

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

Valéria Ortaça Portela

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE  
UM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR *Mycoleptodiscus indicus***

Santa Maria, RS  
2021



Valéria Ortaça Portela

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE  
UM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR *Mycoleptodiscus indicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência do Solo**.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

Santa Maria, RS  
2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001

Ortaça Portela, Valéria  
Optimization of Production and Chemical  
Characterization of a Bioherbicide Produced by  
Mycoleptodiscus indicus / Valéria Ortaça Portela.- 2021.  
113 p.; 30 cm

Orientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2021

1. fungo 2. fermentação 3. metabólitos secundários 4.  
bioprodutos I. Josemar Seminoti Jacques, Rodrigo II.  
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

---

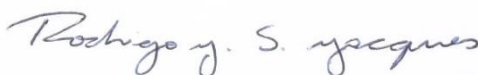
Declaro, Valéria Ortaça Portela, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Valéria Ortaça Portela**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE UM  
BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR *Mycoleptodiscus indicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência do Solo**

**Aprovado em 26 de maio de 2021:**



**Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



**Daiana Bortoluzzi Baldoni, Dra. (UERGS)**



**Ionara Irion Dalcol, Dra. (UFSM)**



**Kelen Müller Souto, Dra. (UNICRUZ)**



**Natielo Almeida Santana, Dr. (UFSM)**

Santa Maria- RS  
2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Jone, Aúrea, meu irmão William e ao tio Jorge pelo exemplo de vida, por seus ensinamentos e apoio incondicionais em todos os momentos da minha vida. Ao meu namorado Pedro, pela presença, amizade, companheirismo e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por colocar em meu caminho tantas pessoas e oportunidades maravilhosas nesse período de aprendizado.

Agradeço a meus pais, Jone Nunes Portela e Aúrea Maria Ortaça Portela, ao meu irmão William Jonny Ortaça Portela pelo apoio incondicional e pela compreensão e incentivo para seguir meus objetivos.

Ao meu namorado Pedro Schmitz Wieczorek, por estar sempre ao meu lado, pela sua compreensão, incentivo e amizade. Agradeço também a toda família Schmitz, pelo apoio, em especial a Marcia da Silva Schmitz.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Jacques, por ter me recebido como orientada e pela oportunidade de construir este trabalho, pelos ensinamentos transmitidos, pelo auxílio em todos os momentos, paciência e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Zaida Inês Antonioli, por todo o auxílio e amizade, pelos ensinamentos transmitidos em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ionara Irion Dalcol, por toda ajuda e auxílio no desenvolvimento desse trabalho. Passamos por tempos difíceis e de muitas incertezas durante a realização das análises devido a pandemia do Covid-19, porém com a sua ajuda e dos demais integrantes do laboratório conseguimos realizar este trabalho, sou imensamente grata pela ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo, Tiana Fredrich, Ísis Caroline Siqueira Santos, Isac Aires de Castro, Reyllis Unfer, Anderson Moro, Joice Freiberg, Fernanda Cantoni, Lisiani Sobucki, Igor Schardong, Nariane de Andrade, Rodrigo Ramos. Obrigado por toda a ajuda e apoio no decorrer do meu trabalho nestes quatro anos.

Aos amigos que encontrei durante esta trajetória da Pós-Graduação, Edicarla Trentin e Juliane Schmitt.

Aos professores do Departamento de Solos pelo aprendizado durante o curso.

Ao Héverton, secretário do curso de Pós-Graduação, a Eunice Figuera, secretária do Departamento de Solos da UFSM e ao Antonio Carlos Bassaco técnico do laboratório de Biologia do Solo.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Agrisus pelo financiamento das atividades de pesquisa e concessão de bolsas de auxílio.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela estrutura física disponibilizada e pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa que resultou nesta tese.

Por fim, obrigada a todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho. Deixo meu agradecimento e o desejo de sucesso, independentemente de onde estejam.



## RESUMO

# OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE UM BIOHERBICIDA PRODUZIDO POR *Mycoleptodiscus indicus*

**AUTOR: Valéria Ortaça Portela**

**ORIENTADOR: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques**

A pesquisa e a produção comercial de bioherbicidas no Brasil ocorre em menor escala em relação aos bioinseticidas e biofungicidas. O objetivo do estudo foi otimizar a produção de um bioherbicida pelo fungo *Mycoleptodiscus indicus* em fermentação submersa e sólida, identificar a estrutura química das moléculas químicas. Na otimização da produção dos metabólitos em meio de cultura com substrato de bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados os delineamentos Plackett-Burman e o Composto Central Rotacional. As variáveis otimizadas foram temperatura, agitação, pH, volume de água no meio de cultura, concentração de glicose e de extrato de levedura. Os metabólitos fúngicos foram aplicados em folhas destacadas de *Cucumis sativus*, *Conyza* sp. e *Sorghum bicolor*. Os testes ecotoxicológicos avaliaram a fuga e a exposição aguda de minhocas *Eisenia andrei* aos metabólitos fúngicos. Para a identificação química destas moléculas o fungo foi cultivado em três meios de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar (SB) ou farelo de aveia + arroz (OR) ou arroz (RI). Os extratos foram obtidos com etanol 99% e submetidos a derivatizações, utilizando anidrido acético/piridina e ácido clorídrico/metanólico. A caracterização química dos compostos acetilados/metilados voláteis foi realizada por cromatografia e espectrometria de massas. O potencial bioherbicida dos extratos foi avaliado em sementes, folhas destacadas e em plantas em crescimento de *C. sativus*. A produção dos metabólitos fitotóxicos foi otimizada a 35 °C, 50 rpm e 1.5 g L<sup>-1</sup> de glicose e na fermentação sólida nos intervalos de 30-37°C e 14-32 mL de água. Os metabólitos causaram danos severos na germinação, no crescimento inicial e nas folhas das três plantas. Na dose de 57 g L<sup>-1</sup> do bioherbicida ocorreu a maior redução da biomassa de *E. andrei*, enquanto na menor dose (1.78 mg L<sup>-1</sup>) houve aumento desta biomassa. Nas doses testadas, os metabólitos de *M. indicus* não foram tóxicos para as minhocas. Foram identificados seis compostos comuns aos três extratos SB, OR e RI: metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5) e iditol (6). No extrato OR e RI foi identificado o ácido linoleico (7), enquanto que no extrato SB detectou-se 4-acetil-2-careno (8). O ácido astérico (9) foi identificado como componente majoritário dos três extratos. Os extratos SB e OR resultaram em danos às folhas destacadas, porém somente SB inibiu a germinação. Quando pulverizados sobre as folhas, os três extratos reduziram o crescimento as plantas. Com estes dados é possível estabelecer a seguinte ordem de eficiência bioherbicida dos extratos avaliados: SB>OR>RI.

**Palavras chaves:** fungo; fermentação; metabólitos secundários; bioprodutos.

## ABSTRACT

### Optimization of production and chemical characterization of a bioherbicide produced by *Mycoleptodiscus indicus*

**AUTHOR:** Valéria Ortaça Portela

**ADVISOR:** Rodrigo Josemar Seminoti Jacques

The research and commercial production of bioherbicides in Brazil occur to a lesser extent compared to biopesticides and biofungicides. The aim of the study was to optimize the production of a bioherbicide by the fungus *Mycoleptodiscus indicus* in submerged and solid fermentation, to identify a chemical structure of chemical molecules. In order to optimize the production of metabolites in a culture medium with sugarcane bagasse substrate, Plackett-Burman and Central Rotational Composite designs were used. The optimized variables were temperature, temperature, pH, volume of water in the culture medium, concentration of glucose and yeast extract. Fungal metabolites were emitted in detached leaves of *Cucumis sativus*, *Conyza* sp. and *Sorghum bicolor*. Ecotoxicological testicles assess escape and acute exposure of *Eisenia andrei* earthworms to fungal metabolites. For chemical identification of these molecules, the fungus was cultivated in three culture media based on sugarcane bagasse (SB) or oat bran + rice (OR) or rice (RI). The extracts were obtained with 99% ethanol and derivations using acetic anhydride/pyridine and hydrochloric/methanolic acid. The chemical characterization of the volatile acetylated/methylated compounds was performed by chromatography and mass spectrometry. The bioherbicide potential of the extracts was evaluated in seeds, detached leaves and growing plants of *C. sativus*. The production of phytotoxic metabolites was optimized at 35 °C, 50 rpm and 1.5 g L<sup>-1</sup> of glucose and in continuous fermentation at intervals of 30-37°C and 14-32 mL of water. The metabolites caused severe damage to germination, initial non-growth and leaves of the three plants. At the dose of 57 g L<sup>-1</sup> of the bioherbicide there was a greater reduction in the biomass of *E. andrei*, while at the lower dose (1.78 mg L<sup>-1</sup>) there was an increase in this biomass. At the doses tested, the metabolites of *M. indicus* were not toxic to earthworms. Six compounds common to the three extracts SB, OR and RI were identified: methyl-latodoratin (1), palmitic acid (2), elaidic acid (3), glycerol (4), benzyl benzoate (5) and iditol (6). In extract OR and RI, linoleic acid was identified (7), while in extract SB, 4-acetyl-2-carene was detected (8). Asteric acid (9) was identified as the major component of the three extracts. The SB and OR extracts resulted in damage to detached leaves, but only SB inhibited germination. When sprayed onto leaves, the three extracts reduced plant growth. With these data it is possible to establish the following order of bioherbicidal efficiency of the obtained extracts: SB > OR > RI.

**Keywords:** fungi; fermentation; secondary metabolites; bioherbicide; ecotoxicological test.

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 O problema das plantas daninhas .....	15
2.2 Herbicidas sintéticos e os danos ambientais .....	15
2.3 Resistência das plantas a herbicidas .....	17
2.4 Bioherbicidas .....	18
2.5 O fungo <i>Mycoleptodiscus indicus</i> .....	19
2.6 Fermentação sólida e submersa .....	20
2.7 Metabólitos secundários fúngicos .....	22
2.8 Identificação química de extratos fúngicos .....	23
2.9 Avaliação Ecotoxicológica .....	25
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>27</b>
3.1 Problema científico .....	27
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	<b>29</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 Objetivo geral .....	29
5.2 Objetivos específicos .....	29
<b>6 ARTIGO I</b> .....	<b>30</b>
<b>7 ARTIGO II</b> .....	<b>65</b>
<b>8 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>97</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>99</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>100</b>



## 1 APRESENTAÇÃO

O crescente aumento da população mundial e da demanda por alimentos resulta na necessidade de intensificação da produção agrícola. Para isto, a otimização dos fatores que interferem no processo de produção agrícola deve ser buscada, para que as culturas atinjam seu máximo potencial produtivo. Porém, aliada a maior demanda de alimentos, existe também a necessidade de tornar o sistema agrícola mais sustentável. Deste modo busca-se a associação de técnicas com menor impacto ao ambiente e que ao mesmo tempo se apresentem eficientes na resolução dos atuais problemas.

Um dos principais fatores que prejudicam o desempenho das culturas é a ocorrência das plantas daninhas, que competem diretamente por recursos básicos do ambiente com as culturas agrícolas, ocasionando perdas diretas e indiretas da produção. Atualmente a principal forma de controle é através de herbicidas sintéticos. Esta forma de controle tem sido facilitada pelas modificações genéticas em cultivares, que as tornam resistentes aos princípios ativos de alguns herbicidas (ASSIRELLI et al., 2015). No entanto, a utilização indiscriminada destes agrotóxicos, principalmente em culturas transgênicas, resultou na seleção de biótipos resistentes de plantas daninhas (FOROUZESH et al., 2015, SALOMÃO et al., 2020). Além disso, os herbicidas sintéticos impactam negativamente o ambiente, contaminando o solo, a água, o ar, os alimentos e os seres vivos (TUDI et al., 2021).

Uma alternativa para reduzir o uso destes agrotóxicos é o desenvolvimento de bioherbicidas (BORDIN et al., 2020). A possibilidade de obtenção destas moléculas se baseia na enorme diversidade de microrganismos encontrados no ambiente e representa um grande potencial biotecnológico a ser explorado (LI et al., 2018; VAREJÃO et al., 2013a, 2013b). Estima-se que o Brasil abriga aproximadamente 20% da diversidade biológica do planeta, a qual pode ser empregada como um recurso para o desenvolvimento de novas e sustentáveis ferramentas em diversas áreas do conhecimento (ABRANCHES et al., 2020).

Para o desenvolvimento de um bioherbicida, várias etapas são fundamentais. A otimização do crescimento do fungo e da produção dos metabólitos é obtida mediante modificações na composição do meio de cultura e das variáveis ambientais, como a temperatura, pH, umidade, agitação, etc. Esta etapa básica, tem grande importância na futura produção industrial, pois diminui os custos, aumenta a produção e reduz o tempo de fermentação. Além disso, também são necessários testes ecotoxicológicos para conhecer a toxicidade ambiental do bioherbicida, pois caso os metabólitos sejam danosos a organismos

não alvos, a pesquisa deve ser reavaliada. Outra etapa imprescindível ao desenvolvimento de um bioherbicida é a identificação da estrutura química dos metabólitos fúngicos com efeito fitotóxico, pois tal informação é necessária para fins de registro e futura produção em larga escala.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 O problema das plantas daninhas

Diversos fatores influenciam o desenvolvimento das culturas agrícolas, como o manejo, a fertilidade do solo, a qualidade da semente, a ocorrência de pragas e doenças, e a competição com plantas daninhas (GOMES JR.; CHRISTOFFOLETI, 2008; VASCONCELOS; SILVA; LIMA, 2012). Por desenvolvem-se no mesmo meio que a plantas de interesse comercial, as plantas daninhas competem com a cultura por recursos do ambiente e por apresentar maior rusticidade e adaptação. Assim perpetuam-se com maior facilidade através da produção de grande quantidade de sementes ou outras estruturas de reprodução.

As plantas daninhas causam reduções significativas da produtividade das culturas agrícolas devido a competição, entretanto a intensidade dos danos depende da espécie e densidade da planta daninha, do ambiente, do período de convivência e da cultura agrícola (LAMEGO et al., 2009; RIZZARDI et al., 2003).

A interferência da cultura agrícola pode ser tanto direta, pela competição e alelopatia, quanto indireta, por ser hospedeira de insetos e doenças. Muitas culturas agrícolas possuem sensibilidade à interferência das plantas daninhas durante o seu ciclo de desenvolvimento (BIANCHI et al., 2010; DATTA et al., 2017), apresentando reduções de produtividade entre 15 a 80% (SCHOLTEN et al., 2011), valor esse que varia de acordo o nível de infestação (BIANCHI et al., 2010; CHARUDATTAN; DINOOR, 2000). As plantas daninhas apresentam características que contribuem para dificultar seu controle, entre essas a alta produção de sementes, a facilidade de disseminação, a heterogeneidade na germinação com diferentes fluxos de germinação durante a mesma estação.

### 2.2 Herbicidas sintéticos e os danos ambientais

O controle das plantas daninhas pelo uso dos herbicidas sintéticos apresenta características atraentes, como simplicidade, previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos do agroecossistema (ASSIRELLI et al., 2015). Porém, o uso intensivo de fungicidas, inseticidas e herbicidas na agricultura promove diversos problemas ambientais, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água, do ar e dos seres vivos (BETTIOL et al., 2009).

Os agrotóxicos utilizados na agricultura possuem grande abrangência de efeitos em toda a comunidade do solo (MIRSAL, 2008). As pesquisas indicam alterações no conteúdo do carbono microbiano do solo (CAMELO et al., 2011), bioacumulação nos organismos do solo (GILL; GARG, 2014), alteração nos processos de decomposição vegetal (HENDRIX; PARMELEE, 1985), na transformação e na mineralização da matéria orgânica (GILL; GARG, 2014). Além de influenciar negativamente sobre as comunidades de minhocas (GARCÍA-PÉREZ et al., 2014), colêmbolos (HAQUE et al., 2011) e nematoides (ZHAO et al., 2013).

Os estudos relacionados as consequências do uso dos herbicidas sintéticos indicam redução da abundância de organismos do solo e outros efeitos em doses subletais (CASABE et al., 2007; CORREIA; MOREIRA, 2010). Diversos estudos demonstram os efeitos tóxicos do N-fosfometil glicina (glifosato) sobre os microrganismos do solo, a atividade microbiana, a biomassa microbiana, a atividade das enzimas desidrogenase e  $\beta$ -glicosidase (TEJADA, 2009). Contudo, o efeito do glifosato sobre a atividade biológica do solo depende das características do solo, principalmente pH, textura e teor de matéria orgânica (ALBERS et al, 2009; TEJADA, 2009). O uso excessivo do glifosato pode prejudicar o desenvolvimento das minhocas (CASABE, 2007) e a eficiência do uso da água por planta (ZOBIOLE, 2010b). Além disso, os estudos têm documentado reduções na fixação biológica do nitrogênio na soja resistente a herbicidas pulverizados com o glifosato (ZOBIOLE, 2010a).

O herbicida 2,4-D é utilizado principalmente para o controle de plantas daninhas em condições de pós-emergência em culturas em que é seletivo, bem como no manejo da vegetação em pré-semeadura (SILVA et al., 2018; SOUZA; CUNHA; PAVANIN, 2012). Porém, devido a suas características físico-químicas, pode ocasionar danos às culturas vizinhas pela deriva da molécula. Sendo a deriva definida como o movimento de poeira ou gotículas do produto aplicado através do ar para áreas não previstas no momento da aplicação e deslocamento dessas moléculas para as culturas não alvos (SILVA et al., 2018; SOUZA; CUNHA; PAVANIN, 2012).

Os herbicidas podem provocar danos pela contaminação residual, como resíduos de atrazina e simazina que foram detectados no leite humano e em água do rio Corumbataí no Estado de São Paulo, após o uso em área agrícola na região (ARMES et al; GARCÍA et al., 2011). Quando ingeridos, podem causar problemas na saúde humana, como efeitos neurológicos e reprodutivos (ABASS et al., 2012). Munger et al. (1997) constataram altas taxas de nascimento de crianças prematuras em Iowa (EUA) em comunidades que consumiam água com altas concentrações de atrazina. Os resíduos de atrazina e simazina podem assim



permanecer estáveis no leite e na água (GARCÍA et al., 2011). Assim podem, podem ser ingeridos e causar possíveis problemas na saúde humana dentre eles efeitos neurológicos e reprodutivos (ABASS et al., 2012).

Atualmente no estado do Rio Grande do Sul há um conflito muito grande entre produtores rurais devido aos danos causados pela deriva de herbicidas, como o 2,4-D. Os produtores de uva, erva-mate, maçã, nozes, mirtilo, hortaliças, oliveiras, etc, tiveram suas culturas atingidas pela deriva do 2,4-D utilizado na cultura da soja (BBC, 2021). Desta forma, o uso sem critérios técnicos deste agrotóxico está prejudicando a produção agrícola gaúcha, além de todos os danos ambientais e aos seres humanos já descritos.

### 2.3 Resistência das plantas a herbicidas

Nos últimos anos, com os avanços da biotecnologia aplicada à produção agrícola, houve o desenvolvimento de cultivares resistentes ao herbicida glifosato, o que permitiu simplificar o controle das plantas daninhas (UIZURRUN; LEADEN, 2012; SILVA et al., 2014). A biotecnologia da soja transgênica (Roundup Ready®) buscou facilitar o manejo, no entanto contribuiu para o surgimento da resistência de plantas daninhas a esse herbicida, pois resultou no uso repetitivo de apenas um princípio ativo na mesma área ou de herbicidas diferentes, mas com o mesmo mecanismo de ação (POWLES; YU, 2010; UIZURRUN; LEADEN, 2012, KNEZEVIC et al., 2019).

Atualmente, existem 519 casos de plantas resistentes a herbicidas no mundo, envolvendo 263 espécies, das quais 152 dicotiledôneas e 111 monocotiledôneas, presentes em 94 culturas e 71 países. No Brasil já foram registradas 53 espécies resistentes a pelo menos um mecanismo de ação, das quais 13 apresentam resistência a dois ou mais mecanismos de ação. Sendo essas: *Amaranthus palmeri*, *A. viridis*, *A. retroflexus*, *A. hybridus*, *Bidens pilosa*, *B. subalternans*, *B. insularis*, *Conyza sumatrensis*, *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*, *Eleusine indica*, *Euphorbia heterophylla*, *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* e *Sagittaria montevidensis* (HEAP, 2021).

As plantas resistentes a herbicidas ocorrem naturalmente em baixa frequência, porém, a pressão de seleção exercida pelo herbicida aumenta a sua frequência na população. Para Powles e Yu (2010), a resistência das plantas daninhas é a capacidade adquirida e herdável que essas possuem em sobreviver a doses de herbicidas que em condições normais controlariam os demais componentes da população. Portanto, o herbicida não é o agente causador, mas sim

selecionador dos indivíduos resistentes. Neste sentido, o manejo incorreto do controle químico de plantas daninhas está contribuindo para o aumento da frequência de resistência. Além disso, o surgimento da resistência depende de alguns fatores, como a genética e a biologia das plantas daninhas, do herbicida, da tecnologia de aplicação, entre outros.

Uma alternativa para o controle de plantas daninhas resistentes é a otimização das doses e do número de aplicações de herbicidas, reduzindo com isso a pressão de seleção (SILVA et al., 2014). Além disto, para alcançar maior eficiência de controle, uma alternativa é o controle integrado, que usa outras práticas de manejo para prevenir que as plantas daninhas atinjam um nível de dano à cultura agrícola (VIDAL et al., 2007).

#### 2.4 Bioherbicidas

A preocupação da sociedade com os impactos ocasionados pelo uso intensivo de agrotóxicos na agricultura e seus prejuízos diretos e indiretos no Homem e no ambiente, está modificando gradativamente o cenário agrícola. Há grande crescimento da produção de alimentos com baixa ou nenhuma utilização de agrotóxicos, o qual vem favorecendo o uso e a disseminação de técnicas alternativas na agricultura, como o controle biológico (POVEDA et al., 2020).

O controle biológico quando usado em plantas daninhas é uma técnica que visa controlar ou reduzir populações destas plantas (VAN DEN BOSCH et al., 1987). A estratégia de biocontrole de plantas daninhas denominada bioherbicida pode envolver o aumento da efetividade do microrganismo, por meio de aplicações inundativas de esporos com a finalidade de gerar um alto nível de doença, com conseqüente morte ou supressão de populações da planta (CHARUDATTAN, 1991). Ainda, o controle biológico de plantas daninhas também pode ser realizado pelo uso de fitotoxinas produzidas por microrganismos, as quais podem ser usadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas, principalmente na forma de metabólitos secundários ou enzimas (DUKE et al. 2000). Para isso, o fungo é cultivado em um meio de cultura específico e após o período de incubação ocorre a extração do metabólito produzido no meio de cultura pela adição de um solvente, homogeneização e filtração do material, resultando no bioherbicida. pesquisas preliminares que avaliam o potencial de controle tanto de extratos de plantas como de organismos como fonte de novos bioherbicidas são importantes. O estudo de Anese et al. (2015), que avaliou o potencial de fitotoxicidade de extratos de folhas e raízes de *Drimys brasiliensis* na germinação e no crescimento de plântulas

de *Panicum maximum* e *Euphorbia heterophylla*, indicam que *D. brasiliensis* é uma possível alternativa de controle para as espécies de plantas daninhas analisadas. Wang et al., (2015) obteve atividade herbicida de farinha de semente de mostarda (*Sinapis alba* e *Brassica juncea*) na emergência de *Digitaria sanguinalis* e *Amaranthus palmeri*, demonstrando que *S. alba* poderia ter melhor eficácia bioherbicida sobre *A. palmeri*, enquanto *Brassica juncea* foi mais eficaz para *D. sanguinalis*.

Entre os microrganismos usados para o controle de plantas daninhas, podemos citar as bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye e *Pseudomonas fluorescens* estirpe WH6. Quanto as pesquisas relacionadas ao uso de vírus para controle de plantas daninhas, podemos citar o *Araujia* vírus do mosaico (ELLIOTT et al., 2009) e vírus do mosaico do pepino (KAZINCZI et al. 2006). Porém, entre os microrganismos, os fungos são os preferidos como agentes de controle biológico de plantas daninhas, pois ocorrem em abundância na natureza, podem ser cultivados em meios artificiais para produção massal e há possibilidade de possuir ação específica sobre uma planta, quando o patógeno for isolado da mesma. Associado a isso, ainda está a possibilidade de otimização da produção de metabólitos fitotóxicos em laboratório, para posterior formulação e aplicação em larga escala (FIORILLO, 2007).

O uso de metabólitos obtidos de fungos consiste em uma forma de controle por substâncias naturais, com provável menor impacto no ambiente (PETTA, 2008). Como vantagens no uso de bioherbicidas, destaca-se a seletividade da maioria desses produtos, a segurança ao aplicador, a biodegradabilidade e a possibilidade de aplicação próximos a locais onde os agrotóxicos ocasionariam sérios impactos ambientais, como em reservas naturais e ambientes aquáticos (BAILEY, 2010; LYN et al., 2010).

Os metabólitos microbianos estão sendo cada vez mais estudados, devido a demanda por métodos menos agressivos ao ambiente e pela necessidade de exploração de forma sustentável desta enorme reserva de recursos biotecnológicos representada pela biodiversidade de microrganismos do solo.

## 2.5 O fungo *Mycoleptodiscus indicus*

A espécie *Mycoleptodiscus indicus* (V.P. Sahni) B. Sutton é descrita como um fungo endofítico, com ampla distribuição geográfica, encontrado em regiões tropicais ou subtropicais associado com plantas, principalmente monocotiledôneas (ANDRIOLI et al., 2014; LI et al.,

2018). Produz esporodóquios e não escleródios em meio de cultura ou em substrato natural, assim como fazem as espécies *M. terrestris* e *M. sphericus* (OSTAZESKI, 1967; SUTTON, 1973). Os esporodóquios de *M. indicus* estão associados com amplas lesões em folhas de *Zamia* spp. (*Cycadofita americana*) e em outras plantas monocotiledôneas. *Zamia* é um gênero de cerca de 40 espécies de pequenas plantas classificadas na família *Zamiaceae* da classe *Cycadophyta*. Estas plantas são encontradas na Carolina do Sul, Flórida, México e ao norte e noroeste da América do Sul. Também está presente na Índia, Sudeste da Ásia e partes da África. *M. indicus* tem sido isolado em culturas a partir de lesões em folhas de *Zamia* spp. (PADHYE et al., 1995; SUTTON, 1973).

O fungo *M. indicus* é considerado um agente etiológico de feohifomicose humana que em condições ideais causa infecção subcutânea em pacientes imunocomprometidos. No litoral da Carolina Sul e na Florida foi causador de infecções subcutâneas em pacientes. Em ambos os casos, a infecção fúngica causada por *M. indicus* foi solucionada com terapia antifúngica sistêmica (PADHYE et al., 1995; GARRISON et al., 2008). Salienta-se que no presente estudo o fungo foi utilizado somente em laboratório para produção de metabólitos fitotóxicos e sua aplicação em lavouras na forma de esporos ou biomassa viva não está prevista.

O potencial biotecnológico de *M. indicus* já é reconhecido na literatura devido a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (ANDRIOLI et al., 2014). Estas substâncias são divididas em duas classes: cromenos e azafilonas (ANDRIOLI et al., 2014). As azafilonas exibem um amplo espectro de ação biológica, tais como: antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, citotóxica e nematocida (OSMANOVA et al., 2010), demonstrando a importância desse fungo em outras aplicações biotecnológicas. Porém, poucos estudos foram realizados sobre a utilização deste fungo para a produção de bioherbicida. Em 2015, Portela et al. (2020) isolaram o *M. indicus* de folhas de *Conyza* sp. com sintomas de doenças fúngicas em áreas de soja no estado do Rio Grande do Sul/Brasil e o fungo apresentou resultados promissores na produção de metabólitos fitotóxicos. Neste sentido, aponta-se a importância da continuidade de estudos envolvendo essas espécies para a otimização da produção de metabólitos fitotóxicos.

## 2.6 Fermentação sólida e submersa

A fermentação em microbiologia é definida como o tipo de metabolismo anaeróbio onde a geração de energia ocorre sem a cadeia de transporte de elétrons. Porém, o termo fermentação

está consolidado na microbiologia industrial e na engenharia de bioprocessos como sinônimo de cultivo aeróbio e é com este sentido que será utilizado no presente estudo. A fermentação pode ser realizada em estado sólido ou submersa. Estas são as principais formas de cultivo de microrganismo para processos de obtenção de bioprodutos. As condições do meio fermentativo (tempo de incubação, temperatura, substrato, agitação, fonte de carbono e nitrogênio, etc), bem como o tipo de fermentação (sólida ou submersa), influenciam diretamente na produção de metabólitos secundários, e essas são variáveis específicas para cada microrganismo (VAREJÃO et al., 2013).

Independentemente do tipo de fermentação, pode-se utilizar meios de cultura industriais ou sintéticos (WEBB, 2017). O meio industrial é aquele que apresenta componentes de resíduos agroindustriais (bagaços, grãos, farelos, etc) em sua constituição, por isto é considerado de baixo custo. Os meios sintéticos utilizam reagentes comerciais, como extrato de levedura, peptona, glicose e vários micronutrientes, por isto são mais caros (BRUN et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

A fermentação submersa é um dos métodos mais utilizados para a produção de bioherbicidas de origem fúngica (SOUZA et al., 2015, 2017; TODERO et al., 2018a). Também denominada fermentação líquida, pois o microrganismo desenvolve-se em meio de cultura com excesso de água (SOUZA et al., 2017; TODERO et al., 2018a). As condições usadas mais frequentemente para o cultivo de fungos são: tempo de fermentação de 5 a 12 dias, temperatura de 24-35 °C e agitação de 50-150 rpm (KLAIC et al., 2017; SOUZA et al., 2015). Na fermentação sólida, o meio de cultura não possui água livre (RAHARDJO et al., 2006), sendo que o cultivo busca simular o hábitat natural dos fungos (HANSEN et al., 2015). Algumas condições biológicas, físico-químicas e ambientais podem afetar diretamente o processo de fermentação sólida, como tempo de fermentação, temperatura, pH, umidade, atividade de água e fatores nutricionais, e a intensidade dessa interferência depende do tipo de substrato e microrganismo (KRISHNA, 2005, MELNICHUK et al., 2020).

Asther et al. (2002) compararam a produção da enzima feruloil esterase por *Aspergillus niger* em estado sólido e fermentação submersa, e ambas as condições foram eficientes. Li et al. (2013) analisaram o crescimento do fungo *Neurospora sitophila* e a produção de enzimas em fermentação sólida e submersa, e observaram que a fermentação sólida foi mais eficiente. No entanto, em outros estudos de produção de bioherbicidas, a fermentação submersa foi mais adequada para produção de metabólitos fitotóxicos pelos fungos (VAREJÃO et al., 2013; SOUZA et al., 2017; BRUN et al. 2017). Disto depreende-se que para cada tipo de metabólito

a ser produzido, para cada fungo e para cada composição do meio de cultura haverá necessidade de otimização das condições de cultivo e dentre estas a opção pela fermentação sólida ou submersa.

## 2.7 Metabólitos secundários fúngicos

Os fungos formam um complexo grupo de microrganismos, presentes nos mais diversos habitats, várias espécies são patogênicas e produzem toxinas que auxiliam na infecção e colonização de seus hospedeiros (IKRAM et al., 2020, WU et al., 2020). Os fungos também são fonte de metabólitos secundários utilizados industrialmente, como antibióticos, antifúngicos, assim como na agricultura (MENDES et al., 2014, RADHAKRISHNAN et al., 2018). Recentemente, o interesse por produtos naturais resultou na busca por outras fontes de organismos potencialmente produtores de substâncias bioativas, como os fungos endófitos (ZHENG, et al., 2021). O termo endófito compreende os organismos que, em pelo menos parte de seu ciclo de vida, são capazes de colonizar os tecidos internos de plantas sem causarem sintomas evidentes de enfermidades (SUN et al., 2012).

Assim nos últimos anos as pesquisas nessa linha se intensificaram, diante da diversidade desses organismos (ZHENG, et al., 2021). Apesar da grande diversidade de metabólitos produzidos por fungos e do fato de que novidades taxonômicas são normalmente acompanhadas de substâncias inéditas, muitos metabólitos são produzidos por espécies distintas. No entanto, espécies muito semelhantes são capazes de produzir perfis diferentes de metabólitos secundários (KELLOGG et al., 2017). Desta forma o uso de métodos analíticos para a caracterização prévia dos metabólitos presentes em extratos brutos originados de fungos pode auxiliar na escolha mais racional das espécies a serem investigadas em um programa de prospecção química (TAKAHASHI et al., 2020).

Os fungos endófitos já estudados produziram substâncias de baixo peso molecular pertencentes a diferentes classes químicas, como policetídeos, alcaloides, terpenos e peptídeos não ribossômicos (CANUTO et al., 2012). Segundo Aly et al., (2010), os compostos bioativos produzidos pelos fungos podem atuar como hormônios reguladores de crescimento, antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, antivirais e inseticidas (XU et al., 2020). Os metabólitos secundários têm grande importância biotecnológica e podem ser utilizados tanto na indústria farmacêutica, quanto na agricultura, como promotores de crescimento e no controle biológico de pragas, nematoides e outros patógenos (ALY et al, 2010).

Considerando a importância e a possibilidade da utilização biotecnológica de metabólitos secundários, recentemente diversos estudos com bioherbicidas fúngicos estão sendo realizados. Os metabólitos de *Diaporthe schini* apresentaram efeito bioherbicida na pós-emergência de *Amaranthus viridis*, *Bidens pilosa*, *Echinochloa crusgalli* e *Lolium multiflorum* (BRUN et al., 2020), podendo este efeito ser justificado pela produção de grande diversidade de compostos, como cromanones, furanones, fenóis, entre outros (XU et al., 2020). O fungo *Fusarium fujikuroi* apresentou atividade fitotóxica em folhas destacadas de *C. sativus*. Nisa et al. (2020) confirmaram a capacidade de *F. fujikuroi* produzir metabólitos secundários com estruturas e atividades diversas, possuindo atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e positivas, em concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> apresentou atividade antioxidante máxima de 45% e 44%, assim como atividade antifúngica variando de 60 a 75% contra *Aspergillus favus* e *A. niger*. Além disso Cavalcante et al. (2021) ao realizarem a análise destes extratos fúngicos em *F. fujikuroi*, por meio de GC-MS, foi verificada a presença de 21 compostos de diversas naturezas e estruturas, e os extratos apresentaram atividade pectinase, celulase, amilase, lactona e peroxidase. Os estudos de identificação de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos ainda são relativamente recentes quando comparamos com extrato vegetais, pois a identificação dos compostos requer tempo para produção dos extratos, purificação, seleção de solventes, assim como disponibilidade de equipamentos de alta complexidade e recursos humanos altamente capacitados.

## 2.8 Identificação química de extratos fúngicos

A química relacionada ao estudo de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário está voltada principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas (HUG et al., 2020, BADER et al., 2020). Os métodos cromatográficos são os mais utilizados na detecção e quantificação dos compostos constituintes dos extratos naturais, em particular a cromatografia líquida de alta eficiência. Este método possui a capacidade de realizar separações e análises qualitativas e quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta eficiência e capacidade de detecção (LANDIM et al., 2012). Porém, há necessidade de diversos testes, pela dificuldade em obter resultados livres de interferências geradas pela matriz analisada (WOLFENDER, 2009, LANDIM et al., 2012).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade), sendo este acoplamento uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (WOLFENDER, 2009). Apesar da grande seletividade da técnica, os compostos presentes nos extratos analisados são matrizes muito complexas, das quais nem sempre é possível realizar a leitura dos compostos sem a interferência de outras substâncias do meio que estejam presentes nos extratos. Desta forma, são necessários diversos testes com diferentes concentrações do extrato, solvente ou ainda tipos de filtragem e/ou purificação de amostras (JAYAPRAKASHA et al., 2002). Além disso, um dos maiores problemas de se realizar o isolamento de compostos bioativos produzidos por microrganismos é o baixo rendimento de algumas substâncias (LARSEN et al., 2005).

Diversos trabalhos foram realizados na identificação de extratos fúngicos com aplicação biotecnológica. O estudo de Sharma et al. (2020) identificaram metabólitos nematocidas produzidos pelo fungo *Purpureocillium lilacinum* cultivado em meio líquido, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os resultados revelaram cinco compostos principais: ácido 2-etil butírico, álcool fenil etílico, ácido benzóico, ácido benzeno acético e 3,5-Di-t-butilfenol. Além disso, Reis et al. (2018) identificaram compostos surfactantes no extrato de *Fusarium fujikuroi* com auxílio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A identificação parcial da estrutura demonstrou que o biosurfactante continha uma  $\alpha$ ,  $\beta$ -trealose, um açúcar frequentemente encontrado nos surfactantes classificados como trealolipídeos.

Além disso os metabólitos de fungo *M. indicus*, microrganismo base desse estudo, foram descritos na literatura pela presença de dois alcalóides, micoleptodiscina A e micoleptodiscina B, isolados após crescimento em meio de cultura com batata e glicose (ORTEGA et al., 2013). Em outro estudo com o mesmo fungo também foram identificados três azafilonas, denominadas micoleptonas A, B e C, e os policetídeos austidiol, eugenitina, 6-metoxyeugenitina e 9-hidroxyeugenitina de culturas de *M. indicus* associadas à planta de *Borreria verticillata* (Andrioli et al., 2014). Além disso, o estudo do extrato de *M. indicus* obtido do cultivo em meio com glicose e batata por Ahmed et al. (2020) resultou na identificação de acetato de isopropila, 6-amino-5-nitroso-2,4 (1H, 3H) -pirimidinadiona, 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol, diisobutil



ftalato, 11-tricoseno , 10-metilantraceno-9-carboxaldeído e bis (2-etilhexil) maleato e 1-hexil-1-nitrociclohexano e 5,7-dodecadiin-1,12-diol.

## 2.9 Avaliação Ecotoxicológica

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias naturais ou sintéticas na estrutura, funções e biodiversidade dos ecossistemas (TARAZONA, 2014). Os testes ecotoxicológicos são baseados na análise da mortalidade e dos efeitos reprodutivos ou de crescimento (efeitos crônicos ou agudos) e usam táxons ecologicamente semelhantes ou relacionados aos táxons residentes do local potencialmente impactado (CHAPMAN, 2002; VAN GESTEL et al., 2018). Para isto, a pesquisa definiu alguns organismos bioindicadores devido a representatividade e importância funcional no ecossistema de estudo, fácil manuseio em laboratório, ciclo relativamente curto, sensibilidade de adaptação às condições ambientais modificadas e às alterações fisiológicas (SOFO et al., 2020; GARCÍA-PÉREZ, 2020).

As minhocas são utilizadas como organismos bioindicadores pois representam uma parte importante da macrofauna do solo e são considerados prestadores de serviços essenciais aos ecossistemas (BLOUIN et al., 2013). As minhocas são afetadas pelas substâncias presente no solo, pois ao ingerir resíduos com contaminantes podem incorporar e até bioacumular em seus tecidos (VALDEZ et al., 2020, LACKMANN et al., 2021). Esses organismos são considerados excelentes bioindicadores da contaminação do solo em função do hábito alimentar, comportamento, habitat, por influenciarem no destino e na distribuição dos produtos químicos no solo (DOMINGUEZ; PÉREZ-LOSADA, 2010). As minhocas respondem de forma diferenciada às alterações no solo. Alguns efeitos são a redução ou o aumento da densidade populacional, modificações no peso corporal, perda de atividade locomotora, alterações morfológicas, entre outros (BRAMI et al., 2017). Como consequência, estes organismos, principalmente das espécies *Eisenia andrei* e *E. fetida*, são adotados como padrões em testes ecotoxicológicos pela OECD Acute Toxicity Test (OECD 1984), USEPA OCSPP 850.3100 Earthworm Subchronic toxicity test (USEPA 2012), teste de toxicidade aguda ISO 11268-1: 2012 (ISO 2015) e teste de evitação ISO 17512-1: 2008 (ISO 2012).

Quando aplicados em uma área de cultivo, somente uma pequena porcentagem do agrotóxico atinge o alvo de controle (inseto, planta daninha, microrganismo), sendo que a maior parte tem como destino outros locais, como o solo, a água, a atmosfera, etc. As diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas dos agrotóxicos, e nas características e

condições ambientais, afetam o seu destino e a degradação ambiental (EMBRAPA, 2018). Por isto, da importância de estudos ecotoxicológicos prévios sobre o efeito das moléculas sobre o ambiente.

Nos últimos anos, poucos trabalhos foram desenvolvidos buscando a obter novos bioherbicidas e testar seus efeitos ecotoxicológicos. Destaca-se o trabalho de Fumagalli et al. (2013) que evidenciou um possível dano do bioherbicida produzido por *Ascochyta caulina* a organismos aquáticos. Outro estudo que podemos destacar é o de Romdhane et al. (2016) que determinaram o efeito ecotoxicológico do bioherbicida leptospermona na comunidade bacteriana de dois solos e observaram mudança na estrutura e redução da diversidade desta comunidade.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Problema científico

O manejo adotado para o controle das plantas daninhas pela maioria dos agricultores brasileiros está baseado no uso de herbicidas sintéticos, principalmente do grupo dos organofosforados, como o glifosato (ANDRIGHETTI et al., 2014, LEOCI et al., 2020). O uso indiscriminado destes herbicidas ocasiona problemas de saúde, danos ambientais e a seleção de plantas daninhas resistentes (MAGGI et al., 2020). Como consequência, os agricultores tendem a aplicar doses cada vez mais elevadas e de forma sucessiva, agravando estes problemas (VERA et al., 2012, SANTOS et al., 2014).

Diante deste contexto, é de fundamental importância a busca por herbicidas menos agressivos e mais eficientes para o controle das plantas daninhas (RADHAKRISHNAN et al., 2018, KESWANI et al., 2019). A bioprospecção de microrganismos para a produção dos metabólitos fitotóxicos é uma alternativa para a obtenção de novos bioherbicidas, os quais devem ser tão eficientes quanto os sintéticos, mas causadores de menores impactos ambientais (VAREJÃO et al., 2013, ROMDHANE et al., 2016).

Apesar do Brasil ser um país megadiverso, a pesquisa científica e tecnológica e por consequência a produção comercial de bioherbicidas está atrasada em relação aos bioinseticidas e biofungicidas. No Ministério da Agricultura brasileiro estão atualmente registrados 179 bioinseticidas, 49 biofungicidas, mas nenhum bioherbicida (MAPA, 2021). Além disso, a busca de novos bioherbicidas também se justifica pela necessidade de identificar novos sítios de ação nas plantas, uma vez que o número de plantas daninhas com resistência aos herbicidas convencionais tem aumentado muito nos últimos anos (QIU et al., 2015, PEROTTI et al., 2020).

O interesse pela exploração de produtos biológicos para a agricultura vem crescendo significativamente nos últimos anos (MORIN, 2020), o que pode ser comprovado pelo aumento significativo dos pedidos de registros (ANVISA, 2015). Neste contexto, as pesquisas que avaliam o potencial de metabólitos microbianos como fonte de novos bioherbicidas tem ganhado cada vez mais importância (ANESE et al., 2015, SOUZA, 2015) devido a demanda por métodos menos agressivos ao ambiente e pela possibilidade de exploração de forma sustentável dos recursos biotecnológicos representados pela enorme biodiversidade de microrganismos do solo. Porém, para a obtenção destes metabólitos há a necessidade do isolamento e da seleção dos microrganismos, da otimização das condições de fermentação, da

utilização de substratos de baixo custo, assim como do isolamento e da identificação dos metabólitos microbianos com ação herbicida.

A maioria dos estudos de isolamento de fungos produtores de moléculas herbicidas está relacionado aos gêneros *Diaporthe* sp. (SOUZA et al., 2017), *Euphorbiicola* spp. (VAREJÃO et al., 2013; LINGARAJU et al., 2020) e *Phoma* spp. (KLAIC et al., 2017; TODERO et al., 2018 b; LUFT et al., 2019). No entanto, a diversidade de fungos no ambiente é muito grande e diferentes espécies podem produzir distintas moléculas, o que pode resultar em descobertas de novos mecanismos de ação (TREMACOLDI, 2006).

Neste sentido, o isolamento dos fungos e o estudo destes como agentes de produção de metabólitos secundários pode ser uma via para o desenvolvimento de herbicidas de origem microbiana (YANG et al., 2014), porém todo este esforço somente poderá ser revertido em desenvolvimento de novos produtos se for realizada uma adequada etapa de identificação química dos metabólitos. Além disso, outra etapa para a obtenção de um bioherbicida é conhecer sua toxicidade ambiental, pois caso os metabólitos sejam danosos a organismos não alvos, a pesquisa deve ser reavaliada.

## 4 HIPÓTESES

- a) A produção e os efeitos fitotóxicos dos metabólitos de *M. indicus* UFSM 54 aumentam com a otimização das condições de cultivo do fungo;
- b) Os metabólitos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 em condições otimizadas de cultivo ocasionam lesões em planta bioindicadora;
- c) Os metabólitos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 em condições otimizadas não possuem efeito tóxico em minhocas da espécie *Eisenia andrei*;
- d) A ocorrência de lesões em planta bioindicadora pelos metabólitos de *M. indicus* UFSM 54 justifica-se pela presença de compostos químicos de ação fitotóxica.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de um bioherbicida pelo fungo *M. indicus* UFSM 54 em fermentação submersa e sólida e identificar a estrutura química deste bioherbicida.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a produção dos metabólitos fitotóxicos de *M. indicus* UFSM 54 em fermentação sólida e submersa;
- b) Avaliar o efeito bioherbicida em plantas de *Cucumis sativus* dos metabólitos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 em condições otimizadas;
- c) Avaliar o efeito ecotoxicológico dos metabólitos de *M. indicus* UFSM 54 em minhocas da espécie *Eisenia andrei*;
- d) Analisar a composição química dos metabólitos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 em diferentes meios de cultura.

## 6 ARTIGO I

### **PRODUCTION OPTIMIZATION OF A FUNGAL BIOHERBICIDE IN SOLID AND SUBMERGED FERMENTATION AND ITS ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS\***

Valéria Ortaça Portela <sup>ac</sup>, Natielo Almeida Santana <sup>b</sup>, Michele Lusa Balbinot <sup>b</sup>, Zaida Inês Antonioli <sup>a</sup>, Andressa de Oliveira Silveira <sup>b</sup> and Rodrigo Josemar Seminoti Jacques <sup>ac</sup>.

<sup>a</sup> Department of Soils, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Maria, Brazil, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil

\*Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Bioprocess and Biosystems Engineering.

## PRODUCTION OPTIMIZATION OF A FUNGAL BIOHERBICIDE IN SOLID AND SUBMERGED FERMENTATION AND ITS ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS

### ABSTRACT

Research and commercial production of bioherbicides occur to a lesser extent compared to bioinsecticides and biofungicides. In order to contribute to developing new bioherbicides with low environmental impact, this study sought to optimize the production of phytotoxic metabolites using the fungus *Mycoleptodiscus indicus* UFSM 54 in solid and submerged fermentation and evaluate the phytotoxic effects on three plants and ecotoxicological effects on earthworms (*Eisenia Andrei*). The Plackett-Burman and central composite rotatable designs were used to optimize metabolite production, and the variables optimized in the fermentation were temperature, agitation, pH, water volume in the culture medium, glucose concentration, and yeast extract. The fungus was grown on sugarcane bagasse substrate applied to detached *Cucumis sativus*, *Conyza sp.*, and *Sorghum bicolor* leaves, and fungal metabolites were used in an avoidance test and acute exposure to earthworms. Metabolite production in submerged fermentation was optimized at 35 °C, 50 rpm, and 1.5 g l<sup>-1</sup> of glucose and in solid fermentation at 30–37 °C and in 14–32 ml of water. The metabolites severely damaged germination, initial growth, and leaves of the three plants and at the doses tested (maximum of 113.92 ml kg<sup>-1</sup>); the phytotoxic metabolites of *M. indicus* UFSM 54 were not toxic to earthworms.

**Keywords:** secondary metabolites, phytotoxic effect, ecotoxicology, bioproducts.

### INTRODUCTION

In many countries, the management systems adopted for weed control are based on synthetic herbicides, mainly from the organophosphates group, such as glyphosate [1, 2]. The indiscriminate use of these herbicides causes health problems, environmental damage, and the development of resistant weeds [3]. Consequently, farmers tend to apply higher and higher doses in succession, aggravating these problems [4, 5].

Given this context, the search for less aggressive herbicides for the environment and that provide effective weed control is of fundamental importance [6, 7], and bioprospecting microorganisms to produce phytotoxic metabolites is an alternative to obtain new herbicides [8, 9]. However, the scientific and technological research and commercial production of

bioherbicides do not occur as for bioinsecticides and biofungicides. What is more, the Brazilian Ministry of Agriculture recently listed 202 bioinsecticides and 56 biofungicides, albeit no bioherbicides [10]. In addition, the search for new bioherbicides is also justified by the need to identify new sites of action in plants since the number of weeds resistant to conventional herbicides has significantly increased in recent years [11, 12].

One of the steps to obtain a bioherbicide from fungal metabolites is by optimizing cultivation conditions, as the quantitative and qualitative production of these molecules varies significantly according to the conditions in which the fungus is cultivated [8, 13]. Another crucial step to obtain a bioherbicide is knowing its environmental toxicity. Moreover, using microbial metabolites as biocidal agents is a form of natural control and likely has less impact on the environment. Nevertheless, its environmental toxicity must be known, and research must be reassessed if the metabolic agents are harmful to non-target organisms.

In recent years, few research groups have attempted to find new bioherbicides and test their ecotoxicological effects. For example, Fumagalli et al. [14] analyzed the ecotoxicological potential of a bioherbicide produced by *Ascochyta caulinaem* in aquatic organisms (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, and *Brachydanio rerio*) and soil organisms (*Eisenia foetida*). Only *D. magna* were sensitive, which indicates possible bioherbicide damage to aquatic environments. In order to contribute to developing new bioherbicides, this study aimed to optimize phytotoxic metabolite production using the fungus *M. indicus* UFSM 54 in solid and submerged fermentation and evaluate the phytotoxic effects on three plants and ecotoxicological effects on earthworms.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fungus and culture medium**

The fungus *Mycoleptodiscus indicus* UFSM 54 (V.P. Sahni) B. Sutton (GenBank KY581194) was isolated in 2015 from *Conyza* sp. leaves with symptoms of fungal diseases in soybean areas of Rio Grande do Sul State (southern Brazil) and presented promising results in phytotoxic metabolite production [15]. The fungus was stored by lyophilization and reactivated in a potato dextrose agar (PDA) culture medium for seven days at 28 °C in the dark.

In all optimization tests described below, two disks ( $\emptyset = 15$  mm) of the PDA medium with fungal mycelium were inoculated into 250 ml Erlenmeyer flasks containing the autoclaved culture medium consisting of sugarcane bagasse (5 g), a macronutrient solution (5 ml; 1 g l<sup>-1</sup> of



NaNO<sub>3</sub>, 5 g l<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g l<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g l<sup>-1</sup> of NaCl), and a micronutrient solution (1 ml; 0.8 g l<sup>-1</sup> of MnSO<sub>4</sub>, 1.7 g l<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 2.5 g l<sup>-1</sup> of Fe SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) [16].

### **Submerged and solid fermentation**

A Plackett-Burman (PB) experimental design was used in the first stage and consisted of 15 experiments to select the variables that most influence phytotoxic metabolite production in submerged and solid fermentation. In the submerged fermentation, the variables temperature (25, 30, and 35 °C), glucose concentration (0.3, 0.5, and 0.7 g l<sup>-1</sup>), yeast extract concentration (0.03, 0.05, and 0.07 g l<sup>-1</sup>), agitation speed (40, 100, and 170 rpm), and pH (4.0, 5.0, and 6.0) were tested. For solid fermentation, the variables temperature (25, 30, and 35 °C), glucose concentration (0.3, 0.5, and 0.7 g l<sup>-1</sup>), yeast extract concentration (0.03, 0.05, and 0.07 g l<sup>-1</sup>), water volume added to the culture medium (8, 16, and 24 ml), and pH (4.0, 5.0, and 6.0) were tested.

Variables with statistical significance in the PB were tested in a central composite rotatable design (CCRD) to optimize the levels of each variable. In submerged fermentation, 17 experiments and 5 central points were used to optimize the temperature (30, 33, 35, 37, and 40 °C), agitation speed (25, 40, 50, 60, and 75 rpm), and glucose concentration (1.5, 3.0, 4.5, 6.0, and 7.5 g L<sup>-1</sup>). In solid fermentation, 11 experiments with 5 central points were evaluated to optimize water volume (8, 14, 20, 26, and 32 mL) and temperature (30, 33, 35, 37, and 40 °C).

### **Fungal metabolite phytotoxicity**

Fungal metabolites produced during fermentation were extracted from the culture medium by adding 30 or 50 ml of sterile distilled water to the Erlenmeyer flasks of the submerged or solid fermentation, respectively. The mycelium + substrate was macerated with a glass stick and incubated at 28 °C for 1 h. The extracts were then passed on qualitative filter paper (Ø = 31 cm) using a vacuum pump. The filtrate was centrifuged at 1372 g for 10 min, and the supernatant was stored in amber glass bottles at 4 °C for 24 h.

The phytotoxic effects of the metabolites were evaluated in the detached leaves of *Cucumis sativus*. A lesion was produced on the leaf adaxial surface using a needle, and 40 µl of the filtrates were deposited. The leaves were maintained at 25 °C with 12 h of photoperiod for 72 h, and metabolite efficiency to produce leaf lesions was quantified based on the scale by

Frans and Crowler [17], with zero absence of effect and 100% when the lesions occupied the entire leaf surface.

The metabolites produced in the optimized condition were evaluated in the seeds using a completely randomized design with four replications and in a 3x2 factorial scheme with three plants (*Conyza* sp., *C. sativus*, and *Sorghum bicolor*), which were treated with the fungal metabolites or sterile water. Each experimental unit was composed of 50 seeds. The germination tests were carried out according to the official Seed Analysis Rules [18] and conducted on a germitest paper roll and gerbox plastic box. The metabolite volume from the fungus or sterile water was 2.5 times the mass of the germitest paper. The seeds were incubated at 25 °C and a 12-h photoperiod for 15 days [18, 19]

The effects of fungal metabolites on plantlet growth of *Conyza* sp., *C. sativus*, and *S. bicolor* were evaluated in a completely randomized design and factorial scheme (3x2; plants and metabolites or sterile water, respectively) with three replications. The germination test plants were cultivated for 30 days at 25 °C and 12-h photoperiod. Shoot and root lengths were measured with an electronic caliper, and the dry mass was determined after 24 h of drying in an oven with forced air circulation at 80 °C [20].

### **Ecotoxicological tests**

Fungal metabolites produced in the optimized condition were evaluated by avoidance tests and acute exposure tests using *E. andrei* earthworms (Bouché, 1972). The experimental design was completely randomized with six treatments and five repetitions for each test. The treatments corresponded to the different metabolite doses (at a concentration of 8.7 mg L<sup>-1</sup>) and were defined based on other studies [14, 21, 22]. The filtrate volume added to the soil was 0, 3.56, 7.12, 14.24, 56.96, and 113.92 mL kg<sup>-1</sup>, with soil moisture corrected to 70% in all treatments. The earthworms were bred in the laboratory for four months in cattle manure at 28 °C. Immediately before their use, the adult earthworms were deposited in containers with filter paper and moistened with distilled water for 24 h to purify their stomach contents. The soil used in the tests had the following physical and chemical characteristics: pH (water 1:1) 5.8; clay (hydrometer) 80 g kg<sup>-1</sup>; P (Mehlich-1) 6.0 mg dm<sup>-3</sup>; K (Mehlich-1) 84 mg dm<sup>-3</sup>; organic matter (Walkley-Black) 8.0 g kg<sup>-1</sup>; exchangeable Al (KCl 1M) 1.6 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca (Mehlich-1) 2.1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg (Mehlich-1) 1.0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Zn (Mehlich-1) 1.1 mg dm<sup>-3</sup>; and Cu (Mehlich-1) 1.7 mg dm<sup>-3</sup>.

In the avoidance test, the earthworms were exposed simultaneously to samples with metabolite presence and absence. The test was carried out according to NBR ISO 17512-1/2011 guidelines [23] with the modifications described below. Plastic pots with a 2-L capacity were divided into two equal compartments by a partition and 500 g of soil as the experimental units. In one section, the fungal metabolite was added at concentrations of 3.56, 7.12, 14.24, 56.96, and 113.92 ml kg<sup>-1</sup>, and the other received distilled water. The partition was then removed, and ten adult earthworms were inoculated into each experimental unit (mean mass of 425 mg ind<sup>-1</sup>). The experimental units were sealed and the lid drilled with small holes to allow gas exchange. The test was conducted in the laboratory with temperatures ranging from 25 to 28 °C for 48 h and without providing food to the earthworms. In the end, the partitions were placed again in the experimental units to separate the control soil (natural) and soil with fungal metabolites. The number of earthworms in each section was then counted, and the avoidance was determined.

Equation 1:

$$Avoidance = \left( \frac{C - T}{N} \right) * 100$$

Where: avoidance = percentage of escape from organisms (%); C = number of earthworms found in the control soil; T = number of earthworms found in the test soil; N = total number of earthworms used per treatment.

The acute toxicity test was carried out according to the chemical test guide No. 207 [24], although natural soil was used instead of artificial soil. The filtrate volumes (3.56, 7.12, 14.24, 56.96, and 113.92 mL kg<sup>-1</sup>) were added to 500 g of soil in 2-L containers, forming a ~5-cm layer of soil with moisture corrected to 70% plus 5 g of dry cow manure for earthworm feed. Ten adult earthworms were inoculated (average mass of 425 mg ind<sup>-1</sup>) in each container. Earthworms were weighed at 7, 14, 21, and 28 days after the beginning of the test.

### **Statistical analysis**

The PB, CCRD, and detached leaf experimental data were analyzed using Statistica® 5.0 software ( $p < 0.1$ ) and analysis of variance (ANOVA) to estimate the statistical parameters and analyze the prediction or not of the mathematical model. Data were compared using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). For the avoidance test, earthworm distribution was analyzed by the binomial distribution test in order that each individual had an equal probability of appearing in

both soils. If significant ( $p < 0.05$ ), fewer earthworms were found in the altered soil than the control soil, meaning avoidance means were above or equal to 60%, indicating strong avoidance. The acute test data were submitted to a two-way ANOVA (factors: days and doses) followed by regression analysis using the SISVAR software [25].

## **RESULTS**

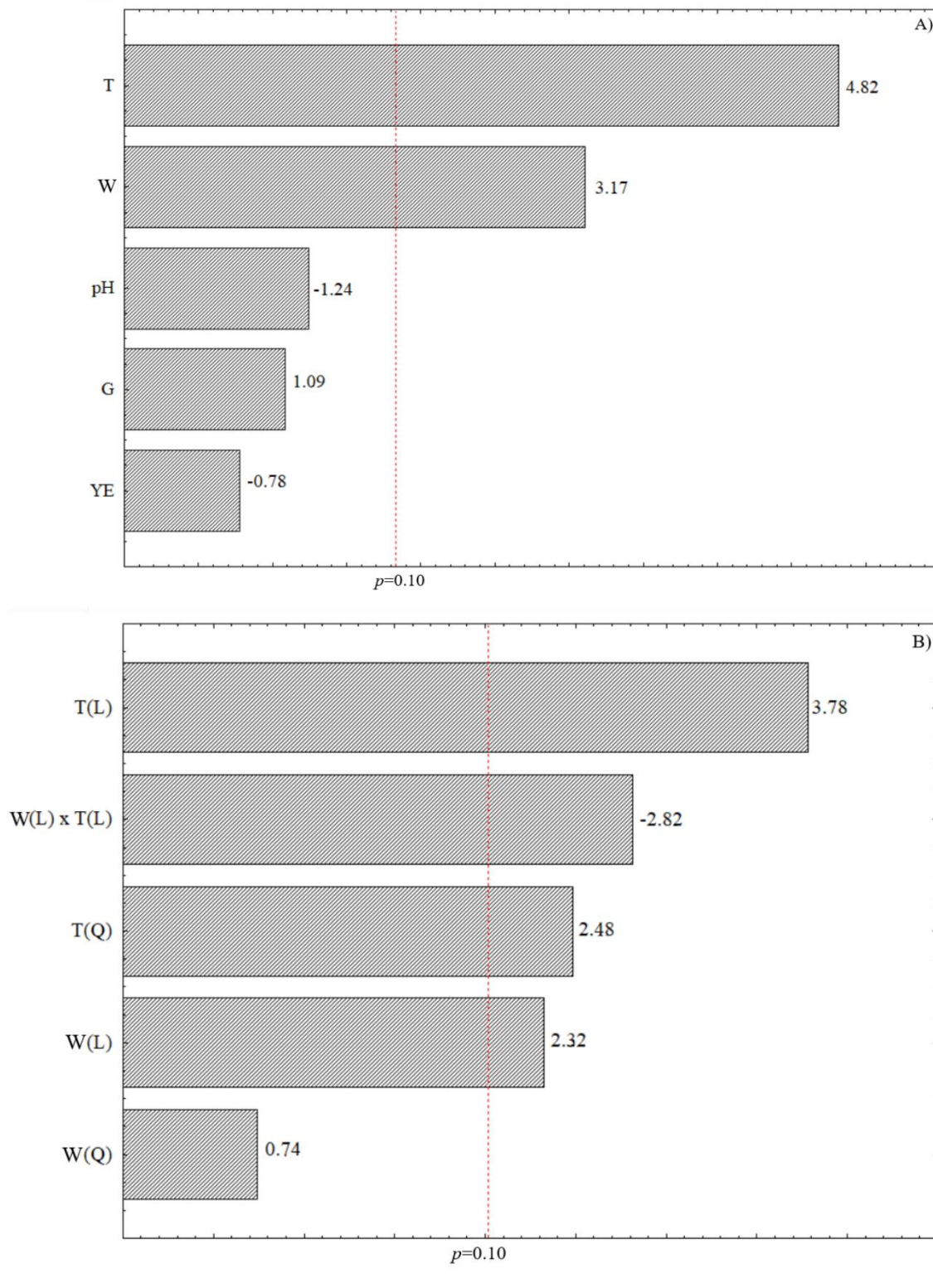
### **Solid fermentation optimization**

The *M. indicus* UFSM 54 metabolites produced in solid fermentation led to lesions in the *C. sativus* leaves under all evaluated growth conditions (Table 1). Nevertheless, experiments 4, 6, and 10 had the largest lesions on the leaf surface, and PB data were used to assess the influence of variables on lesion development (Fig. 1A). Only temperature and water volume were statistically significant ( $p < 0.1$ ), with the most extensive injuries occurring at higher temperatures and water volumes. Hence, these two variables were selected to be optimized through the CCRD experimental matrix (Table 2).

**Table 1** The Plackett-Burman experimental design was used to evaluate the effects of solid fermentation variables on lesion development in detached *C. sativus* leaves by *M. indicus* UFSM 54 metabolites

Experiment	T <sup>1</sup> (°C)	pH	W <sup>2</sup> (ml)	YE <sup>3</sup> (g l <sup>-1</sup> )	G <sup>4</sup> (g l <sup>-1</sup> )	Lesion <sup>5</sup> (%)
1	35 (1)	4 (-1)	24 (1)	0.05 (-1)	0.5 (-1)	25 abc <sup>6</sup>
2	35 (1)	6 (1)	8 (-1)	0.15 (1)	0.5 (-1)	12 e
3	25 (-1)	6 (1)	24 (1)	0.05 (-1)	1.5 (1)	16 de
4	35 (1)	4 (-1)	24 (1)	0.15 (1)	0.5 (-1)	32a
5	35 (1)	6 (1)	8 (-1)	0.15 (1)	1.5 (1)	22 bcd
6	35 (1)	6 (1)	24 (1)	0.05 (-1)	1.5 (1)	30 ab
7	25 (-1)	6 (1)	24 (1)	0.05 (1)	0.5 (-1)	17 cde
8	25 (-1)	4 (-1)	24 (1)	0.15 (1)	1.5 (1)	17 cde
9	25 (-1)	4 (-1)	8 (-1)	0.15 (1)	1.5 (1)	12 e
10	35 (1)	4 (-1)	8 (-1)	0.05 (-1)	1.5 (1)	27 ab
11	25 (-1)	6 (1)	8 (-1)	0.05 (-1)	0.5 (-1)	12 e
12	25 (-1)	4 (-1)	8 (-1)	0.05 (-1)	0.5 (-1)	12 e
13	30 (0)	5 (0)	16 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	17 cde
14	30 (0)	5 (0)	16 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	17 cde
15	30 (0)	5 (0)	16 (0)	0.10 (0)	1.0 (0)	17 cde

<sup>1</sup>T = Temperature; <sup>2</sup>W = water volume; <sup>3</sup>YE = yeast extract; <sup>4</sup>G = glucose; <sup>5</sup>percentage of leaf surface with lesions caused by fungal metabolites. <sup>6</sup>Means followed by the same letter do not differ statistically from each other by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1** Pareto graph with the solid fermentation variables evaluated in the PB (A) and CCRD (B) designs to produce *M. indicus* UFSM 54 metabolites that cause lesions in *C. sativus* leaves. T = Temperature; W = water volume; G = glucose; YE = yeast extract; L= linear; Q = quadratic

In the execution of the experimental matrix of the CCRD, experiments 2, 3, 4, and 8 with temperatures ranging from 33 to 40 °C and water volume from 14 to 32 mL caused the most damage to the tested plants, reaching 40-48% of the leaf surface (Table 2).

**Table 2** Central composite rotatable design used to optimize the variables temperature and water volume of solid fermentation to produce *M. indicus* UFSM 54 metabolites, causing lesions in *C. sativus* leaves

Experiment	T <sup>1</sup> (°C)	W <sup>2</sup> (mL)	Lesion <sup>3</sup> (%)
1	33 (-1)	14 (-1)	25 c
2	33 (-1)	26 (1)	45 ab
3	37 (1)	14 (-1)	45 ab
4	37 (1)	26 (1)	40 abc
5	35 (0)	8 (-1.41)	25 c
6	35 (0)	32 (1.41)	35 bcd
7	30 (-1.41)	20 (0)	25 c
8	40 (1.41)	20 (0)	48 a
9	35 (0)	20 (0)	30 cd
10	35 (0)	20 (0)	30 cd
11	35 (0)	20 (0)	30 cd

<sup>1</sup>T = Temperature; <sup>2</sup>W= water volume; <sup>3</sup>percentage of the leaf surface with lesions caused by fungal metabolites. Means followed by the same letter do not differ statistically from each other by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

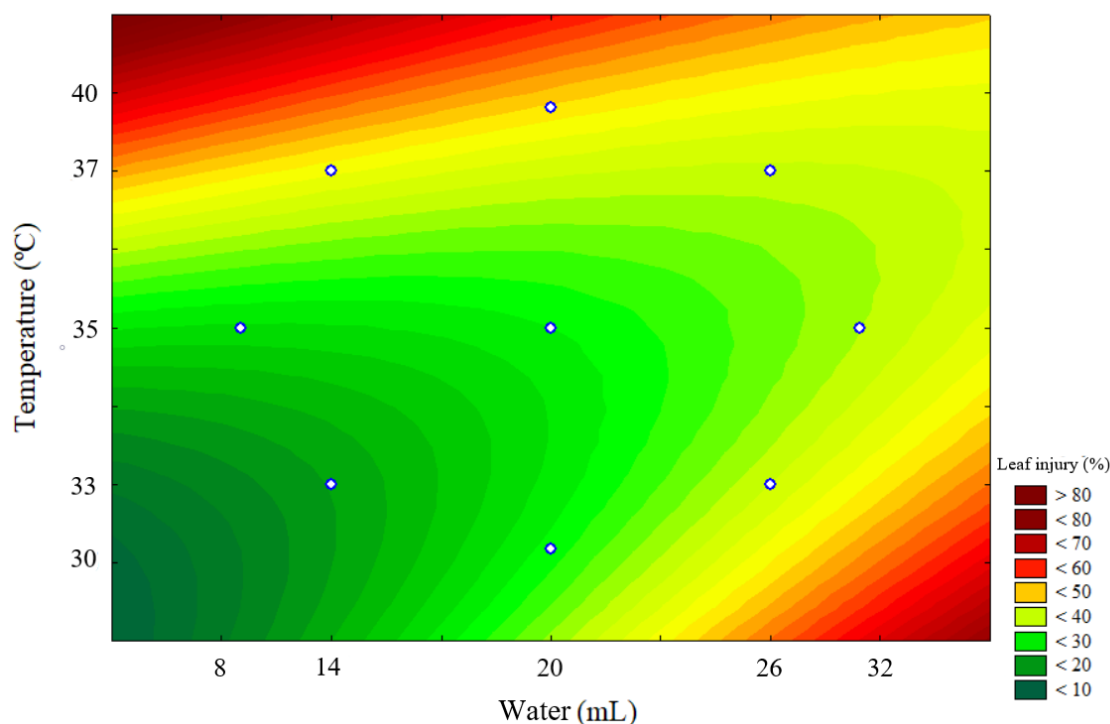
The CCRD results were used to estimate the parameters of a quadratic mathematical model to define the significant variables that maximize *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolite production in solid fermentation (Equation 2).

Equation 2:

$$L = 29.98 + 3.65 * W + 1.39 * W^2 + 5.95 * T + 4.66 * T^2 - 6.25 * W * T$$

Where: L is leaf lesion development, W is the volume of water in the solid culture medium, and T is the temperature ( $p < 0.01$ ).

This model was validated by ANOVA, and the coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.87 (Table S1). The response surface was used to define the optimal ranges depending on lesion development (Figure 2). By analyzing the model parameters, we observed that the increased water volume and temperature led to more phytotoxic metabolites for *C. sativus* ( $p < 0.01$ ) (Fig.2).



**Fig. 2** Contour curve to optimize *M. indicus* phytotoxic metabolite production in solid fermentation while considering variables with interaction (temperature and water volume)

### Submerged fermentation optimization

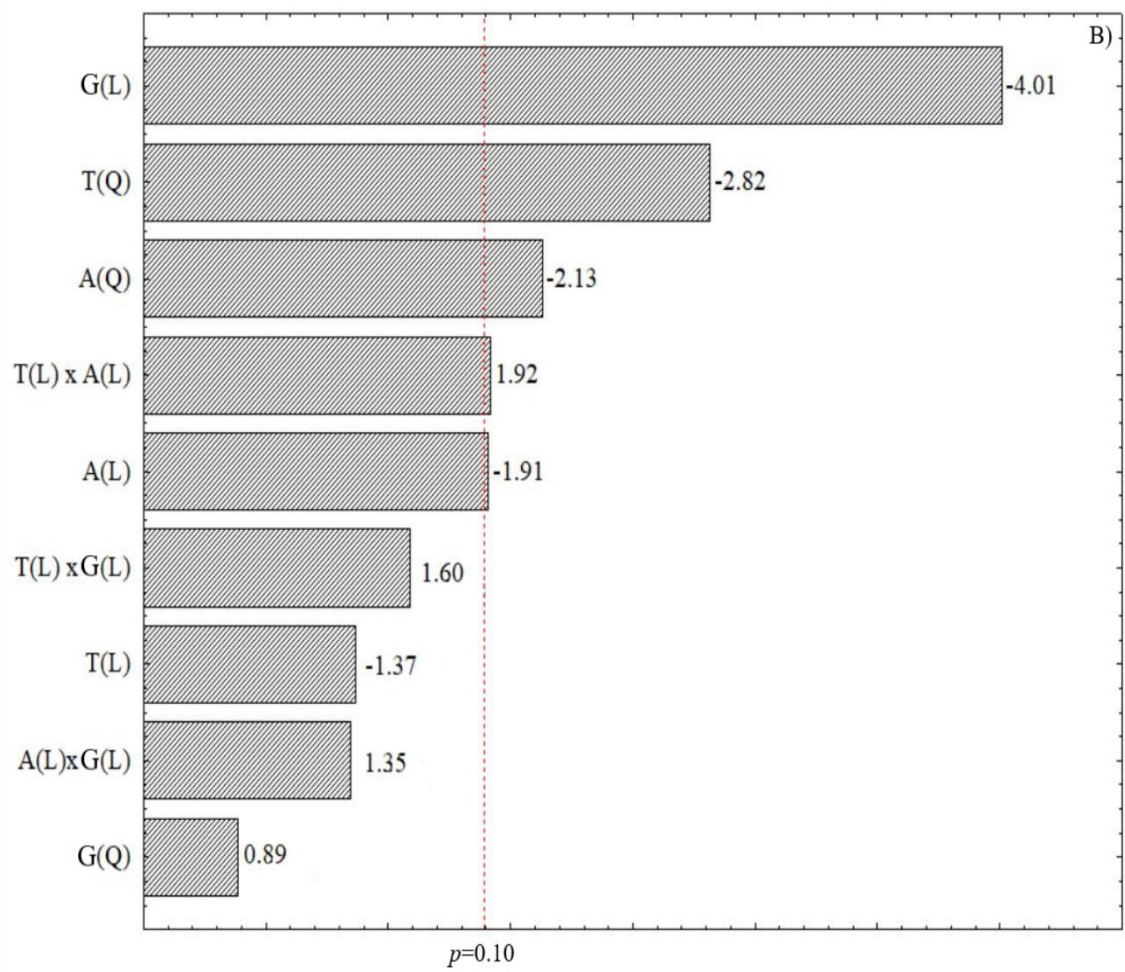
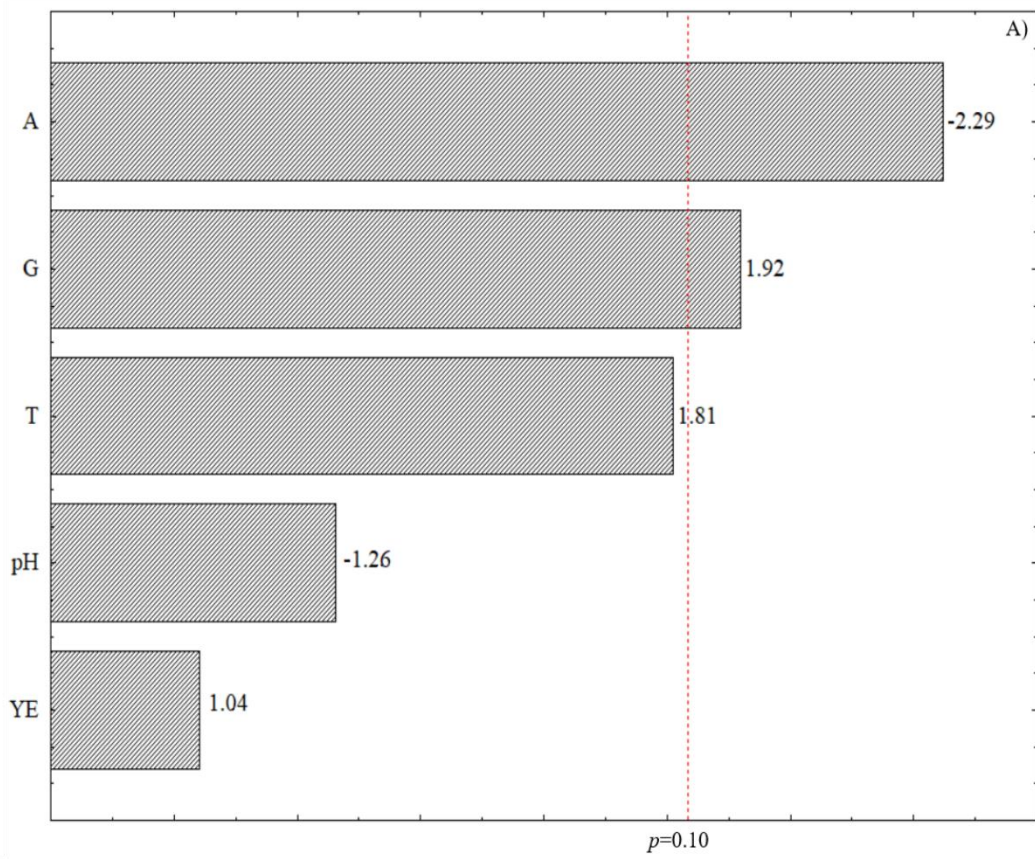
The application of fungal metabolites produced by submerged fermentation on detached *C. sativus* leaves resulted in greater lesions in experiment 6 of the PB (Table 3). The submerged fermentation variables that significantly influenced the production of *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolites were identified by submitting the data in Table 3 to statistical analysis (Fig. 3A). Among the five variables tested, only medium agitation speed and glucose concentration were significant in developing lesions in detached *C. sativus* leaves. However, we also decided to include the temperature variable in the subsequent analyses due to the proximity to the statistical limit.



**Table 3** Plackett-Burman experimental design used to evaluate the effects of submerged fermentation variables on the production of *M. indicus* UFSM 54 metabolites that cause lesions in detached *C. sativus* leaves.

Experiment	T <sup>1</sup> (°C)	YE <sup>2</sup> (g L <sup>-1</sup> )	G <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	<sup>4</sup> A (rpm)	pH	<sup>5</sup> Lesion (%)
1	35 (1)	0.03 (-1)	0.7 (1)	40 (-1)	4 (-1)	26 ab
2	35 (1)	0.07 (1)	0.3 (-1)	170 (1)	4 (-1)	20 ab
3	25 (-1)	0.07(1)	0.7 (1)	40 (-1)	6 (1)	20 ab
4	35 (1)	0.03 (-1)	0.7 (1)	170 (1)	4 (-1)	20 ab
5	35 (1)	0.07 (1)	0.3 (-1)	170 (1)	6 (1)	14 ab
6	35 (1)	0.07 (1)	0.7 (1)	40 (-1)	6 (1)	34 a
7	25 (-1)	0.07 (1)	0.7 (1)	170 (1)	4 (-1)	15 ab
8	25 (-1)	0.03 (-1)	0.7 (1)	170 (1)	6 (1)	10 c
9	25 (-1)	0.03 (-1)	0.3 (-1)	170 (1)	6 (1)	8 c
10	35 (1)	0.03 (-1)	0.3 (-1)	40 (-1)	6 (1)	10 c
11	25 (-1)	0.07 (1)	0.3 (-1)	40 (-1)	4 (-1)	14 ab
12	25 (-1)	0.03 (-1)	0.3 (-1)	40 (-1)	4 (-1)	24 ab
13	30 (0)	0.05 (0)	0.5 (0)	100 (0)	5 (0)	20 ab
14	30 (0)	0.05 (0)	0.5 (0)	100 (0)	5(0)	14 ab
15	30 (0)	0.05 (0)	0.5 (0)	100 (0)	5 (0)	18 ab

<sup>1</sup>T = Temperature; <sup>2</sup>YE = yeast extract; <sup>3</sup>G = glucose; <sup>4</sup>A = agitation speed. <sup>5</sup>Percentage of leaf surface with lesions caused by fungal metabolites. Means followed by the same letter do not differ statistically from each other by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3** Pareto chart with the variables evaluated in the PB (A) and CCRD (B) designs in submerged fermentation to produce *M. indicus* UFSM 54 metabolites that cause lesions in detached *C. sativus* leaves. A = agitation speed; G = glucose; T = temperature; YE = yeast extract; L = linear; Q = quadratic

Upon applying the CCRD experimental matrix, experiment 13 (35 °C, 50 rpm, and 1.5 g L<sup>-1</sup> glucose concentration) provided the most significant injuries, reaching 76% of the leaf surface (Table 4). This result represents a 44% increase in injuries compared to the maximum value obtained in the PB experimental matrix.

**Table 4** Central composite rotational design with selected variables from submerged fermentation to optimize the production of fungal metabolites capable of injuring detached *C. sativus* leaves

Experiment	T <sup>1</sup> (°C)	A <sup>2</sup> (rpm)	G <sup>3</sup> (g L <sup>-1</sup> )	Lesion <sup>4</sup> (%)
1	33(-1)	40 (-1)	3 (-1)	62 b
2	37 (1)	40 (-1)	3 (-1)	28 bcde
3	33(-1)	60 (1)	3 (-1)	26 cde
4	37 (1)	60 (1)	3 (-1)	22 de
5	33 (-1)	40 (-1)	6 (1)	28 bcde
6	37(1)	40 (-1)	6 (1)	20 de
7	33 (-1)	60 (1)	6 (1)	15 e
8	37 (1)	60 (1)	6 (1)	24 de
9	30 (-1.68)	50 (0)	4.5 (0)	28 bcde
10	40 (1.68)	50 (0)	4.5 (0)	24 de
11	35 (0)	25 (-1.68)	4.5 (0)	34 bcd
12	35 (0)	75 (1.68)	4.5 (0)	28 bcde
13	35 (0)	50 (0)	1.5 (-1.68)	76 a
14	35 (0)	50 (0)	7.5 (1.68)	30 bcd
15	35 (0)	50 (0)	4.5 (0)	40 bc
16	35 (0)	50 (0)	4.5 (0)	42 b
17	35 (0)	50 (0)	4.5 (0)	42 b

<sup>1</sup>T = Temperature; <sup>2</sup>A = agitation speed; <sup>3</sup>G = glucose. <sup>4</sup>Means followed by the same letter do not differ from each other by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

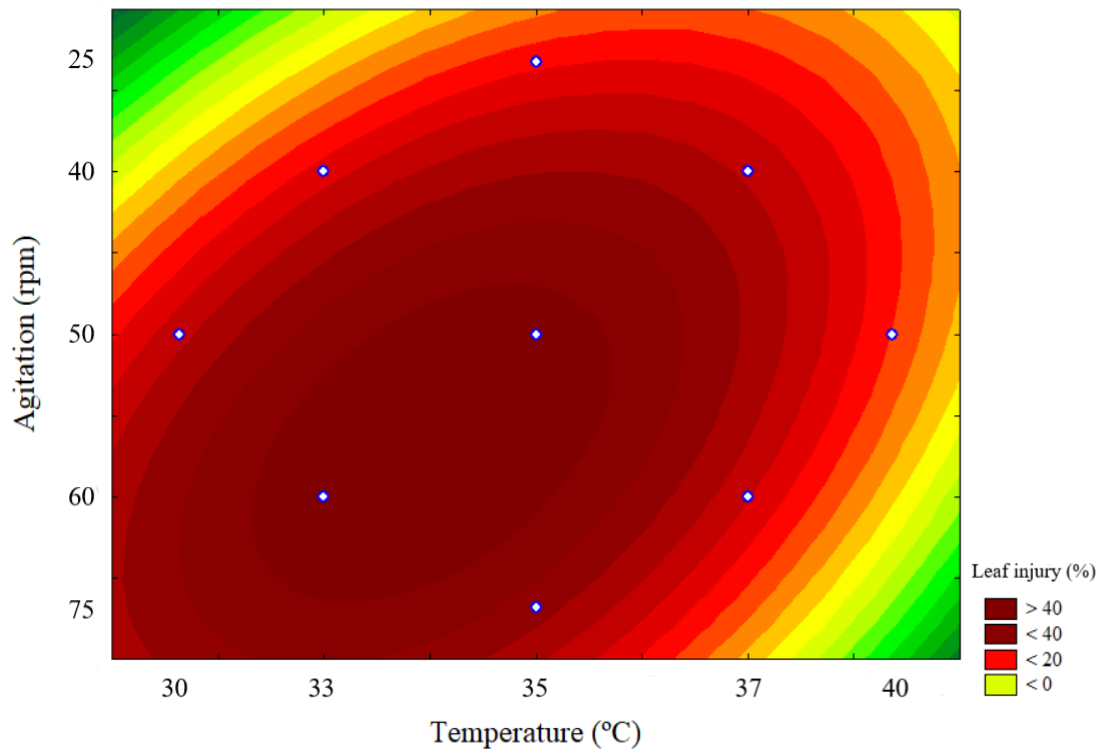
The data in Table 4 were used to estimate the parameters of a quadratic model that allows defining significant variables to maximize the production of *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolites (Equation 3).

Equation 3:

$$L = 0.41 + 0.072 * T^2 - 0.04 * A + 0.05 * A^2 - 0.09 * G + 0.05 * T * A$$

Where: L is the leaf lesion development, T is the temperature, A is the agitation speed, and G is the glucose concentration in the growth medium at a 10% significance level.

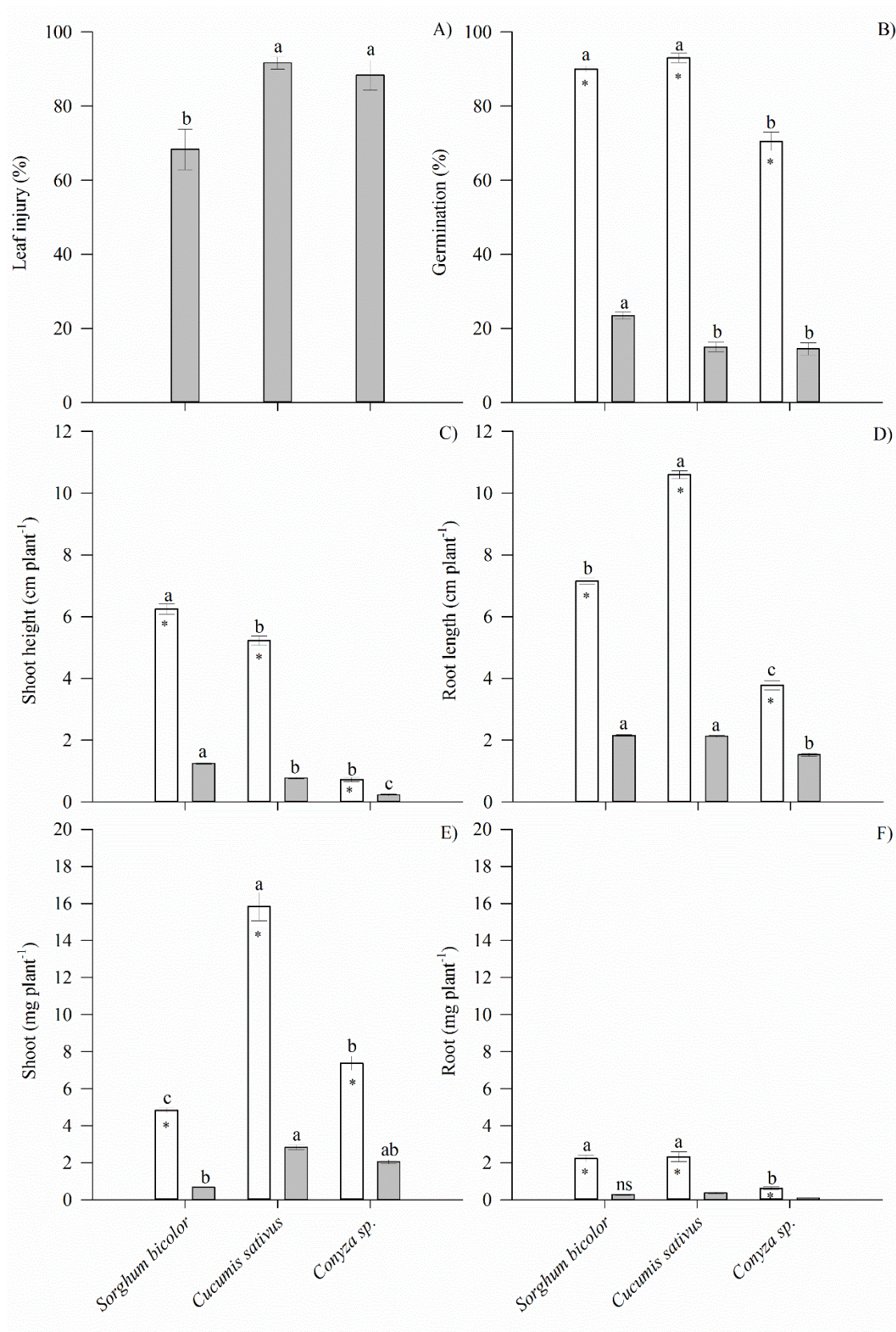
The response surface was used to determine the optimal ranges depending on the development of lesions (Fig. 4). Analysis of the model parameters revealed that higher temperatures, lower agitation speeds, and glucose concentrations in the culture medium lead to more phytotoxic metabolites (Fig. 2b). The effects of the variables in the model above were validated by ANOVA (Table S2) ( $R^2 = 0.86$ ). Thus, the model can be considered adequate to estimate leaf lesion development by *M. indicus* UFSM 54 metabolites based on the independent variables expressed by the contour curve (Fig. 4). The development of the most significant leaf lesions by fungal metabolites was observed to occur at the 30-37 °C temperature range and between 25 to 60 rpm.



**Fig. 4** Contour curve to optimize the production of *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolites considering the variables with interaction (agitation and temperature) in submerged fermentation

### Phytotoxic effects

Considering that the largest lesions on the *C. sativus* leaves were observed in experiment 13 of the submerged fermentation (76%; Table 4), this condition was considered the optimized one and used in the following tests. The phytotoxic effects of the metabolites produced by *M. indicus* UFSM 54 were tested on detached *Conyza sp.*, *S. bicolor*, and *C. sativus* leaves. The lesions reached a high percentage of the surface of adult *C. sativus* (92%), *Conyza sp.* (88%), and *S. bicolor* (68%) leaves (Fig. 5A). There was an average reduction in seed germination above 70% (Fig. 5B).



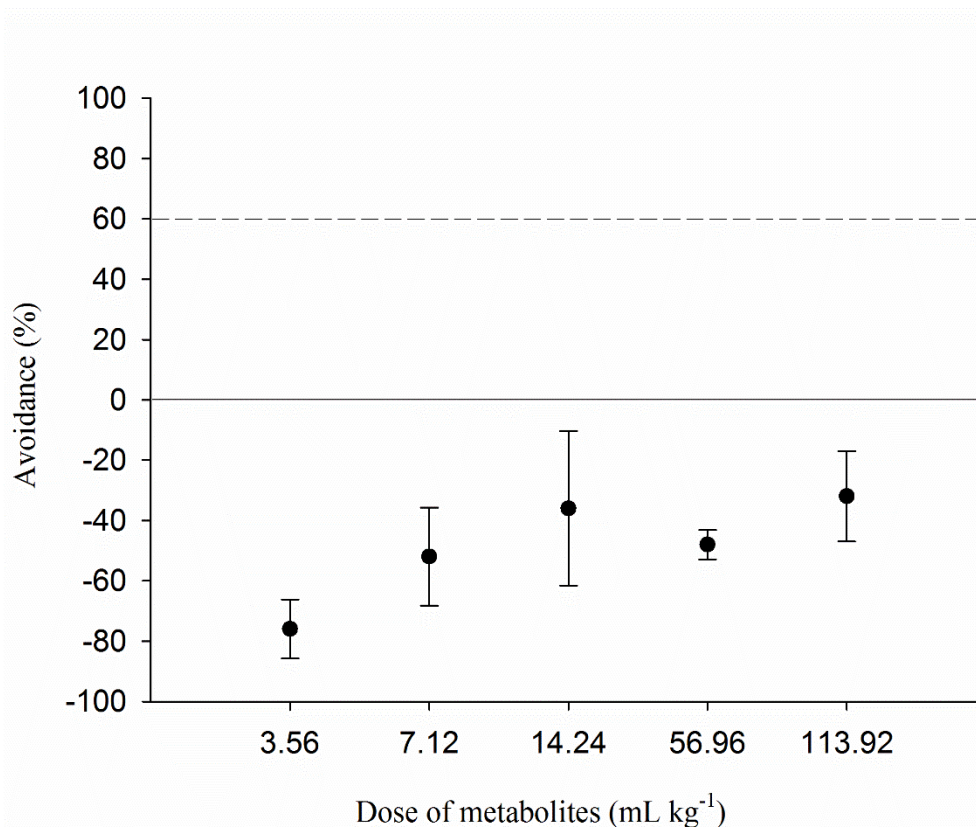
**Fig. 5** The phytotoxic effects of *M. indicus* UFSM 54 metabolites in *S. bicolor*, *Conyza sp.*, and *C. sativus* were evaluated by the surface of lesions on the detached leaves (A), germination (B), and seedling growth as per the length of the aerial part (C) and root (D) and dry mass of the

aerial part (E) and roots (F). \*Significant effect of the metabolite on the plant ( $p<0.05$ ); the letters compare the different plants in the same treatment (metabolite or control) by Tukey's test ( $p<0.05$ )

The suppressive effects of the fungal metabolites had consequences on seedling growth. The fungal metabolite reduced the length and dry mass of the aerial part and root of all plants ( $p<0.05$ ) (Fig. 5C, D, E, F), while *C. sativus* presented the most significant reduction in root length (80%) and aerial part (85%) compared to the control. Regarding plant biomass, the fungal metabolite caused an average growth reduction of 80% of the aerial part and 85% of the roots. Notably, even in the case of a plant difficult to control by conventional herbicides, there was a reduction of 72% in the aerial part and 84% in the roots of *Conyza sp.* compared to the control. The phytotoxicity of the *M. indicus* UFSM 54 metabolites on the plants followed the order: *C. sativus* > *S. bicolor* > *Conyza sp.*

### **Ecotoxicological tests**

After 48 h of exposure to fungal metabolites, earthworm lethality did not occur in the avoidance test at any of the six concentrations analyzed, thereby validating the test. The increasing doses of the metabolites modified *E. andrei* behavior ( $p<0.05$ ) (Fig. 6), albeit no worm evasion was observed in the soil where the metabolites were added. On the contrary, there was acceptance of the metabolites at all doses, with emphasis on the lowest dose used ( $3.56 \text{ ml kg}^{-1}$ ), as there was 30% more acceptance than what was observed in the averages of the other doses. Even so, no avoidance was observed, and it was evident that the higher doses reduced the earthworms' acceptance of the bioproduct.

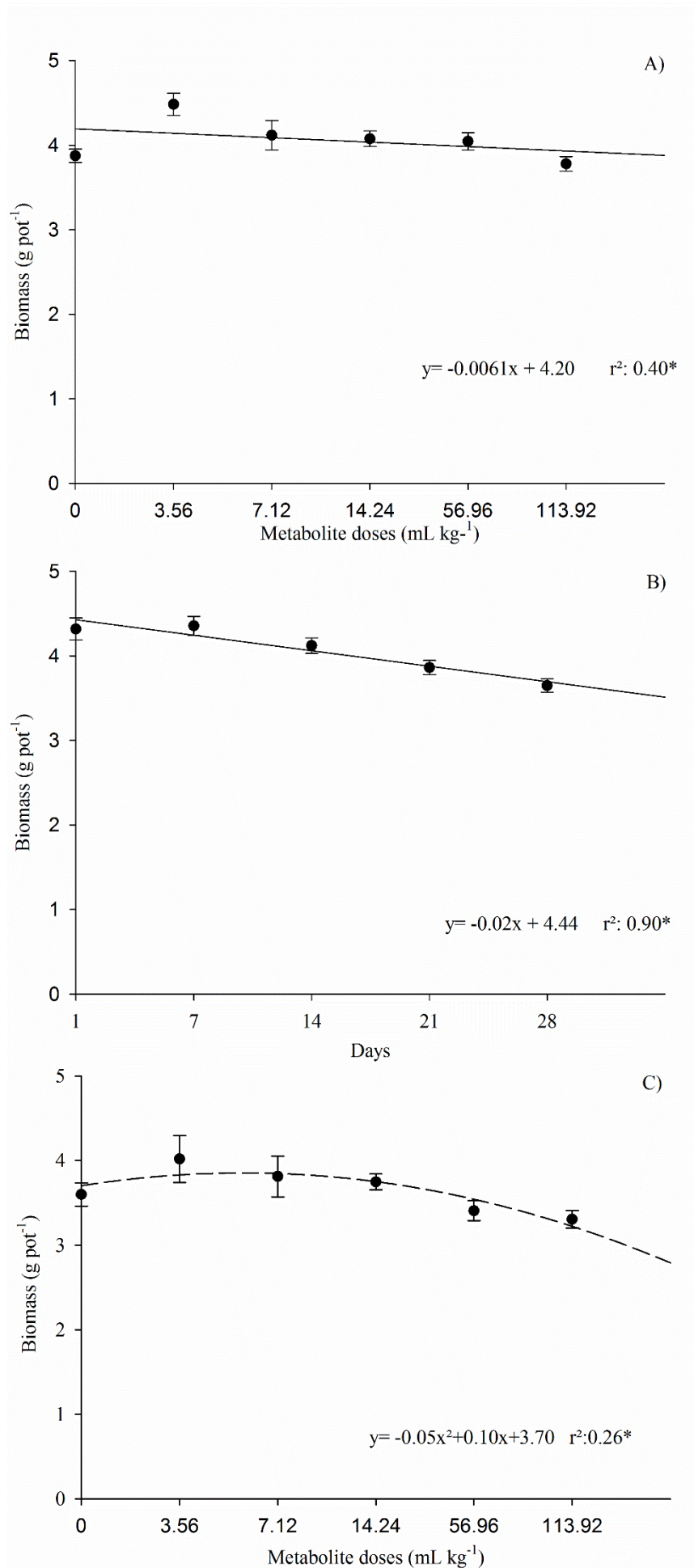


**Fig. 6** Avoidance of earthworms (*E. andrei*) added to the soil with increasing doses (ml kg) of the *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolites with reference control soil without adding the metabolites. \*Values above the dashed line indicate that the real distribution of earthworms between the control soil and treatment soil is significantly different ( $p \leq 0.05$ ) from the expected binomial distribution ( $p=0.5$ ;  $n=30$ ). Avoidance below zero means the earthworms preferred the soil with fungal metabolites. Bars are standard errors from five repeated tests (five containers)

There were no earthworm deaths during the acute test since, on the 28th day, ten individuals were observed in each container. This finding indicates that the fungal metabolites can be characterized as non-toxic because there was no acute toxicity during exposure to the treated soil [26]. Moreover, the metabolite changed the earthworm biomass (Fig. 7), albeit there was no significant interaction between the doses used and exposure time ( $p=0.4284$ ). In isolation, there was an effect of the metabolite doses ( $p<0.001$ ) and exposure time ( $p<0.001$ ). The higher doses resulted in a linear decrease in *E. andrei* biomass (Fig. 7a), and at the highest dose used (113.92 mg kg<sup>-1</sup>), a 9% reduction in earthworm biomass was verified compared to the average of the other doses. The most significant increase in biomass (0.6 g pot<sup>-1</sup>) was observed in the lowest dose of the bioherbicide (3.56 mg kg<sup>-1</sup>) in relation to the soil that did not



receive the metabolite. Earthworms showed a reduction in biomass with increasing exposure time (Fig. 7b). The highest biomass was verified on the seventh day, with a 9.2% increase compared to the average of the other days. At 28 days, the earthworms showed a reduction of approximately 1 g pot<sup>-1</sup> compared to the beginning of the test, and at the highest dose, the greatest reduction in biomass was observed (Fig. 7c).



**Fig. 7** Fresh mass of *E. andrei* in soil added with the *M. indicus* UFSM 54 phytotoxic metabolites, considering the effects of the doses of the metabolite (A), exposure period (B), and mass of earthworms at the end of the test (28 days) (C) ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

In recent years, the number of studies with *M. indicus* has increased significantly, indicating that it is a promising fungus to obtain metabolites with bioherbicidal, antimicrobial, antiparasitic, and antitumor properties [15, 27-29]. In this study, solid and submerged fermentation were optimized, which allowed us to compare the best production process of phytotoxic metabolites in a low-cost residue-based culture medium. This information is of utmost importance for industrial processes and large-scale metabolite production. Furthermore, ecotoxicological tests with bioherbicides are rare in the literature, and our findings indicate that *M. indicus* UFSM 54 metabolites have low toxicity to earthworms.

In solid fermentation, the optimal conditions to produce metabolites occurred at temperatures varying between 33-40 °C and water volume from 14 to 32 ml, which caused injuries between 40 and 48% on *C. sativus* leaf surfaces. The use of solid-state fermentation shows the similarity of cultivation to the conditions of the microorganism's natural habitat due to the low amount of water in the medium and presenting more significant heterogeneity [30]. The microbial metabolic processes in solid fermentation are influenced by several parameters, mainly by temperature and humidity [31]. Temperature can affect microbial growth or the quality of the metabolite produced due to difficulty removing the metabolic heat generated by the microorganism [32]. Water is involved in most vital metabolic activities, and microbial cells require high moisture levels for their growth. Suboptimal moisture results in low nutrient solubility, poor growth, and water stress, while high moisture content in solid fermentation leads to low oxygen transfer [32, 33]; hence the study of the ideal substrate moisture is a determining factor in solid fermentation.

In the submerged fermentation, the temperature conditions of 35 °C, agitation of 50 rpm, and glucose concentration of 1.5 g l<sup>-1</sup> provided injuries of 76% of the leaf surface. Among the five variables tested in the submerged fermentation of *M. indicus* UFSM 54 (temperature, agitation, pH, glucose concentration, and yeast extract), only the agitation of the culture medium and glucose concentration were statistically significant in developing leaf lesions on *C. sativus* leaves. However, the study maintained the temperature due to its importance for

fungal metabolism and the proximity to the statistical limit [34, 35]. Research has shown that higher temperatures provide stress conditions for the microorganism, triggering the production of secondary metabolites. Gonçalves et al. [36] obtained higher values of  $\beta$ -glucosidase production by *Lichtheimia ramosa* cultivated at 35 °C. Likewise, Matkar et al. [37] obtained cellulase production by the fungus *Aspergillus sydowii* at 40 °C. The 50-rpm agitation promoted better metabolite production, thereby corroborating Souza et al. [38] and Brun et al. [39], who reported the optimal agitation speed interval for producing *Diaporthe* spp. and *Phoma* spp. metabolites to be between 25 to 60 rpm. Very high agitations are unfavorable for phytotoxic metabolite production and favor mechanical damage to hyphae by shearing [40]. As observed herein (1.5 g l<sup>-1</sup>, the lowest dose tested), low glucose concentrations in the medium may favor secondary metabolite production in submerged fermentation. According to Kobakhidze et al. [41], higher glucose concentrations may cause metabolic repression, negatively affecting metabolite production.

The choice of the solid or submerged fermentation process is decisive in producing compounds of interest, although their selection depends on the type of microorganism [42]. As reported herein, the metabolite obtained in submerged fermentation showed a more significant development of lesions in *C. sativus* leaves than the produced in solid fermentation and, therefore, it was used for the other tests. Similar results were recently observed by Sepúlveda et al. [43] in *Aspergillus fumigatus* cultivation for ellagic acid production, Wei et al. [44] in *Antrodia cinnamomea* cultivation for 4-acetyl anthroquinonol B and antroquinonol production, and Agboyibor et al. [45] in *Monascus purpureus* cultivation for the production of red and yellow monascus pigments.

The *M. indicus* UFSM 54 metabolites obtained under the optimized conditions (submerged fermentation, 35 °C, 1.5 g l<sup>-1</sup> of glucose, and 50 rpm) promoted large lesions in *S. bicolor*, *Coryza* sp., and *C. sativus* leaves. This phytotoxic efficiency is associated with the phytopathogenic capacity of the fungus, which has already been reported for *Zamia* spp. [46] and *Borreria verticillata* plants [27]. A similar result was observed by Brun et al. [39] for metabolites of *Phoma* spp., which inhibited *C. sativus* and *S. bicolor* seed germination. Bailey et al. [47] observed the same fungus inhibition of seed germination in dicotyledonous but not in monocotyledonous. The *M. indicus* UFSM 54 metabolites showed the potential to cause lesions in mono and dicotyledons, thereby demonstrating its potential as a bioherbicide.

Traditional environmental risk assessment procedures for pesticides are based on toxicological exposure, although preliminary research to assess the ecotoxicological effects of

the product on non-target organisms is essential for screening phytotoxic metabolites with reduced environmental impact [14]. The avoidance test was performed to verify the effects of the *M. indicus* UFSM 54 metabolite as a stress-causing agent in earthworms [42, 48]. Thus, the metabolite applied to the soil was not considered toxic to the earthworm species *E. andrei*, since, in order for it to be considered toxic, over 80% of the total earthworms should remain in the control soil, which was not observed in this study [23]. On the contrary, the earthworms were attracted to the metabolite, albeit this decreased at higher doses.

The acute effect of a toxic agent on the body could be observed through lethality; however, other manifestations may develop, including decreased mobility and changes in body weight [49]. There were no *E. andrei* deaths despite the lower biomass of individuals at higher doses and exposure times to the metabolite. Therefore, plausible that any  $LC_{50}$  values of the *M. indicus* UFSM 54 metabolite applied to the soil would be above  $113.92 \text{ ml kg}^{-1}$ , which was the highest concentration tested. The reduction of *E. andrei* biomass in response to higher doses and exposure times indicates a direct response to the metabolite, given that the organism is restricted to the concentration tested, and although mortality did not occur, it shows that the earthworms showed small physiological losses [50].

The rapid degradation of organic compounds in the fungal metabolite likely justifies the low avoidance of earthworms and even the greater biomass in the first days of exposure (7 days) [51]. However, this does not exclude possible sublethal effects that should be further studied using chronic ecotoxicity tests [52]. The rapid compound degradation and depletion of the new food source of earthworms support biomass reduction with the longest exposure time. Few studies have evaluated fungal metabolite toxicity in earthworms [9, 14], but some have already reported the toxic effects, including Schnug et al. [53], who studied the toxicity of three biocides (sphenolvalerate, picoxystrobin, and triclosan) in earthworms and found that the time and doses applied in the biocide formulations reduced *E. foetida* biomass. This shows that ecotoxicological studies with microbial metabolites are paramount and must receive greater attention from researchers.

This study employed agro-industrial residues as a basis for the fungal culture medium, reducing production costs and providing an environmentally correct destination to polluting residues [54, 55]. Sugarcane bagasse has been used in culture media due to its highly fibrous texture, which results in a greater surface for hyphae adhesion and colonization [56]. In addition, the culture medium supplementation with other components (e.g., glucose) and under

optimized culture conditions (e.g., temperature, water, and agitation) is suitable for producing fungal metabolites (57-59).

## CONCLUSIONS

Under optimized cultivation conditions, the most significant lesions on *C. sativus* leaves were caused by *M. indicus* UFSM 54 metabolites produced in submerged fermentation;

The *M. indicus* UFSM 54 metabolites severely damaged germination, initial growth, and detached *C. sativus*, *Conyza* sp., and *S. bicolor* leaves;

The *M. indicus* UFSM 54 had no ecotoxicological effects on *E. andrei* earthworms at the tested doses.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1. ANOVA parameters of CCRD for the production of lesions in detached *C. sativus* leaves by the metabolites produced by *M. indicus* UFSM 54 in solid fermentation.

Effects	Quadratic sum	Degree of freedom	Quadratic mean	F value	<i>P</i>
Water volume L	106.17	1	106.17	5.39	0.0670*
Water volume Q	10.81	1	10.81	0.55	0.4920
Temperature L	282.40	1	282.40	14.32	0.0128*
Temperature Q	121.58	1	121.58	6.17	0.0555*
Water volume L x Temperature L	156.25	1	156.25	8.00	0.0373*
Error	98.51	5	19.7	–	–
Total SS	764.55	10	–	–	–

$R^2 = 0.87$ . \*Statistically significant at  $p < 0.01$ .

Table S2. CCRD ANOVA parameter estimators for the development of lesions on detached *C. sativus* leaves by *M. indicus* UFSM 54 metabolites produced by submerged fermentation.

Effects	Quadratic sum	Degree of freedom	Quadratic mean	F value	<i>P</i>
Temperature L	140.090	1	140.090	1.865	0.214
Temperature Q	594.689	1	594.689	7.916	0.026*
Stirring L	273.420	1	273.420	3.639	0.098*
Agitation Q	340.267	1	340.267	4.529	0.071*
Glucose L	12106.009	1	12106.009	16.053	0.005*
Glucose Q	59.126	1	59.126	0.787	0.405
Temperature L x Agitation L	276.125	1	276.125	3.676	0.097*
Temperature L x Glucose L	190.125	1	190.125	2.532	0.156
Agitation L x Glucose L	136.125	1	136.125	1.812	0.220
Error	525.879	7	75.126	–	-
Total SS	3832.235	16	–	-	-

$R^2 = 0.86$ . \*Statistically significant at  $p < 0.01$ .



## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq); the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, CAPES), Finance Code 001; for scholarships and funding support. We also thank the members of the Laboratory of Soil Biology at the Federal University of Santa Maria for their involvement in this study.

## **DECLARATIONS**

### **Funding**

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq); the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, CAPES), Finance Code 001.

### **Conflicts of interest/Competing interests**

The authors declare that there are no conflicts of interest associated with the work presented.

### **Ethics approval**

Not applicable.

### **Availability of data and material**

Availability of data and materials the strain *Mycoleptodiscus indicus* UFSM 54 was preserved in Laboratory of Soil Biology at the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### **Code availability**

Not applicable.

## REFERENCES

1. Andrighetti, M.S., Nachtigall, G.R., Nascimento de Queiroz, S.C., Ferracini, V.L., Ayub, M.A.Z. (2014) Biodegradation of glyphosate by microbiota of soils of apple tree fields. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 38:1643-1653. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000500029>
2. Leoci, R., Ruberti, M. (2020) Glyphosate in Agriculture: Environmental Persistence and Effects on Animals. *J. Agric. Environ. Int. Dev.* 114:99-122. <https://doi.org/10.12895/jaeid.20201.1167>
3. Maggi, F., Cecilia, D., Tang, F.H.M., McBratney, A. (2020) The global environmental hazard of glyphosate use. *Sci. Total Environ.* 717:137167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>
4. Vera, M.S., Fiori, E.D., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Molina, M.C.R., Tell, G., Pizarro, H. (2012) Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21:1805-1816. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-0915-2>
5. Santos, F.M., Vargas, L., Christoffoleti, P.J., Agostinetto, D., Mariani, F., Dal Magro, T. (2014) Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl herbicide. *Planta Daninha* 32:427-435. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582014000200021>
6. Radhakrishnan, R., Alqarawi, A.A., Abd Allah, E.F. (2018) Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotox. Environ. Safe* 158:131-138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
7. Keswani, C., Singh, H.B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T.R., Borriss, R., Vinale, F., Sansinenea, E. (2019) Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl. Microbiol. Biot.* 103:9287-9303. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>
8. Varejão, E.V.V., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Barreto, R.W., Vieira, B. (2013) Toxicidade de Filtrados de Cultura de *Alternaria euphorbiicola* em folhas de *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha* 31:1-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582013000100001>
9. Romdhane, S., Devers-Lamrani, M., Barthelmebs, L., Calvayrac, C., Bertrand, C., Cooper, J.F., Dayan, F.E., Laurent, F.M. (2016) Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermone on the microbial community of two arable soils. *Front. Microbiol.* 7:1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00775>

10. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021) AGROFIT, Brazil. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Accessed 10 August 2021
11. Qiu, P., Feng, Z.X., Tian, J.W., Lei, Z.C., Wang, L., Zeng, Z.G., Chu, Y.W., Tian, Y.Q. (2015) Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China Chinese. *J. Nat. Med.* 13:942-953. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30102-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30102-3)
12. Perotti, V.E., Larran, A.S., Palmieri, V.E., Martinatto, A.K., Permingeat, H.R. (2020) Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant. Sci.* 290:110255. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110255>
13. Bonny, S. (2017) Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact. *Biol. Control.* 10:1-9. <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0589-7>
14. Fumagalli, P., Andolfi, A., Avolio, F., Boari, A., Cimmino, A., Finizio, A. (2012) Ecotoxicological characterisation of a mycoherbicide mixture isolated from the fungus *Ascochyta caulina*. *Pest. Manag. Sci.* 69:850-856. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3447>
15. Portela, V.O., Moro, A., Santana, N.A., Baldoni, D.B., Castro, I.A., Antonioli, Z.I., Dalcol, I.I., Jacques, R.J.S. (2020). First report on the production of phytotoxic metabolites by *Mycoleptodiscus indicus* under optimized conditions of submerged fermentation. *Environ. Technol.* <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1836030>
16. Souza, A.R.C., Baldoni, D.B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Machado, C., Ferraz, R.C., Kuhn, R.C., Jacques, R.J.S., Guedes, J.V.C., Mazutti, M.A. (2017) Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *Braz. J. Microbiol.* 48:101-108. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>
17. Frans, R., Crowler, H. (1986) In: Camper ND (ed) *Research Methods in Weed Science*. Southern Weed Science Society, 3rd edn. Champaign.
18. Brasil. (2009). *Regras Para Análise de Sementes. Teste de Germinação*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília.
19. Vidal, R.A., Kalsing, A., Goulart, I.C.G.R., Lamego, F.P., Christoffoleti, P.J. (2007) Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. *Planta Daninha* 25:309-315. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582007000200010>

20. Nakagawa, J. (1999) In: Krzyzanoski, F.C., Vieira, R.D., França Neto, J.B. (ed) Vigor de sementes: conceitos e testes (1 st). ABRATES, Londrina.
21. Mendes, I.S., Rezende, M.O.O. (2014) Assessment of the allelopathic effect of leaf and seed extracts of *Canavalia ensiformis* as post emergent bioherbicides: A green alternative for sustainable agriculture. J. Environ. Sci. Health B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 49:374-380. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.882179>
22. Radwan, M.A., Farrag, S.A.A., Abu-Elamayem, M.M., Ahmed, N.S. (2012) Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. Appl. Soil Ecol. 56:58-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008>
23. ABNT. Brazilian Association of Technical Standards NBR ISO 17512-1 (2011) Soil quality: leakage test to assess soil quality and effects of chemical substances on behavior: Part 1: earthworm test (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro.
24. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development (2004) Guideline for the testing of chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*)
25. Ferreira, D.F. (2014) Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Cienc. Agrotec. 38:109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
26. ABNT. Brazilian Association of Technical Standards NBR 15537 (2007) Terrestrial ecotoxicology – Acute ecotoxicity – Earthworm test method. Rio de Janeiro.
27. Andrioli, W.J., Conti, R., Araújo, M.J., Zanasi, R., Cavalcanti, B.C., Manfrim, V., Toledo, J.S., Tedesco, D., Moraes, M.O., Pessoa, C., Cruz, A.K., Bertucci, C., Sabino, J., Nanayakkara, D.N.P., Pupo, M.T., Bastos, J.K. (2014) Mycoleptones A-C and polyketides from the endophyte *Mycoleptodiscus indicus*. J. Nat. Prod. 77:70-78. <https://doi.org/10.1021/np4006822>
28. Oliveira, L.C., Ishida, A.K.N., Silva, C.T.B., Carvalho, J.M., Feitosa, A.O, Marinho, P.S.B., Marinho, A.M.R. (2019) Antibacterial Activity of Austdiol Isolated from *Mycoleptodiscus indicus* Against *Xanthomonas axonopodis* pv. Passiflorae. Rev. Virtual. Quim. 11:596-604. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190045>
29. Ahmed, T., Pattnaik, S., Khan, M.B., Ampasala, D.R., Busi, S., Sarma, V.V. (2020) Inhibition of quorum sensing–associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Mycoleptodiscus indicus* PUTY1. Braz. J. Microbiol. 51:467-487. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00235-y>
30. Pandey, A. (2003) Solid state fermentation. Biochem. Eng. J. 13:81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)

31. El-Feky, R.M., Abdel Fattah, A.A., Gibriel, A.Y., Farag, A.A. (2019) Optimization the Parameter Process of Solid-State Fermentation to Produce the Fungal  $\alpha$ -amylase on Agro-Industrial By-Products. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences 27:441-454. <http://dx.doi.org/10.21608/AJS.2019.43583>
32. Khanahmadi, M., Arezi, I., Amiri, M.S., Miranzadeh, M. (2018) Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. Biocatal. Agric. Biotechnol. 13:272-282. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.005>
33. Webb, C., Manan, M.A. (2017) Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. J. Appl. Biotechnol. Bioeng. 4:511-532. <http://dx.doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
34. Lonsane, B.K., Ramesh, M.V. (1990) Production of bacterial thermostable  $\alpha$ -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. Adv. Appl. Microbiol. 35:1-56. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70242-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70242-9)
35. Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni, S.K. (2005) Production of a thermostable  $\alpha$  -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process. Biochem. 40:525-534. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.008>
36. Gonçalves, F.A., Leite, R.S.R., Rodrigues, A., Argandoña, E.J.S., Fonseca, G.G. (2013) Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. Biocatal. Agric. Biotechnol. 16:377-384. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.006>
37. Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Nighojkar, A., Madamwar, D. (2013) Production of celulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. Int. Biodeter. Biodegr. 78:24-33. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.002>
38. Souza, A.R.C., Baldoni, D.B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Ferraz, R.C., Kuhn, R.C., Jacques, R.J.S., Guedes, J.V.C., Mazutti, M.A. (2015) Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. Biocatal. Agric. Biotechnol. 4:575-578. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.005>
39. Brun, T., Rabuske, J.E., Todero, I., Almeida, T.C., Junior, J.J.D., Ariotti, G., Confortin, T., Arnemann, J.A., Kuhn, R.C., Guedes, J.V.C., Mazutti, M.A. (2016) Production of bioherbicide

- by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. 3 Biotech 6:230-237. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>
40. Singh, R.S., Chauhan, K., Pandey, A. (2019) Influence of aeration, agitation and process duration on fungal inulinase production from paneer whey in a stirred tank reactor. Bioresour. Technol. Rep. 8:100343. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100343>
41. Kobakhidze, A., Asatiani, M., Kachlishvili, E., Elisashvili, V. (2016) Induction and catabolite repression of cellulase and xylanase synthesis in the selected white-rot basidiomycetes. Ann. Agrar. Sci. 14:169-176. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.07.001>
42. Liu, J., Yang, J., Wang, R., Liu, L., Zhang, Y., Bao, H., Jang, J.M., Wang, E., Yuan, H. (2020) Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. Int. J. Biol. Macromol. 152:288-294. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>
43. Sepúlveda, L., Laredo-Alcalá, E., Buenrostro-Figueroa, J.J., Ascacio-Valdés, J.A., Genisheva, Z., Aguilar, C., Teixeira, J. (2020) Ellagic acid production using polyphenols from orange peel waste by submerged fermentation Electronic. J. Biotechnol. 43:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.002>
44. Wei, Y.Y., Chou, K.C.C., Yang, S.H., Chiang, B.H. (2020) Oxygen vector accelerates farnesylation and redoxreaction to promote the biosynthesis of 4-acetylanthroquinol B and anthroquinol during submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. Food Bioprod. Process. 20:80-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.12.012>
45. Agboyibor, C., Kong, W.B., Zhang, A.M., Niu, S.Q. (2019) Nutrition regulation for the production of Monascus red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus*. Biocatal. Agric. Biotechnol. 21: 101276.
46. El-Gholl, N.E., Alfieri, S.A. (1991) Leaf necrosis of *Zamia* caused by *Mycoleptodiscus indicus*. Plant. Pathol. Circular 349:1-2
47. Bailey, K.L., Pitt, W.M., Falk, S., Derby, J. (2011) The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. Biol. Control. 58:379-386. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.001>
48. Sales Junior, S.F., Vallerie, Q., Araujo, G.F., Soares, L.O.S., Silva, E.O., Correia, F.V., Saggiaro, E.M. (2020) Triclocarban affects earthworms during long-term exposure: Behavior, cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity assessments. Environ. Pollut. 267:115570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115570>

49. Clasen, B., Lisbôa, R.M. (2019) In: Vázquez-Luna, D., Cuevas-Díaz, M.deC. (ed) Soil Contamination and Alternatives for Sustainable Development. IntechOpen, Rijeka, Croatia.
50. Soares, K.W.P., Mariano, W.S., Paulino, M.G. (2020) Avoidance test with earthworms (*Eisenia andrei*) in natural soil treated with a *Bacillus thuringiensis* based biopesticide to soil quality evaluation. Res. Soc. Dev. 9:e423985774. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5774>
51. Shao, H., Zhang, Y. (2017) Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. Sci. Rep. 7:1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
52. Pino-Otín, M.R., Val, J., Ballesteros, D., Navarro, E., Sánchez, E., González-Coloma, A., Mainar, A.M.(2019) Ecotoxicity of a new biopesticide produced by *Lavandula luisieri* on non-target soil organisms from different trophic levels. Sci. Total Environ. 671:83-93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.293>
53. Schnug, L., Jensen, J., Scott-Fordsmand, J.J., Leinaas, H.P. (2014) Toxicity of three biocides to springtails and earthworms in a soil multi-species (SMS) test system. Soil Biol. Biochem. 74:115-126. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.007>
54. Marques, N.P., Pereira, J.C., Gomes, E., Silva, R., Araújo, A.R., Ferreira, H., Rodrigues, A., Dussána, K.J., Bocchini, D.A. (2018) Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. Ind. Crop. Prod. 122:66-75. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
55. Salomao, G.S.B., Agnezi, J.C., Paulino, L.B., Hencker, L.B., Shimosakai, T.L., Tardioli, P.W., Pinotti, L.M. (2019) Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. Biocatal. Agric. Biotechnol. 17:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.019>
56. Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., Grobman, Y.J. (2020) Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: Comparative review and experimental analysis. J. Clean. Prod. 246:19037. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119037>
57. Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., Loera, O. (2008) Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. Bioresource Technol. 99:7842-7847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>

58. Shabana, Y.M., Charudattan, R., Abou Tabl, A.H., Morales-Payan, J.P., Roskopf, E.N., Klassen, W. (2010) Production and application of the bioherbicide agent *Dactylaria higginsii* on organic solid substrates. *Biol. Control* 54:159-165. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.002>
59. Ottati-de-Lima, E.L., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Gassen, M.H., Wenzel, I.M., Almeida, A.M.B., Zapellini, L.O. (2014) Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. *Arq. Inst. Biol.* 81:342-350. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001352012>



## 7 ARTIGO II

### **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOHERBICIDA DE EXTRATOS DE *Mycoleptodiscus indicus* APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO\***

\*Estudo faz parte do pedido de patente intitulado “Composição química do bioherbicida produzido por *Mycoleptodiscus indicus*”, de titularidade da Universidade Federal de Santa Maria. O pedido está protocolado sob sigilo na Agência de Inovação e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Maria sob o nº 00531-PI/2021.

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOHERBICIDA DE EXTRATOS DE *Mycoleptodiscus indicus* APÓS CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

### RESUMO

Os fungos produzem metabólitos fitotóxicos que podem ser utilizados no desenvolvimento de bioherbicidas. O objetivo deste trabalho foi conhecer a composição química dos metabólitos presentes nos extratos do fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus* UFSM 54 produzidos em três condições de cultivo e avaliar o potencial bioherbicida destes extratos. Para isso, o fungo foi cultivado em meios de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar (SB) ou farelo de aveia + arroz (OR) ou somente arroz (RI). Os extratos foram obtidos por extração com etanol, submetidos a derivatização com anidrido acético/piridina e ácido clorídrico metanólico, e os perfis dos metabólitos determinados por cromatografia e espectrometria de massa. Para avaliação do potencial bioherbicida, os extratos foram aplicados em sementes, folhas destacadas e plantas vivas de *Cucumis sativus*. Foram identificados seis compostos comuns aos três extratos: metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido eláídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5) e iditol (6). No extrato OR e RI foi identificado o ácido linoleico (7), enquanto que no extrato SB detectou-se 4-acetil-2-careno (8). O ácido astérrico (9) foi identificado nos extratos SB e RI. Os extratos SB e OR resultaram em danos às folhas destacadas, porém somente SB inibiu a germinação. Quando pulverizados sobre as folhas, os três extratos reduziram o crescimento as plantas. Com estes dados é possível estabelecer a seguinte ordem de eficiência bioherbicida dos extratos avaliados: SB>OR>RI.

**Palavras-chaves:** microrganismo endofítico, metabólito secundário, identificação química, bioproduto, planta daninha.

## INTRODUÇÃO

Os herbicidas sintéticos utilizados na agricultura causam efeitos adversos à saúde humana, aos organismos não alvos, ao ambiente como um todo (BRAGANÇA et al., 2019; PERVAIZ et al., 2020). Outro problema é a seleção de plantas daninhas com resistência a estes herbicidas, ocasionado pelo uso repetitivo e em doses elevadas dos mesmos princípios ativos ou ainda de princípios ativos diferentes, mas com o mesmo mecanismo de ação (BECKIE et al., 2019; PU et al., 2019). Neste contexto, há uma crescente preocupação da sociedade com uso dos pesticidas sintéticos e por consequência a necessidade de se buscar alternativas eficientes, mas de menor impacto ambiental, como os produtos naturais (TRIOLET et al., 2019).

O emprego de bioherbicidas em áreas agrícolas possui atualmente grande potencial de mercado, o que estimula pesquisas básicas e aplicadas para o desenvolvimento de novos bioprodutos. Uma fonte promissora para obtenção dos bioherbicidas é a prospecção de microrganismos com capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade fitotóxica (BORDIN et al., 2020; CAVALCANTE et al., 2021). Dentre os microrganismos, os fungos têm recebido destaque pela facilidade de isolamento, rápido crescimento, baixo custo de cultivo e alta capacidade de produção de metabólitos secundários, o que facilita a descoberta de novas moléculas (CRUZ et al., 2020; OSEMWEGIE et al., 2020). Porém, estas etapas exigem especial atenção, pois o perfil de metabólitos produzidos por determinado fungo varia de acordo com a composição do meio de cultivo e as condições de crescimento (ANDRIOLI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019).

Nos últimos anos as pesquisas têm se voltado a obtenção de fungos de fontes menos comuns, devido ao ineditismo de moléculas e a busca por diversidade química (CRUZ et al., 2020). Os microrganismos endofíticos podem produzir metabólitos com estruturas inovadoras e amplo espectro de atividades biológicas, sendo por isto de interesse tanto para a aplicação na agricultura como para a indústria farmacêutica (JÚNIOR et al., 2019; BARROS et al., 2020). A espécie *Mycoleptodiscus indicus* (V.P. Sahni) B. Sutton é descrita como um fungo endofítico, encontrado nas folhas de diversas espécies de plantas e com ampla distribuição geográfica (ANDRIOLI et al., 2014; SILVA et al., 2020). Nos últimos anos, o número de estudos com o *M. indicus* têm aumentado, indicando ser um fungo promissor para obtenção de metabólitos com atividade bioherbicida, antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (ANDRIOLI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019; AHMED et al., 2020).

Em recente estudo, Portela et al. (2020) isolaram um fungo *M. indicus* UFSM 54 a partir de folhas doentes de *Conyza* sp., uma planta daninha de difícil controle no Brasil, e demonstraram o potencial herbicida do seus metabólitos em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Para avançar no desenvolvimento de um novo bioherbicida, este trabalho buscou conhecer a composição química dos extratos do fungo endofítico *M. indicus* UFSM 54 produzidos em três condições de cultivo e avaliar o potencial herbicida destes extratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fungo, meios de cultura e condições de crescimento

O fungo *Mycocleptodiscus indicus* UFSM 54 (GenBank KY581194) isolado de *Conyza* sp. (PORTELA et al., 2020) estava liofilizado e armazenado a 4°C no escuro. O fungo foi reativado em meio de cultura BDA por 7 dias a 28°C no escuro e cultivado em três diferentes meios de cultura: **a)** 5 g de bagaço de cana-de-açúcar, 0,15 g extrato de levedura, 1,5 g de glicose, 5 mL da solução de macronutrientes (1 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, 5 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> de NaCl) e 1 mL da solução de micronutrientes (0,8 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>, 1,7 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O e 2,5 g L<sup>-1</sup> de Fe SO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O) em 60 mL de água destilada estéril, incubado a 35 °C (PORTELA et al., 2020); **b)** 30 g de aveia, 30 g de arroz, 0,375 g L<sup>-1</sup> de peptona e 0,188 mL de solução de MnCl<sub>2</sub> (20 mg de MnCl<sub>2</sub> mL<sup>-1</sup>) em 42 mL de água destilada, incubado a 30°C (ANDRIOLI et al., 2014); **c)** 30 g L<sup>-1</sup> de arroz em 20 mL de água destilada, incubado a 30°C (Adaptado de OLIVEIRA et al., 2019). Cada meio de cultura foi acondicionado em 20 erlenmeyers de 250 mL e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Seis discos (Ø=15 mm) de micélio fúngico foram inoculados em cada erlenmeyer, seguido de incubação por 15 dias sem agitação, com 12 horas de fotoperíodo, nas temperaturas acima descritas.

### Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos por adição de solvente (etanol 99%) aos erlenmeyers, homogeneização e armazenamento por 24 horas a 28°C. Após o micélio foi separado do caldo por filtração a vácuo em funil de Buchner e kitassato. Todos os extratos foram evaporados separadamente à 40° C em bomba de vácuo, resultando nos extratos brutos oriundos dos meios de cultura a base de bagaço-de-cana (SB), aveia+arroz (OR) e arroz (RI) e controles (meios de

cultura sem o fungo). Os extratos foram ressuspensos em água destilada para realização das análises de fitotoxicidade em plantas.

### **Análises cromatográficas (CG-EM e CLAE)**

As análises por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em um sistema Shimadzu GC2010 Plus, compreendendo um modelo de autoinjeter AOC-5000 Plus e um detector de massa QP2110 Ultra, usando uma coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5MS (30 mx 0,25 mm id; espessura de filme de 0,25 µm). As injeções das amostras (volume de injeção de 1µL) foram realizadas no split na proporção de 1:20 e purga de 3 mL min<sup>-1</sup>. O cromatógrafo de gás foi operado nas seguintes condições: injetor 240 °C, a temperatura do forno foi inicialmente de 90 °C a 200 °C com um aumento de 3 °C/min, mantida a 200 °C por 5 min, seguido por um aumento para 280 °C a 10 °C/min e mantido por 5 min. Foram ajustadas a temperatura da fonte de íons para 260 °C, a temperatura da interface MS para 280 °C e a energia de ionização para 70 eV. Os extratos foram submetidos a reações de derivatização utilizando anidrido acético/ piridina ou HCl-metanol para obtenção dos derivados acetilados ou esterificados correspondentes, seguindo os procedimentos descritos por Assunção et al. (2009) e Tivendalea et al. (2016) com adaptações. Brevemente, para a obtenção dos derivados acetilados foram dissolvidos 35 mg de cada extrato em anidrido acético/piridina (0,7:0,35 mL) e a suspensão mantida sob agitação magnética por 24h a temperatura ambiente. Após a adição de água e extração com CHCl<sub>3</sub>, a fase orgânica foi tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. As reações de esterificação foram realizadas como segue: 18 mg de cada extrato foi dissolvido em 0,5 mL de em HCl metanólico. A solução resultante permaneceu sob agitação a 60°C por 60 minutos, sendo após evaporada e ressuspensa em 1 mL de água. A solução aquosa foi extraída com éter etílico (2 x 5 mL). A fase orgânica foi então seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. Os derivados voláteis foram dissolvidos em diclorometano, filtrados usando filtro de seringa de PTFE de 0,2 µm e caracterizados por CG-MS. Os constituintes foram identificados pela comparação dos dados espectrais de massa com aqueles armazenados nas bibliotecas espectrais Wiley 8 e NIST11 do sistema analítico.

As análises por cromatografia CLAE foram realizadas em um sistema Nexera-XR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto por bombas LC-20AXR, amostrador automático SIL-20XR, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A usado para cromatografia. O Software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado

para tratamento dos dados. Amostras dos extratos foram solubilizadas em água ou metanol-água (5:1) e filtradas usando filtro de seringa de PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  previamente a injeção no equipamento usando coluna Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (150 mm  $\times$  4,6 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$  tamanho de partícula) (Shimadzu, Kyoto, Japão) e gradiente binário de eluição constituído pelos solventes: água ultrapura com 0,045% de TFA (v/v; solução A) e acetonitrila com 0,036% de TFA (v/v; solução B). Empregou-se gradiente linear de eluição de 5% a 100% de B em 40 minutos, seguido de estabilização do gradiente a 5 % de B até 45 minutos, e esta proporção se manteve até 50 minutos. As demais condições para as análises foram: 20  $\mu\text{L}$  de volume de injeção, taxa de fluxo de 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura do forno da coluna de 30  $^{\circ}\text{C}$ , detector monitorando nos comprimentos de onda de 210, 220, 280 e 360 nm, temperatura do detector de 30 $^{\circ}\text{C}$  e tempo total de análise de 50 minutos. Amostras dos extratos SB, OR e RI foram solubilizadas em água ou metanol-água (5:1) e filtradas usando filtro de seringa de PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$  previamente a injeção no equipamento.

### **Isolamento e identificação dos metabólitos**

Para o isolamento dos metabólitos, uma porção de cada extrato (SB, OR e RI) foi evaporada sob vácuo e ressuspendida em água. As frações aquosas obtidas foram fracionadas e particionadas; primeiro com *n*-hexano (200 mL  $\times$  5), seguido de diclorometano (200 mL  $\times$  5) e acetato de etila (200 mL  $\times$  5), para obter as frações correspondentes FHex, FDCM e FAcOEt. Estas frações foram secas sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporadas à secura.

A FDCM-SB (0,57 g) foi fracionada em coluna cromatográfica de sílica gel tipo F60 malha 240-400 (SILICICLER) empregando como fase móvel *n*-hexano: clorofórmio: metanol, aumentando gradualmente a polaridade do sistema. As frações obtidas foram reunidas por similaridade. O fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada (Merck, sílica 60 F-254) com fase móvel *n*-hexano: clorofórmio ou clorofórmio: metanol, sendo as placas cromatográficas reveladas sob luz ultravioleta e com spray de reagente vanilina-ácido sulfúrico. A partir deste procedimento foi isolado o composto **9** (0,011 g), identificado por espectroscopia de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR (DEPT-135, COSY, HSQC e HMBC; Material Suplementar) como o metabólito secundário ácido astérico. Os espectros de NMR foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance III HD DPX 400, operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$  em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , usando TMS como padrão interno. A partir de repetidos processos de cristalização em clorofórmio, também foi isolado 0,095 g do composto **9** da FDCM-RI (1,27

g). O fracionamento da FDCM-OR (1,7 g) resultou no isolamento de 0,055 g de um composto (denominado aqui **NE1**), que está atualmente em processo de elucidação estrutural.

*Ácido asterrico* (**9**). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2,07 (3H, s, H-8),  $\delta$  3,74 (3H, s, H-8'),  $\delta$  3,81 (3H, s, H-9'),  $\delta$  5,91 (1H, m, H-5),  $\delta$  6,48 (1H, m, H-3),  $\delta$  6,92 (1H, d,  $J = 2,83$  Hz, H-4'),  $\delta$  7,05 (1H, d,  $J = 2,83$  Hz, H-2'). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  23,0 ( $\text{CH}_3$ , C-8),  $\delta$  53,7 ( $\text{CH}_3$ , C-8'),  $\delta$  57,7 ( $\text{CH}_3$ , C-9'),  $\delta$  101,7 (qC, C-1),  $\delta$  106,7 (CH, C-4'),  $\delta$  107,1 (CH, C-5),  $\delta$  110,3 (CH, C-2'),  $\delta$  113,6 (CH, C-3),  $\delta$  126,8 (qC, C-1'),  $\delta$  135,7 (qC, C-6'),  $\delta$  148,8 (qC, C-4),  $\delta$  155,8 (qC, C-5'),  $\delta$  158,0 (qC, C-3'),  $\delta$  160,5 (qC, C-6),  $\delta$  165,2 (qC, C-2),  $\delta$  166,7 (qC, C-7'),  $\delta$  172,7 (qC, C-7).

### Fitotoxicidade dos extratos

A fitotoxicidade em folhas destacadas de *Cucumis sativus* dos extratos brutos de *M. indicus* UFSM 54 foi avaliada em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os extratos obtidos após o crescimento de *M. indicus* UFSM 54 nos meios de cultura com bagaço de cana-de-açúcar (SB), aveia+arroz (OR), arroz (RI) e os brancos obtidos dos mesmos meios de cultura sem o fungo (WSB, WOR, WRI) foram testados nas concentrações de 8,7; 17,4 e 26,1 mg mL<sup>-1</sup>. Como controle utilizou-se água destilada estéril. Três mL destas concentrações do extrato bruto foram aplicadas em um algodão estéril, diretamente em contato com a base do pecíolo de uma folha destacada (Figura 2). A folha foi armazenada em uma placa de Petri estéril, com fundo coberto com um papel filtro úmido e estéril, conforme Todero et al. (2019). As placas de Petri foram incubadas a 25°C e as lesões foliares foram avaliadas até 144 horas. Os sintomas foram convertidos em grau de lesão da escala de notas de Varejão et al. (2013): ausência de sintomas (-); amarelecimento (+); necrose < 50% da área foliar (++); necrose > 50% da área foliar (+++).

A fitotoxicidade em sementes de *C. sativus* dos extratos fúngicos SB, OR e RI foi avaliada em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições. Utilizou-se a concentração intermediária de 17,4 mg mL<sup>-1</sup> e água estéril como controle. O teste de germinação foi adaptado das Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009). Cada unidade experimental foi composta de 25 sementes distribuídas sobre papel germitest (dimensões de 10,5 x 10,5 cm) estéril e umedecido com 4 mL de extrato ou água estéril. O papel germitest foi armazenado em caixa plástica gerbox (dimensões 11 x 11 cm), vedada com plástico filme e incubada a 25 °C por 8 dias, com fotoperíodo de 12 horas.

Na avaliação da fitotoxicidade em plantas, o *C. sativus* foi cultivado em vasos em casa de vegetação por 20 dias, até o estágio vegetativo (V2), quando as folhas foram pulverizadas com os extratos fúngicos na concentração de 17,4 mg mL<sup>-1</sup> produzidos pelo *M. indicus* UFSM 54 nos meios de cultura SB, OR e RI. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e 4 repetições. Para a pulverização utilizou-se uma câmara de aplicação (Generation III Research Sprayer, Devries Manufacturing, USA), com pressão de aplicação de 25 psi e volume de 200 L ha<sup>-1</sup>. No tratamento controle foi pulverizado água destilada. Após a aplicação as plantas retornaram para a casa de vegetação por mais 12 dias quando foram coletadas para determinação do comprimento da parte aérea, massa seca de parte aérea e raiz e grau de lesões foliares, conforme a escala de Varejão et al. (2013) acima descrita.

### **Análise estatística**

Os dados da fitotoxicidade em sementes e plantas foram submetidos à análise de variância e comparação de médias, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software Sisvar 5.6 pt (Statsoft Inc., OK, EUA).

## **RESULTADOS**

### **Identificação dos metabólitos**

Na Tabela 1 estão listados os metabólitos identificados por CG-EM nas amostras dos extratos SB, OR e RI após estas serem submetidas a dois diferentes processos de derivatização. As análises mostraram que seis metabólitos estão presentes nos três extratos, sendo eles: metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5) e iditol (6) (Figura 1). A derivatização com ácido clorídrico metanólico também revelou a presença de 39,0 e 30,9% do ácido graxo poli-insaturado ácido linoleico (7) nos extratos obtidos nos meios de cultura a base de arroz (RI) e farelo de aveia + arroz (OR), respectivamente (Tabela 1), não sendo detectado no extrato SB. Além do iditol (6), a derivatização com ácido clorídrico metanólico permitiu a identificação do monoterpene 4-acetil-2-careno (8, 15,6%) somente no extrato SB.



Tabela 1. Compostos identificados por CG-EM após processos de derivatização dos extratos brutos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 cultivado em três meios de cultura a base de bagaço de cana-de-açúcar (SB), farelo de aveia+arroz (OR) e arroz (RI).

Composto identificado	Fórmula molecular	Derivados Analisados	Tempo de retenção (min.)	Área de Pico* (%)
(continua)				
<i>Bagaço de cana-de-açúcar/ etanol (SB) - Derivatização por esterificação com ácido clorídrico metanólico</i>				
4-Acetil-2-Careno	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O	4-Acetil-2-careno	3,17	15,61
Ácido 2,4-heptadienóico	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	Ácido 2,4-heptadienóico, éster metílico	6,23	2,24
Metil β-D-ribopiranosídeo / metil α-D-ribopiranosídeo	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Metil β-D-ribopiranosídeo / metil α-D-ribopiranosídeo	9,69	3,41
Ácido aconítico	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	Ácido aconítico, éster trimetílico	15,41	1,49
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido cítrico, éster trimetílico	16,49	7,68
Ácido isocítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido isocítrico, éster trimetílico	18,06	2,57
Metil-latodoratina*	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Metil-latodoratina	18,17	6,76
Ácido 3-cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Ácido 3-cumárico, éster metílico	26,86	1,51
Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Ácido palmítico, éster metílico	32,97	7,25
Ácido elaídico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Ácido elaídico, éster metílico	38,75	2,93
<i>Bagaço de cana-de-açúcar/ etanol (SB) – Derivatização por acetilação com Ac<sub>2</sub>O-piridina</i>				
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Triacetina	12,10	4,09
Benzoato de benzila	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Benzoato de benzila	27,44	2,94
β-D-glicose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Pentaacetato de β-D-glucopiranosose	37,31	3,72
Iditol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Iditol, hexaacetato	39,88	82,58
Sorbitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	D-Glucitol, hexaacetato	40,11	1,70
<i>Aveia-Arroz/ etanol (OR) - Derivatização por esterificação com ácido clorídrico metanólico</i>				
Metil-latodoratina*	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Metil-latodoratina	18,21	18,98
Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Ácido palmítico, éster metílico	32,93	18,00
Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Ácido linoleico, éster metílico	38,49	38,99
Ácido elaídico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Ácido elaídico, éster metílico	38,71	24,02

(conclusão)

<i>Aveia-Arroz/ etanol (OR)- Derivatização por acetilação com Ac<sub>2</sub>O-piridina</i>				
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Triacetina	12,11	4,74
Benzoato de benzila	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Benzoato de benzila	27,44	2,37
3-O-etil-D-glicose	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	3-O-etil-D-glicose, pentaacetato	37,49	38,60
Iditol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Iditol, hexaacetato	39,81	22,94
<i>Arroz/ etanol (RI)- Derivatização por esterificação com ácido clorídrico metanólico</i>				
Metil-latodoratina*	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Metil-latodoratina	18,13	34,01
Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Ácido palmítico, éster metílico	32,92	19,23
Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Ácido linoleico, éster metílico	38,47	30,94
Ácido elaídico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Ácido elaídico, éster metílico	38,70	11,31
<i>Arroz/ etanol (RI)- Derivatização por acetilação com Ac<sub>2</sub>O-piridina</i>				
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Triacetina	12,10	1,67
Benzoato de benzila	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Benzoato de benzila	27,44	1,62
3-O-etil-D-glicose	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	3-O-etil-D-glicose, pentaacetato	37,49	20,72
Iditol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Iditol, hexaacetato	39,86	26,90

\*Constituinte identificado por CG-EM através de comparação com os dados descritos por Silva et al. (2020)

A Figura 1A apresenta a comparação entre os principais constituintes analisados por CG-EM após derivatização com ácido clorídrico metanólico (esterificação). O extrato SB apresenta uma proporção similar dos constituintes metil-latodoratina (**1**) e ácido palmítico (**2**). O extrato OR contém quantidades muito próximas de **1**, **2** e **3** (entre 18 – 24%) e o extrato RI possui 34% de **1**, 19,2% de **2** e 11,3% do constituinte **3**. Na Figura 2B é apresentada a análise comparativa entre os principais constituintes analisados por CG-EM, após derivatização com anidrido acético/ piridina (acetilação). Pode-se destacar o constituinte iditol (**6**) como metabólito majoritário em todos os extratos, com percentuais variando de 22,9 a 82,6% (Tabela 1). Esta faixa percentual é ampla, uma vez que o extrato SB apresenta uma produção do iditol 75% superior aos demais compostos (Figura 1). Além deste constituinte, representaram menos de 7,5% da composição de cada extrato os metabólitos glicerol (**4**) e benzoato de benzila (**5**).

Os processos de isolamento e purificação das frações FDCM dos extratos SB, OR e RI utilizando cromatografia em coluna e em camada delgada resultaram no isolamento de dois metabólitos majoritários (Figuras **S1-S5**, Material Suplementar). Os dados de RMN uni e bidimensionais do composto isolado a partir das frações FDCM-SB e FDCM-RI, quando comparados aos dados espectroscópicos reportados por Liao et al. (2012), corroboram com a estrutura do metabólito ácido astérico (**9**). A partir da FDMC-OR foi isolado um sólido branco insolúvel na maioria dos solventes orgânicos cujos dados espectroscópicos indicam tratar-se de um metabólito polar. A estrutura exata deste metabólito, denominado aqui **NE1**, encontra-se em processo final de elucidação estrutural por espectroscopia de RMN e difração de Raios-X. Além disto, o difenil éter ácido astérico (**9**) foi identificado por CLAE como um dos componentes majoritários do extrato aveia + arroz (OR) e pode ser visualizado também nos cromatogramas de CLAE dos extratos SR e RI (Figura **S8**, Material Suplementar).

### **Fitotoxicidade dos extratos**

Os extratos produzidos durante o crescimento do *M. indicus* UFSM 54 no meio de cultura de bagaço de cana (SB) e de farelo de aveia+arroz (OR) causaram maiores lesões nas folhas destacadas de *C. sativus*, em comparação ao extrato produzido com arroz (RI) (Tabela 2, Figura 2). Os extratos obtidos a partir dos meios de cultura não inoculados (sem fungos) e por isto resultantes somente das moléculas originadas dos constituintes do meio de cultura, também causaram lesões nas folhas, porém em menor grau se comparados aos extratos produzidos na presença do fungo nos meios de cultura SB e OR. Porém para o meio de cultura RI observou-se o contrário, pois as maiores lesões foliares foram causadas pelo extrato originado do meio de cultura sem fungo.

Tabela 2. Grau das lesões em folhas destacadas e em plantas de *C. sativus* após 72, 96, 120 e 144 horas da aplicação das concentrações de 8,7; 17,4 e 26,1 mg mL<sup>-1</sup> dos extratos produzidos pelo fungo *M. indicus* UFSM 54 cultivado em três meios de cultura (SB, AO e RI).

Extrato <sup>1</sup>	Folha destacada												Planta
	72 h			96 h			120 h			144 h			12 dias
	8,7	17,4	26,1	8,7	17,4	26,1	8,7	17,4	26,1	8,7	17,4	26,1	17,4
SB	- <sup>2</sup>	-	+	-	+	+	+	++	++	+	+++	+++	++
WSB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	nd <sup>3</sup>
OR	+	+	-	+	+	-	++	++	-	+++	++	+	++
WOA	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	+	++	nd
RI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
WRI	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	nd
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Extrato obtido do meio de cultura com bagaço de cana-de-açúcar inoculado com o fungo (SB) ou sem fungo (WSB). Extrato obtido do meio de cultura com farelo de aveia+arroz inoculado com o fungo (OA) ou sem fungo (WOA). Extrato obtido do meio de cultura com arroz inoculado com o fungo (RI) ou sem fungo (WRE). <sup>2</sup>Escala de lesões foliares: ausência de sintomas (-); amarelecimento (+); necrose < 50% da área foliar (++); necrose > 50% da área foliar (+++), de acordo com Varejão et al. (2013). <sup>3</sup>nd = não determinado.

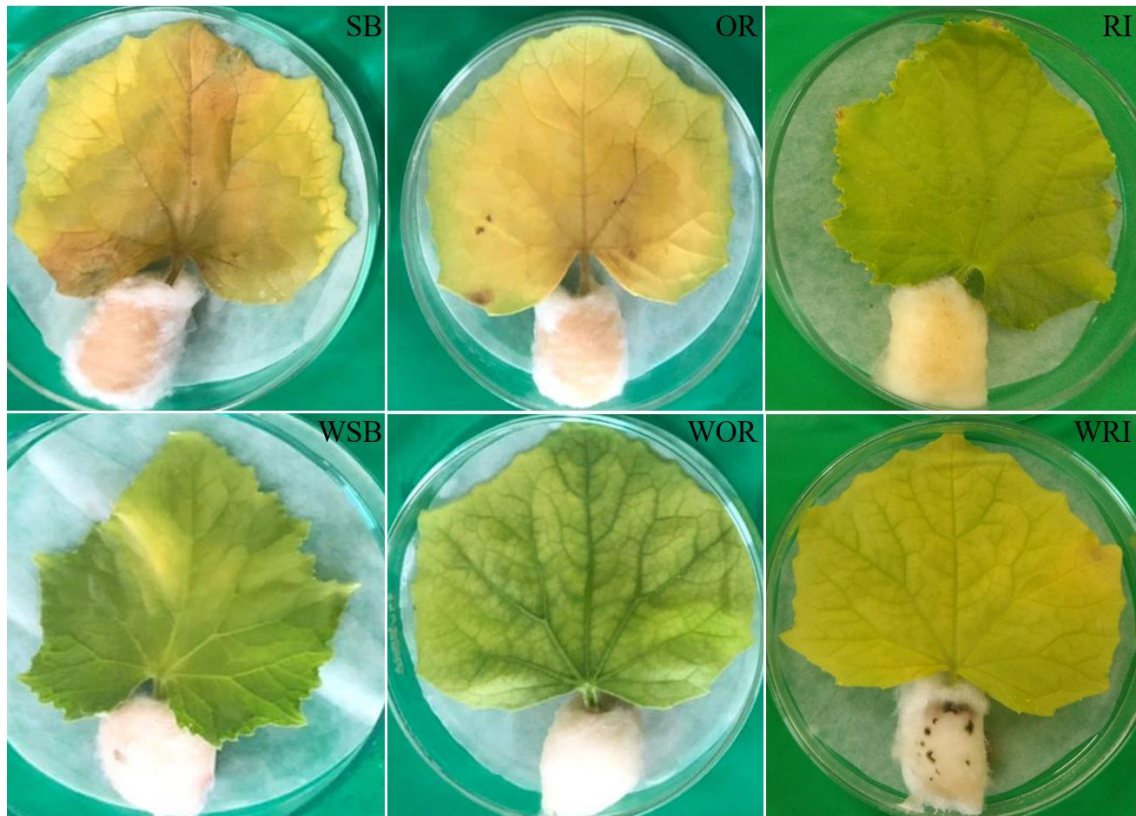


Figura 2. Lesões em folhas destacadas de *C. sativus* após 144 horas da aplicação da concentração de  $17,4 \text{ mg mL}^{-1}$  do extrato produzido pelo fungo *M. indicus* UFSM 54 quando cultivado em três meios de cultura: com bagaço de cana-de-açúcar (SB) (controle sem fungo = WSB); com farelo de aveia+arroz (OR) (controle sem fungo = WOR); e com arroz (RI) (controle sem fungo = WRI).

Na Tabela 2 também se observa que quanto maior o tempo de contato do extrato com a folha, maior é a porcentagem da área foliar com lesões. As avaliações em tempos intermediários serviram para demonstrar mais claramente as diferenças entre os extratos dos meios de cultura com e sem o fungo. No meio de cultura SB, as lesões causadas pelo extrato produzido na presença do fungo tiveram início às 72 h, enquanto que na ausência do fungo somente na última avaliação. De forma semelhante ocorreu com o meio de cultura OR, onde a primeira lesão foi observada na menor concentração da primeira avaliação, enquanto que na ausência do fungo somente na avaliação das 96 h e na maior concentração. O mesmo não ocorreu com os extratos originados do meio de cultura RI. Os danos foliares do extrato obtido na ausência do fungo iniciaram às 96 h, enquanto que na presença do fungo os danos foram percebidos somente às 144 h.

No extrato obtido no meio de cultura SB também fica evidenciado o efeito da concentração (Tabela 2). Quanto mais concentrado o extrato, maiores e mais precoces foram os danos foliares. Já para o extrato obtido do meio de cultura OR, de forma inesperada, na maior concentração foram observados os menores danos, em todas as datas avaliadas. Para o meio de cultura RI, devido a sua baixa eficiência, não foram observados efeitos de concentração. O teste de aplicação dos extratos sobre as plantas vivas confirma os resultados observados nas folhas destacadas (Tabela 2 e Figura 3). Os extratos dos meios de cultura SB e OR resultaram em maiores danos foliares se comparados ao extrato produzido no meio de cultura RI.



Figura 3. Lesões em plantas de *C. sativus* após 12 dias da aplicação da concentração de  $17,4 \text{ mg mL}^{-1}$  do extrato produzido pelo fungo *M. indicus* UF54 quando cultivado em três meios de cultura: com bagaço de cana-de-açúcar (SB) (controle sem fungo = WSB); com farelo de aveia+arroz (OR) (controle sem fungo = WOR); e com arroz (RI) (controle sem fungo = WRI).

No teste com sementes de *C. sativus*, a concentração de  $17,4 \text{ mg mL}^{-1}$  do extrato SB obtido na presença do fungo reduziu em 27% a germinação em relação ao controle (água destilada) (Figura 4). Os extratos obtidos dos meios OR e RI reduziram a germinação em ~10% sem, no entanto, diferir estatisticamente do controle. A pulverização foliar dos três extratos nesta concentração reduziu o comprimento da parte aérea, a massa seca de raiz e de parte aérea das plantas de *C. sativus*, 12 dias após a aplicação, diferindo estatisticamente do controle (água destilada). Com base nos dados de lesões nas folhas destacadas, de inibição da germinação das sementes e de redução de crescimento das plantas de *C. sativus*, foi possível estabelecer a seguinte ordem de eficiência bioherbicida dos extratos avaliados: SB>OR>RI.

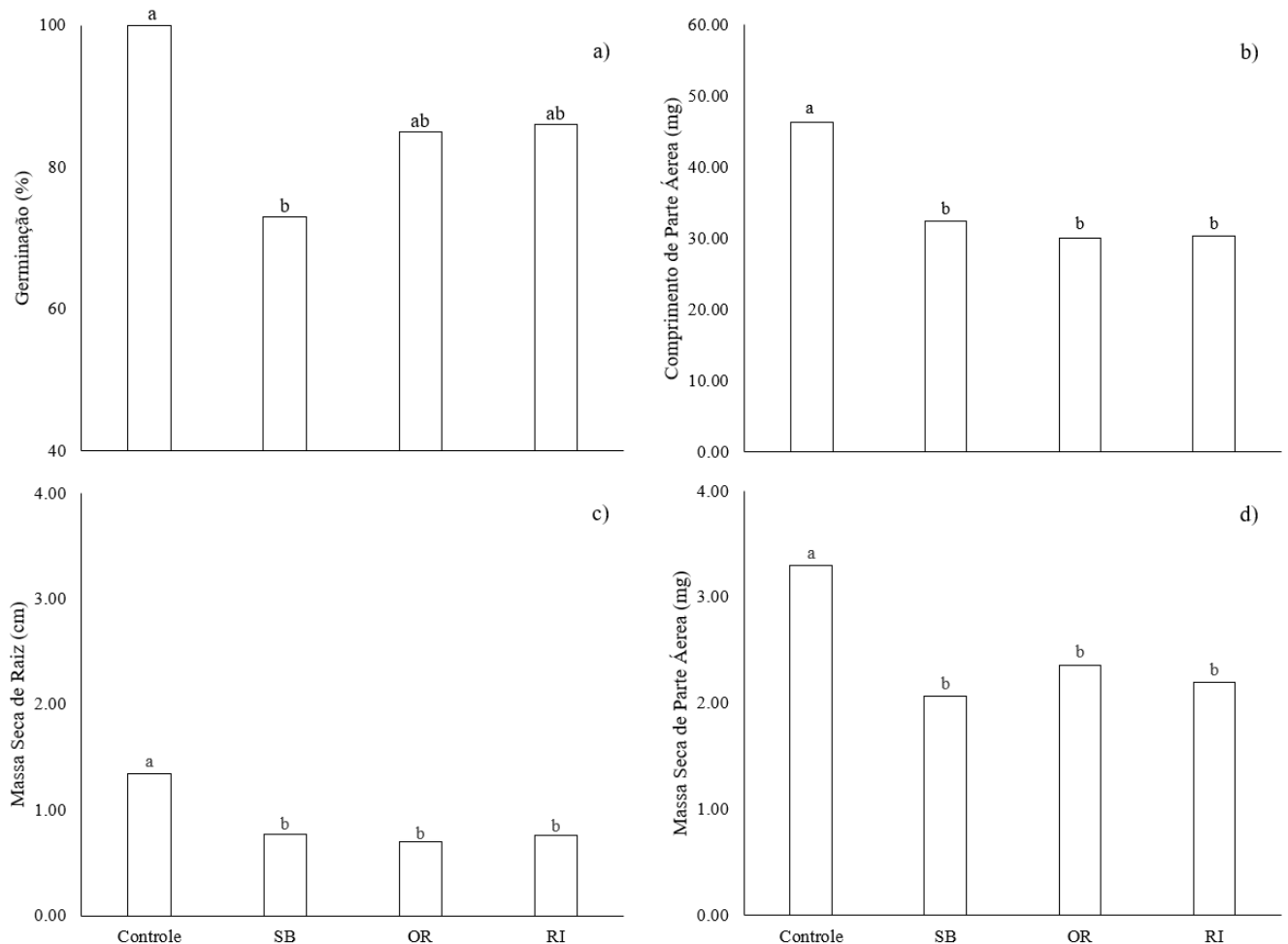


Figura 4. Efeitos fitotóxicos dos extratos produzidos pelo fungo *M. indicus* UFSM 54 nos meios de cultura SB, OR e RI, na concentração de  $17,4 \text{ mg mL}^{-1}$  sobre a germinação (a), o comprimento da parte aérea (b), a massa seca de raiz (c) e a massa seca de parte aérea (d) de *C. sativus*. Letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta. No entanto, parte deste inestimável patrimônio está sendo perdido, sem que ao menos tenha sido conhecido, pela rápida degradação dos ecossistemas naturais. Por outro lado, há forte demanda da sociedade para a produção de alimentos mais saudáveis, com baixo ou nenhum uso de pesticidas sintéticos. Os estudos do nosso grupo de pesquisa buscam atender a esta demanda, utilizando de forma sustentável a biodiversidade microbiana para desenvolver um bioherbicida, que poderá ser utilizado na agricultura em substituição aos herbicidas sintéticos. Em trabalho prévio, Portela et al. (2020) isolaram e identificaram o fungo *M. indicus*, e comprovaram o potencial bioherbicida de seus metabólitos. Dando continuidade a este estudo, no presente trabalho foi realizada a identificação química dos metabólitos produzidos por este fungo após cultivo em três meios de cultura e avaliado o potencial bioherbicida destes extratos. O estudo apresenta contribuição ao estado da arte, pois trata de um fungo endofítico pouco estudado na literatura, é inédita a identificação do perfil de metabólitos do *M. indicus* cultivado no meio de cultura com bagaço de cana-de-açúcar e vários compostos identificados estão sendo apresentados pela primeira vez como metabólitos produzidos por este fungo.

As análises por CG-EM dos extratos após crescimento do fungo em meio de cultura de bagaço de cana (SB), farelo de aveia+arroz (OR) e arroz (RI) resultaram na identificação de oito metabólitos metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5) e iditol (6), ácido linoleico (7) e monoterpene 4-acetil-2-careno (8). Na literatura há relatos da produção dos metabólitos metil-latodoratina (1) por *M. indicus* (SILVA et al., 2020); ácido palmítico (2) por *Beauveria bassiana* cultivado em meio agar com extrato de levedura, glicose e nutrientes (CRESPO et al., 2002); e ácido elaídico (3) por *Neofusicoccum vitifusiforme* e *N. parvum* (SALVATORE et al., 2018). O metabólito glicerol (4) é comumente produzido por microrganismos por se tratar de uma molécula constituinte dos fosfolípidos e também utilizado como reserva energética na célula (TAROCCO et al., 2005), sendo relatado a identificação deste composto em diversos fungos, como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* (HALLSWORTH, MAGAN, 1995). O benzoato de benzila (5), produzido pelo fungo endofítico *Emericella quadrilineata* (GOUTAM et al., 2016). O iditol por *Candida boidinii* (VONGSUVANLERT, TANI, 1988). O ácido linoleico (7) pelo fungo *Fusarium oxysporum* (OLIW, HAMBERG, 2019) e *Cunninghamella echinulata* (AL-HAWASH et al., 2018).



A purificação por cromatografia em coluna e em camada delgada dos extratos etanólicos produzidos pelo fungo resultou no isolamento de dois constituintes principais. Um destes é o ácido astérico (9), um composto produzido por outros fungos, como *Penicillium citrinum* (HOUBRAKEN et al., 2010), *Aspergillus terreus* (BORUTA et al., 2019), *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. (UJAM et al., 2021), com propriedades micotxicológicas e antioxidantes. O outro composto isolado é um metabólito polar, que está em processo de elucidação estrutural. As informações obtidas até o momento indicam que trata-se de uma molécula inédita. Com o andamento das pesquisas, espera-se confirmar esta expectativa.

Os poucos estudos que trataram da identificação e caracterização dos metabólitos de *M. indicus*, indicam a produção de uma diversidade grande de compostos e isto tem despertado o interesse de pesquisadores (OLIVEIRA et al., 2019). Assim como no presente trabalho, Silva et al. (2020) também identificaram três moléculas de metil-latodoratina (3-etilcromona metil-latodoratina, 8-metoximetilatoratina e 3-etil-5-hidroxi-7,8-dimetoxicroman-4-ona) produzidas por um *M. indicus* isolado de plantas de *Justicia brandegeana*. Após o cultivo em meio líquido deste fungo foi descrito o isolamento de dois alcalóides denominados micoleptodiscina A e micoleptodiscina B por Ortega et al. (2013). Andrioli et al. (2014) obtiveram um *M. indicus* a partir de plantas de *Borreria verticillata* e após cultivo em meio de cultura com substrato a base de farelo de aveia+arroz identificaram três azafilonas- as micoleptonas A, B e C- e quatro policetídeos (austidiol, eugenitina, 6-metoxieugenitina e 9-hidroxeugenitina). No extrato de *M. indicus* obtido após crescimento em caldo dextrose batata (PDB), Ahmed et al. (2020) identificaram acetato de isopropila, 6-amino-5-nitroso-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol, ftalato de diisobutila, 11-tricoseno, 10-metilantraceno-9-carboxaldeído, maleato de bis(2-etilhexila), 1-hexil-1-nitrocicloexano e 5,7-dodecadiin-1,12-diol. Ao nosso conhecimento, os compostos ácido palmítico (2), ácido eláidico (3), iditol (6), ácido linoleico (7), 4-acetil-2-careno (8), ácido astérico (9) identificados em nosso trabalho estão sendo apresentados pela primeira vez como metabólitos produzidos pelo fungo *M. indicus*.

No trabalho de Andrioli et al. (2014), quando o cultivo do *M. indicus* ocorreu no meio de cultura aveia+farelo de arroz, os metabólitos identificados como pertencentes à classe das zafilonas apresentaram atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Já Oliveira et al. (2019) obteve compostos com atividade antibacteriana quando cultivou o *M. indicus* isolado de planta com sintomas de lesão em meio de cultura com arroz. Os metabólitos do fungo também apresentaram atividade antibacteriana, quando o cultivo ocorreu em meio com arroz (OLIVEIRA et al., 2019). Como visto, nenhum trabalho anterior ao de Portela et al. (2020)

havia comprovado a ação bioherbicida dos extratos do *M. indicus*. É provável que esta capacidade esteja associada a sua fitopatogenicidade, já relatada pelos danos foliares acentuados (necroses) em plantas de *Zamia* spp. (EL-GHOLL; ALFIERI Jr., 1991), *Echinacea purpúrea* (ROSA et al., 2012), *Borreria verticillata* (ANDRIOLI et al., 2014), *Ixora coccínea* (BANERJEE et al., 2018) e *Morinda citrifolia* (OLIVEIRA et al., 2019).

Os compostos encontrados nos extratos produzidos pelo *M. indicus* UFSM 54 no presente trabalho resultaram no efeito herbicida observado nos testes de folha destacada, de germinação e nas plantas. Os extratos produzidos nos meios de cultura SB e OR causaram as maiores lesões nas folhas destacadas de *C. sativus* que o extrato produzido no meio de cultura RI. Este resultado evidencia a importância da otimização das condições de cultivo, pois o perfil de metabólitos produzidos pelo *M. indicus* depende do meio de cultura e das condições de incubação (temperatura, agitação, luminosidade, etc). Por sua vez, perfis de metabólitos diferentes podem determinar diferentes eficiências bioherbicidas. Destaca-se também que a eficiência deste bioherbicida poderia ser maior se fossem misturados aditivos e adjuvantes aos extratos fúngicos, o que será feito nos próximos estudos. Bastos et al. (2017) demonstraram que a adição desses produtos aumenta a eficiência do bioherbicida produzido por *Diaporthe* sp.

Os extratos obtidos a partir dos meios de cultura não inoculados (sem fungos) causaram lesões brandas nas folhas de *C. sativus*. Resultados semelhantes a estes são relatados na literatura. O efeito bioherbicida de extratos de *Phoma* sp. foi avaliado por Klaic et al. (2017) e de *Trichoderma koningiopsis* e *Rhizopus stolonifer* por Cavalcante et al. (2021). Estes autores também observaram que os extratos controle (sem fungo) causaram lesões nas folhas das plantas, porém menos intensas se comparadas às causadas pelos metabólitos fúngicos. Esse efeito pode estar relacionado com o tipo e a concentração dos reagentes utilizados na composição do meio de cultura, os quais podem apresentar efeitos fitotóxicos (CAVALCANTE et al. 2021, KLAIC et al., 2017).

A diversidade de microrganismos endofíticos é enorme, assim como a capacidade de biossíntese de metabólitos secundários bioativos (WANG et al., 2017). Porém, o habitat endofítico é caracterizado por condições ecológicas muito específicas e por isto pode haver dificuldade de cultivo destes microrganismos e de produção dos metabólitos de interesse em laboratório. Por isto utilizou-se fermentação sólida e submersa no presente estudo. Os meios de cultura OR e RI não apresentaram água livre no meio, caracterizando-se assim como uma fermentação sólida. Neste tipo de fermentação, a concentração de metabólitos no meio de cultura é alta, o que resulta em maior atividade bioherbicida. Porém, há dificuldade de extração dos metabólitos na fermentação sólida (BRUN et al., 2020). Já o meio de cultura SB foi

utilizado em fermentação submersa, onde os metabólitos secundários produzidos pelo fungo não ficam aderidos aos substratos e sim livres, porém neste caso há diluição dos metabólitos no meio de cultura.

O presente trabalho se constituiu em mais uma etapa dos estudos que estão sendo desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa sobre o potencial dos fungos endofíticos para a produção de bioherbicidas. As moléculas obtidas neste estudo continuarão a ser avaliadas quanto a sua estrutura química e capacidade bioherbicida, mas também serão utilizadas em testes para avaliar outros efeitos, como antifúngico, antimicrobiano, antitumoral, etc.

## CONCLUSÕES

Os compostos metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5), iditol (6), ácido graxo poli-insaturado ácido linoleico (7), monoterpene 4-acetil-2-careno (8), ácido astérico (9) e NE1 (em processo final de elucidação estrutural) estão presentes nos extratos resultantes do cultivo do fungo endofítico *M. indicus* UFSM 54 nos meios de cultura a base de bagaço de cana (SB) ou de farelo de aveia+arroz (OR) ou arroz (RI);

Os extratos produzidos durante o crescimento do fungo *M. indicus* UFSM 54 no meio de cultura SB e OR apresentam efeito bioherbicida em folhas destacadas de *C. sativus*, porém somente o extrato SB reduz a germinação das sementes. Quando pulverizados sobre as plantas em crescimento, os três extratos apresentam efeito bioherbicida em *C. sativus*. Com estes dados é possível estabelecer a seguinte ordem de eficiência bioherbicida dos extratos avaliados: SB>OR>RI.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, T. et al. Inhibition of quorum sensing–associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Mycoleptodiscus indicus* PUTY1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 467-487, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00235-y>.

AL-HAWASH, A.B., et al. Productivity of  $\gamma$ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field. **Food bioscience**, v. 21, p. 1-7, 2018.

ANDRIOLI, W.J. et al. Mycoleptones A-C and polyketides from the endophyte *Mycoleptodiscus indicus*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 70-78, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np4006822>.

ASSUNÇÃO, J.C. Bioacetilação de álcoois catalisada por *Saccharum officinarum*. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1549-1552, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600036>

Barros, V.M. de S. et al. Herbicides of biological origin: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1846465>.

Bastos, B. de O et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, 1-9, 2017.

BECKIE, H.J., ASHWORTH, M.B., FLOWER, K.C. Herbicide Resistance Management: Recent Developments and Trends. **Plants**, v. 8, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants8060161>.

BORDIN, E.R. et al. Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1833864>.

BORUTA, T., MILCZAREK, I., BIZUKOJC, M. Evaluating the outcomes of submerged co-cultivation: production of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* in

fungal co-cultures. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 14, p.5593-5605, 2019.

Bragança, I. et al. Deltamethrin impact in a cabbage planted soil: Degradation and effect on microbial community structure. **Chemosphere**, v. 220, p. 1179-1186, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.004>.

Brasil. 2009. **Regras Para Análise de Sementes**. in: (Eds.) Teste de Germinação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, pp. 147-224.

Brun, T. et al. Weed control by metabolites produced from *Diaportheschini*. **Environmental Technology**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1780477>

CAVALCANTE, B.D.M. et al. Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, n. 101947, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101947>

CRESPO, R. et al. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. **BioControl**, v. 47, n. 6, 685-696, 2002.

CRUZ, J.S.; DA SILVA, C.A.; HAMERSKI, L. Natural Products from Endophytic Fungi Associated with *Rubiaceae* Species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 128, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof6030128>

EL-GHOLL, N.E., ALFIERI Jr, S.A. Leaf necrosis of *Zamia* caused by *Mycoleptodiscus indicus*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. **Plant Pathology Circular**, v. 349, 1991.

GOUTAM, J. et al. Isolation and identification of antibacterial compounds isolated from endophytic fungus *Emericella qaudrilineata*. **Natural Products Chemistry & Research**, v.4, n.2, p. 1-7, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6836.1000205>

HALLSWORTH, J.E., MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, v. 141, p. 1109-1115, 1995.

HOUBRAKEN, J.A.M.P., FRISVAD, J. C., SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Divers**, v. 44, p. 117-133, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09874-0>

JÚNIOR, F.W.R. et al. New perspectives for weeds control using autochthonous fungi with selective bioherbicide potential. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01676, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>.

KLAIC, R. et al. Optimization of Solid-State Fermentation for Bioherbicide Production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 377–384, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>.

LIAO, W. et al. Asperjinone, A Nor-Neolignan, and Terrein, A Suppressor of ABCG2-expressing Breast Cancer Cells, from Thermophilic *Aspergillus terreus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 630-635, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np200866z>.

OLIVEIRA, L.C. da et al. Antibacterial Activity of Austdiol Isolated from *Mycoleptodiscus indicus* Against *Xanthomonas axonopodis* pv. Passiflorae. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 596-604, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20190045>

OLIW, E.H., HAMBERG, M. Biosynthesis of jasmonates from linoleic acid by the fungus *Fusarium oxysporum*. Evidence for a novel allene oxide cyclase. **Lipids**, v. 54, n. 9, p. 543-556.

ORTEGA, H.E. et al. Mycoleptodiscins A and B, cytotoxic alkaloids from the endophytic fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 741-744, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np300792t>

OSEMWEGIE, O.O. et al. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. **Heliyon**. v. 6, n. 6, p. e04205. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205>.

Pervaiz, Z.H. et al. Continuous Cropping Alters Multiple Biotic and Abiotic Indicators of Soil Health. **Soil Systems**, v. 4, p. 1-30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/soilsystems4040059>.

- Portela, V.O. et al. First report on the production of phytotoxic metabolites by *Mycoleptodiscus indicus* under optimized conditions of submerged fermentation. **Environmental Technology**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1836030>
- PU, J., WANG, Z., CHUNG, H., 2020. Climate change and the genetics of insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 76, n. 3, p. 846-852. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5700>.
- Rosa, L.H. et al. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Agricultural Research Service Gainesville FL Center for Medical Agricultural and Veterinary Entomology**, 2012.
- Salvatore, M.M. et al. Fatty Acids Produced by *Neofusicoccum vitifusiforme* and *N. parvum*, Fungi Associated with Grapevine Botryosphaeria Dieback. **Agriculture**, v. 8, n. 189, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture8120189>
- Silva, A. A. et al. Multilocus sequence analysis of endophytic fungi from *Justicia brandegeana* with the culture-dependent method and their bioprospection for health field. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 359-368, 2020.
- Tarocco, F. et al. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 481-488, 2005.
- Tivendalea, N.D. et al. Extraction, purification, methylation and GC–MS analysis of short-chain carboxylic acids for metabolic flux analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1028, p. 165-174, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.042>.
- Todero, I. et al. Concentration of exopolysaccharides produced by *Fusarium fujikuroi* and application of bioproduct as an effective bioherbicide. **Environmental Technology**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1580775>
- Triolet, M. et al. Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? **Weed Research**, v. 60, p. 60-77, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wre.12389>

Ujam, N.T. et al. Antioxidant and immunosuppressive activities of extracts of endophytic fungi isolated from *Psidium guajava* and *Newbouldia laevis*. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 2, p. 100028, 2021.

Varejão, E.V.V. et al. Phytotoxicity of *Alternaria euphorbiicola* culture filtrates in *Euphorbia heterophylla* leaves. **Planta Daninha**. v. 31, n. 1, p.1-9, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582013000100001>.

VONGSUVANLERT, V.; TANI, Y. 1-Iditol production from l-sorbose by a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 5, p. 517-523, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(88\)90084-2](https://doi.org/10.1016/0385-6380(88)90084-2)

WANG, K.F. et al. Improved production and antitumor activity of intracellular protein-polysaccharide from *Trametes versicolor* by the quorum sensing molecule-tyrosol. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 90- 96.



## 7 MATERIAL SUPLEMENTAR

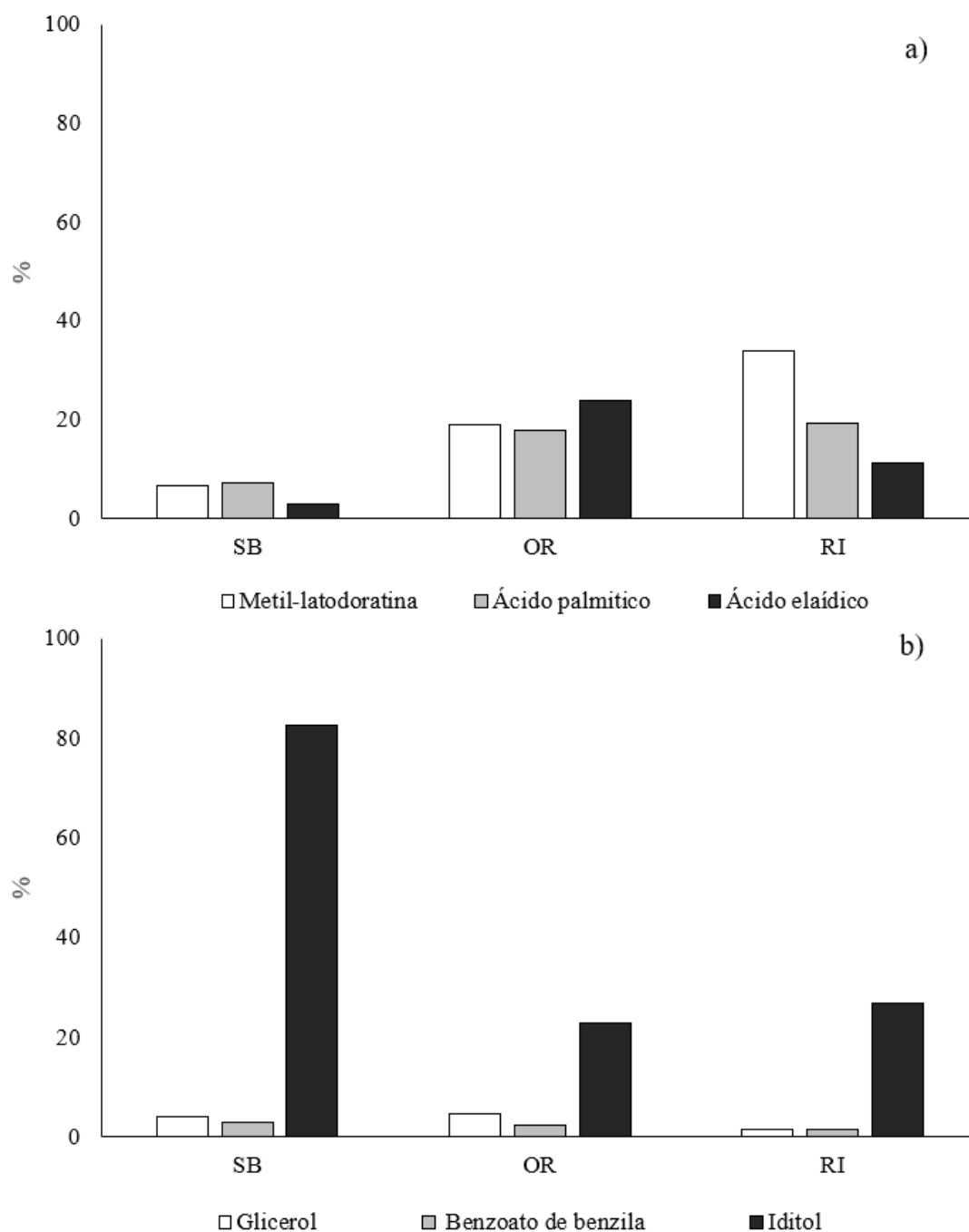


Figura S1. Conteúdo relativo dos metabólitos comuns aos extratos obtidos a partir do crescimento de *M. indicus* UFSM 54 em meio de cultura a base de bagaço (SB), arroz+aveia (OR) ou arroz (RI), identificados por CG-EM após processo de derivatização por reação com ácido clorídrico metanólico (A) e com anidrido acético/ piridina (B).

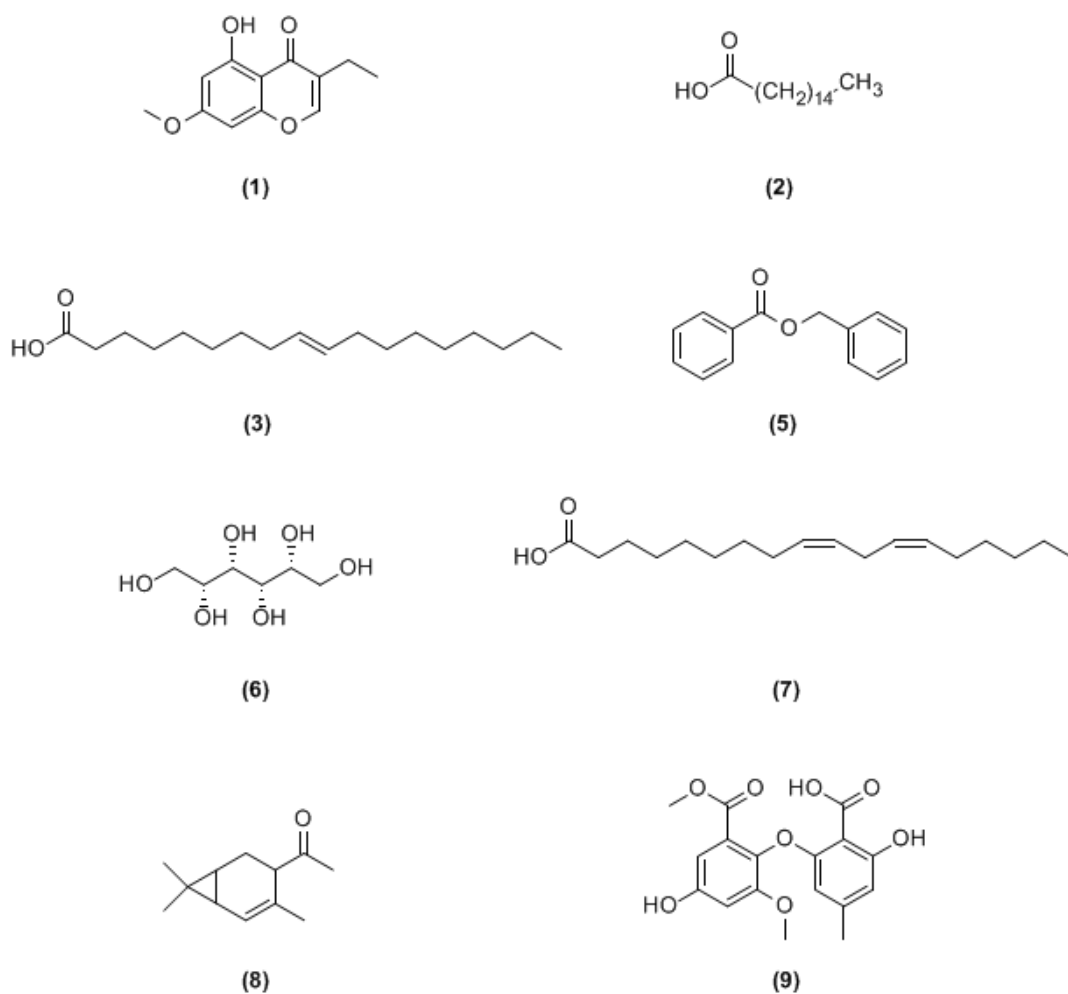


Figura S2. Estruturas químicas dos compostos majoritários detectados por CG-EM e CLAE presentes nos extratos brutos de *M indicus* UFSM 54: metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), benzoato de benzila (5), iditol (6), ácido linoleico (7), 4-acetil-2-careno (8) e ácido astérico (9).

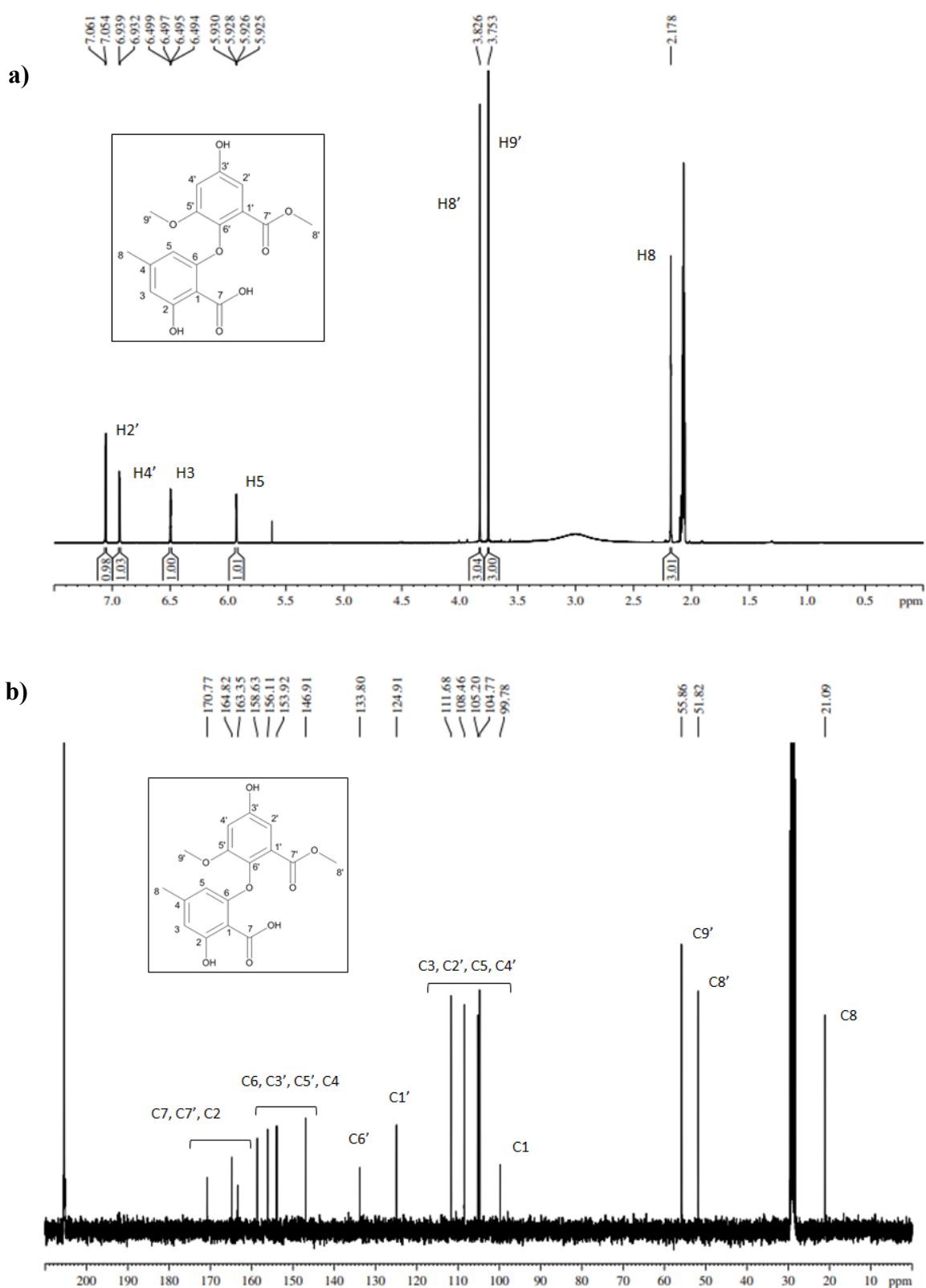


Figura S3. a) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido astérico em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz.; b) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido astérico em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz.

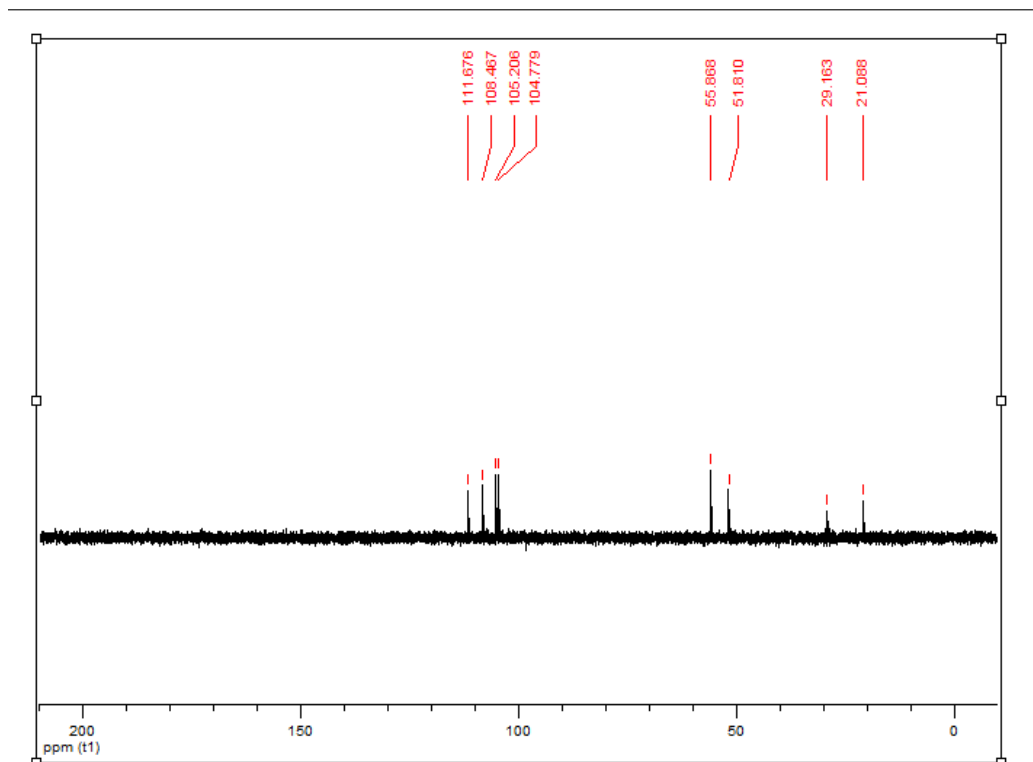


Figure S4. Espectro de RMN DEPT 135 do ácido astérico em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz.

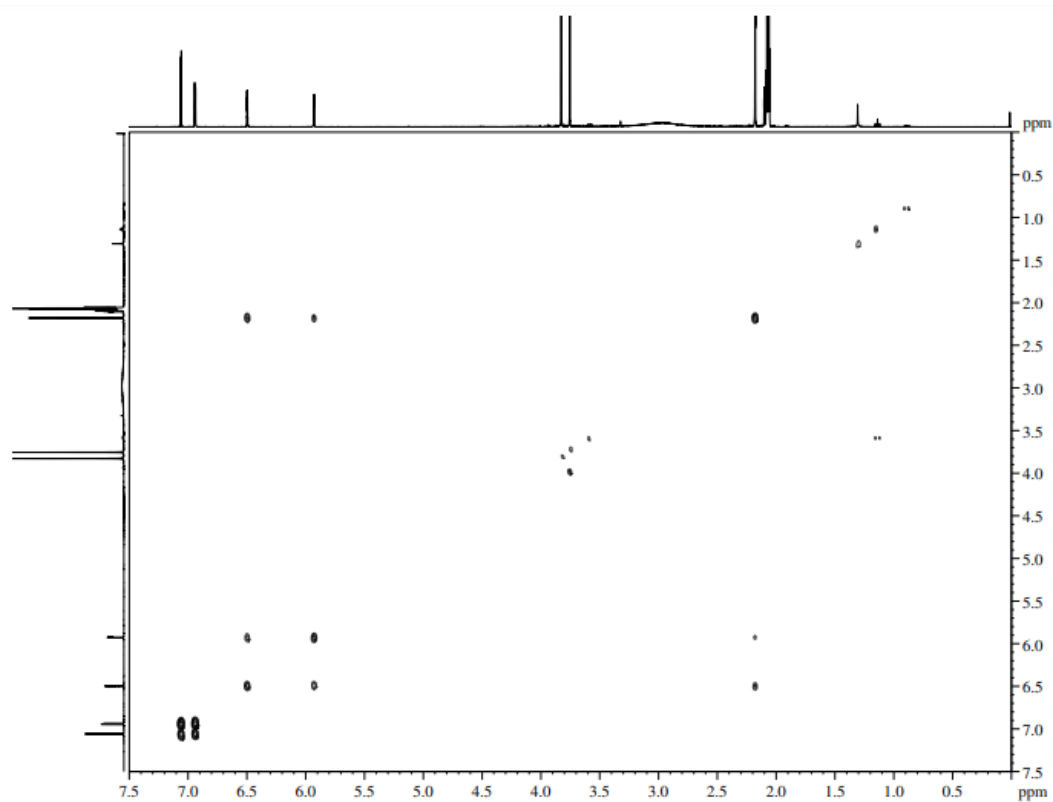


Figure S5. Espectro de RMN 2D COSY do ácido astérico em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz.

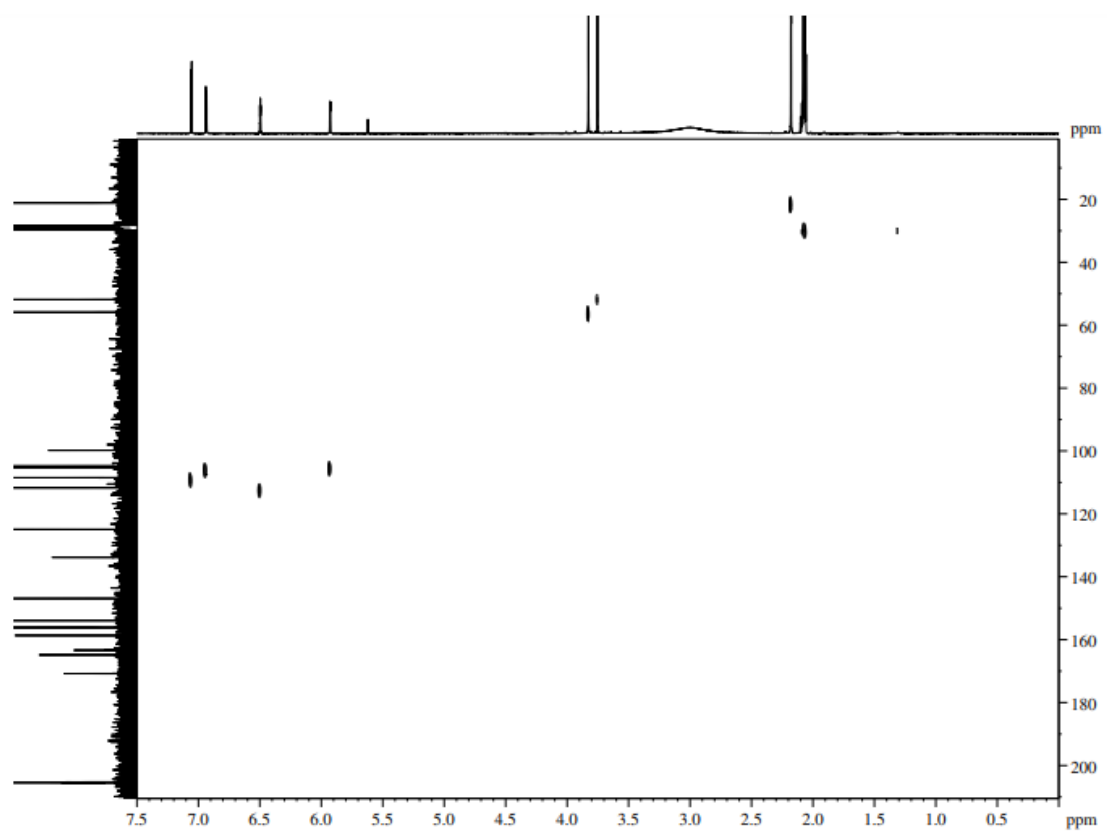


Figure S6. Espectro de RMN 2D HMQC do ácido astérico em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , 400 MHz.

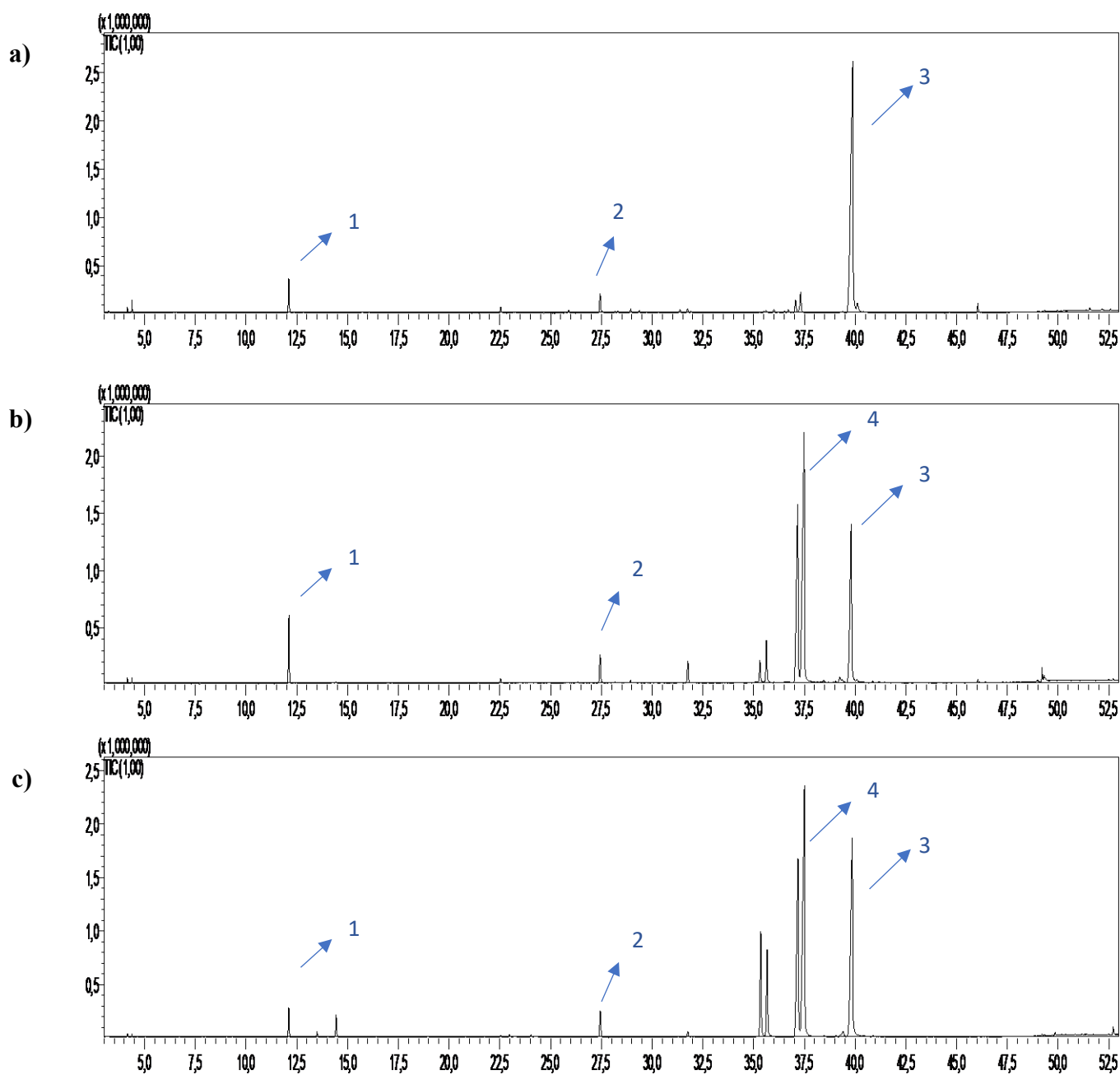


Figura S7. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos produtos de derivatização com anidrido acético-piridina dos extratos: a) extrato etanol bagaço; b) extrato etanol arroz+aveia e c) extrato etanol arroz. Legenda: (1) triacetina; (2) benzoato de benzila; (3) iditol, hexaacetato; (4) 3-O-etil-D-glicose, pentaacetato.

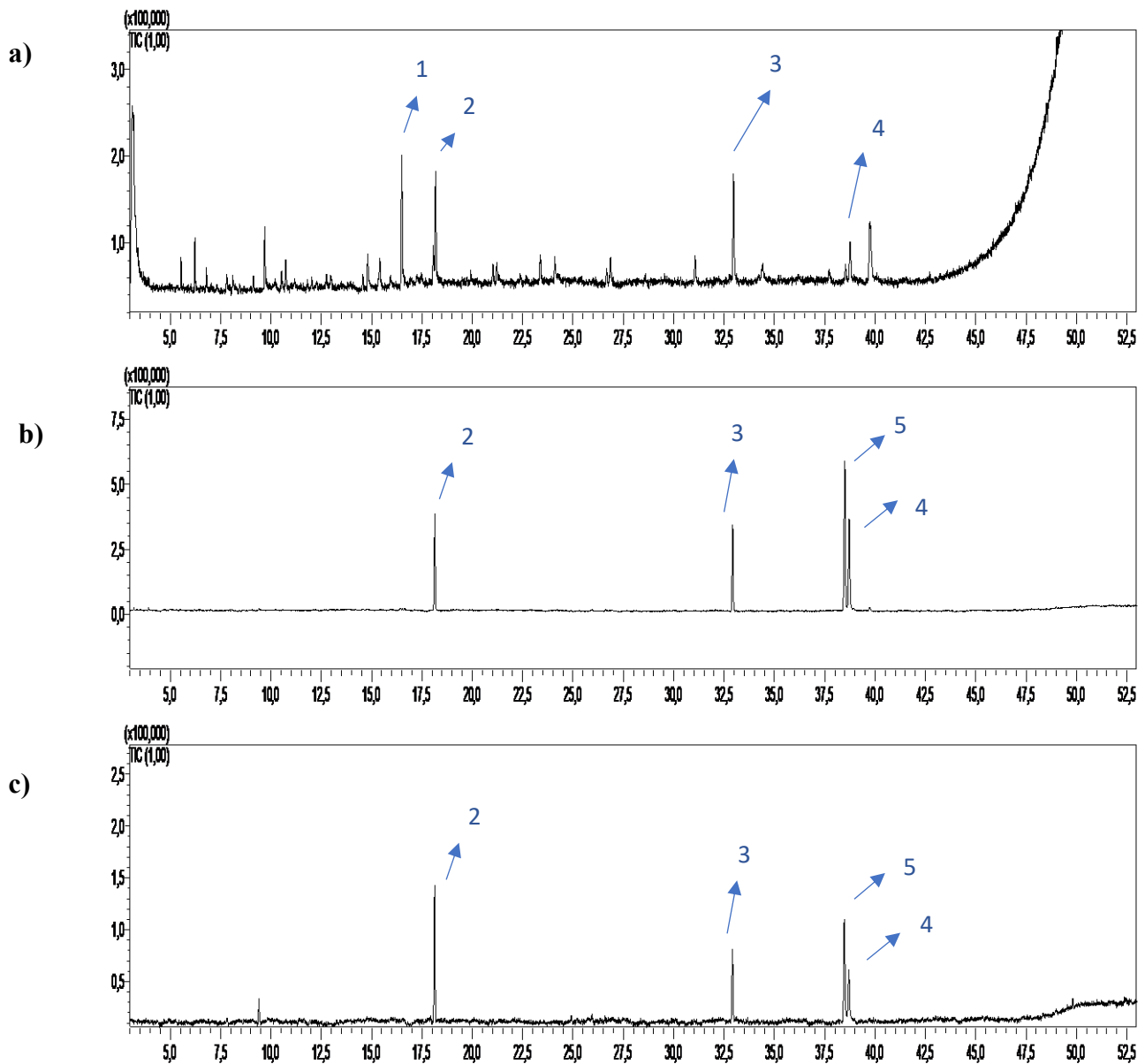


Figura S8. Cromatogramas obtidos por CG-EM dos produtos de derivatização com metanol-HCl dos extratos: a) extrato etanol bagaço; b) extrato etanol arroz-aveia e c) extrato etanol arroz. Legenda: (1) ácido cítrico, éster trimetílico; (2) metil-latodoratina; (3) ácido palmítico, éster metílico; (4) ácido elaídico, éster metílico; (5) ácido linoleico, éster metílico.

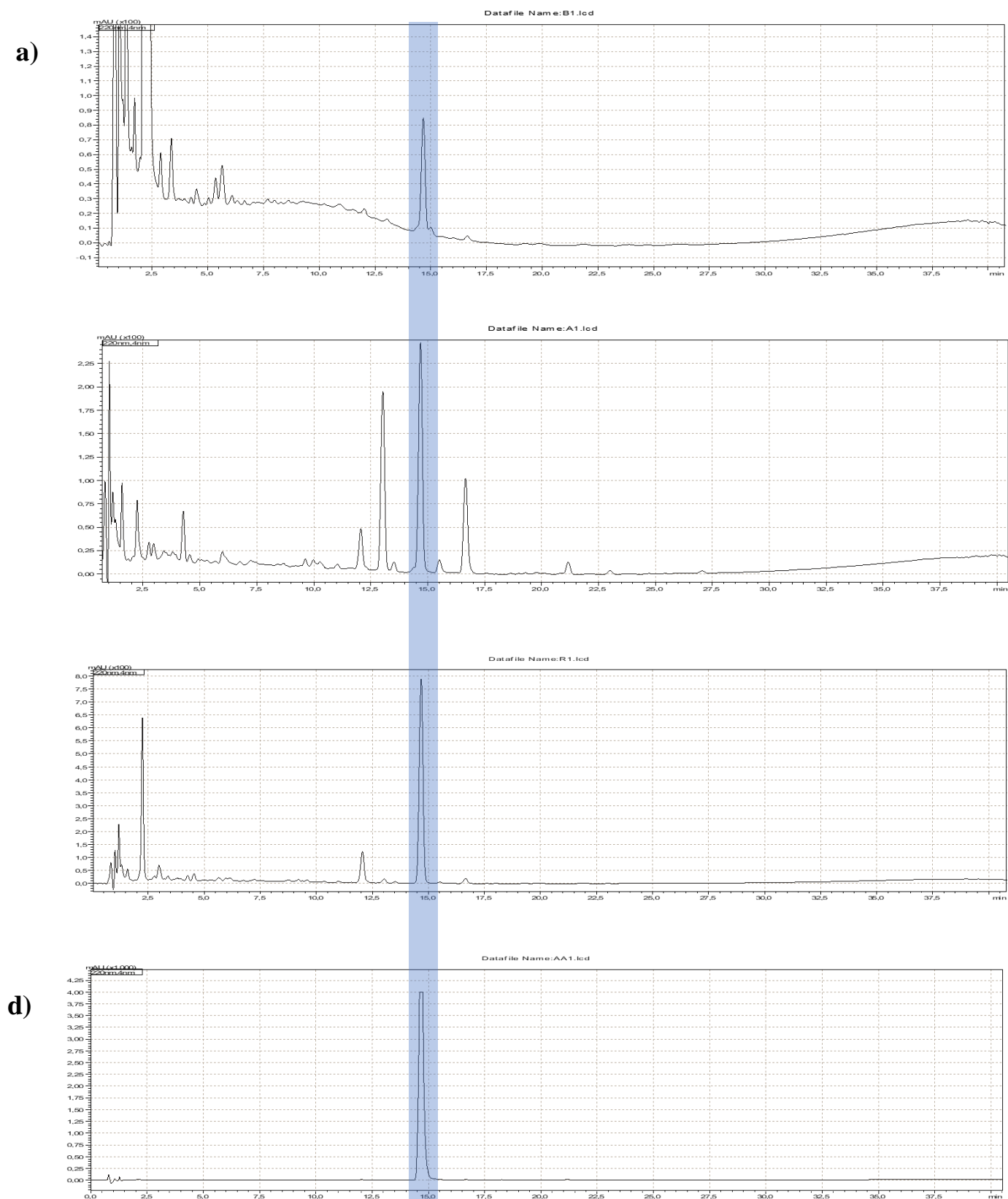


Figura S9. Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos brutos: a) Extrato bagaço-etanol; b) Extrato arroz-aveia-etanol e c) Extrato arroz-etanol e d) ácido astérico isolado.



## 8 DISCUSSÃO GERAL

A preocupação com a produção sustentável e a preservação do ambiente tem incentivado novas pesquisas sobre o isolamento, quantificação e caracterização de compostos bioativos de alta eficiência e baixa toxicidade (GANGADEVI et al., 2008) para uso nas mais diversas atividades humanas (agricultura, indústria alimentícia, farmacêutica, química, etc). Neste contexto, os metabólitos de fungos têm grande importância, comprovado pelo aumento dos estudos de bioprospecção e descoberta de substâncias bioativas inéditas (MAHAPATRA et al., 2013). Exemplo disto são os resultados promissores no controle de plantas daninhas com metabólitos obtidos do cultivo em fermentação submersa e/ou sólida (BRUN et al., 2016; TRIOLET et al., 2020), que podem penetrar na planta, destruir a parede celular e induzir lesões necróticas (KAUR et al., 2015; KUMAR et al. 2017).

Diversas etapas são importantes em estudos de bioprospecção visando o desenvolvimento de bioprodutos. Muitos fungos promissores podem ser descartados precocemente durante os estágios de desenvolvimento de bioherbicidas por apresentarem baixa atividade herbicida. Isto pode estar diretamente relacionado ao cultivo do fungo em uma condição que não é a ideal para produção dos metabólitos com ação bioherbicida (SOUZA et al. 2017). A maioria dos estudos de isolamento de fungos produtores de moléculas herbicidas está relacionado aos gêneros *Diaporthe* sp. (SOUZA et al., 2017), *Euphorbiicola* spp. (VAREJÃO et al., 2013; LINGARAJU et al., 2020) e *Phoma* spp. (KLAIC et al., 2017; TODERO et al., 2018; LUFT et al., 2019). No entanto, a diversidade de fungos no ambiente é muito grande e diferentes espécies podem produzir distintas moléculas, o que pode resultar em descobertas de novos mecanismos de ação sobre as plantas (TREMACOLDI, 2006).

Nos últimos anos, o número de estudos com o fungo *Mycoleptodiscus indicus* aumentou significativamente, indicando ser um microrganismo promissor para obtenção de metabólitos com atividade bioherbicida, antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral (ANDRIOLI et al., 2014, OLIVEIRA et al., 2019, AHMED et al., 2020, PORTELA et al., 2020). O presente trabalho dá sequência ao estudo iniciado em 2015 por Portela et al. (2020), que isolou nove fungos de lesões em folhas de *Conyza* sp. com a finalidade de selecionar um fungo produtor de metabólitos com potencial bioherbicida.

No artigo I desta tese foi realizada a otimização da produção do bioherbicida em fermentação sólida e submersa. No artigo II, analisou-se a composição química e o potencial bioherbicida dos extratos produzidos por *M. indicus* UFSM 54 cultivado em três meios de cultura (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de aveia + arroz e arroz). Cumpridas estas etapas muitas

outras podem ser realizadas buscando-se avançar no desenvolvimento de um bioherbicida. Neste sentido, sugere-se: testes do potencial bioherbicida de doses maiores dos extratos fúngicos e avaliação da eficiência bioherbicida dos extratos misturados com a aditivos e adjuvantes.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na otimização do cultivo de *M. indicus* UFSM 54 por fermentação sólida e submersa, as maiores lesões em folhas de *C. sativus* são causadas pelos metabólitos produzidos em fermentação submersa. Além disso, os metabólitos provocam danos severos na germinação, no crescimento inicial e nas folhas destacadas de *C. sativus*, *Conyza* sp. e *S. bicolor* e não apresentaram efeito ecotoxicológico sobre as minhocas *E. andrei* nas doses testadas.

Os compostos metil-latodoratina (1), ácido palmítico (2), ácido elaídico (3), glicerol (4), benzoato de benzila (5), iditol (6), ácido graxo poli-insaturado ácido linoleico (7), monoterpeneo 4-acetil-2-careno (8), ácido astérico (9) e NE1 (em processo final de elucidação estrutural) estão presentes nos extratos resultantes do cultivo do fungo endofítico *M. indicus* UFSM 54 nos meios de cultura a base de bagaço de cana (SB) ou de farelo de aveia+arroz (OR) ou arroz (RI);

Os extratos produzidos durante o crescimento do fungo *M. indicus* UFSM 54 no meio de cultura SB e OR apresentam efeito bioherbicida em folhas destacadas de *C. sativus*, porém somente o extrato SB reduz a germinação das sementes. Quando pulverizados sobre as plantas em crescimento, os três extratos apresentam efeito bioherbicida em *C. sativus*. Com estes dados é possível estabelecer a seguinte ordem de eficiência bioherbicida dos extratos avaliados: SB>OR>RI.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABASS, K. et al. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. **Toxicology**, v. 294, n. 01, p. 17-26, 2012.

ABI SAAB, O. J. et al . Pesticides deposition in vineyards on different conditions of leaf wetness. **Engenharia Agricola**, v. 37, n. 2, p. 286-291, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v37n2p286-291/2017>.

ABRANCHES, S. Biological Megadiversity as a Tool of Soft Power and Development for Brazil. **Brazilian Political Science Review**, v. 14, n. 2, p. e0006 – 1/18, 2020.

<https://doi.org/10.1590/1981-3821202000020006>.

ALBERS, C.H.N. et al. The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil—comparing different soils and humic substances. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 10, p. 2865-2870, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.004>.

ALY, A.H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0034-4>.

ANDRIGHETTI, M.S. et al. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1643-1653, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000500029>.

ANDRIOLI, W.J. et al. Mycoleptones A-C and polyketides from the endophyte *Mycoleptodiscus indicus*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 70-78, 2014. <https://doi.org/10.1021/np4006822>.

ANESE, S. et al. Phytotoxic potential of *Drimys brasiliensis* Miers for use in weed control. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 4, p. 505-516, 2015.

<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i4.19476>.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; UFPR. 2012. Seminário Mercado de Agrotóxico e Regulação. Brasília: Anvisa. Acesso em: 11 abril de 2021.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. Seminário MERCADO DE AGROTÓXICO E REGULAÇÃO, 2012. Brasília: Anvisa. Acesso em: 11 março de 2021.

ARMAS, E.D.D. et al. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova*, v. 28, p. 975-982, 2005.

ASSIRELLI, A. et al. Evaluation of sensors for poplar cutting detection to be used in intra-row weed control machine. *Computers and Electronics in Agriculture*, v. 115, p. 161-170, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.06.001>

ASTHER, M. et al. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 685-691, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00196-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00196-6)

BADER, C.D.; PANTER, F.; MÜLLER, R. In depth natural product discovery- Myxobacterial strains that provided multiple secondary metabolites. *Biotechnology advances*, v. 39, p. 07480, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107480>

BAILEY, K. L. et al. The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biological Control*, v. 58, n. 3, p. 379–386, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.06.001>

BALDONI, D.B. et al. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 1897-1908, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>.

BBC New Brasil.com. Como um agrotóxico usado na Guerra do Vietnã está destruindo videiras na Campanha Gaúcha. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-55712264>>. Acesso em: 20 março de 2021.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente: Ed. 2009. 314p.

BIANCHI, M.A. et al. D. Papéis do arranjo de plantas e do cultivar de soja no resultado da interferência com plantas competidoras. *Planta Daninha*, v. 28, p. 979-991, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000500006>

BORDIN, E. R. et al. Current production of bioherbicides: mechanisms of action and technical and scientific challenges to improve food and environmental security.

**Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-14, 2020.

<https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1833864>

BRAMI, C. et al. Avoidance, biomass and survival response of soil dwelling (endogeic) earthworms to OECD artificial soil: potential implications for earthworm ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 576–579, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s10646-017-1788-1>

BRUN, T. et al. Weed control by metabolites produced from *Diaporthe schini*.

**Environmental Technology**, p.1-10, 2020.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1780477>

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>

BRUN, T. et al. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor. **3 Biotech**, v. 6, p. 230-238, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0557-9>.

CAMELO, G.N. et al. Efeito do sistema de plantio e doses do nicosulfuron sobre a atividade microbiana do solo. **Planta Daninha**. v. 29, n. 4, p. 829-35. 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0100-83582011000400013>

CANUTO, K. M., et al. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. EMBRAPA, Embrapa Agroindústria Tropical- Documentos (INFOTECA-E). 2012 - Portal Embrapa. Disponível em <  
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/951754/fungos-48-endofiticos-perspectiva-de-descoberta-e-aplicacao-de-compostos-bioativos-naagricultura>> Acesso em 26 de fevereiro de 2021.

CASABE, N. et al. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. **Journal of Soils and Sediments**, v. 7, p.232-239, 2007. <https://doi.org/10.1065/jss2007.04.224>

CAVALCANTE, B.D.A.M. et al. Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control.

**Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, p. 101947, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101947>

CHAPMAN, P.M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00253-3).

CHARUDATTAN, R. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agroecology. **BioControl**, v. 6, p. 229-260, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011477531101>

CHARUDATTAN, R.; DINOOR, A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. **Crop Protection**, v. 19, n. 8–10, p. 691-695, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00092-2)

CORREIA, F.V.; MOREIRA, J.C.; Effects of glyphosate and 2,4-d on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, p. 264-268, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0089-7>

DATTA, A. et al. Managing weeds using crop competition in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Crop Protection**, v. 95, p. 60-68, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.005>

DUKE, S.O. et al. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. **Weeds Research**, v. 40, n. 1, p. 99-111, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2000.00161.x>

ELLIOTT, M.S. et al. Supplemental host range of *Araujia mosaic virus*, a potential biological control agent of moth plant in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**. v. 38, p. 603–607, 2009. <https://doi.org/10.1071/AP09046>

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Perdas de agrotóxicos. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_39\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html)>. Acesso em: março de 2020.

FIORILLO, C.M.T. **Controle biológico de *Sagittaria montevidensis* com *Cylindrocarpon* sp.** 2007. 78 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Produção Vegetal) -

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

FOROUZESH, A. et al. Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies-an update. **Weed Research**, v. 55, n. 4, p. 334-358, 2015. <https://doi.org/10.1111/wre.12153>

FUMAGALLI, P. et al. Ecotoxicological characterization of a mycoherbicide mixture isolated from the fungus *Ascochyta caulina*. **Pest Management Science**. v. 69, n. 7, p. 850-856. <https://doi.org/10.1002/ps.3447>.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycol Balc**, v. 5, p. 1-4, 2008.

GARCÍA - PÉREZ, J.A. et al. Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. **Applied Soil Ecology**, v. 83, p. 230-237, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.09.006>

GARCÍA, M. Á.; SANTAUFEMIA, M.; MELGAR, M. J. Triazine residues in raw milk and infant formulas from spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 03-04, p. 503-510, 2011.

GARRISON, A.P. et al. A case of subcutaneous *Mycocleptodiscus indicus* infection in a liver transplant recipient successfully treated with antifungal therapy. **Transplant Infections Disease**, v. 10, p. 218-220, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2007.00278.x>

GILL, H.K.; GARG, H. Pesticides: environmental impacts and management strategies. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. Editors. Pesticides - Toxic aspects. Rijeka: InTech. p.187-230, 2014.

GOMES JR., F.G.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Biologia e Manejo de Plantas Daninhas em Áreas de Plantio Direto. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 789-798, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000400010>

HANSEN, G.H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.50, n.9, p.1327-1341, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>



HAQUE, A.; GUPTA, R.; CHAKRAVORTY, P.P. Effect of two herbicides on *Xenylla welchi* (Hexapoda: Collembola) under laboratory conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 583-6, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00128-011-0277-0>

HEAP, I., International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org). Acesso em 20 de março de 2021.

HENDRIX, P.F.; PARMELEE, R.W. Decomposition, nutrient loss and microarthropod densities in herbicide-treated grass litter in a Georgia Piedmont agroecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, n. 4, p. 421-428, 1985. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90003-3)

HUG, J.J.; KRUG, D.; MÜLLER, R. Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. **Nature Reviews Chemistry**, v. 4, p. 172-193, 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41570-020-0176-1>

HUPFFER, H.M.; FIGUEIREDO, J.A.S.; WEYERMÜLLER, A.R. Conflito e construção de riscos na sociedade complexa e globalizada: O caso da deriva do herbicida 2, 4-D. **Revista de Direito Brasileira**, v. 25, n. 10, p. 120-141, 2020.

<http://dx.doi.org/10.26668/IndexLawJournals/2358-1352/2020.v25i10.5697>

IKRAM, M. et al. Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 115-123, 2020.

<https://doi.org/10.2174/2212798410666190612130139>

JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M.; SAKARIAH, K.K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3668-3672. 2002.

<https://doi.org/10.1021/jf025506a>

KAUR, M.; AGGARWAL, N.K. Comparative evaluation of phytotoxicity of *Alternaria macrospora* isolates, potential biocontrol agent against parthenium weed. **Research Journal of Botany**, v.10, p.14-21, 2015. <https://doi.org/10.3923/rjb.2015.14.21.16>.

KAZINCZI, G. et al. Biological Decline of *Solanum nigrum* L. Due to Tobacco mosaic tobamovirus (TMV) Infection. II. Germination, Seed Transmission, Seed Viability and

- Seed Production. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v. 37, n. 4, p. 329-333, 2006. <https://doi.org/10.1556/aphyt.37.2002.4.3>
- KELLOGG, J.J.; RAJA, H.A. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon. **Phytochemistry reviews**, v. 16, n. 2, p. 271-293, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9473-1>
- KESWANI, C. et al. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, p. 9287-9303, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>.
- KLAIC, R. et al. Optimization of Solid-State Fermentation for Bioherbicide Production by *Phoma* sp. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 34, n. 2, p. 377–384, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150613>.
- KNEZEVIC, S.Z. et al. Critical time for weed removal in glyphosate-resistant soybean as influenced by preemergence herbicides. **Weed Technology**, v. 33, n. 3, p. 393-399. <http://dx.doi.org/10.1017/wet.2019.18>
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, n.1-2, p.1-30, 2005. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- KUMAR, M.; MADHUPRIYA; RAO, G.P. Molecular characterization, vector identification and sources of phytoplasmas associated with brinjal little leaf disease in India. **3 Biotech**, v. 7, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0616-x>.
- LAMEGO, F.P. et al. Manejo de *Conyza bonariensis* resistente ao glifosato: coberturas de inverno e herbicidas em pré-semeadura da soja. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 433-442, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000200022>
- LANDIM, L.P., G.S. FEITOZA; COSTA, J.G.M. da. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.1, p. 58-64, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000111>
- LARSEN, T.O. et al. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 6, p. 672-695, 2005. <https://doi.org/10.1039/B404943H>

LEOCI, R.; RUBERTI, M. Glyphosate in Agriculture: Environmental Persistence and Effects on Animals. A Review. **Journal of Agriculture and Environment for International Development**, v. 114, n. 1, p. 99-122, 2020.

<https://doi.org/10.12895/jaeid.20201.1167>.

LI, S.J. et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, n. 5, p. 316-343, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.015>

LI, Y.; PENG, X.; CHEN, H. Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 493-498, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.001>

LINGARAJU, K. et al. Biosynthesis of Nickel oxide Nanoparticles from *Euphorbia heterophylla* (L.) and their biological application. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 4712-4719, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.11.003>.

LUFT, L. et al. Different techniques for concentration of extracellular biopolymers with herbicidal activity produced by *Phoma* sp. **Environmental Technology**, v. 42, n. 9, p. 1-27, 2019 <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1669720>.

LYN, M.E. et al. Interaction of water with three granular biopesticide formulations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1804–1814, 2010.

<https://doi.org/10.1021/jf903309s>

MAGGI, F. et al. The global environmental hazard of glyphosate use. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 137167, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137167>.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydr Polym**, v. 97, p. 627–634, 2013.

MAPA. 2021. AGROFIT. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. (accessed 29 February 2021).

- MELNICHUK, N. et al. Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. **Waste Management**, v. 106, p. 155-161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025>
- MENDES, I.S., REZENDE, M.O.O. Assessment of the allelopathic effect of leaf and seed extracts of *Canavalia ensiformis* as postemergent bioherbicides: A green alternative for sustainable agriculture. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 49, n. 5, p. 374-380, 2014. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.882179>.
- MIRSAL, I. A. Soil pollution: origin, monitoring and remediation. Berlin: Springer; 2008.
- MORIN, L. Progress in biological control of weeds with plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 58, p. 201-223, 2020.
- MUNGER, R. et al. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 03, p. 308-314, 1997.
- CRAGIN, L. A. et al. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, v. 111, n. 08, p. 1293-1301, 2011.
- NISA, S. et al. Identification and bioactivities of two endophytic fungi *Fusarium fujikuroi* and *Aspergillus tubingensis* from foliar parts of *Debregeasia salicifolia*. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 45, p. 4477-4487, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04454-1>
- OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315-342, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9171-3>
- OSTAZESKI, S.A. An undescribed fungus associated with a root and crown rot of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). **Mycologia**, v. 59, n. 6, p. 970-975, 1967. <https://doi.org/10.1080/00275514.1967.12018484>

PADHYE, A.A. et al. *Mycoleptodiscus indicus*: A new etiologic agent of phaeohyphomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2796–2797, 1995.

PEROTTI, V.E. et al. Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. **Plant Science**, v. 290, p. 110255, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110255>.

PETTA, T. **Técnicas modernas em espectrometria de massa aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos**. 2008. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PORTELA, V.O. et al. First report on the production of phytotoxic metabolites by *Mycoleptodiscus indicus* under optimized conditions of submerged fermentation. **Environmental Technology**. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1836030>.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: Trichoderma, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>

POWLES, S.B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 317-347, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>

QIU, P. et al. Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 13, n. 12, p. 942-953, 2015. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30102-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30102-3).

RADHAKRISHNAN, R. et al. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 158, p. 131-138, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives.

**Biotechnology Advances**, v.24, p.161-179, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>

REIS, C.B.L.D. et al. First report of the production of a potent biosurfactant with  $\alpha$ ,  $\beta$ -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation.

**Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 185-192, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.004>

RIZZARDI, M.A. et al. Perdas de rendimento de grãos de soja causadas por interferência de picão-preto e guanxuma. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 621-627, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000400005>

ROMDHANE, S. et al. Ecotoxicological impact of the bioherbicide leptospermone on the microbial community of two arable soils. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 5, p. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00775>.

SALOMÃO, P.E.A.; FERRO, A.M.S.; RUAS, W.F. Herbicides in Brazil: a brief review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e32921990, 2020.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i2.1990>

SANTOS, F.M. et al. Differential susceptibility of biotypes of *Conyza sumatrensis* to chlorimuron-ethyl herbicide. **Planta Daninha**. v. 32, n. 2, p. 427-435, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582014000200021>.

SANTOS, F.M. et al. Estádio de desenvolvimento e superfície foliar reduzem a eficiência de chlorimuron-ethyl e glifosato em *Conyza sumatrensis*. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 361-375, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582014000200014>.

SANTOS, G. et al. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas. **Weed Biology and Management**. v. 14, n. 2, p. 106–114, 2014.

<https://doi.org/10.1111/wbm.12037>

SCHOLTEN, R.; PARREIRA, M.C.; ALVES, P.L. da C.A. Período anterior à Interferência das plantas daninhas Pará uma cultivar de feijoeiro 'Rubi' em Função do espaçamento e da Densidade de sementeira. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 313-320, 2011. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v33i2.5646>.

SHARMA, A. et al. Linking Organic Metabolites as Produced by *Purpureocillium Lilacinum* 6029 Cultured on Karanja Deoiled Cake Medium for the Sustainable

Management of Root-Knot Nematodes. **Sustainability**, v. 12, n. 19, p. 8276.

<https://doi.org/10.3390/su12198276>

SILVA, D.R.O. Drift of 2,4-D and dicamba applied to soybean at vegetative and reproductive growth stage. **Ciência Rural**, v. 48, n. 8, p. 1-7, 2018.

<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180179>

SILVA, D.R.O. et al. Habilidade competitiva, alterações no metabolismo secundário e danos celulares de soja competindo com *Conyza bonariensis* resistente e suscetível a glifosato. **Planta Daninha**, v. 32, n. 3, p. 579-589, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582014000300014>

SILVA, D.R.O.D. et al. Glyphosate-resistant hairy fleabane competition in RR® soybean. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 451-457, 2014. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.0200>.

SOUZA, A.R.C. et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 575-578, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.005>.

SOUZA, A.R.C. et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 101-108, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.004>.

SOUZA, L.A. de; CUNHA, J.P.A.R.da; PAVANIN, L.A. Weed deposition of 2, 4-D Amine herbicide applied with different spray volumes and nozzles. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 78-85, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000100010>

SUN, Y. et al. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 781-790. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0790-x>

SUTTON, B.C. *Pucciniopsis*, *Mycoleptodiscus* and *Amerodiscosiella*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 60, n. 3, p. 525-536, 1973.

TAKAHASHI, J.A. et al. Use of the versatility of fungal metabolism to meet modern demands for healthy aging, functional foods, and sustainability. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 223, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040223>

TARAZONA, J.V.; RAMOS-PERALONSO, M.J. Ecotoxicology. In: WEXLER, P. Encyclopedia of Toxicology, 3<sup>th</sup>, p. 276-280, 2014

TODERO, I. et al. Concentration of metabolites from *Phoma* sp. using microfiltration membrane for increasing bioherbicidal activity. **Environmental Technology**, v. 40, n.18, p. 1-9, 2018. a <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1441330>

TODERO, I. et al. Formulation of a bioherbicide with metabolites from *Phoma* sp. **Scientia Horticulturae**, v. 241, n. 18, p. 285-292, 2018. b <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.009>

TREMACOLDI, C.R.; FILHO, A.P.S.S. **Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas**. 1 ed. Belém (PA). Embrapa Amazônia:Ed. 2006. 160 p.

TRIOLET, M. et al. Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? **Weed Research**, v. 60, p. 60-77, 2020. <https://doi.org/10.1111/wre.12389>

TUDI, M. et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.18, n. 3, p.1112, 202. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

UIZURRUN, P.D.; LEADEN, M.I. Análisis de la sensibilidad de biótipos de *Lolium multiflorum* a herbicidas inhibidores de la enzima ALS, ACCasa y glifosato. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 667-673, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000300024>

VAN DEN BOSH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A. **An introduction to biological control**. New York. Plenum Press: Ed. 1987. 247p.

VAN GESTEL, C. A.; LOUREIRO, S.; Zidar, P. Terrestrial isopods as model organisms in soil ecotoxicology: a review. **ZooKeys**, v. 801, p. 127-162, 2018. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.21970>.

VAREJÃO, E.V. et al. The search for new natural herbicides - Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. **Crop Protection**, v. 48, p. 41-50, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.008>



VASCONCELOS, M. da C.C.de et al. Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**. v. 8, n. 1, p. 01-06, 2012. <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v8i1.159>

VERA, M.S. et al. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1805–1816, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0915-2>

VIDAL, R. A. et al. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glifosato. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 309-315, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000200010>

WANG, X.; GU, M.; NIU, G.; BAUMANN, P. A. Herbicidal activity of mustard seed meal (*Sinapis alba* ‘IdaGold’ and *Brassica juncea* ‘Pacific Gold’) on weed emergence. **Industrial Crops and Products**. v. 77. p. 1004–1013, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.070>

WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 1-25 2017. <http://http://dx.doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>

WOLFENDER, J.-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719-734, 2009. <http://http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1088393>

WU, H. et al. Infection of *Ophiocordyceps sinensis* Fungus Causes Dramatic Changes in the Microbiota of Its Thitarodes Host. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 577268, 2020. <http://http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.577268>

XU, T.-C. et al. Bioactive Secondary Metabolites of the Genus *Diaporthe* and *Anamorph phomopsis* from Terrestrial and Marine Habitats and Endophytes: 2010–2019. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 217, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020217>

YANG, J. Et al. Isolation, Identification, and Herbicidal Activity of Metabolites Produced by *Pseudomonas aeruginosa* CB-4. **Journal of Integrative Agriculture**. v. 13, p. 1719-1726, 2014. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60695-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60695-4).

ZHAO, J. et al. Non-target effects of herbicides on soil nematode assemblages. *Pest Management Science*, v. 69, p. 679-84, 2013. <https://doi.org/10.1002/ps.3505>

ZHENG, R. et al. Biological Activities of Some New Secondary Metabolites Isolated from Endophytic Fungi: A Review Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22020959>

ZOBIOLE, L.H.S. et al. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 3, p. 182-193, 2010. b <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.01.004>

ZOBIOLE, L.H.S. et al. Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 176-180, 2010. a <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.003>