



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ

FACULDADE DE QUÍMICA

LICENCIATURA EM QUÍMICA

CINTHIA MENDES SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL BIOHERBICIDA DE *Penicillium chrysogenum*

MARABÁ

2024

CINTHIA MENDES SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL BIOHERBICIDA DE *Penicillium chrysogenum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de Licenciatura em Química, Faculdade de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira.

MARABÁ

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA

S237e Santos, Cinthia Mendes
Estudo químico e potencial bioherbicida de *Penicillium chrysogenum*
/ Cinthia Mendes Santos. — 2024.
28 f.: il., color.

Orientador (a): Marilene Nunes Oliveira.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade
Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá,
Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de
Licenciatura em Química, 2024.

1. Fungos – Cultura e meios de cultura. 2. Fungos – Meios de
cultivo. 3. Hormônios vegetais. 4. Produtos biológicos. I. Albino, Ulisses
Brigatto, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 579.5

CINTHIA MENDES SANTOS

ESTUDO QUÍMICO DO POTENCIAL BIOHERBICIDA DE *Penicillium chrysogenum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura Plena em Química, Faculdade de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Data de aprovação: 01/03/2024.

Banca examinadora

Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira – FAQUIM/Unifesspa

Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva – FAQUIM/Unifesspa

Prof. Dr. Andreia Hentz de Mello – FECAM/Unifesspa

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria
Amelia Mendes Santos, por todo apoio
dedicados desde o início desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, mulher guerreira, e que me ensinou tudo que sei até hoje sobre a vida, mãe te amo e a minha irmã pelo estímulo e apoio – emocional e financeiro – que foram determinantes para a finalização desta longa caminhada chamada “Universidade da Química”. Agradeço, especialmente à minha família: eu amo vocês, e faltam palavras para expressar o sentimento de gratidão.

Agradeço também a uma pessoa muito especial para mim, Irlene Sampaio, que esteve comigo desde o início desta jornada me apoiando de todas as maneiras possíveis, é minha madrinha, amiga, segunda mãe, companheira dos desesperos e agonias, não tenho palavras para agradecer tudo que fez por mim, que Deus lhe pague.

Agradeço a todos os meus colegas e companheiros, por todas as horas de estudos e debates que passamos juntos, em especial a Raiane Barros, estudar com você sempre foi um privilégio (mesmo quando restavam 30min antes da prova).

Agradeço aos meus professores pelos ensinamentos, vocês são demais! Em especial a minha professora de ensino médio, por sua dedicação ao ensino de química que me inspirou nesta profissão: Maria... você me deu a certeza de que estou no curso que me completa e que me fará realizada profissionalmente. Agradeço ao meu professor Claudio Emídio que nas horas de desespero não me deixou desistir.

Agradeço a minha banca, por aceitarem meu convite e dedicarem seu tempo a mim e a este trabalho.

Agradeço a minha orientadora Marilene pela dedicação desde o primeiro contato. obrigada por ser essa professora maravilhosa que não mede esforços para realizar um belíssimo trabalho. Tua didática é

Agradeço a turma de 2019 do curso de química, no começo foi um pouco atribulado, mas no final deu tudo certo, agradeço a cada um pelo acolhimento, por não ser a minha turma de origem e me fizeram vivenciar experiências inesquecíveis obrigada a todos. Também agradeço aos amigos, tantos os que já passaram como aqueles que ainda estão presentes na minha vida, que por algum momento foram determinantes para a conclusão deste curso.

RESUMO

Com o elevado crescimento populacional em meio ao desenvolvimento tecnológico, também tem sido crescente uma série de demandas para que essa evolução ocorra de forma sustentável. Entre essas, é possível destacar a busca por novas substâncias passíveis de aplicação nos mais variados setores, como farmacêutico, agroquímico, indústria de alimentos entre outros. Nesse cenário os recursos naturais microbianos têm se apresentado como alternativa promissora. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial bioherbicida de extratos orgânicos obtidos a partir de cultivo em meio sólido do fungo *Penicillium chrysogenum*. Para a produção dos extratos o fungo *P. chrysogenum* foi cultivado em meio sólido (arroz) por um período de 30 dias. Pós cultivo, os extratos foram obtidos por percolação utilizando hexano e metanol. Após concentração em evaporador rotativo sob vácuo, os extratos foram submetidos aos testes bioherbicidas para avaliar o potencial de inibir a germinação de sementes de *Brachiaria decumbens*. Os extratos foram testados nas concentrações de 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0 % (m/v). Para uma avaliação preliminar do perfil químico dos extratos, estes foram avaliados via cromatografia líquida de alta eficiência. A partir dos percentuais de germinação obtidos nos bioensaios levantou-se a hipótese de que ao contrário do que era esperado, os extratos produzidos por *P. chrysogenum* possuem efeito fitohormonal, uma vez que as taxas de germinação acumulada para os extratos foram crescentes com o aumento da concentração e para alguns tratamentos se aproximando ou se igualando ao controle. Entre os extratos testados, o hexânico se destacou com taxa de germinação de 30% na maior concentração testada. No que se refere ao perfil químico, nos extratos predominam substâncias polares com boa absorção na região de 254 nm. Apesar de preliminares os resultados obtidos motivam a realização de novos testes com a finalidade de confirmar a hipótese que os extratos possuem efeito fitohormonal.

Palavras-chave: Fungos. Fitohormônio. Bioproduto.

Abstract

With high population growth amid technological development, a series of demands have also been growing for this evolution to occur in a sustainable way. Among these, it is possible to highlight the search for new substances that can be applied in the most varied sectors, such as pharmaceuticals, agrochemicals, the food industry, among others. In this scenario, microbial natural resources have presented themselves as a promising alternative. Thus, the present work aimed to evaluate the bioherbicidal potential of organic extracts obtained from cultivation on solid media of the fungus *Penicillium chrysogenum*. To produce the extracts, the fungus *P. chrysogenum* was cultivated on solid medium (rice) for a period of 30 days. Post cultivation, extracts were obtained by percolation using hexane and methanol. After concentration in a rotary evaporator under vacuum, the extracts were subjected to bioherbicide tests to evaluate their potential to inhibit the germination of *Brachiaria decumbens* seeds. The extracts were tested at concentrations of 0.50; 1.0; 1.5 and 2.0% (m/v). For a preliminary assessment of the chemical profile of the extracts, they were evaluated via high-performance liquid chromatography. From the germination percentages obtained in the bioassays, the hypothesis was raised that, contrary to what was expected, the extracts produced by *P. chrysogenum* have a phytohormonal effect, since the accumulated germination rates for the extracts increased with increasing concentration and for some treatments approaching or equaling the control. Among the extracts tested, hexane stood out with a germination rate of 30% at the highest concentration tested. Regarding the chemical profile, the extracts predominate polar substances with good absorption in the 254 nm region. Despite being preliminary, the results obtained motivate the carrying out of new tests in order to confirm the hypothesis that the extracts have a phytohormonal effect.

Keywords: Fungi. Phytohormone. Bioproduct

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos Geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
2.3 Hipótese.....	14
3 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	15
3.1 Penicillium chrysogenum.....	15
3.2 Brachiaria Decumbens.....	16
3.3 Agrotóxicos.....	17
3.4 Bioinsumo.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Reativação do microrganismo em BDA.....	19
4.2 Produção de extratos orgânicos	20
4.3 Perfil químico dos extratos.....	21
4.4 Ensaio Bioherbicida.....	21
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Perfil químico dos extratos.....	22
5.2 Avaliação do potencial bioherbicida.....	23
6 – CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Colônia de <i>P. chrysogenum</i> em meio de cultura BDA.....	20
Figura 2 – Imagens associadas à produção de extratos orgânicos a partir de <i>P. chrysogenum</i>	20
Figura 3 - Perfil cromatográfico do extrato hexânico de <i>P. chrysogenum</i> via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H ₂ O: ACN (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.....	22
Figura 4 - Perfil cromatográfico do extrato metanólico de <i>P. chrysogenum</i> via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H ₂ O: MeOH (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.....	23
Figura 5 - Avaliação do potencial bioherbicida de extratos de <i>P. chrysogenum</i>	23

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata, Dextrose, Ágar
GA	Germinação Acumulada
P.	Penicillium
B.	Brachiaria
FAQUIM	Faculdade de Química
UNIFESSPA	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
m/v	Massa/Volume

1 - INTRODUÇÃO

De acordo com a lei nº 6.938/81, que criou a Política Nacional de Meio Ambiente, são considerados recursos naturais os diversos componentes ecológicos da natureza, como as reservas hídricas (superficiais e subterrâneas), o solo, o mar territorial, a atmosfera e toda a diversidade biológica (BARBOSA et al., 2014).

A partir do solo, um dos sistemas mais explorados, é possível trabalhar diretamente com organismos vivos. Englobando desde organismos procarióticos, como bactérias e arqueias até os organismos eucarióticos, onde se destacam os fungos (CARDOSO., et al.,2016). Esses micro-organismos têm chamado bastante atenção por serem considerados produtores de substâncias de alto valor biotecnológico, se tornando alvo de pesquisa em países do mundo inteiro para possíveis aplicações em vários setores da sociedade, incluindo o agropecuário (CHAVES NETO et al., 2021).

Nessa perspectiva o presente trabalho busca no metabolismo de *Penicillium chrysogenum* substâncias com potencial bioherbicida para o controle da gramínea *Brachiaria decumbens*.

A *B. decumbens* é uma das principais forrageiras utilizada para a produção de ruminantes devido ao seu rápido crescimento e alta produção de matéria seca. Cerca de 95 milhões de hectares de pastagens cultivadas no Brasil são de *Brachiaria* spp., desse total, aproximadamente 25 milhões de hectares possuem *B. decumbens*. Apesar das várias vantagens da sua utilização, a *B. decumbens* está associada à ocorrência de surtos de fotossensibilização em diversas partes do mundo, o que motivou a seleção de suas sementes para a realização desta pesquisa.

Historicamente, o controle de plantas indesejáveis é feito a partir do uso de herbicidas sintéticos, que acabam por comprometer o meio ambiente e a saúde humana. Estudos toxicológicos demonstraram efeitos como alterações no DNA, câncer, ações teratogênicas e autismo (BOCCOLINI et., 2013; LEON et al., 2019; AGOSTINI et al., 2019; BEECHAM e SENEFF, 2016). Por outro lado, a utilização de insumos biologicamente ativos na agricultura, aliada ao desenvolvimento e utilização de técnicas de extração, purificação e identificação de metabólitos secundários de plantas bioativas são alternativas promissoras, o que justifica a realização deste trabalho.

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

O presente trabalho tem como objetivo contribuir com estudos voltados à busca de novas substâncias com potencial bioherbicida a partir da investigação do metabolismo de *P. chrysogenum*.

2.2 Objetivos específicos

Para tanto foi necessário:

- a) Reativação do fungo fitopatogênico *P. chrysogenum*;
- b) A produção de extratos orgânicos a partir do isolado fúngico;
- c) Estudo químico dos extratos por meio de técnicas cromatográficas;
- d) Avaliação do potencial bioherbicida a partir de ensaios de inibição da germinação de sementes de *Brachiaria*.

2.3 Hipóteses

Tendo em vista o problema geral e os objetivos colocados, levanta-se as seguintes hipóteses:

- a) Com aumento da concentração do extrato levaria a percentuais de germinação superiores aos obtidos.
- b) O número de dias de cultivo foi suficiente para avaliação do efeito dos extratos sobre a germinação das sementes assim estavam ávidas à germinação.
- c) Qual conclusão seria alcançada com um tratamento estatísticos dos dados encontrados.

3 – REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 *Penicillium chrysogenum*

Os fungos são popularmente conhecidos como bolores, mofos, leveduras, cogumelos-de-pau (champignons) e orelha-de-pau. São organismos eucariontes unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares que incorporam seus alimentos por absorção: as células do corpo dos fungos eliminam enzimas que digerem a matéria orgânica presente no meio, possibilitando sua absorção (BARBOSA et al., 2014). O corpo dos fungos multicelulares é formado por filamentos delgados chamados hifas, cujo conjunto forma um micélio (BARBOSA et al., 2014). Essas hifas geralmente se desenvolvem para fora do substrato, o que proporciona a dispersão dos esporos. Em várias espécies de fungos as hifas organizam-se em estruturas reprodutivas especiais chamadas de corpos de frutificação, onde ocorre a formação de esporos (BARBOSA et al., 2014).

Atualmente estima-se que o reino fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (OLIVEIRA, et al., 2010).

Os fungos são particularmente atraentes por utilizarem vias bioquímicas únicas e incomuns caracterizando-os como ferramenta potencial à produção de substâncias biologicamente ativas e inéditas pertencentes a diversas classes de produtos naturais bem como, espectro de atividades, tais como antibiótico, antioxidante, anticâncer, inseticida, herbicida, etc (FIERRO et al., 2022). Entre essa diversidade de fungos, o gênero *Penicillium* está entre os mais estudados (FIERRO et al., 2022).

O gênero *P. chrysogenum* é reconhecido como o fungo responsável pela era dos antibióticos, um marco que mudou profundamente o campo da medicina. Provavelmente nenhum outro microrganismo (e nenhum outro ser vivo) salvou mais vidas humanas na história do que este fungo filamentososo de cor verde azulada, superfície aveludada e fácil de disseminação. Há alguns anos, *P. chrysogenum* foi reclassificado e renomeado com o nome *P. Rubens* (FIERRO et al., 2022).

P. chrysogenum ainda mantém uma posição de liderança na indústria da biotecnologia farmacêutica e é um dos fungos sobre os quais mais pesquisas são realizadas atualmente, tendo se tornado um modelo para o estudo do metabolismo secundário e sua regulação (FIERRO et al., 2022).

Segundo Shaaban et al., 2023, a partir de pesquisas bibliográficas selecionadas no período de 2013 a 2023, 277 compostos foram identificados a partir de *P. chrysogenum*, que foi isolado como fungo endossimbiótico de diferentes organismos hospedeiros. Esses compostos apresentam atividades biológicas de grande valor para a indústria farmacêutica.

P. chrysogenum é reconhecido como produtor de substâncias, predominantemente pertencentes às classes dos terpenóides, alcalóides, policetídeos e esteróides (SHAABAN et al., 2023).

3.2 *Brachiaria Decumbens*

O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo de bovinos do mundo, apresentando 22,2% do rebanho mundial, perdendo apenas para a Índia. O Brasil possui cerca de 845 milhões de hectares, dos quais 177 milhões de hectares são ocupados por pastagens. A bovinocultura de corte no país tem nas pastagens a principal fonte de alimento para o rebanho e entre as forrageiras utilizadas destacam-se as gramíneas do gênero *Brachiaria* (MOREIRA et al., 2018).

As espécies de *Brachiaria*, originárias da África do Sul, são encontradas em regiões como Àsia, Austrália, além da América do Sul. Entre as várias espécies, *B. brizantha* e *B. decumbens* são as mais frequentemente cultivadas (MUSTAFÁ et al., 2012).

A *Brachiaria decumbens* é muito utilizada como forrageira devido ao seu rápido crescimento e alta produção de matéria seca. Cerca de 95 milhões de hectares de pastagens cultivadas no Brasil são de *Brachiaria* spp., desse total, aproximadamente 25 milhões de hectares possuem *B. decumbens* (BRUM et al., 2009), com isto a *Brachiaria* é a forrageira mais importante no Centro-Oeste, Sudeste e Norte do Brasil (RIET-CORREA et al., 2011). Apesar das várias vantagens da sua utilização, a *B. decumbens* está associada à ocorrência de surtos de fotossensibilização em diversas partes do mundo (SATURNINO et al., 2010). O primeiro registro de intoxicação por *Brachiaria* spp. na América do Sul ocorreu na Venezuela, onde 12 bezerros foram a óbito após a ingestão da planta (DÖBEREINER et al., 1976).

O princípio tóxico da braquiária é um componente da própria planta, identificado como sendo uma saponina litogênica, chamada de protodioscina, que causa hepatotoxicidade, obstrução de ductos biliares e fotossensibilização (MUSTAFA et al., 2012).

Fotossensibilização é uma dermatite que ocorre devido à sensibilidade exagerada das camadas superficiais da pele à luz. A fotossensibilização é classificada como primária ou secundária, sendo a última também conhecida como hepatógena (ROSSO, 2019). Os principais agentes fotossensibilizantes no Brasil são plantas e algumas micotoxinas que chegam à pele pela corrente sanguínea. Inicialmente, acreditava-se que o único agente causador da fotossensibilização hepatógena era o fungo *Pithomyces chartarum*, produtor da toxina esporidesmina mas, atualmente, sabe-se que a *B. decumbens* e a *B. brizantha* podem, também, causar a fotossensibilização (RAMOS et al., 2021).

A intoxicação por *B. decumbens* é descrita em bovinos (MOREIRA et al., 2018), ovinos (ALBERNAZ et al., 2010), equinos (MACEDO et al., 2006) e bubalinos (RIET-CORREA et al., 2010); e ocorre em qualquer época do ano (SATURNINO et al., 2010). A vasta capacidade de disseminação e produção de biomassa mesmo em solos pobres tornaram esta gramínea de grande importância para pecuária brasileira, superando as limitações da fotossensibilização em ruminantes.

Associados à preocupação com a saúde dos ruminantes estão os problemas ambientais relacionados com uso de herbicidas para o combate a essa gramínea. Este fato motiva a busca de herbicidas naturais utilizando sementes desta forrageira como modelo em testes de controle de germinação, objetivo desta pesquisa (RIET-CORREA et al., 2001).

3.3 Agrotóxicos

A utilização excessiva de agrotóxicos na agricultura vem sendo considerado um agente significativo na contaminação do solo, das águas e do ar devido à sua toxicidade e o aumento crescente de seus teores encontrados no ambiente (SILVÉRIO et al., 2012). Supõe-se que apenas 30% do total de agrotóxico fica na planta. Os resultados desfavoráveis desses produtos nos ecossistemas naturais e cultivados abrangem, além da contaminação do ambiente, a modificação da microbiologia do solo, a morte de polinizadores e de organismos que são capazes de controlar as populações de pragas e prejuízos às lavouras (FREITAS E PINHEIRO, 2010). Os fertilizantes químicos, se utilizados excessivamente, também ocasionam impactos significativos no ambiente, sendo capaz de levar à eutrofização de cursos d'água, lagos e mananciais, acidificação dos solos, contaminação de aquíferos, geração de gases relacionados ao efeito estufa e estrago da camada de ozônio (SAMBUICHI et al., 2012).

Desse modo, os efeitos gerados no solo podem causar impactos nas águas superficiais e subsuperficiais e, estas, por sua vez, podem afetar a fauna e os seres humanos. De acordo com Silvério et al., (2012), o aproveitamento dessas águas ou suas reutilizações na agricultura podem suceder em riscos à saúde pública, além da contaminação de recursos naturais.

A venda total desses produtos foi de 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos, o que representa um aumento de 10,51% nas vendas internas de agrotóxicos “Químicos e Bioquímicos” em relação a 2019. Foram identificados 309 ingredientes ativos, químicos e bioquímicos, sendo os dez mais comercializados: Glifosato; 2,4-D; Mancozebe; Atrazina; Acefato; Clorotalonil; Malationa; Enxofre; Imidacloprido e Clorpirifós (IBAMA, et al., 2022).

Informações sobre as quantidades de produto usadas e suas tendências ao longo do tempo podem auxiliar na tomada de decisões regulatórias, no direcionamento da fiscalização e em decisões sobre investimentos, estudos e pesquisas para registro de alternativas menos impactantes (IBAMA, et al., 2022).

Alguns países têm alterado suas políticas para desencorajar o uso de produtos químicos e promover bioinsumos (AJMAL et al., 2018). Há um esforço internacional no sentido de organizar as ações de incentivo a bioinsumos, dentre elas: harmonizar conceitos, propor testes necessários para registro, estimular novos processos de registros que considerem as multifuncionalidades dos bioinsumos, adequar marcos regulatórios e normativos, instituir linhas de fomento ao desenvolvimento dos bioinsumos (VIDAL et al., 2020).

3.4. Bioinsumo

Bioinsumos, também conhecidos como insumos biológicos, são produtos de origem biológica formulado com microrganismos (por exemplo, bactérias, fungos, nematoides e vírus) ou com compostos bioativos microbianos ou plantas, que limitam ou reduzem as populações de pragas, ou são utilizados para melhorar a produtividade, a qualidade e a saúde das plantas ou as características biológicas do solo (MARCHESI; FILIPPONE, et al., 2018; SAMADA; TAMBUNAN, et al., 2020). Os bioinsumos podem vir de uma grande diversidade de organismos e muitos produtos já foram lançados e registrados no mercado agrícola (SAMADA; TAMBUNAN, et al., 2020).

Os bioinsumos exercem um papel fundamental na proteção da cultura, especialmente em áreas onde a resistência a pesticidas, nichos de mercado e preocupações ambientais limitam o uso de agrotóxicos. Os bioinsumos mais comumente usados são organismos vivos, patogênicos para a praga de interesse. O crescente interesse no uso de bioinsumos pode estar relacionado aos benefícios associados: i) benefício ecológico; eles são menos tóxicos e prejudiciais do que os pesticidas convencionais, reduzindo assim a exposição dos consumidores aos pesticidas regulamentados; ii) especificidade de alvo; projetado para afetar apenas a praga alvo e organismos intimamente relacionados, em contraste com os pesticidas convencionais que podem afetar outros organismos diferentes, como pássaros, insetos e mamíferos; iii) ambientalmente benéfico; muitas vezes são eficazes em pequenas quantidades, decompõem-se rapidamente, resultando em menor exposição e efeitos adversos limitados no meio ambiente, flora e fauna e evitando problemas de poluição e; iv) adequação; reduz muito o uso de pesticidas convencionais quando usados como um componente de programas de manejo e controle de pragas, enquanto os rendimentos das colheitas permanecem altos (ABBEY et al., 2019).

Os bioinsumos constituem hoje uma nova promessa tecnológica que abre a possibilidade de reconciliar interesses dentro do âmbito agrícola, oferecendo soluções inovadoras para responder a um crescimento cada vez maior por parte dos consumidores e setor produtivo que exigem mudanças ao uso expressivo de agrotóxicos (VIDAL et al., 2020).

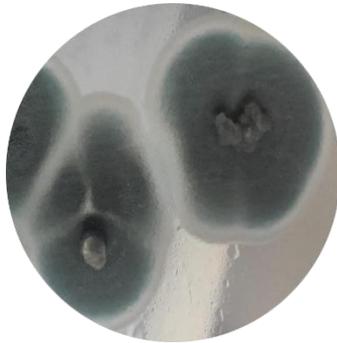
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reativação do microrganismo em BDA.

Para realização deste trabalho a cepa de *P. chrysogenum* (CML 2705) (Figura 1) adquirido do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras foi reativado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar).

O meio de cultura BDA tem a seguinte recomendação para o preparo de 1 L de meio de cultura: 300g de batata inglesa, 20 g de dextrose e 15 g de ágar. A batata foi cozida e ao caldo adicionados a dextrose e o ágar (MALDANER et al., n.d.). Esse meio de cultura foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos (YANG et al., 2009). Em seguida, o meio BDA foi levado para capela de fluxo laminar e vertido em placas de Petri esterilizadas. Discos de micélios da linhagem fúngica foram inoculados nas placas de Petri contendo meio e incubados a uma temperatura de 27°C.

Figura 1: Colônia de *P. chrysogenum* em meio de cultura BDA.



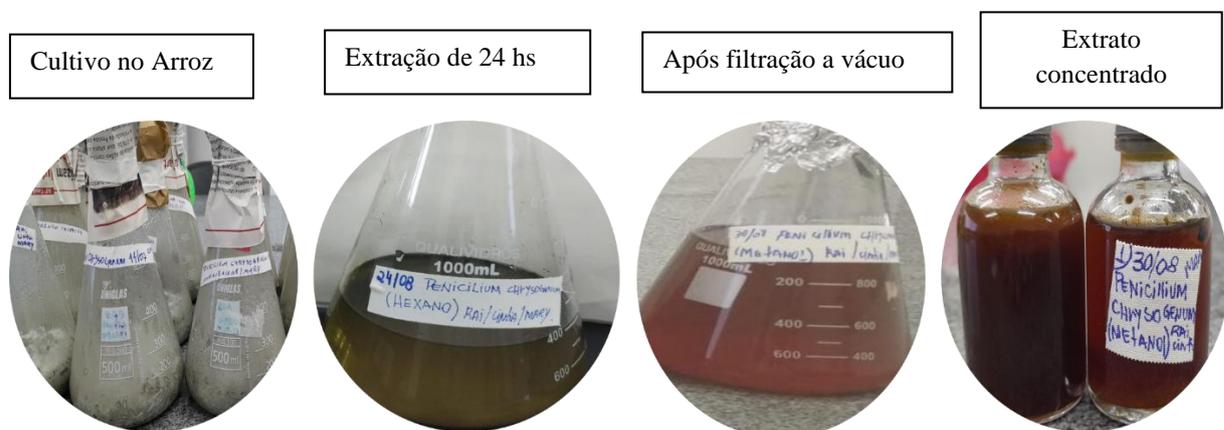
Fonte: 2024

4.2 Produção de extratos orgânicos

Os microcultivos foram realizados em meio sólido. Para o cultivo em arroz foram utilizados 1,5 kg do cereal distribuídos uniformemente em 15 Erlenmeyers de 500 mL, 100g de cereal a cada Erlenmeyer, juntamente com 30 mL de água destilada. Os frascos vedados foram autoclavados por 45 minutos a temperatura de 121°C. Ao atingir a temperatura ambiente, fragmentos de micélio fúngico foram inoculados nos frascos em ambiente estéril e em seguida foram incubados a 27 °C por 30 dias sob condições estáticas.

Após o período de incubação, foi acrescentado hexânico e metanol aos Erlenmeyeres; com 24 horas de extração os sistemas foram submetidos à filtração e concentração a vácuo resultando nos extratos diclorometano e metanólico. Na figura 2 observam-se imagens associadas à produção dos extratos.

Figura 2: Imagem representativa das atividades de produção de extratos orgânicos a partir de *P. chrysogenum*.



Fonte: 2024

4.3 Perfil químico dos extratos

Os extratos foram submetidos à análise cromatográfica de alta eficiência. A separação cromatográfica foi desenvolvida em temperatura de 30°C em uma coluna Shim-Pack C18 (250 x 4,6 mm, 5µm), volume de injeção de 25 µL e sistemas de fase móvel: (A) H₂O e (B) (5% - 100%) em 60 minutos e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A fase móvel orgânica (B) consistiu de acetonitrila para análise do perfil cromatográfico do extrato diclometano e metanol para análise do extrato metanólico.

4.4 Ensaio Bioherbicida

Para a realização do bioensaio, ambos os extratos foram submetidos aos mesmos tratamentos. Os extratos hexânico e metanol foram homogeneizados em metano e água, respectivamente para a composição dos tratamentos. Os experimentos consistiram de seis tratamentos cada: controle água destilada; controle hexano; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (m/v). O controle hexano foi estabelecido aplicando 5 mL do referido solvente em placas de Petri contendo papel de germinação, e após 24 h umedecido com 1 mL de água destilada e adição de 20 sementes do capim *B. decumbens*, a fim de se descartar o efeito do solvente nos tratamentos. O controle água consistiu apenas de água destilada e as sementes do capim em um sistema semelhante.

As sementes de capim *B. decumbens* foram dispostas sobre papel de germinação do tipo mata-borrão em caixas gerbox (capacidade 250 mL, medida 11 x 11 x 3,5 cm). O papel de germinação foi umedecido com a solução respectiva de cada tratamento em um volume de 5 mL por repetição, sendo reaplicados 1 mL de água destilada a cada três dias para evitar a desidratação. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Cada repetição consistiu de uma caixa do tipo gerbox com 20 sementes de *B. decumbens*. Os testes foram realizados em sala de crescimento climatizada, com temperatura controlada de 25 °C ± 2 e fotoperíodo de 12 horas. Foram feitas contagens diárias da germinação e o potencial germinativo foi avaliado através das da germinação acumulada. Na figura x imagens do experimento realizado.

Germinação acumulada – Adaptado de Brasil (2013), foi realizada a contagem ao final de 10 dias após a incubação, com o resultado expresso em porcentagem. Para fins de padronização, neste trabalho foi convencionado como germinada a semente que emitiu a radícula com no mínimo 2 mm de comprimento; Sementes mortas – Realizada

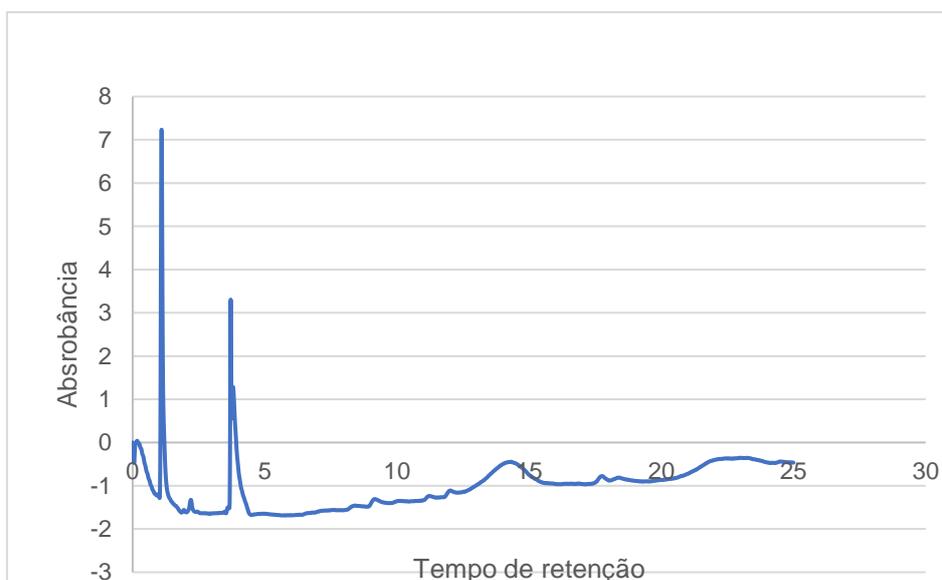
concomitantemente com a germinação acumulada, sendo que as sementes que não germinaram, foram classificadas como mortas. O resultado foi expresso em porcentagem.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico dos extratos

Para uma avaliação preliminar do perfil químico dos extratos de *P. chrysogenum*, amostras na concentração de 1mg/mL foram analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com o perfil cromatográfico observado (Figuras 4 e 5) é possível destacar algumas observações: são poucas as substâncias dotadas de cromóforos, uma vez que são poucos os picos registrados nos cromatogramas para os extratos analisados (hexano e metanol); as substâncias dotadas de cromóforos têm pouca afinidade com a fase estacionária, uma vez que a maioria dos picos situam-se entre 0 e 15 minutos; o metanol foi o solvente que melhor extraiu as substâncias com detecção via arranjo de diodos; As substância detectadas têm melhor absorção no comprimento de onda 254 nm.

Figura 3: Perfil cromatográfico do extrato hexânico de *P. chrysogenum* via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H₂O: ACN (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.



Fonte: 2024

Figura 4: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de *P. chrysogenum* via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H₂O: MeOH (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.



Fonte: 2024

5.2 Avaliação do potencial bioherbicida

Nos testes a partir dos extratos hexânico e metanólico foi observado percentuais de inibição da germinação inversamente correlacionados com o aumento da concentração testada, ou seja, quanto maior a concentração, menor o percentual de inibição, o que levou à conclusão de que os extratos fúngicos possuem algum efeito estimulante à germinação das sementes que poderia estar associado à produção de fitohormônios.

Ao analisar a tabela 1, o extrato hexânico se destaca apresentando percentual de germinação de 30% na maior concentração testada (2 % m/v). Acompanhando os resultados da GA, a mortalidade foi decrescente com o aumento da concentração do extrato.

Figura 5: Avaliação do potencial bioherbicida de extratos de *P. chrysogenum*.



Fonte: 2024

A partir dos dados obtidos conclui-se que os extratos não poderiam ser aplicados na perspectiva dos bioherbicidas e apesar de que são motivadores na perspectiva de fitohormônios os dados obtidos para o controle ditam a necessidade de realização de um novo experimento. Os dados de germinação acumulada esperados para o controle se aproximam de 100 %, no entanto estes não superaram os 40%.

Tabela 1: Avaliação da germinação do *capim B. decumbens* em exposição aos extratos de *P. Chrysogenum* em diferentes concentrações (%). GA = Germinação acumulada.

GA					
	Controle	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
Metanol	26,87	14,37	18,75	25	26,87
Hexano	40,31	8,75	22,5	18,75	30,0
Mortas					
	Controle	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
Metanol	73,12	85,63	81,25	75	73,13
Hexano	59,69	91,25	77,5	81,25	70

Dias e Alves (2008) realizaram um estudo de viabilidade das sementes de *B. Brizantha* e concluíram que as há variação de 15 a 28 dias para germinação de suas sementes. Este é dado que reforça a necessidade de realização de um novo experimento. Não foram encontrados dados referentes à viabilidade para a espécie *B. decumbens*.

6 – CONCLUSÃO

Em busca de recursos naturais com potencial aplicação como bioherbicida, foram produzidos cultivos microbianos a partir de *P. chrysogenum* e a partir destes foram obtidos extratos hexânicos e metanólicos. Os extratos foram avaliados quanto ao potencial para inibir a germinação do capim *B. decumbens*. A partir dos obtidos, ao contrário do esperado, observou-se que os extratos possuem efeito estimulante à germinação das sementes de *B. decumbens*. Além disso, o baixo percentual de germinação medido para os controles sugere a necessidade de novos bioensaios.

No que se refere as análises de perfil químico dos extratos via CLAE/DAD, nesses predominam substâncias de alta polaridade com melhor absorção na região de 254 nm.

Apesar de preliminares, os resultados incentivam a realização de estudos mais aprofundados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, L.; [ABBEY](#), J.; [LEKE-ALADEKOBA](#), A.; [IHESHIULO](#), E. M.; [IJENYO](#), M. “**Biopesticides and biofertilizers: types, production, benefits, and utilization**”. Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels. NJ, USA, pp. 479–500, 2019.

ALBERNAZ, T. T.; SILVEIRA, J. A. S.; SILVA, N. S.; OLIVEIRA, C. H. S.; REIS, A. S. B.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. **Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará**. Pesquisa Veterinária Brasileira. 30(9), 741-748, 2010.

BARBOSA, Rildo Pereira **Recursos naturais e biodiversidade: prevenção e conservação dos ecossistemas** / Rildo Pereira Barbosa, Viviane Japiassú Viana. --1. ed. -- São Paulo: Érica, 2014.

CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira, **Microbiologia do solo [recurso eletrônico]** / Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e Fernando Dini Andreote. – 2. Ed. – Piracicaba : ESALQ, 2016.

DELGADO, Liliana F. ; BARBEDO Claudio J. **Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica**. Av. Miguel Stéfano, 3.687, CEP: 0431-012, São Paulo-SP. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04301-012 São Paulo, SP. Bolsista CNPq. Revista Brasileira de Sementes, vol. 33, nº 3 p. 463 - 471, 2011.

FIERRO, F.; Vaca, I.; Castillo, N.I.; García-Rico, R.O.; Chávez, R. **Penicillium chrysogenum, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology**. *Microorganisms* 2022, 10, 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030573>

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros**. *Oecologia Australis* 14(1), 282-298, 2010.

IBAMA. Relatório de comercialização de agrotóxicos. 2022.

MAGUIRE, J. D. **Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor**. *Crop Science*, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAIA, LC., and CARVALHO JUNIOR, AA. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, RC., org., et al. **INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Available from SciELO Books .

MALDANER, J. M. N. Oliveira; F. S. Silva; L. E. P. Lima; D. A. Santos, Silva, S. Y. S.; Silva, S. C.; S. L. Goulart, WENDEL, MARIA VITÓRIA; G. P. K. Steffen1 ; R. M. de Moraes1 ; C. W. Saldanha; E. L. Missio / **Centro de Pesquisa em Florestas/ Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agrocuária do Rio Grande do Sul**, 97001- 970, Santa Maria-RS, Brasil -

Faculdade de Química, UNIFESSPA, 68505-080, Marabá-PA, Brasil Programa de Pós Graduação em Química, UNIFESSPA, 68505-080, Marabá-PA, Brasil Universidade Federal Rural da Amazônia. 68515-000Parauapebas-PA, Brasil.

MARCHESE, A. M.; FILIPPONE, M. P. **Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible**. Rev. Agron. Noroeste Argent. v. 38, n. 1, p. 9-21, 2018.

MOREIRA, N.; MARTIN, C. C.; HILGERT, A. R.; TOSTES, R. A.; VIOTT, A. De M. **Surto de fotossensibilização hepatógena em bovinos por ingestão de *Brachiaria decumbens* no município de cascavel** – PR. Archives of Veterinary Science, 23 (1), 52-62, 2018

MOREIRA, N.; MARTIN, C. C.; HILGERT, A. R.; TOSTES, R. A.; VIOTT, A. De M. **Surto de fotossensibilização hepatógena em bovinos por ingestão de *Brachiaria decumbens* no município de cascavel** – PR. Archives of Veterinary Science, 23 (1), 52-62, 2018.

MUSTAFA, V. S.; Augusto Ricardo Coelho MOSCARDINI, A. R. C.; BORGES, J. R. J.; RECKZIEGEL, G. C.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, M. B. **Intoxicação natural por *Brachiaria spp.* em ovinos no Brasil Central**. Pesq. Vet. Bras. 32(12),1272-1280, 2012.

OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos. Mestrado (dissertação)**. Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Manaus – AM, 2010.

PRATA, Fabio.; Arquimedes Lavorenti.; Rev. biociênc., Taubaté, v.6, n.2, p.17-22, jul.-dez.2000.

RAMOS, D. S.; DREYER, C. T.; SCHMIDT, V. **Hepatogenous photosensitization caused by *Brachiaria brizantha* cv. Marandu in sheep in Rio Grande do Sul: case report**. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, 4(1), 1240-1246, 2021.

RAWAN Shaaban · Mohamed S. Elnaggar · Noha Khalil · Abdel Nasser B. Singab/
Department of Pharmacognosy and Medicinal Plants, Faculty of Pharmacy, Future University in Egypt, Cairo 11835, Egypt. Archives of Microbiology (2023) 205:240

RIET-CORREA, B.; CASTRO, M.B.; LEMOS, R.A.A. et al. ***Brachiaria spp.* poisoning of ruminants in Brazil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 31(3), 183-192, 2011.

RIET-CORREA, F.; e Medeiros, M.T. Rosane et al. **Palestra apresentada no XXI Congresso Mundial de Buiatria realizado em Punta Del Este, Uruguai, de 4 a 8 de dezembro de 2000**. Pesq. Vet. Bras. 21(1):00-00, jan./mar. 2001

ROSSO, G. **Identificação rápida de casos de fotossensibilização no rebanho diminui prejuízos do pecuarista**. Embrapa Pecuária Sudeste.

SAMADA, L. H.; TAMBUNAN, U. S. F. **Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status**. Journal of Biological Sciences, 20(2), 66–76, 2020.

SAMBUICHI, R. H. R.; OLIVEIRA, M. A. C.; SILVA, A. P. M.; LUEDEMANN, G. **Sustentabilidade ambiental da agropecuária brasileira: impactos, políticas públicas e desafios**. Brasília: Ipea, 1-47, 2012.

SANTANA, D.G.; RANAL, M.A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: UnB, 2004. 247p.

SATURNINO, K.C.; MARIANI, T.M.; BARBOSA-FERREIRA, M. et al. **Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.3, p.195-202, 2010.

SHAABAN, Rawan · Mohamed S. Elnaggar · Noha Khalil · Abdel Nasser B. Singab./ **Department of Pharmacognosy and Medicinal Plants, Faculty of Pharmacy, Future University in Egypt, Cairo 11835, Egypt**. Received: 29 March 2023 / Revised: 20 April 2023 / Accepted: 5 May 2023 / Published online: 17 May 2023 © The Author(s) 2023.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. **Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência**. Química Nova, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012.

VIDAL, M. C.; SALDANHA, R.; VERISSIMO, M. A. A. **Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável**. In: GINDRI, D. M.; MOREIRA, P.A.B.; VERISSIMO, M. A. A. (org). Sanidade Vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável. Florianópolis: Governador do Estado de Santa Catarina, p. 382-410, 2020.

YANG DJ, Zhang TQ, Zhang KF, Greenwood DJ, Hammond JP, White PJ. **An easily implemented agro-hydrological procedure with dynamic root simulation for water transfer in the crop-soil system: validation and application**. J Hydrol. 2009;370:177-90. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.03.005>.