exibiram um maior teor para todas as variáveis analisadas. Apenas os valores das amostras seca e *in natura* de antocianinas não apresentaram diferença estatística entre si.

Figura 2. Teores de flavonoides e antocianinas encontrados no extrato etanólico e nas amostras seca e *in natura* de *Azadirachta indica*



Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Figura 3. Teor de compostos fenólicos encontrados no extrato etanólico e nas amostras seca e *in natura* de *Azadirachta indica*



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Em estudo que visava a determinação do conteúdo total de flavonoides em extratos de folhas de *A. indica* elaborados com diferentes solventes, especificamente etanol 70% e acetato de etila, foram encontrados $118,57 \pm 0,08 \text{ mg/gQE}$ e

74,17±0,20mg/gQE, respectivamente (Widiyana; Illian, 2022). De acordo com os autores, tal resposta é um indicativo de que solventes de alta polaridade fornecem uma quantidade total de flavonoides mais elevada, fato este que converge com o padrão de resultados analisados na presente pesquisa.

Avaliando quais solventes seriam mais eficazes na extração de flavonoides e fenóis totais das folhas de Nim, pesquisadores utilizaram como comparação os teores de tais metabólitos em cinco extratos distintos, feitos com acetato de etila, etanol, água e combinações destes (acetato de etila-etanol e etanol-água). A variedade entre os extratores objetivava que todos os componentes ativos presentes, tanto os não polares, como também os semipolares e polares pudessem ser extraídos (Septiyani; Wibowo, 2019).

Os resultados da pesquisa supracitada mostraram, para flavonoides, que a maior concentração destes foi no extrato de acetato de etila, seguido pelo extrato de etanol, e tendo como menor teor o extrato aquoso. Em fenóis totais ocorre relativamente o inverso, no qual o extrato de etanol-água apresentou maiores concentrações, seguido do extrato de etanol, e o extrato de acetato de etila exibiu o teor mais baixo, bem como foi notado que à medida que a polaridade do solvente era elevada, o conteúdo total de fenol também aumentava, indicando que solventes não polares são menos efetivos para a extração de compostos fenólicos.

As diferenças observadas nos teores de clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos no presente estudo e nas demais pesquisas supracitadas, podem estar associadas a fatores distintos, como o genótipo da espécie vegetal, localização geográfica e o clima predominante, fertilidade do solo, período de plantio e colheita, processo de secagem e armazenamento, métodos de extração para produção do extrato e as concentrações das amostras analisadas, uma vez que estes podem exercer influência direta na qualidade e quantidade dos compostos bioativos (Santos, 2021; Seriana *et al.*, 2021).

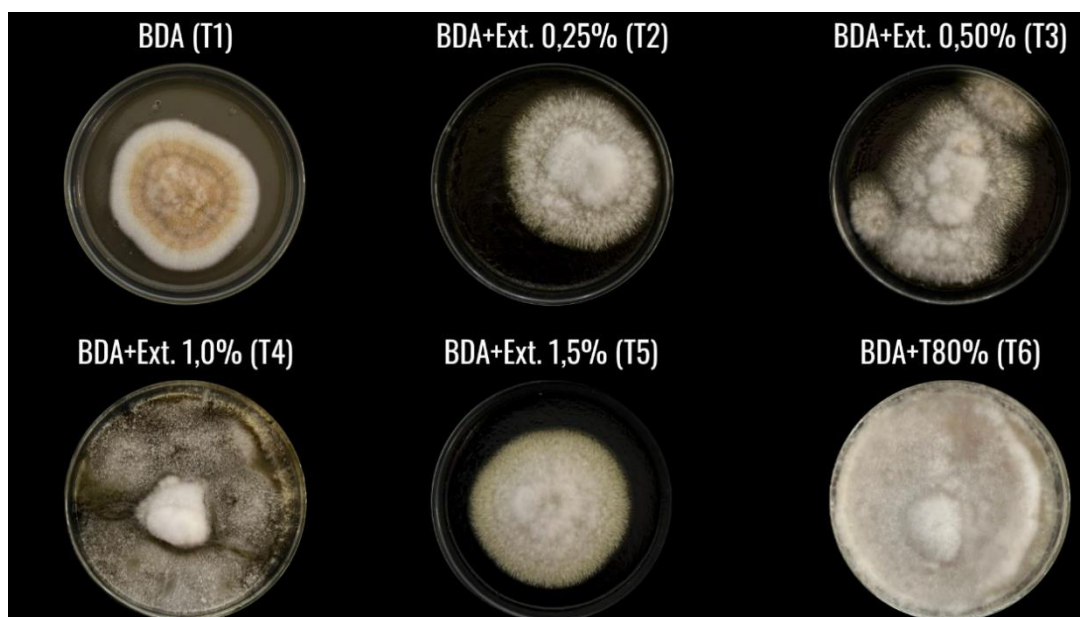
Os efeitos avaliados nos tratamentos de fitopatologias com a utilização de extratos ou óleos de Nim são resultantes dos mecanismos de ação dos biocompostos presentes na composição destes, os quais são responsáveis por proporcionar alterações físico-químicas no organismo fúngico. Os flavonoides, muitas vezes, impossibilitam crescimento do fungo por meio de mecanismos subjacentes, dentre eles a ruptura da membrana plasmática, indução de disfunção mitocondrial, além da inibição da formação da parede celular, da divisão celular e da síntese de RNA e proteínas (Al Aboody; Mickymaray, 2020).

Nos compostos fenólicos, os mecanismos apontados como causadores da sua toxicidade para microrganismos incluem a inibição enzimática por intermédio dos compostos oxidados, provavelmente por meio da reação com grupos sulfidrila ou através de interações inespecíficas com proteínas (Arif *et al.*, 2009). Assim, faz-se necessário que se realizem análises fitoquímicas de produtos de origem vegetal, a fim de constatar quais componentes presentes no mesmo detém potencial biológico voltado para a atividade que se deseja verificar.

3.2 Análise da atividade antifúngica do extrato

O estágio de desenvolvimento micelial das colônias de *C. gloeosporioides*, submetidas a diferentes tratamentos e concentrações em comparação com os grupos de controle, pode ser avaliado através da análise do registro fotográfico (Figura 4), em que exibe as placas de Petri nas quais as colônias foram cultivadas ao longo de 07 dias.

Figura 4. Desenvolvimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* nas diferentes concentrações dos tratamentos em meio BDA, 07 dias após a instalação do bioensaio



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

As análises efetuadas mostraram que as concentrações testadas do extrato etanólico de *A. indica* não apresentaram efeito fungicida ou fungistático no desenvolvimento de *C. gloeosporioides*. O crescimento das colônias sucedeu de maneira similar em todos os tratamentos ao longo do intervalo de observação. Após 64 horas, notou-se que as placas Petri do T4 já estavam totalmente preenchidas, seguidas do T6, com 86 horas.

Notou-se que a forma do crescimento das colônias em T4 e T6 ocorreram de maneira irregular, com focos de expansão distribuídos aleatoriamente pelas placas, enquanto que nos demais, observou-se um padrão na progressão das mesmas, caracterizado por um avanço que se iniciava no centro e expandia-se em direção às bordas, em formato semelhante a uma circunferência. Todavia, todas as colônias apresentaram um desenvolvimento normal, sendo assim possível inferir que *C. gloeosporioides* não se mostrou sensível à quantidade empregada de 10mL de tween 80%.

Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram os encontrados na literatura, no que concerne a ação do extrato sobre o desenvolvimento da espécie fúngica analisada. Em uma pesquisa para verificar o potencial antifúngico do extrato alcoólico de folhas de *A. indica* em *C. gloeosporioides*, os autores constataram que na concentração de 15% o mesmo apresentou um potencial inibitório considerável, podendo ser utilizado no controle do fitopatógeno (Shinde; Gawai, 2011). Da mesma forma, em estudo para testar a ação do extrato aquoso do bolo de *A. indica* em *C. gloeosporioides f. sp. Mangiferae* (antracnose de manga), os dados obtidos revelaram 100% de inibição utilizando uma concentração de 0,9% (Kumari *et al.*, 2013).

Na literatura, os extratos de Nim, quando testados frente a outras espécies de fitopatógenos, também apresentam resultados favoráveis. Ao investigar a atividade antifúngica do extrato etanólico de folhas de *A. indica* em quatro fungos isolados de tecidos de inhame em estado de necrose, sendo estes *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Botryodiplodia theobromae*, nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, os dados apontam que em todas houve inibição significativa do crescimento micelial, com uma taxa de inibição variável de 88% a 97%, que se elevou ao passo que as concentrações do extrato aumentavam (Ijato, 2019).

Semelhantemente, foi comprovado cientificamente o efeito do extrato etanólico de folhas frescas de *A. indica* em *Aspergillus parasiticus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum*, espécies responsáveis por grandes perdas no setor agrícola, demonstrando potencial inibitório para todas as espécies, sendo fungicida frente *F. oxysporum* e *M. phaseolina*, nas respectivas concentrações de 500µg.mL⁻¹ e 1000µg.mL⁻¹ (Kasper *et al.*, 2018). Ademais, outros estudos já relataram resultados satisfatórios no que se refere ao uso de extratos de *A. indica*, elaborados com diferentes partes da planta e fazendo uso de tipos distintos de solventes, contra outras espécies fúngicas (Amadioha, 2000; Kishore; Pande; Rao, 2001; Saha; Dasgupta; Saha, 2005; Moslem; El-Kholie, 2009; Chandrashekara *et al.*, 2012; Al-Hazmi, 2013).

Da mesma forma, quanto a extratos elaborados com outras espécies vegetais, estes também foram relatados com potencial para o controle de *C. gloeosporioides*. Um bioensaio avaliando a ação antifúngica de extratos etanólicos de folhas maduras de seis espécies vegetais (*Azadirachta indica*, *Calotropis procera*, *Gliricidia sepium*, *Heliotropium indicum*, *Lippia origanoides* e *Phyllanthu sniruri*), na concentração de 2,5%, em *C. gloeosporioides*, indicou que o extrato de *L. origanoides* foi o mais significativo para o controle *in vitro* e *in vivo* do patógeno, e que os demais extratos também foram eficazes na redução da patologia (Bolívar *et al.*, 2009). Equivalente a este, estudo avaliando os extratos aquosos das folhas de cinco espécies vegetais (*Terminalia arjuna*, *Adhatoda vasica*, *Azadirachta indica*, *Polygonum barbatm* e *Cymbopogon citratus*), indicou que o extrato produzido com *A. vasicam*, a 2%, pode ser empregado como biofungicida no controle de *C. gloeosporioides* (Islam *et al.*, 2015).

Extratos hexânicos dos frutos de *Capsicum chinense* também apresentaram eficácia no controle de *C. gloeosporioides*, com uma inibição observada de 100% de seu crescimento nas doses 150 µL do extrato de pimenta bode verde e 300 µL do extrato de pimenta biquinho madura (Tiogo, 2023). Sacramento *et al.* (2024) constatou que o extrato etanólico de *Lippia alba* também demonstrou potencial antifúngico frente a *C. gloeosporioides*, sendo constatada a inibição do crescimento macroscópico destes em meio de cultura. Tais resultados são um indicativo de que a espécie de fitopatógeno analisada no presente estudo apresenta sensibilidade aos biocompostos presentes em extratos vegetais, podendo este tipo de produto natural ser explorado para um uso potencial no controle de fitopatologias.

A discrepância verificada entre a resposta obtida no presente estudo e na literatura pode ter explicação em fatores adversos, tais como: composição do extrato, no tangente a qualidade e quantidade dos metabólitos, uma vez que estes estão envolvidos na ação antifúngica; concentrações testadas, as quais podem ter sido insuficientes para uma inibição visível do crescimento micelial *in vitro* da espécie fúngica; e as próprias características biológicas da cepa utilizada, especialmente resistência a antifúngicos, seja ela inata ou adquirida.

4. Considerações Finais

Perante o exposto, conclui-se que o extrato etanólico das folhas de *Azadirachta indica*, quanto a caracterização fitoquímica, apresentou um maior teor de biocompostos em relação as amostras seca e *in natura*, devido a eficiência no processo de extração em decorrência do uso de álcool etílico como solvente. No que tange a atividade antifúngica, o extrato testado não apresenta, nas concentrações e condições avaliadas, influência no desenvolvimento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sendo assim, recomenda-se a realização de estudos complementares, utilizando concentrações mais elevadas do extrato, para que se possa contrastar as respostas e investigar, com um maior detalhamento, o potencial biológico do Nim no controle de microrganismos.

Referências

- Al Aboody, M. S., Mickymaray, S. (2020). Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics*, 9 (2), 45.
- Al-Hazmi, R. H. M. (2013). Effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaves and seeds extract on the growth of six of the plant disease causing fungi. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2 (5), 089-098.
- Amadioha, A. C. (2000). Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection*, 19 (5), 287-290.
- Arif, T., Bhosale, J. D., Naresh, K., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., Rajesh, D. (2009). Natural products–antifungal agentes derived from plants. *Journal of Asian natural products research*, 11 (7), 621-638.
- Bolívar, K., Sanabria, M. E., Rodriguez, D., Camacaro, M., Ulacio, D., Cumana, L. J., Crescente, O. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales em el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9 (1), 175-181
- Borges, L. P., Amorim, V. A. (2020). Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, 11 (1), 54-67.
- Brasil, R. B. (2013). Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM). *Enciclopédia Biosfera*, 9 (17), 1-17.
- Carneiro, S. M. T. P. G., Pignoni, E., Gomes, J. C. (2008). Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle da mancha angular do feijoeiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 10 (3), 6-10.
- Celoto, M. I. B., Papa, M. F. S., Sacramento, L. V. S., Celoto, F. J. (2008). Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Acta Scientiarum. Agronomy*, 30 (1), 01-05.
- Chandrashekar, K. T., Prakash, B. M., Mahesha, K. S., Rajashekar, N. (2012). Antifungal activity of plant extracts Against leaf rust disease of mulberry. *Journal of Sericulture & Technology*, 3 (1), 60-63.
- Corrêa, T. A., Silva, E. A., Franco, A. L., Rocha, L. P., Tavares, M. C. S. (2022). NIM (*Azadirachta indica*): aspectos fitoquímicos e anatômicos. *Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros*, 1 (1), 99-115.
- Dean, R., Kan, J. A. V., Hammond-Kosack, K. E., Pietro, D. A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13 (4), 414-430.
- Dofuor, A. K., Quartey, N. K. A., Osabutey, A. F., Antwi-Agyakwa, A. K., Asante, K., Boateng, B. O., Ablormeti, F. K., Lutuf, H., Osei-Owusu, J., Osei, J. H. N., Enlok, W., Loh, S. K., Hoger, J. O., Aidoo, O. F., Ninsin, K. D. (2023). Mango anthracnose disease: the current situation and direction for future research, *Front. Microbiol.*, 14.
- Elaigwu, E. D., Ogo, O., Efiog, E., Oche, G. O. (2019). Effects of ethanolic leaf extracts of neem (*Azadirachta indica*) on oxidative stability of palm oil. *Res J Phytochem*, 13 (1), 1-10.
- Francis, F. J. (1982). Analysis of anthocyanins in foods. In Markakis, P (Eds.), *Anthocyanins as food colors* (pp. 181-207). Academic Press.
- Garcia, R. Á., Juliatti, F. C., Barbosa, K. A. G., Cassemiro, T. A. (2012). Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biosci. j. (Online)*, p. 48-57, 2012.
- Guedes, E. M., Mendonça, C. M. S., Nunes, L. E., Araújo, I. D. R. (2022). Atividade antimicrobiana da planta *Azadirachta indica* (nim indiano) – uma revisão integrativa. *Diversitas Journal*, 7 (4), 2615-2636.
- Guo, S., Sun, Q., Liu, S., Wu, F., Li, C., Xi, Z., Chao, O., Chen, Y., Tan, X. (2024). CgNis1's Impact on Virulence and Stress Response in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Int. J. Mol. Sci.*, 25 (6), 3505.
- Ijato, J. Y. (2019). Evaluation of antagonistic effects of etanol leaf extract of *Azadirachta indica* on tuber rot pathogens of yam tuber. *MOJ Curr. Res. Rev.*, 2 (1), 15-18.
- Islam, M. S., Ali, M., Ahmed, M., Akonda, M. M. R., Himel, R. M. (2015). Efficacy of leaf extracts of some indigenous plants in controlling *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) - dieback disease of tea. *Tea Journal Of Bangladesh*, 44 (1), 20-24.
- Júnior, I. T. S., Sales, N. L. P., Martins, E. R. (2009). Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. *Biotemas*, 22 (3), 77-83.
- Kasper, A. A. M., Sousa, S. F., Júnior, J. J. V. S., Escher, S. K. S., Barata, L. E. S. (2018). Comparação da atividade antifúngica do óleo comercial e do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* Juss) frente a fungos fitopatogênicos. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 9 (6), 54-62.
- Kishore, G., Krishna, P. S., Rao, J. N. (2001). Control of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea*) by extracts from non-host plant species. *Plant Pathology Journal*, 17 (5), 264-270.
- Kumar, A. (2020). *Advances in Medicinal Plant Sciences*. Integrated Publications.
- Kumari, A., Kumar, R., Maurya, S., Choudhary, J. S. (2013). Antifungal efficacy of aqueous extracts of nem cake, karanj cake and vermicompost against some phytopathogenic fungi. *The Bioscan*, 8 (2), 671-674.

- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Ma, Z., Liu, F., K. M. Tsui, C. K. M., Cai, L. (2025). Phylogenomics and adaptive evolution of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Communications biology*, 8, 593.
- Mahmoud, D. A., Hassanein, N. M., Youssef, K. A., Abou Zeid, M. A. (2011). Antifungal activity of diferente nem leaf extracts and the nimonol against some importante human pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (3), 1007-1016.
- Martins, C. R., Lopes, W. A., Andrade, J. B. (2013) Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química nova*, 36 (8), 1248-1255.
- Morais, F. L. (2006). *Carotenóides: Características Biológicas e Químicas*. [Monografia para Pós-graduação *Lato Sensu*, Universidade de Brasília].
- Morandi, M. A. B., Júnior, T. J. P., Bettiol, W., Teixeira, D. (2009). Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, 30 (251), 73-82.
- Moslem, M. A., El-Kholie, E. M. 2009. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 12 (14), 1045-1048.
- Othman, R., Amin, A., MSA, A., Fadzillah, N. A., Jamaludin, M. A. (2018). Carotenoid and chlorophyll profiles in five species of Malaysian seaweed as potential halal active pharmaceutical ingredient (API). *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol*, 8 (4-2), 1610-1616.
- Peralta-Ruiz, Y., Rossi, C., Grande-Tovar, C. D., Chaves-López, C. (2023). Green Management of Postharvest Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, *J. Fungi*, 9 (6), 623.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Pereira, F. J., Shitsuka, R., (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual review of Phytopathology*, 34 (1), 413-434.
- Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria, 2021.
- Rocha, D. S., Reed, E. (2014) Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, 41 (1), 76-85.
- Sacramento, F. S., Clara, N. C. A., Elisa, G. R. O. M., Roseane, S. O., Isaac, M. J. S., Tatiana, O. V. (2024). Caracterização e atividade antifúngica do extrato vegetal da *Lippia alba* como potencial controle da antracnose do mamão. *Revista de Biotecnologia & Ciência*, 13, p. e14772-e14772.
- Saha, D., Dasgupta, S., Saha, A. (2005). Antifungal activity of some plant extracts against fungal pathogens of tea (*Camellia sinensis*). *Pharmaceutical biology*, 43 (1), 87-91.
- Sangaletti, P. (2019). *Fotoquímica de pigmentos fotossintéticos: avaliação estrutural e do ambiente*. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina]. Repositório Institucional da UFSC.
- Santos, M. A. (2021). *Bioatividade de extratos e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides**. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande].
- Septiyani, R., Wibowo, C. (2019). Identification of active compounds and testing the antioxidante properties of nem leaf extract. *Revista AIP Conference Proceedings*, 2094 (1).
- Seriana, I., Akmal, S. M., Darusman, D., Wahyuni, S., Khairan, K. (2012). Phytochemicals characterizations of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves ethanolic extract: na important medicinal plant as male contraceptive candidate. *Rasayan Journal of Chemistry*, 14 (1), 343-350.
- Shinde, J. U., Gawai, D. U. Effect of aqueous and alcoholic extracts of some medicinal plants on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. *E-International Scientific Res. J*, 3 (4), 295-298.
- Shitsuka, R., Shitsuka, C. D. W. M., Shitsuka, R. I. C. M. (2014). *Matemática fundamental para tecnologia*. (2ed). Editora Érica.
- Silva, E. V. (2017). *Potencialidades da pimenta biquinho (*Capsicum chinense*) como aditivo natural*. [Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba]. Repositório Institucional da UFPB.
- Sousa, A. C. B. (2004). *Análise da diversidade genética através de marcadores moleculares e características citomorfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides**. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco]. Biblioteca Digital do Cerrado.
- Sousa, C. M. M., Silva, H. R., Vieira-Jr., G. M., C. Ayres, C. M., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.
- Sousa, R. M. S., Serra, I. M. R. S., Melo, T. A. (2012). Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. *Summa Phytopathologica*, 38 (1), 42-47.
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W., Hecktheuer, L. H. H. (2005) The chlorophylls. *Ciência Rural*, 35 (3), 748-755.
- Taiz, L.; Ziegler, E. (2004). *Fisiologia vegetal* (3ª ed). Artmed.
- Thao, L. D., Choi, H., Choi, Y., Mageswari, A., Lee, D., Kim, D. H., Shin, H. D., Choi, H., Ju, H. J., Hong, S. B. (2024). Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex Isolates in Korea and Their Host Plants, *The Plant Pathology Journal*, 40 (1), 16–29.

Tiogo, S. E. M. (2023). *Extrato vegetal de Capsicum chinense: composição química, ação anticolinesterase, antileishmaniose, anitumorral, antifúngica e aplicação em filmes biodegradáveis*. [Dissertação de Mestrado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano]. Repositório Institucional do IF Goiano.

Von Elbe, J. H. (2000). Colorantes. In Fennema, O. W. (Eds.), *Química de los alimentos* (2ª ed., pp. 782–799). Zaragoza: Wisconsin.

Waterhouse, A. (2006). Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. *American Journal of Ecology and Viticulture*, USA, p 3-5.

Widiyana, A. P., Illian, D. N. (2022). Phytochemical Analysis and Total Flavonoid Content on Ethanol and Ethyl Acetate Extract from Neem (*Azadirachta Indica* Juss.) Leaves utilizing UV–Vis Spectrophotometric. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 8 (1), p. 60-65.

Worku, S., Alemu, K., Tsedaley, B. (2025). Combining plant extracts and hot water treatments for the management of postharvest mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Scientific Reports*, 15 (1), p. 5074.

Wu, Y., Zhou, F., Chen, Q., He, L., Zang, Y., Wang, Z., Lin, C., Miao, W., Li, Z. (2025). Comparative Mitogenome Analysis of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose of Rubber Trees Unveils Distinct Species Complex-Specific Evolution Trajectories Within the Genus. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 11(9), 679.