



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

FACULDADE DE QUÍMICA

RAIANE BARROS ARAÚJO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Penicillium paradoxum*

MARABÁ

2024

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

A663e Araújo, Raiane Barros
 Estudo químico e biológico de *Penicillium paradoxum* /
 Raiane Barros Araújo. — 2024.
 27 f.: il. (algumas color).

Orientador (a): Marilene Nunes Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura Plena em Química, Marabá, 2024.

1. Fitoquímicos. 2. Química vegetal. 3. Bioherbicida. 4. Bioquímica – análise. I. Oliveira, Marilene Nunes, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 572.51

RAIANE BARROS ARAÚJO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Penicillium paradoxum*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para 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

RAIANE BARROS ARAÚJO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Penicillium paradoxum*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciatura 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 – Orientadora - FAQUIM/ICE/UNIFESSPA

Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva – Membro- FAQUIM/ICE/UNIFESSPA

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva – Membro - FAQUIM/ICE/UNIFESSPA

Dedico esta monografia aos meus familiares que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar e realizar os meus sonhos profissionais nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustentou e ajudou a ultrapassar todos os obstáculos ao longo do curso.

Aos meus pais, irmão e minha avó, por todo apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho, sem eles nada disso seria possível pois foram anos de lutas e contratempos.

Ao meu namorado, Eduardo Reis, pela paciência e por todo incentivo nos momentos mais difíceis, por compreender e ajudar na trajetória.

A minha melhor amiga Andréa Moreira, por estar ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este curso.

A minha amiga e dupla Cinthia Mendes, que atuou comigo na pesquisa e desenvolvimento deste trabalho, assim como em outras fases do curso como companheira de estágio, estudos e na vida acadêmica.

Agradeço imensamente a minha orientadora Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira, que me acolheu e me permitiu entrar para o grupo dela, onde pude recomeçar e ser direcionada a uma nova linha de pesquisa.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e dedicarem seu tempo a correção deste trabalho.

RESUMO

A rica biodiversidade amazônica é um reservatório precioso de bioprodutos e pode abrigar a solução para vários problemas da sociedade moderna, como o uso excessivo de pesticidas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial bioherbicida de extratos produzidos por *Penicillium paradoxum* (I1CXS1C1), isolado de rejeito de mineração. A partir de cultivo em meio arroz foram produzidos os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico. Todos os extratos foram submetidos a bioensaios visando à inibição da germinação de sementes de *Brachiara decumbens*. Os experimentos foram realizados em um período de 10 dias, fotoperíodo de 12 h e temperatura em torno de 25 °C. Para cada extrato foram preparadas soluções em diferentes concentrações (m/v) de acordo com os tratamentos de interesse: 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0 % (m/v). O experimento foi conduzido na presença de controle água, hexano, diclorometano e metanol. Para avaliação preliminar do perfil químico dos extratos, estes foram submetidos à análise cromatográfica de alta eficiência. A partir dos bioensaios realizados, ao contrário do esperado, a maioria dos tratamentos favoreceu a germinação das sementes, com destaque ao extrato hexânico com taxa de germinação acumulada em 53,75%, sendo superior a todas as taxas registradas para os controles. Em se tratando do perfil químico dos extratos, nestes predominam substâncias polares com boa absorção na faixa de 254 nm. Apesar de preliminares, os resultados observados motivam a realização de novos ensaios na perspectiva de comprovação do efeito fitohormonal dos extratos.

Palavras-chave: Fitohormônio. Bioprodutos. *Penicillium*

ABSTRACT

The rich Amazonian biodiversity is a precious reservoir of bioproducts and may contain the solution to several problems in modern society, such as the excessive use of pesticides. In this context, the objective of this work was to evaluate the bioherbicidal potential of extracts produced by *Penicillium paradoxum* (I1CXS1C1), isolated from mining waste. From cultivation in rice medium, hexane, dichloromethane and methanolic extracts were produced. All extracts were subjected to bioassays aimed at inhibiting the germination of *Brachiara decumbens* seeds. The experiments were carried out over a period of 10 days, a 12-hour photoperiod and a temperature around 25 °C. For each extract, solutions were prepared in different concentrations (m/v) according to the treatments of interest: 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0% (m/v). The experiment was conducted in the presence of water, hexane, dichloromethane and methanol controls. For preliminary evaluation of the chemical profile of the extracts, they were subjected to high-performance chromatographic analysis. From the bioassays carried out, contrary to expectations, the majority of treatments favored seed germination, with emphasis on the hexane extract with an accumulated germination rate of 53.75%, being higher than all rates recorded for controls. When it comes to the chemical profile of the extracts, polar substances with good absorption in the 254 nm range predominate. Despite being preliminary, the results observed motivate the carrying out of new tests with a view to proving the phytohormonal effect of the extracts.

Keywords: Phytohormone. Bioproducts. *Penicillium*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivos Geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	13
3.1 Fungos.....	13
3.2 Características, importância e diversidade química de fungos do gênero <i>Penicillium</i> ...	14
3.3 <i>Brachiaria decumbens</i>	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Reativação do microrganismo em BDA.....	17
4.2 Produção de extratos orgânicos.....	18
4.3 Perfil químico dos extratos.....	18
4.4 Ensaio Bioherbicida.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Perfil químico dos extratos.....	20
5.2 Avaliação do potencial bioherbicida.....	22
6 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem das características macromorfológicas de <i>P. paradoxum</i>	17
Figura 2 - Imagens do microcultivo e obtenção dos extratos.....	18
Figura 3 - Imagens do ensaio biohebicida.....	20
Figura 4 -Perfil cromatográfico do extrato hexânico de <i>P. paradoxum</i> via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H ₂ O: ACN (5-100 %). Comprimento de onda 254nm.....	21
Figura 5 - Perfil cromatográfico do extrato diclorometano de <i>P. paradoxum</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.....	21
Figura 6 - Perfil cromatográfico do extrato metanólico de <i>P. paradoxum</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.....	22
Tabela 1: Germinação das sementes <i>B. decumbens</i> em exposição aos extratos de <i>P. paradoxum</i> em diferentes concentrações (%). GA = Germinação acumulada.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata, Dextrose, Ágar
GA	Germinação Acumulada
P.	<i>Penicillium</i>
B.	<i>Brachiaria</i>
FAQUIM	Faculdade de Química
UNIFESSPA	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.
IICXS1C1	<i>Penicillium Paradoxum</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CLAE	A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

1 INTRODUÇÃO

A natureza é uma fonte inesgotável de moléculas complexas e únicas, que não podem ser criadas em laboratório. Essa diversidade química é um tesouro para a descoberta de novas moléculas bioativas com um vasto potencial de aplicação que abrange vários setores da sociedade moderna (SILPA et al., 2018).

Historicamente, a partir de 1940, os cientistas passaram a isolar, identificar e sintetizar substâncias presentes em organismos vivos, como bactérias, fungos, plantas e animais, isso resultou na descoberta de uma infinidade de compostos com propriedades biológicas diversas como antitumoral, inseticida, herbicida, antioxidante, entre outros (KUMAR e TEWARI, 2018).

Atualmente, entre os recursos naturais, alvos às descobertas de substâncias com propriedades biológicas úteis, os fungos têm se destacado devido a sua grande versatilidade (FARPHA et al., 2019). Os fungos são reconhecidos pela produção de uma variedade de substâncias pertencentes às classes dos alcalóides, antraquinonas, terpenos, lactonas, flavonóides, ácidos orgânicos, entre outros (CHAPLA et al., 2013).

Na maioria das vezes o combate às espécies vegetais indesejadas se dá com uso de herbicidas sintéticos, no entanto, o custo ambiental devido ao uso indiscriminado dessas substâncias é enorme, pois desfavorece a estabilidade ecológica de sistemas naturais, contaminando e empobrecendo o solo e as águas subterrâneas (OOTANI et al., 2013 REICHERT JÚNIOR, 2017). Além disso, os efeitos sobre a saúde humana são desastrosos. 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.

Nesse contexto, o presente trabalho busca no metabolismo de *Penicillium paradoxum*, substâncias capazes de controlar a germinação de *Brachiaria decumbens* na perspectiva de propor um recurso natural potencial à produção de um bioherbicida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Geral

O presente trabalho tem como objetivo contribuir com estudos voltados à busca de bioherbicidas investigando extratos produzidos por *P. paradoxum* (I1CXS1C1).

2.2 – Objetivos específicos

Para realização do presente trabalho foi necessário:

- a) Reativação do fungo *P. paradoxum*, isolado de rejeitos de mineração;
- b) Obter os extratos orgânicos a partir de cultivo em meio de arroz;
- c) Analisar os extratos por meio de cromatografia líquida e de alta eficiência (CLAE).
- d) Desenvolvimento de métodos que atestem a aplicação das substâncias como bioherbicida.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Fungos

Os fungos são organismos que constituem um diverso e abundante grupo de seres vivos pertencente ao domínio Eukaria e ao reino Fungi. Destacam-se, sobretudo, por serem exímios decompositores de uma ampla gama de substratos, sendo essenciais para a cadeia alimentar e para diversos segmentos econômicos, devido as inúmeras enzimas extracelulares produzidas durante seu processo de digestão (AFONSO; SIMÕES E LIMA, 2021).

Segundo Tortora (2017) os fungos são seres eucarióticos que podem ser unicelulares, no caso das leveduras, ou multicelulares como os filamentosos. São quimio heterotróficos, pois usam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono por meio do processo de absorção. São amplamente distribuídos geograficamente, podendo ser encontrados em ambientes que compreendem desde o ar, a água, o solo, plantas e outros seres vivos, até locais hostis com temperatura e pH extremos, altas pressões osmóticas e elevadas concentrações de substâncias tóxicas (BALTAZAR, 2018).

A classificação dos fungos está em constante evolução, sendo reconhecidos atualmente sete filos: Basidiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Blastocladiomycota,

Neocallimastigomycota, Chytridiomycota e o Ascomycota, que corresponde por aproximadamente 75% de todos os fungos descritos na literatura. Dentre os indivíduos pertencentes a este filo encontram-se os fungos filamentosos do gênero *Penicillium* que é constantemente citado na literatura devido seu potencial biotecnológico (DONIZETE *et al.*, 2015).

3.2 Características, importância e diversidade química de fungos do gênero *Penicillium*

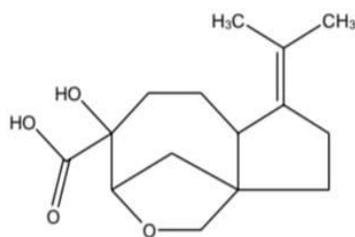
O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez em 1809, por Link que o nomeou desta forma devido as semelhanças dos conidióforos (estruturas reprodutivas assexuadas) dos organismos estudados com uma “escova”. Nesta data, realizou-se a descrição das três primeiras espécies do gênero: *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. Expansum* (VISAGIE *et al.*, 2014). Entretanto, somente em 1928, quando o médico escocês Alexander Fleming, descobriu por acaso a penicilina, um poderoso antibiótico natural, o gênero voltou a tomar evidência, direcionando os olhares da comunidade científica para o seu metabolismo secundário (TORTORA, 2017). Atualmente, o gênero possui ocorrência mundial, contabilizando 429 espécies válidas e reconhecidas pela Comissão Internacional de *Penicillium* e *Aspergillus* - ICPA (ASHTEKAR *et al.*, 2021). De acordo com Pirotta *et al.* (2015), os indivíduos do gênero *Penicillium* são capazes de sobreviver em uma variada gama de ambientes, que compreendem desde o solo até o ar, a água e diversos produtos alimentícios, podendo ser isolado também como endofítico, nos tecidos de várias plantas.

Segundo Tortora (2017) os fungos do gênero *Penicillium*, são caracterizados como filamentosos, visto que são formados por hifas, que consistem em filamentos alongados de células conectadas, que podem se estender por grandes proporções e quando sofrem fragmentações, podem se alongar formando uma nova hifa.

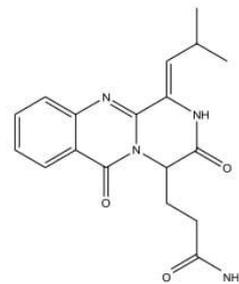
Para Houbraken, Vries e Samson (2014) a ocorrência deste gênero é mais comum em ambientes tropicais e sub-tropicais e suas colônias caracterizam-se por apresentarem crescimento rápido e cores diversas, podendo variar de acordo com a espécie e outros fatores como a restrição de nutrientes ou variações na temperatura, iluminação e umidade. Dentre as cores mais comuns destacam-se o verde, o cinza, o verde-azulado, o rosa, o amarelo e algumas vezes o branco, sobretudo no início do crescimento. No que tange a textura das colônias, estas podem assemelhar-se a algodão, ou veludo, podendo também ter aspecto felpudo, ou semelhante a um pó espalhado (ASHTEKAR *et al.*, 2021).

Várias espécies deste gênero são amplamente relatadas na literatura como produtoras de micotoxinas que provocam patologias em plantas, frutas e animais. Entretanto, com o avanço das pesquisas em produtos naturais, inúmeras substâncias biologicamente ativas como alcalóides, terpenos, policetonas, esteróides, macrólídeos, e enzimas também têm sido isoladas a partir deste gênero, tornando-o uma importante fonte de produtos bioativos com propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais dentre outras (LOTFY *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2022).

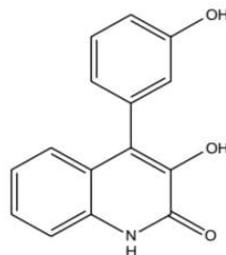
No estudo realizado por Boulis *et al.*, (2020), foram obtidas nove substâncias produzidas por uma cepa de *Penicillium sp.* isolada de ambiente marinho, dentre estas, encontram-se o ácido aspérico (1), um sesquiterpeno com atividade antimicrobiana, que apresentou zona de inibição de 10 mm aurantiomida C (2) para *Staphylococcus aureus* e 18 mm para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, e o veridicatol (3), dois alcalóides com potencial antioxidante, com valores máximos de atividade sequestrante DPPH de 75,26% e 42,29%, respectivamente, e o β -sitosterol (4), um esteróide com propriedade antibiofilme bacteriano, com o valor máximo de inibição de 64% para o biofilme de *S. aureus*.



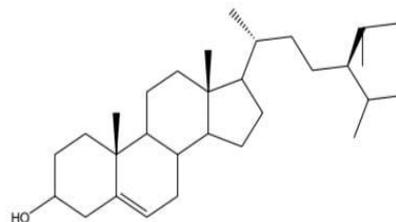
Ácido aspérico (1)



Aurantiomida C (2)



Veridicatol (3)



β -Sitosterol (4)

Em virtude dos registros já publicados, pesquisas voltadas ao estudo do perfil químicos de microrganismos do gênero *Penicillium*, tornam-se essenciais, uma vez que estes são excelentes

fontes de novas substâncias, com possíveis aplicações biotecnológicas, podendo gerar produtos capazes de proporcionar melhorias na qualidade de vida da população em geral e avanços significativos em diversos segmentos econômicos (BOULIS *et al.*, 2020).

3.3 *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 *Brachiaria* 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).

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.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reativação do microrganismo em BDA.

Para realização deste trabalho a cepa de *P. paradoxum* - I1CX51C1 (Figura 1), isolado de rejeitos da mineração pelo grupo de pesquisa em química de Produtos Naturais da Unifesspa, e identificado tomando como base em suas características macro e micromorfológicas pelo Biólogo Ulisses Brigatto Albino, foi reativado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose 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 agar. A batata foi cozida e ao caldo adicionados a dextrose e o agar. Esse meio de cultura foi esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos (YANG et al., 2009). Em seguida, o meio 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 em uma B.O.D.

Figura 1: Imagem das características macromorfológicas de *P. paradoxum*.



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 na BOD a 27 °C por 30 dias sob condições estáticas.

Após o período de incubação, foi acrescentado hexano, diclorometano e metanol aos Erlenmeyeres; com 24 horas de extração os sistemas foram submetidos à filtração e concentração a vácuo no rotaevaporador, resultando nos extratos hexânico, diclorometano e metanólico. Na figura 2 é possível observar imagens associadas as etapas do microcultivo e obtenção dos extratos.

Figura 2: Imagens do microcultivo e obtenção dos extratos.



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.

4.4 Ensaio Bioherbicida

Para a realização do bioensaio, os extratos foram submetidos aos mesmos tratamentos. Os extratos hexânico, diclorometano e metanol foram homogeneizados em diclorometano e água, respectivamente para a composição dos tratamentos. Os experimentos consistiram em 7 tratamentos cada: controle água destilada; controle hexano, controle diclorometano, controle metanol; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (m/v). Os controles foram estabelecidos aplicando 5 mL dos referidos solventes: hexânico, diclorometano e metanólico, 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 laboratório climatizada, com temperatura controlada de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas. Foram feitas contagens diárias da germinação e o potencial germinativo foi avaliado através das seguintes variáveis:

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.

Índice de velocidade de germinação (IVG) – Determinado através de contagens diárias da germinação durante 10 dias. Os valores obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ (MAGUIRE, 1962; MALDANER et al., 2023); onde, IVG = índice de velocidade de germinação; G1, G2.... Gn = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem; N1, N2,... Nn = número de dias da semeadura à primeira, segunda e última contagem;

Tempo médio de germinação (TMG) – Calculado pela fórmula $TMG = (G1N1+G2N2+G3N3+\dots+GiNi) / (G1+G2+G3+\dots+Gi)$, onde: TMG = tempo médio de

germinação; G= número de plântulas germinadas observadas em cada dia de contagem; N= número de dias da sementeira a cada contagem (SANTANA e RANAL, 2004). Na figura 3 é possível observar imagens associadas ao protocolo do bioensaio.

Figura 3: Imagens do ensaio bioherbicida com o fungo *P. paradoxum*.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico dos extratos

Para uma avaliação preliminar do perfil químico dos extratos de *P. paradoxum*, amostras na concentração de 1mg/mL foram analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com o perfil cromatográfico (Figuras 4, 5 e 6) é possível destacar que: são poucas as substâncias dotadas de cromóforos, uma vez que são poucos os picos registrados nos cromatogramas para os extratos analisados (hexano, dicloro 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 10 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 4: Perfil cromatográfico do extrato hexânico de *P. paradoxum* via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H₂O: ACN (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.



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



Figura 6: Perfil cromatográfico do extrato metanólico de *P. paradoxum* via cromatografia líquida de alta eficiência, modo de eluição gradiente exploratório, fase móvel H₂O: MeOH (5 – 100 %). Comprimento de onda 254 nm.



5.2 Avaliação do potencial bioherbicida

Nos testes a partir dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico foi observado de modo predominante que os extratos são potenciais fitohormônios, uma vez que ao comparar os dados obtidos para os controles, foi observado um estímulo à germinação das sementes, em especial nos bioensaios com os extratos diclorometano e metanol. Em se tratando dos testes com o extrato hexânico não foi observada regularidade nos efeitos dos extratos.

Ao analisar a tabela 1, o extrato metanólico se destaca apresentando percentual de germinação de 53, 75% na menor concentração testada (0,5 % m/v). Acompanhando os resultados da GA, a mortalidade foi crescente com o aumento da concentração do extrato.

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 41%. Assim, nascem novas hipóteses: O número de dias de cultivo foi suficiente para avaliação do efeito dos extratos sobre a germinação das sementes? As sementes estavam ávidas à germinação? Qual conclusão seria alcançada com um tratamento estatísticos dos dados encontrados?

Tabela 1: Germinação das sementes *B. decumbens* em exposição aos extratos de *P. paradoxum* em diferentes concentrações (%). GA = Germinação acumulada.

GA					
	controle	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
DICLORO	15,10	36,5	2,5	28,75	21,25
METANOL	26,87	53,75	48,75	45	33,75
HEXANO	40,31	53,75	32,5	46,25	33,75

MORTAS					
	controle	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
DICLORO	84,90	63,5	97,5	71,25	78,75
METANOL	73,13	46,25	51,25	55	66,25
HEXANO	59,69	46,25	67,5	53,75	66,25

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. Esses dados são motivam a realização de novos bioensaios na perspectiva de produção de fitohormônios, uma vez que no presente trabalho foram observados percentuais de germinação superiores a 50% em período de 10 dias de ensaio.

Vale destacar que 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. paradoxum* e a partir destes foram obtidos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico. 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 algum efeito estimulante à germinação das sementes. 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

- 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.
- BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M. B. et al. **Steroid saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages.** Ciência Rural, 39, 1, 279-281, 2009.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais.** Revista Virtual de Química, 5 (3), 421-437, 2013.
- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; MONTEIRO, M.C.C. et al. **Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 11, 87-94, 1976.
- HARVEY, R.A. **Microbiologia Ilustrada.** Artmed, 2ª Edição., 368 p., 2007
- KUMAR, R.; TEWARI, A.K. **Isolation of medicinally important constituents from rare and exotic medicinal plants.** In Synthesis of Medicinal Agents from Plants; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 229–256, 2018.
- MACEDO, M. F.; BEZERRA, M. B.; BLANCO, B.S. **Fotossensibilização em animais de produção na região semiárida do Rio Grande do Norte.** Arquivos do Instituto Biológico.,73, 251-254, 2006.
- 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.
- 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.
- 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.

RIET-CORREA, B.; RIET-CORREA, F.; OLIVEIRA, C. A. J. et al. **Alterações histológicas em fígados e linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) mantidos em pastagens de *Brachiaria* spp.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 9, 705-711, 2010.

ROSSO, G. **Identificação rápida de casos de fotossensibilização no rebanho diminui prejuízos do pecuarista.** Embrapa Pecuária Sudeste. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47795453/identificacao-rapida-de-casos-de-fotossensibilizacao-no-rebanho-diminui-prejuizos-do-pecuarista>. Acessado em 14/02/2024.

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.

SILPA, P.; ROOPA, K.; THOMAS, T.D. **Production of Plant Secondary Metabolites: Current Status and Future Prospects.** In Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants; Springer Science and Business Media LLC: Cham, Switzerland, 3–25, 2018.