
ECOLOGIA

JULLYANA SANTOS ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS
FÚNGICOS BIOATIVOS NA GERMINAÇÃO E
ALONGAMENTO DE RADÍCULAS DE PLANTAS**

JULLYANA SANTOS ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS FÚNGICOS
BIOATIVOS NA GERMINAÇÃO E ALONGAMENTO DE RADÍCULAS
DE PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

Orientadora Prof. Dr. Daiane Cristina Sass

Coorientadora Gabrielle Vieira

Rio Claro
2021

A345a	Albuquerque, Jullyana Santos Avaliação da toxicidade de extratos fúngicos bioativos na germinação e alongamento de radículas de plantas / Jullyana Santos Albuquerque. -- Rio Claro, 2021 26 f. : il., tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Daiane Cristina Sass Coorientadora: Gabrielle Vieira 1. Ecologia. 2. Microbiologia. 3. Fitopatologia. 4. Extratos fúngicos. 5. Germinação. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

JULLYANA SANTOS ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS FÚNGICOS
BIOATIVOS NA GERMINAÇÃO E ALONGAMENTO DE RADÍCULAS
DE PLANTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Daiane Cristina Sass (orientador)

Profa. Dra. Gabrielle Vieira (coorientador)

Profa. Dra. Antônia Marli dos Santos

Prof. Dr. Vitor Rodrigues Marin

Aprovado em: 28 de Janeiro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura da orientadora



Assinatura do(a) coorientadora

RESUMO

Bactérias do gênero *Xanthomonas* afetam culturas agrícolas de grande importância econômica no Brasil e seu controle é realizado pela aplicação de produtos químicos, que causam impactos negativos no meio ambiente e saúde humana. Sendo assim, a busca por alternativas sustentáveis ao combate de pragas agrícolas é de suma importância. Uma possível alternativa é a aplicação de metabólitos secundários naturais provenientes de fungos da Antártica com ação antimicrobiana. Neste contexto, este projeto teve como objetivo avaliar a potencial atividade de metabólitos secundários obtidos de fungos provenientes da Antártica (solo e mar) contra *Xanthomonas* patogênicas das culturas de tomate e frutas cítricas. Os fungos serão submetidos ao processo de crescimento em meio de cultura líquido malte 2% e agitação em *shaker*, seguido de extração com solvente acetato de etila para a obtenção de extratos contendo metabólitos secundários. Os extratos serão submetidos ao teste REMA para avaliação da atividade antibacteriana observando-se a concentração indicada à inibição de células bacterianas do gênero *Xanthomonas* (1,5mg/ml). Em seguida, será feita a diluição do extrato com etanol 100% e os extratos serão colocados em papéis filtro submetidos ao teste com sementes de alface, tomate e rúcula, de modo que o etanol evapore e o extrato permaneça no bioensaio. Após 10 dias na BOD a fotoperíodo de 12 horas, serão contadas o número de germinações das sementes e será feita a medição para avaliar a fitotoxicidade do extrato. De maneira geral, os extratos 8E e 14E apresentaram os resultados mais interessantes, não apresentando fitotoxicidade elevada e até mesmo promovendo o crescimento radicular em sementes de rúcula e tomate.

Palavras chave: *Xanthomonas*. Fitopatologia. Extratos fúngicos. Germinação

ABSTRACT

Bacteria of the *Xanthomonas* genus affect agricultural crops of great economic importance in Brazil and their control is carried out through the use of chemical products, which cause negative impacts on the environment and human health. Therefore, the search for sustainable alternatives to combat agricultural pests is of paramount importance. A possible alternative is the application of secondary natural metabolites from Antarctic fungi with antimicrobial action, as they are natural products. In this context, this project aims to evaluate the potential activity of secondary metabolites obtained from fungi from Antarctica (soil and sea) against pathogenic *Xanthomonas* of tomato and citrus fruit crops. The fungi will be submitted to the growth process in 2% malt liquid culture medium and shaking in a shaker, followed by extraction with ethyl acetate solvent to obtain extracts containing secondary metabolites. The extracts will be submitted to the REMA test to evaluate the antibacterial activity, observing the concentration indicated for the inhibition of bacterial cells of the genus *Xanthomonas* (1.5mg/ml). Then, the extract will be diluted with 100% ethanol and the extracts will be placed on filter papers submitted to the test with lettuce, tomato and arugula seeds, so that the ethanol evaporates and the extract remains in the bioassay. After 10 days in BOD at 12-hour photoperiod, the number of seed germinations will be counted and measurement will be taken to assess the phytotoxicity of the extract. In general, extracts 8E and 14E showed more interesting results, not showing high phytotoxicity and even promoting root growth in rocket and tomato seeds.

Key words: *Xanthomonas*. Phytopathology. Fungal extracts. Germination.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Recursos Microbianos	8
3.2 Produção de Extratos Bioativos	9
3.3 Bioatividade dos Extratos	9
3.4 Ensaio de fitotoxicidade em sementes	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Produção de Extratos Bioativos	12
4.2 Bioatividade dos Extratos	13
4.3 Ensaio de fitotoxicidade em sementes	15
5 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

Os solos férteis e clima tropical propiciam o desenvolvimento da agricultura e colocam o Brasil entre os principais produtores e fornecedores mundiais de alimentos. Todavia, inúmeras doenças e pragas agrícolas limitam a produção e prejudicam todo o setor do agronegócio. Dentre as fitopatologias que acometem as plantações e que resultam em sérios prejuízos econômicos e de produtividade, encontram-se aquelas causadas por bactérias do gênero *Xanthomonas*, que são bactérias fitopatogênicas responsáveis por doenças em diversas espécies vegetais economicamente importantes (ENCHEVA et al., 2015; NEDIALKOVA, 2005; MONCHEVA et al., 2002) (Figura 1).

FIGURA 1. CANCRO CÍTRICO EM FRUTO



(Fundecitrus, 2017).

No Brasil muitas doenças causadas por *Xanthomonas* afetam culturas de grande importância econômica e social tais como: citros, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar (RYAN et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2012). O controle destas infecções causadas por diversos patovares de *Xanthomonas* tem sido geralmente realizado por adição de produtos químicos à base de cobre, erradicação de plantas contaminadas e uso de variedades resistentes (SANCHES et al., 2014; LOPES e QUEZADO-SOARES, 2000; TEIXEIRA 1994). Porém, estas medidas têm sido ineficientes, devido à acumulação de material químico no ambiente, suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e perdas de área plantada.

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle a espécies de *Xanthomonas* que visam substituir os produtos químicos sintéticos e ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente, nosso grupo de pesquisa tem se empenhado em buscar extratos metabólicos de fungos com potencial ação contra *Xanthomonas* de importância para a agricultura brasileira.

Recentemente encontramos 30 linhagens de fungos (*Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Cadophora*, *Paraconiothyrium* e *Toxicocladosporium*), isoladas do solo e de ambiente marinho da Antártica, produtoras de extratos com atividade antibacteriana contra pelo menos uma das seguintes espécies de *Xanthomonas*: *X. citri* subsp. *citri*, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. euvesicatoria* que causam doenças respectivamente em citros, maracujá e tomate (PURIC, et al., 2018; VIEIRA, et al., 2018). Demonstrando assim a capacidade destes micro-organismos em produzir compostos com potencial ação contra *Xanthomonas*.

Entretanto, ainda há a necessidade de realizar vários estudos adicionais destes extratos para verificar a viabilidade da utilização destes na agricultura. Dentre estes estudos, destacam-se as avaliações toxicológicas, pois mesmo se tratando de produtos naturais, ele próprio ou o excesso dessas substâncias podem ser potencialmente prejudiciais ao homem e ao habitat em que estas substâncias serão manipuladas.

A avaliação da toxicidade do composto a partir da germinação e crescimento de plantas é um dos mais importantes critérios utilizados pelas agências ambientais para avaliar a fitotoxicidade de uma substância (TAVARES et al., 2011; OECD, 1994; TIQUIA et al., 1996). Os efeitos biológicos de substâncias podem ser avaliados por meio de diversos organismos, dentre estes, plantas vasculares permitem que efeitos em germinação e desenvolvimento das plântulas sejam avaliados nos primeiros dias do desenvolvimento vegetal (Lewis, 1995). O biensaio da toxicidade de sementes de plantas permite avaliar a toxicidade aguda após a exposição a compostos presentes no substrato por meio do processo de germinação e desenvolvimento das plântulas durante os primeiros dias de crescimento. Assim, a análise dos efeitos fitotoxicológicos baseia-se na inibição da germinação e no desenvolvimento da radícula (TAVARES et al., 2011).

É importante salientar que durante o processo de germinação, em especial nos primeiros dias de desenvolvimento da plântula, ocorrem inúmeros processos fisiológicos nos quais a presença de uma substância tóxica pode interferir, afetando a sobrevivência e o desenvolvimento normal da plântula, que nesta fase possui elevada sensibilidade a fatores externos adversos (CASTILLO MORALES, 2004). Além disso, o uso de sementes em bioensaios para análise de fitotoxicidade é bastante promissor por ser de baixo custo, fácil manejo, rápida execução e alta sensibilidade (BRITO-PELEGRINI et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Dessa maneira, o presente projeto realizou avaliações fitotoxicológicas dos extratos bioativos produzidos por fungos da Antártica em trabalhos já desenvolvidos em nosso laboratório, a fim de verificar a viabilidades destes extratos para utilização na agricultura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Recursos microbianos

Fungos filamentosos isolados de amostras de solo abaixo de madeira podre coletados na Ilha Deception, Antártica por Alysson Wagner Fernandes Duarte sob orientação da Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) realizada em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS) e isolados de sedimentos marinhos coletados em diversos locais na Antártica durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015) no âmbito do projeto PROANTAR/CNPq intitulado "A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção - MICROSFERA" sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari (IO/USP) com ação antibacteriana em *Xanthomonas* previamente observada foram reativados e tiveram seus metabólitos extraídos para avaliação de fitotoxicidade em sementes.

Testes de ação antimicrobiana foram conduzidos em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri* – Xac), causadora do cancro cítrico, cedida pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da UNESP Rio Claro; *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (*X. passiflorae* – Xap) isolado LM4a, responsável pela bacteriose do maracujá; e *Xanthomonas euvesicatoria* (*X. euvesicatoria* – Xae) isolado IBSBF1387, agente causador da mancha-bacteriana no tomate e pimentão, ambos cedidos pela Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Carneiro Vieira da ESALQ/USP.

As bactérias foram mantidas em criopreservação em ultra freezer a -80 °C e os fungos em criopreservação em geladeira pelo método Castellani.

3.2. Produção de extratos bioativos

Os fungos foram reativados em meio de cultivo Ágar Malte 2% (20 g de extrato de malte/L) e incubados a 15 °C por 7 dias. Após o período de incubação, 3 plugs de aproximadamente 0,5 mm contendo ágar mais micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido Malte 2% e incubados por 20 dias a 15 °C e 150 rpm. Em seguida, a biomassa foi retirada por filtração à vácuo para extração dos metabólitos dissolvidos no sobrenadante.

O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila (2 partes de acetato de etila : 1 parte de sobrenadante) em liquidificador industrial, seguida da separação entre fase orgânica e fase aquosa em funil de separação. O acetato de etila foi removido da fração orgânica por evaporação em rotaevaporador com banho-maria a 35 °C e os extratos secos em concentrador de amostras por pressão de ar. A massa de cada extrato foi determinada por pesagem e uma solução estoque de 30 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% foi preparada para confirmação da bioatividade dos extratos através de ensaio de viabilidade celular e o extrato seco restante foi armazenado em geladeira a 10 °C.

3.3. Bioatividade dos extratos

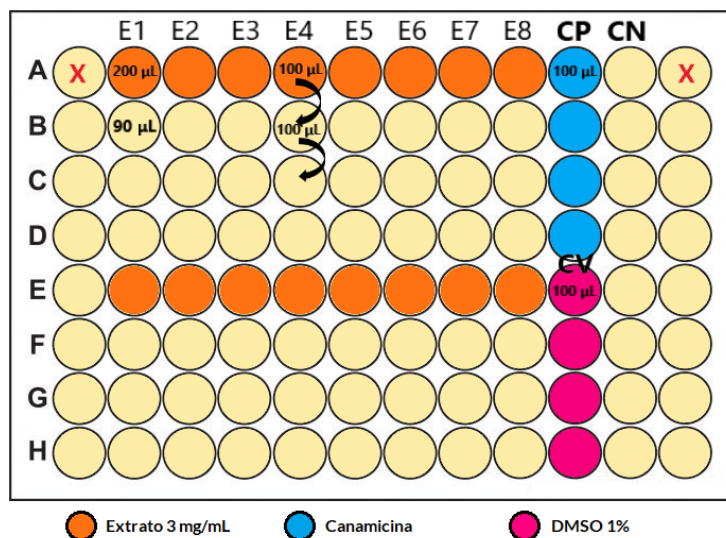
Os extratos foram submetidos à ensaio de viabilidade celular contra três espécies de *Xanthomonas*: *X. citri*, *X. passiflorae* e *X. euvesicatoria* pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) que utiliza como indicador o corante azul de baixa fluorescência resazurina, que na presença de células viáveis (metabolismo - NADH/NAD⁺), é reduzido a resorufina, um corante rosa altamente fluorescente em vermelho.

O teste foi executado em microplaca de 96 poços onde extratos e os controles positivo (CP), de veículo (CV) e negativo (CN) foram avaliados. Cada extratos foi avaliado em 4 concentrações diferentes por microdiluição: 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,750 mg/mL e 0,375 mg/mL. Canamicina foi usada como CP em concentração de 20 µg/mL, DMSO 1% foi usado como CV e meio de cultivo NYG (0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona bacteriológica e 2 mL/L de glicerol) com inóculo foi o CN.

O ensaio seguiu a metodologia descrita por Silva e Ferreira (2013) com adaptações: adicionou-se 200 µL de extrato na concentração de 3 mg/mL nos poços de 2 a 9 das linhas A e E da microplaca. Nos quatro primeiros poços da coluna 10 adicionou-se 100 µL de canamicina (CP) em NYG e nos quatro últimos, 100 µL de DMSO 1% (CV) em NYG. Nos demais poços adicionou-se 90 µL de NYG. A partir do extrato concentrado foi feita uma microdiluição para as concentrações de 1,5 mg/mL, 0,750 mg/mL e 0,375 mg/mL. As colunas 1 e 12 não foram

utilizadas para evitar evaporação dos compostos. Após montagem da placa o inóculo bacteriano foi adicionado. Um pré-inóculo foi preparado com uma alçada de bactérias em 25 mL de NYG e mantido em agitação de 200 rpm overnight a 29°C até D.O.₆₀₀:0,8. O pré-inóculo foi diluído 1:10 em NYG e 10 µL foram adicionados aos poços contendo os extratos e os controles (Figura 2).

FIGURA2. DISPOSIÇÃO DE EXTRATOS E CONTROLES EM MICROPLACA PARA REMA.



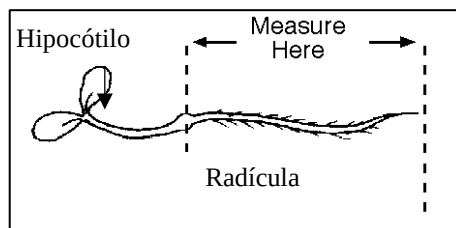
A microplaca foi incubada por 18h à 29 °C e em seguida, 15 µL de resazurina 0,01% foi adicionada e a microplaca novamente incubada nas mesmas condições por 1h30min. A fluorescência das amostras foi medida em leitor de microplacas usando um espectrômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD. A partir dos valores de unidades de fluorescência (UF), foi calculada a porcentagem de inibição pela fórmula:

$$\frac{UF \text{ média de CN} - UF \text{ do extrato}}{UF \text{ média de CN}} * 100$$

3.4. Ensaio de fitotoxicidade em sementes

Para avaliação da toxicidade em sementes foram realizados bioensaios com sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Eruca sativa* (rúcula) e *Solanum lycopersicum* (tomate) (PELEGRINI et al., 2006; RAS, 2009). Em cada bioensaio os seguintes parâmetros foram avaliados: Germinação de sementes (G), Comprimento do Hipocótilo (Hip) e Comprimento da Radícula (R) (Figura 3).

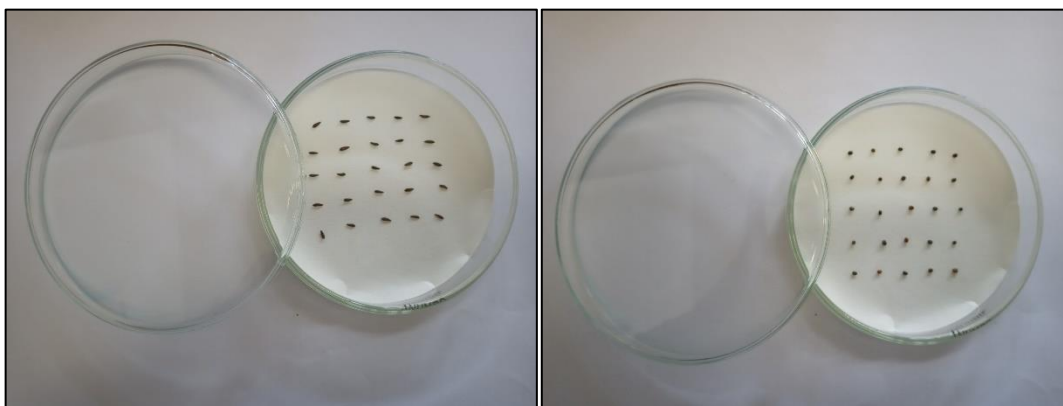
FIGURA 3. ESQUEMA PARA MEDIÇÃO DO COMPRIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA EM SEMENTES.



Os testes foram realizados com 100 sementes dispostas em 4 Placas de Petri (90 x 15 mm) para cada tratamento e controles (Figura 4). Os extratos foram diluídos em etanol 100% para concentração de 1,5 mg/mL e 1ml do extrato foi aplicado sobre 2 folhas de papel filtro autoclavado por placa. As placas foram mantidas abertas dentro de câmara de fluxo laminar para evaporação do etanol e em seguida, 3ml de água destilada foram adicionados para umedecimento.

As sementes foram incubadas por 10 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12h e o papel filtro regado com 1ml de água destilada quando necessário. Além dos extratos, foram aplicados tratamentos controle utilizando Água Destilada como Controle Negativo (CN), Sulfato de Zinco 1M como Controle Positivo (CP) e Etanol como Controle do Veículo (CV).

FIGURA 4. ENSAIO DE FITOTOXICIDADE. SEMENTES DE ALFACE (ESQUERDA) E RÚCULA (DIREITA).



A partir dos dados obtidos foi calculado o Índice de Germinação (IG) e o Índice de Crescimento Radicular (ICR) para cada extrato nas três sementes conforme as equações abaixo:

$$\text{Índice de Crescimento Radicular (ICR)} = \frac{CRA}{CRCN}$$

Onde:

CRA: Comprimento da Radícula na Amostra

CRCN: Comprimento da Radícula no Controle Negativo

$$\text{Índice de Germinação (\%)} = ICR * \frac{SGA}{SGCN} * 100$$

Onde:

ICR: Índice de Crescimento Radicular

SGA: Número de Sementes Germinadas na Amostra

SGCN: Número de Sementes Germinadas no Controle Negativo

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Produção de extratos bioativos

Os isolados reativados para produção de bioativos são apresentados na Tabela 1. Quatro fungos foram isolados de solo abaixo de madeira podre (SMP) e nove foram isolados de sedimentos marinhos, totalizando 13 extratos de fungos filamentosos avaliados.

TABELA 1. EXTRATOS PRODUZIDOS E ORIGEM DOS ISOLADOS

Isolado	Origem	Identificação
3MP	SMP ¹ Ilha Deception	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
6MP	SMP ¹ Ilha Deception	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
CMP	SMP ¹ Ilha Deception	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
FMP	SMP ¹ Ilha Deception	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
5E	SM ² Punta Ullman	<i>Penicillium</i> sp.
8E	SM ² Refugio 2	<i>Penicillium</i> sp.
13E	SM ² EACF Estação Brasileira	<i>Cadophora</i> sp.
14E	SM ² Botany Point	<i>Penicillium</i> sp.
18E	SM ² EACF Estação Brasileira	<i>Cadophora</i> sp.
38E	SM ²	<i>Penicillium</i> sp.
39E	SM ²	<i>Penicillium</i> sp.
40E	SM ² Botany Point	<i>Penicillium</i> sp.

41E	SM ²	<i>Penicillium</i> sp.
44E	SM ²	<i>Penicillium</i> sp.

EACF Estação Brasileira

¹SMP: Solo abaixo de Madeira Podre; ²SM: Sedimentos Marinhos.

4.2. Bioatividade dos extratos

Em estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo, foram considerados positivos apenas extratos que inibiram mais de 90% do crescimento dos fitopatógenos alvo. Para esse trabalho, foram considerados positivos os extratos que inibiram mais de 90% o crescimento de *Xanthomonas* quando na concentração de 3 mg/mL e os extratos que mostraram ação antimicrobiana acima de 70% na concentração de 1,5 mg/mL e acima de 40% em 0,75 mg/mL e 0,375 mg/mL. O valor de corte foi modificado pois o teste é realizado com extrato bruto e, portanto, quando em menores concentrações a quantidade do composto bioativo provavelmente é muito menor. A Tabela 2 traz os resultados do bioensaio nas três *Xanthomonas*: *X. citri*, *X. euvesicatoria* e *X. passiflorae*.

TABELA 2. ATIVIDADE DOS EXTRATOS EM *Xanthomonas* spp.

Extrato	Fitopatógeno	Concentração (mg/mL)			
		3,0	1,5	0,75	0,375
3MP	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
6MP	<i>X. citri</i>	+	-	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	+	-
CMP	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	-	-	-	-
FMP	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	-	-	-	-
5E	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	-	-	-
8E	<i>X. citri</i>	+	+	+	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	-	-

13E	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
14E	<i>X. citri</i>	+	+	+	+
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	+	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	+	+
18E	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
38E	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	-	-	-
39E	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
40E	<i>X. citri</i>	+	+	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	-	-	-
41E	<i>X. citri</i>	+	-	-	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	+	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	+	-	-
44E	<i>X. citri</i>	+	+	+	-
	<i>X. euvesicatoria</i>	-	-	-	-
	<i>X. passiflorae</i>	+	-	-	-
Controles					
CP [20 µg/mL]	<i>X. citri</i>	+			
	<i>X. euvesicatoria</i>	+			
	<i>X. passiflorae</i>	+			
CV [1%]	<i>X. citri</i>	-			
	<i>X. euvesicatoria</i>	-			
	<i>X. passiflorae</i>	-			

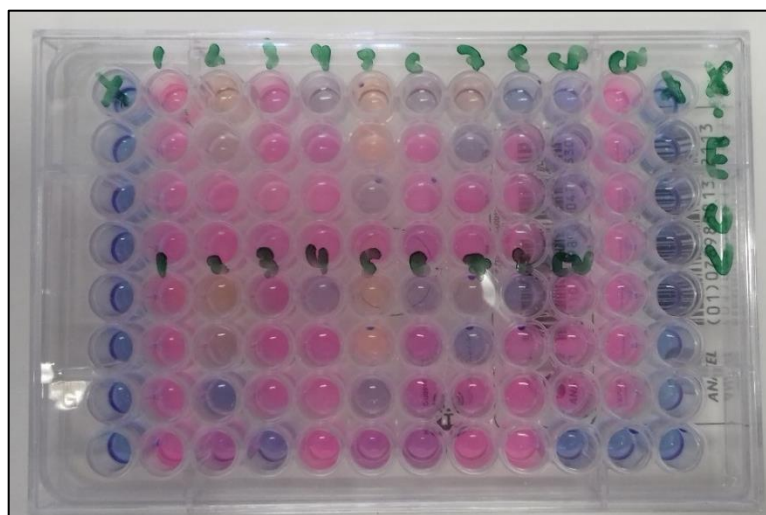
(+): positivo para inibição; (-): negativo para inibição.

Os novos extratos produzidos apresentaram atividade semelhante aos estudos anteriormente realizados, mostrando que o método de conservação utilizado para as linhagens de fungos filamentos, o método Castellani (CASTELLANI, 1939), além de um método simples,

preserva os isolados de maneira que não ocorre contaminação. O método de extração líquido-líquido com acetato de etila mostra sua estabilidade, sendo capaz de extrair provavelmente os mesmos compostos presentes no meio líquido. Os métodos de retirada de solvente, secagem e condicionamento dos extratos também conservaram os extratos até o momento de sua aplicação.

A Figura 5 mostra um exemplar de microplaca onde foi realizado o REMA com *X. euvesicatoria*. Em alguns casos, o extrato reagiu com o corante resazurina, porém não foi detectada fluorescência no leitor de placas. Antes da adição do corante na placa, foi observado que não havia turbidez, indicativo do crescimento bacteriano, como pôde ser observado nos controles CN e CV. Assim, os dados obtidos foram utilizados de forma qualitativa para o crescimento bacteriano. Provavelmente os extratos que reagiram com resazurina apresentam elementos acidificados em sua composição, assim, embora o REMA seja um excelente método para triagem de extratos, devido à sua simplicidade, é importante que outros testes sejam realizados para agregar aos seus resultados. Devido à essa ocorrência, os extratos serão reavaliados utilizando como método a contagem de colônias, que pode oferecer resultados mais precisos de inibição.

FIGURA 5. MICROPLACA REMA PARA BIOENSAIO. ATIVIDADE DE 8 EXTRATOS EM 4 CONCENTRAÇÕES CONTRA *X. euvesicatoria*.



A partir dos resultados obtidos, a concentração dos extratos para o ensaio de toxicidade foi determinada em 1,5 mg/mL, nessa concentração pelo menos uma das espécies de *Xanthomonas* teve seu crescimento inibido.

4.3. Ensaio de fitotoxicidade em sementes

Inicialmente, os extratos testados em sementes foram dissolvidos em DMSO 1%, no entanto o DMSO mostrou-se extremamente tóxico para a germinação das sementes. Foi

realizada uma tentativa de dissolução dos extratos em água, no entanto, não houve uma boa dissolução e os extratos adquiriram um aspecto turvo. O mesmo ocorreu quando etanol 10% foi utilizado como veículo e por isso, após testes para determinação de um novo veículo, etanol 100% foi selecionado para dissolução dos extratos (Figura 6). A toxicidade dos extratos foi avaliada em 1,5 mg/mL.

FIGURA 2. EXTRATOS DISSOLVIDOS EM ETANOL PARA TESTE DE TOXICIDADE.



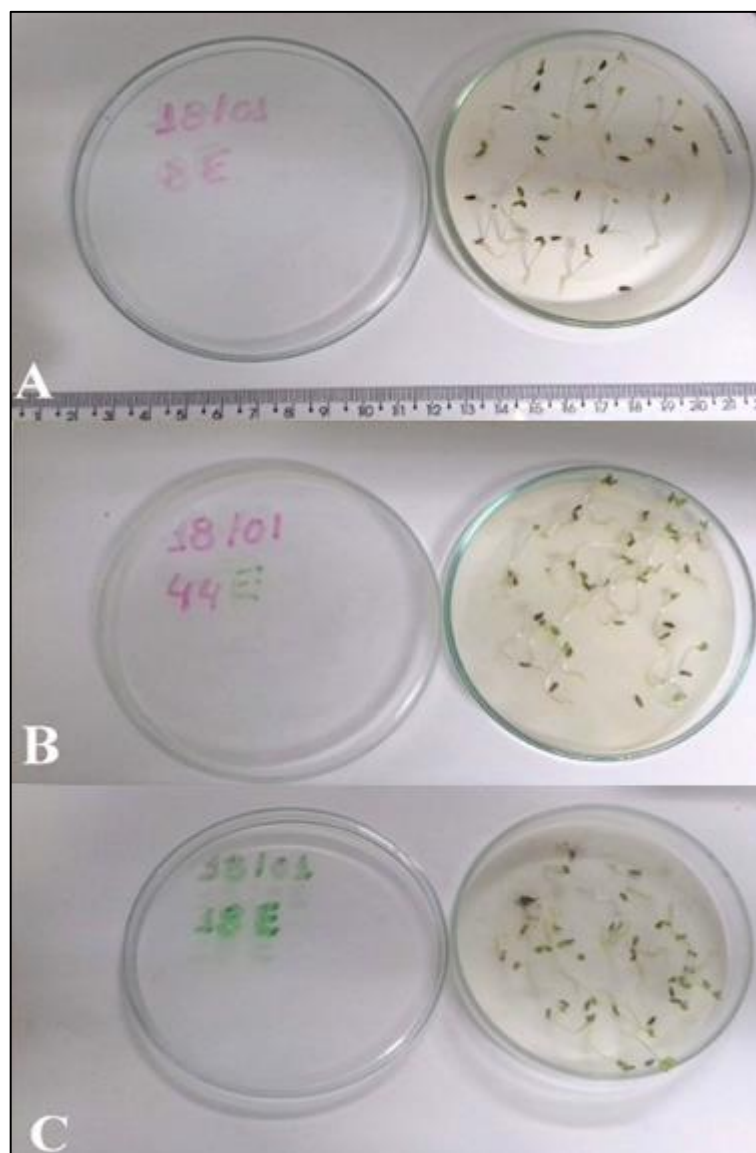
A Tabela 3 traz os dados de cada tipo de semente utilizada nos testes e a Figura 7 mostra como as sementes foram dispostas em placas de Petri para germinação. O comprimento do hipocótilo e das radículas foi medido com auxílio de uma régua e foram consideradas germinadas sementes cujo comprimento médio das radículas foi igual ou superior a 5 mm.

Utilizou-se para determinação da toxicidade dos extratos os valores empregados de Young et al. (2012), onde uma amostra com IG abaixo de 80% é considerada tóxica, taxas acima de 120% são consideradas estimulantes para o crescimento radicular e valores entre 80% e 120% se referem à efeitos não significativos.

TABELA 3. INFORMAÇÕES DAS SEMENTES UTILIZADAS PARA ENSAIO DE FITOTOXICIDADE.

Semente	Marca	Lote	Germinação (%)	Pureza (%)
<i>Lactuca sativa</i>	ISLA PAK	116353-002-S2	86	99,6
<i>Eruca sativa</i>	FELTRIN	0079701710000030	97	100,0
<i>Solanum lycopersicum</i>	ISLA	124921-004-S2	87	99,8

FIGURA 3. SEMENTES GERMINADAS APÓS 10 DIAS EM FOTOPERÍODO DE 12H. **A** – GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE COM 1,0 ML DO EXTRATO DO FUNGO 8E; **B** - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE COM 1,0ML DO EXTRATO DO FUNGO 44E (MARINHO) DILUÍDO EM ÁLCOOL 100%; **C** - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE COM 1,0ML DO EXTRATO DO FUNGO 18E (MARINHO) DILUÍDO EM ÁLCOOL 100%;

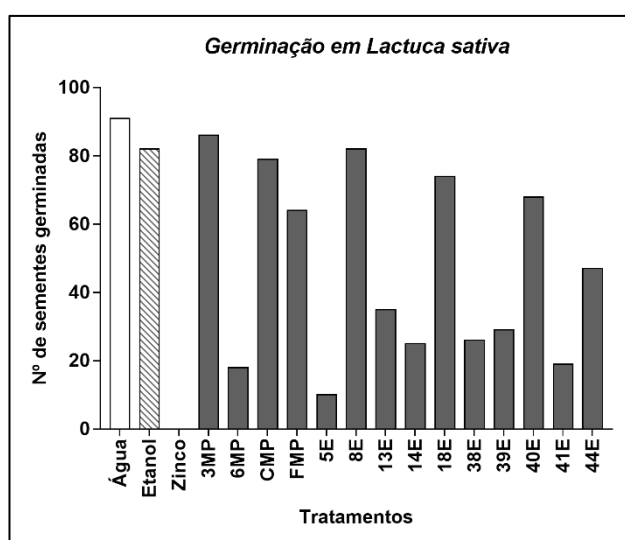


4.3.1. *Lactuca sativa*

As sementes de *Lactuca sativa* se mostraram as mais sensíveis aos extratos testados em comparação com as outras sementes. De acordo com a fabricante, a porcentagem de germinação das sementes de alface do lote utilizado é de 86%.

No teste realizado, 91% das sementes germinaram no Controle Negativo, água destilada e 82% no Controle do Veículo. Os resultados validam o experimento para a semente de alface e mostram que 3MP, CMP e 8E apresentaram a menor interferência no processo de germinação, com 86%, 79% e 82% de sementes germinadas (Figura 8). Para o extrato 18E a germinação foi de 74%, e para os demais, abaixo de 70%. Como esperado, sulfato de zinco 1M inibiu totalmente a germinação das sementes, sendo um ótimo exemplo de controle positivo para toxicidade. Dentre os extratos avaliados, 5E e 41E inibiram a germinação de sementes de alface com germinação menor que 20%.

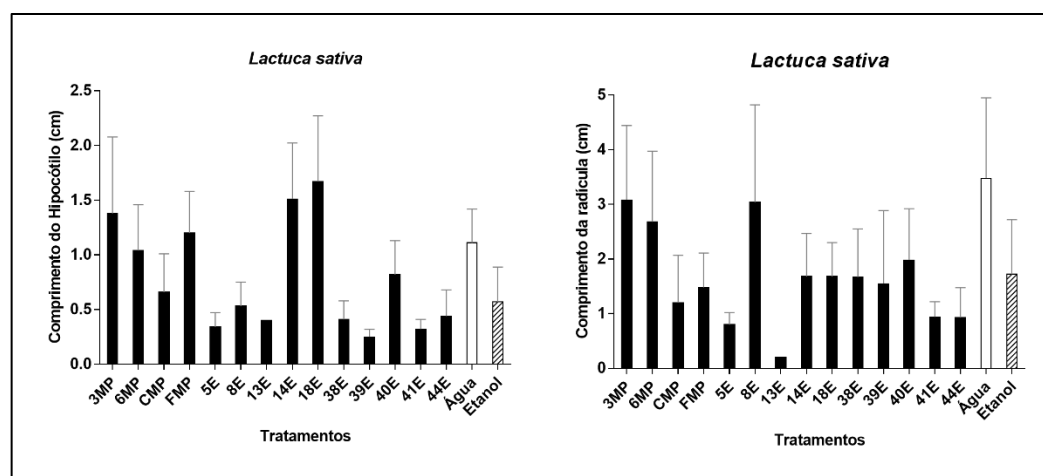
FIGURA 4. EFEITO DOS EXTRATOS E CONTROLES NA GERMINAÇÃO DE ALFACE.



Embora tenham apresentado baixa germinação, 14E (25%) estimulou o crescimento do hipocótilo, com valor médio de 1,51 cm assim como FMP, com germinação de 64% e tamanho médio de 1,2 cm. O comprimento do hipocótilo em 18E, 1,67 cm, foi superior ao controle negativo. 3MP, 6MP, CMP, 8E, 38E e 40E apresentaram valores entre 1,0 cm e 0,5 cm. Em 5E, 13E, 39E e 41E a média do hipocótilo foi menor 0,4 cm.

Para o comprimento da radícula, os extratos 3MP e 8E apresentaram média de 3,0 cm; o resultado mais próximo ao da água (3,48 cm). Dentre os extratos de fungos terrestres, CMP e FMP apresentaram valores médios entre 1,2 e 1,5 cm enquanto 6MP teve a maior média de 2,68 cm seguido de 40E com 1,98 cm. Os extratos 14E com 1,68 cm, 18E e 38E com 1,60 cm e 39E com 1,55 cm apresentaram valores próximos ao do controle de veículo (1,70 cm). O menor valor observado foi do extrato 13E. As médias e desvios do comprimento do hipocótilo e da radícula para cada extrato e para os controles podem ser vistas na Figura 9.

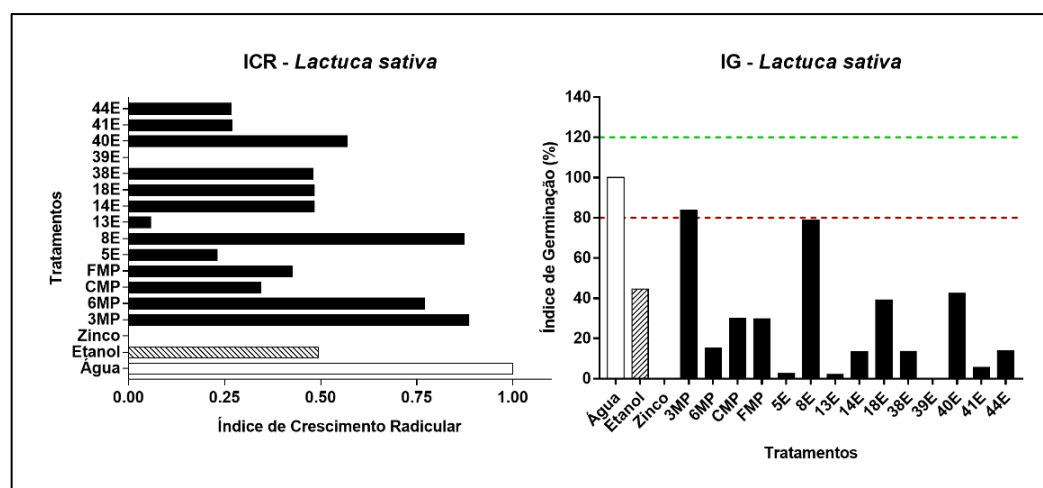
FIGURA 5. COMPRIMENTO MÉDIO DO HIPOCÓTILO E DA RADÍCULA DE SEMENTES DE ALFACE.



A partir do comprimento da radícula foi calculado o Índice de Crescimento Radicular (ICR) e o Índice de Germinação (IG) para cada tratamento conforme as fórmulas apresentadas no item 3.4. (Figura 10). Os extratos 3MP e 8E novamente se destacam por apresentarem ICR de 0,8, seguido por 6MP com 0,77. Os extratos 14E, 38E apresentaram ICR de 0,48, 39E ICR de 0,45 e 40E ICR de 0,57, próximos do CV (0,49).

O IG foi calculado com base no ICR e número de sementes germinadas de cada tratamento em relação ao número de sementes germinadas do controle negativo (água). Assim, para *Lactuca sativa*, exceto 3MP, com ICR de 83,6%, todos os extratos foram considerados tóxicos. Embora alguns extratos tenham permitido a germinação de até 80% das sementes, o crescimento radicular das mesmas foi negativamente afetado e inferior ao controle negativo, o que levou a um IG menor que 80%. O extrato 8E apresentou os valores mais próximos do limite de 80%, com IG de 78,7%, ICR 0,87 e germinação de 82% das sementes.

FIGURA 6. ICR E IG (%) DOS TRATAMENTOS EM *Lactuca sativa*.

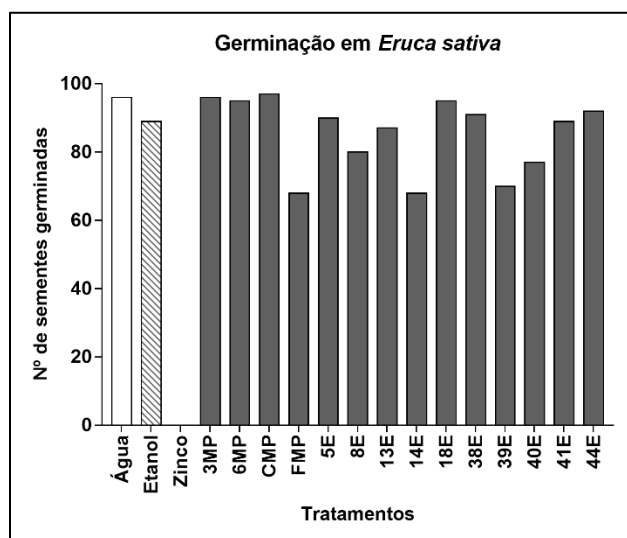


As sementes de alface são conhecidas por sua alta sensibilidade e talvez por isso reagiram tão fortemente aos tratamentos utilizados. É importante ressaltar que os extratos aplicados são compostos de diversas substâncias com diversos níveis de toxicidade e que quando em uma mistura podem apresentar nível tóxico elevado nas sementes (Gómez et al., 2001). O etanol como veículo também afetou negativamente a germinação das sementes embora menos que o DMSO 1% e mesmo sendo um ótimo solvente para os extratos, é necessário encontrar uma alternativa ao seu uso para novos testes com esse bioindicador. Também é possível que o composto puro responsável pela atividade em *Xanthomonas* apresente toxicidade diferente do extrato bruto.

4.3.2. *Eruca sativa*

Em rúcula, os extratos aplicados afetaram menos a germinação das sementes. A fabricante informa que a germinação das sementes é de 97%, o controle negativo teve 96% de germinação enquanto para etanol 89% das sementes germinaram normalmente. Os extratos 3MP (96%), 6MP (97%), CMP (97%), 18E (95%), 38E (91%), e 44E (92%) se destacaram, com germinação semelhante ao controle com água destilada. Além disso, 6MP (90%), 5E (90%), 8E (80%), 13E (87%) e 41E (89%), apresentaram germinação a par com o controle de veículo. Em 40E e 39E a germinação foi entre 70 e 80%. Já 14E e FMP apresentaram valores baixos de germinação, 68%. (Figura 11).

FIGURA 7. EFEITO DOS EXTRATOS E CONTROLES NA GERMINAÇÃO DE RÚCULA.

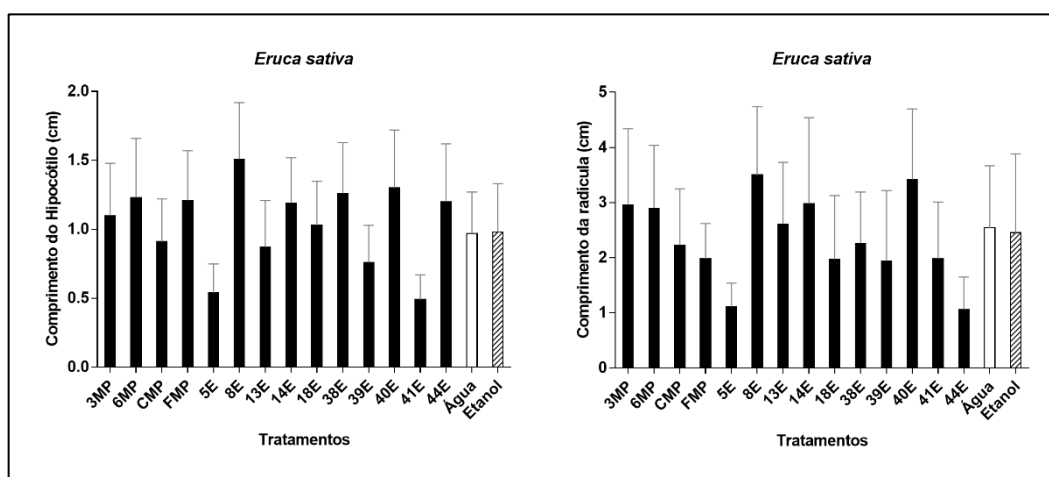


Em relação ao comprimento do hipocótilo em rúcula, água e etanol tiveram uma média de 0,97 e 0,98 cm. Alguns extratos apresentaram média acima dos controles como 3MP (1,10 cm), 6MP (1,23 cm), FMP (1,21 cm), 8E (1,51 cm), 14E (1,19 cm), 18E (1,03 cm), 38E (1,26

cm), 40E (1,30 cm) e 44E (1,20 cm). Os extratos CMP e 13E apresentaram média próximas dos controles, com comprimentos de 0,91 cm e 0,87 cm, respectivamente. 5E, 39E e 41E apresentaram médias abaixo dos controles e menor que 0,7 cm.

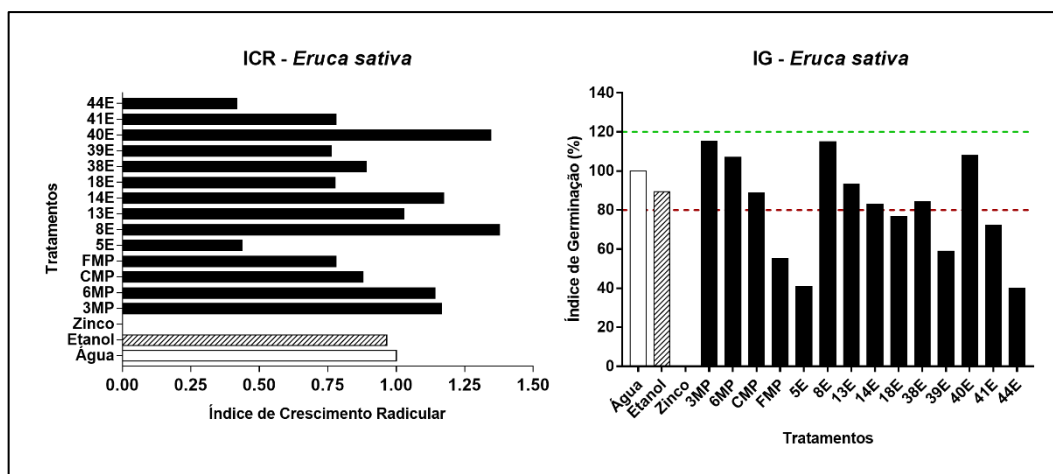
O comprimento radicular das sementes germinadas em CN foi de 2,54 cm e 2,45 cm para CV. Os extratos 8E (3,5 cm), 40E (3,42 cm), 13E (2,61 cm), 14E (2,98 cm), 38E (2,26 cm), 3MP (2,96 cm) e 6MP (2,90 cm) parecem ter promovido o crescimento radicular das plântulas. Para FMP, 18E e 41E a média foi 1,98 cm, para 39E 1,94 cm e para 5E e 44E o tamanho médio foi de 1,10 cm. Com exceção desses últimos, os tratamentos não parecem ter impactaram o processo germinativo em rúcula, ao contrário do ocorrido com as sementes de alface. O etanol utilizado como veículo também não afetou as sementes como anteriormente (Figura 12).

FIGURA 8. COMPRIMENTO MÉDIO DO HIPOCÓTILO E DA RADÍCULA DE SEMENTES DE RÚCULA.



Na Figura 13 pode-se observar que em *Eruca sativa* 6 extratos apresentaram ICR maior que 1,0: 3MP, 6MP, 8E, 13E, 14E e 40E. O CV apresentou ICR de 0,96 enquanto que para os extratos CMP, FMP, 18E e 41E o ICR ficou entre 0,75 e 1,0. Os extratos 5E 39E e 44E tiveram o menor ICR (0,40).

De acordo com o Índice de Germinação dos extratos em rúcula (Figura 13) os extratos 3MP, 6MP, CMP, 8E, 13E, 14E, 38E e 40E não apresentam características fitotóxicas. 3MP e 8E tiveram a melhor relação entre germinação e tamanho de radícula, com IG de 115%, seguido por 40E com 108%, 6MP com 107,0%, 13E com 93,1%, CMP com 88,7%, 38E com 84,3% e 14E com 83%.

FIGURA 9. ICR E IG (%) DOS TRATAMENTOS EM *Eruca sativa*.

O extrato 44E demonstra que mesmo amostras com alta germinação (92%) podem ter efeitos indesejados no processo germinativo e causarem problemas no desenvolvimento das plântulas. A germinação na presença desse extrato, por exemplo, apresentou IG de 40%, e, portanto, tóxico.

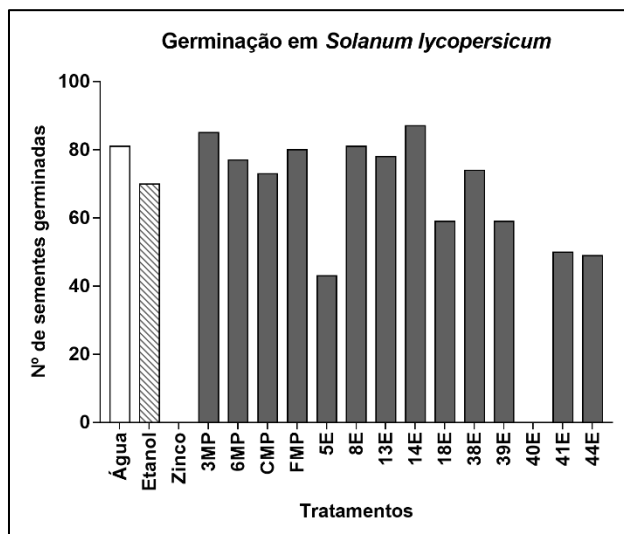
As sementes de rúcula apresentaram menor sensibilidade ao etanol como veículo do que as sementes de alface, e o mesmo foi observado com os extratos.

4.3.3. *Solanum lycopersicum*

Em sementes de tomate, a germinação ocorreu em 81% das sementes tratadas com água e em 70% das sementes tratadas com etanol. Os extratos 3MP e 14E apresentaram maior germinação que o controle, com 85% para 3MP e 87% para 14E. Germinação entre 70-81% foi observada em CMP, FMP, 8E, 13E, 38E e em 6MP.

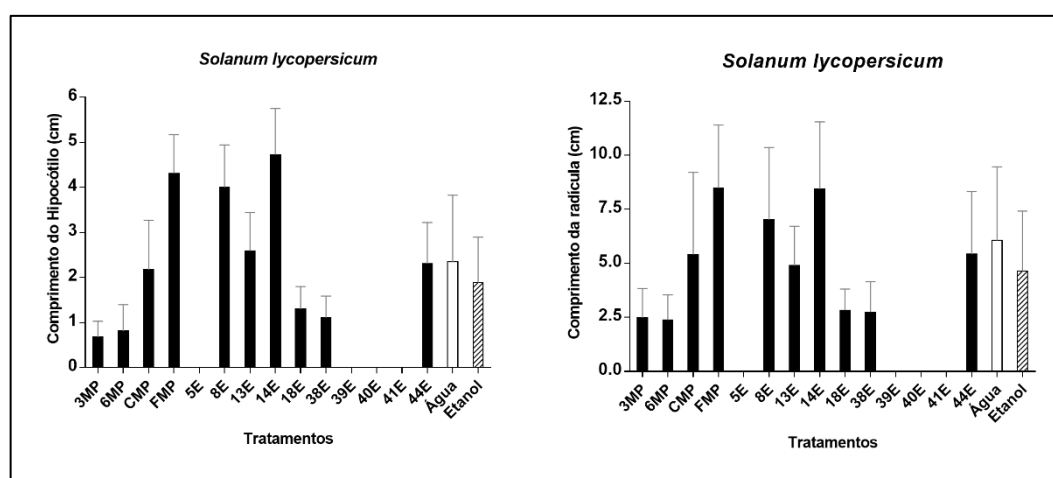
Para 18E foram 59 sementes germinadas em média. As sementes em 5E, 39E, 40E e 41E iniciaram a germinação, mas não se desenvolveram, o que indica a presença de alguma substância nociva ao seu crescimento. O extrato 40E impediu totalmente a germinação (Figura 14).

FIGURA 10. EFEITO DOS EXTRATOS E CONTROLES NA GERMINAÇÃO DE TOMATE



Em média o hipocótilo das sementes de tomate germinadas apresentou comprimento de 2,35 cm em água e 1,89 em etanol. Dentre os extratos FMP teve medida média de 4,31 cm, 8E de 4,0 cm e 14E de 4,72 cm. O extrato 13E teve média de 2,59 cm, maior que CN e 44E teve média de 2,31cm. Os demais extratos apresentaram comprimento médio entre 0,3 e 1,3 cm. Em relação ao comprimento radicular, se destacaram os extratos 14E (8,43 cm) e FMP (8,48 cm) e 8E (7,01 cm). Para CMP e 44E a média foi de 5,4 cm e para 13E, 4,89 cm. Os extratos 13E, 3MP, 18E, 38E e 6MP tiveram média entre 1,5 e 2,8 cm. Em água a média foi de 6,06 cm e em etanol de 4,64 cm. Os resultados podem ser visualizados na Figura 15.

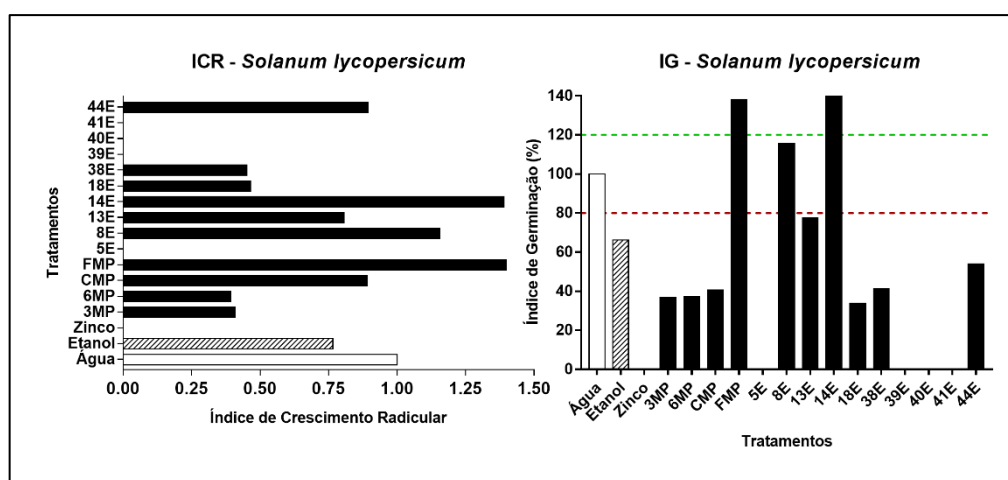
FIGURA 11. COMPRIMENTO MÉDIO DO HIPOCÓTILO E DA RADÍCULA DE SEMENTES DE TOMATE.



Três extratos apresentaram ICR maior que o do CN e IG acima de 80%, são eles FMP (1,4), 8E (1,16) e 14E (1,4) (Figura 16). Dentre esses três, o IG de 14E foi 149,4%, indicando um feito estimulante no processo de germinação de tomate. Esse extrato também teve a maior

média no comprimento da radícula e do hipocótilo de tomate. FMP apesar de apresentar 80% de germinação, teve IG de 138,21%, forte indício de promoção do crescimento. 8E apresentou germinação de 80% em tomate, valores acima da média dos controles para comprimento de hipocótilo e radícula e IG de 115,7%. O extrato 44E apresentou ICR de 0,89 porém, devido ao seu efeito negativo na germinação, teve IG de 54%, menor que 80%. Todos os extratos restantes, com ICR menor que 1,0 também tiveram IG menor que 80% e são, portanto, classificados como tóxicos em semente de tomate. Para os extratos 5E, 39E, 40E e 41E, o ICR foi de 0.

FIGURA 12. ICR E IG (%) DOS TRATAMENTOS EM *Solanum lycopersicum*



Os resultados mostram que apenas o fator germinação não é suficiente para determinar a toxicidade de um composto. Parâmetros como IG e ICR, baseados no comprimento radicular, e o desenvolvimento do hipocótilo foram fundamentais para determinar quais extratos tiveram efeito negativo no crescimento das espécies avaliadas.

De acordo com Fantin et al. (2009) a variabilidade dos testes de germinação é dependente de fatores abióticos e do organismo utilizado. Dessa forma, a escolha de um organismo para condução dos testes é importante e tem grande influência para a interpretação dos dados. No caso dos extratos avaliados, os testes com *Eruca sativa* e *Solanum lycopersicum* foram mais informativos em relação aos diferentes efeitos de toxicidade de cada extrato, o que não ocorreu com *Lectuca sativa*.

O teste de germinação é extensamente utilizado para avaliar a toxicidade de herbicidas, pesticidas, resíduos sólidos e de efluentes tratados química e/ou biologicamente tratados (BRITO-PELEGRINI et al., 2009; GRYCZAK et al., 2018). Um estudo sobre o uso de extratos de origem fúngica como biocontroladores realizados em sementes de soja não mostrou toxicidade nas sementes em que foram aplicados (COPPO et al., 2017), no entanto, não foram

encontrados estudos sobre o efeito de extratos orgânicos de fungos filamentosos em sementes de alface, rúcula e tomate.

5. CONCLUSÃO

Alface se provou muito sensível aos tratamentos na concentração de 1,5 mg/mL, uma avaliação em concentrações menores dos extratos, mudança do veículo e utilização dos compostos inibidores de crescimento bacteriano puros podem trazer alterações aos resultados obtidos com os extratos brutos.

As sementes de rúcula apresentaram maior resistência ao efeito do veículo do que alface e tomate e também ao efeito dos extratos. Oito dos extratos avaliados não apresentaram efeito fitotóxicos em sementes de *Eruca sativa*. Em *Solanum lycopersicum* três extratos apresentaram resultados superiores aos dos controles, sendo que 14E e FMP tiveram efeito positivo maior e Índice de Germinação maior que 120%.

De maneira geral, os extratos 8E e 14E apresentaram os resultados mais interessantes, não apresentando fitotoxicidade elevada e até mesmo promovendo o crescimento radicular em sementes de rúcula e tomate. Os metabólitos produzidos pelos isolados 5E, 39E, 40E e 41E foram altamente tóxicos para sementes de tomate e portanto, seriam inaptos a serem aplicados em campo. Os outros extratos apresentaram resultados variados conforme a semente em que foram testados, o que mostra a importância do uso de diversos tipos de sementes ao analisar a toxicidade de compostos por bioindicadores.

Ensaio ecotoxicológicos simples como a germinação e crescimento radicular de sementes permitem a avaliação da toxicidade de compostos orgânicos produzidos por fungos de forma rápida e com baixo custo.

É importante que novos testes sejam realizados quando os compostos bioativos parcialmente purificados ou purificados foram obtidos após purificação dos extratos, e que novas concentrações dos mesmos sejam avaliadas.

REFERÊNCIAS

- BRITTO-PELEGRINI et al. Ensaios biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratado por processo fotoquímico. *Minerva*. v. 6, p. 219-228, 2009.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 225-226 – 1939.
- CASTILLO MORALES G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Standarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Ed. Gabriela Castillo Morales, IMT- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 189p., 2004.
- COPPO et al.. Sanidade e germinação de sementes de soja tratadas com extratos de plantas e de fungo. *Revista de Ciências Agroambientais*. v. 15, p. 92-99, 2017.
- BRITO-PELEGRINI NN, et al. Ensaios biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratado por processo fotoquímico. *Minerva*, 6, 219-228, 2006.
- ENCHEVA-MALINOVA M. et al. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol. Biotec. Eq.* v. 28, p. 721-727, 2014.
- FANTIN ACN, FREITAS DPC, FAGNANI GF, LAPA TCMA. Teste de sensibilidade em sementes de Rúcula (*Eruca sativa*) e Alface (*Lactuca sp.*) em contato com diferentes concentrações do pesticida Glifosato. *Congresso Internacional de Meio Ambiente da AUGM*. 2009.
- Gómez, C, Contento, L, Carsen, A. Toxicity test to assess pollutants removal during wastewater treatment and the quality of receiving waters in Argentina. *Environmental Toxicology*. v. 16, p. 217-224, 2001.
- GRYCZAK M, KILIPER JT, DE COSTA PD, MACCARI A. Sementes de *Lactuca sativa* como bioindicador de toxicidade em resíduos de construção civil. *Revista Tecnologia e Ambiente*. v. 4, p. 233-242, 2018.
- LEWIS, MA. Algae and vascular plant tests. In: G. Rand (Ed.), *Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Taylor & Francis Publishers, EUA. p. 135-369, 1995.
- LOPES CA, QUEZADO-SOARES AM. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM L; VALE FXR; COSTA H. (ed). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: UFV. p. 754-784, 2000.
- MONCHEVA P. et al. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*. v. 3, p. 3-14, 2002.
- NEDIALKOVA D, NAIDENOVA M. Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *J. Cult. Collect.* v. 4, p. 29-35, 2005.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD
Oecd guidelines for testing of chemicals: guideline 208, terrestrial plants, growth test. Paris. Organisation for Economic Co-operation and Development. 14p., 1984.

PURIC J. et al. Activity of antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. Accepted Article, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12875>.

RODRIGUEZ LM. et al. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiology*. v. 12, p. 1-14, 2012.

RYAN RP. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*. v. 9, p. 344-355, 2011.

SANCHES ALR. et al. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Econ. Sociol. Rural*. v. 52, p. 549-566, 2014.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE JR, J.; SACRAMENTO, L. V. S.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/195/1/85.long>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

TAVARES KG, et al. Avaliação da fitotoxicidade de compostos orgânicos a partir de ensaios biológicos envolvendo sementes de tomate. *Scientia Plena*, 7, 1-12, 2011.

TEIXEIRA CG. Cultura. In: TEIXEIRA CG, et al. Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 142p, 1994.

TIQUIA SM, TAM NFY, HODGKISS IJ. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, 93, 249-256, 1996.

VIEIRA G. et al. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Lett. Appl. Microbiol.* Accepted Article, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12890>.

PELEGRINI NNB. et al. Estudo da sensibilidade de sementes de *Euruca sativa* (rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA) João Pessoa - PB, 2006.

RAS - Regras para Análise de Semente. Ministério da Agricultura. Brasília: SNAD/DNPV/CLAV, 365p., 2009.

YOUNG et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n. 76, p. 182-186, 2012.