

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**RAÍSSA BARCHA ACCARINI**

**Estudo fitoquímico e alelopático de extratos de *Diaporthe phaseolorum***

SÃO CARLOS – SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**RAÍSSA BARCHA ACCARINI**

**Estudo fitoquímico e alelopático de extratos de *Diaporthe phaseolorum***

Tese apresentada ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais

**Orientadora:**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sonia Cristina Juliano Gualtieri**

SÃO CARLOS – SP

2021



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

## Folha de Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Raissa Barcha Accarini, realizada em 07/10/2021.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sonia Cristina Juliano Gualtieri (UFSCar)

Profa. Dra. Maristela Imatomi (UFSCar)

Profa. Dra. Lidiane Gaspareto Felipe (UNESP)

Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves (UNESP)

Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha orientadora Sonia Cristina Juliano Gualtieri por todo acolhimento, apoio e assistência que foram de suma importância para que eu conseguisse prosseguir durante esses 4 anos.

Agradeço aos meus pais Mario e Rejane Accarini por me incentivarem e acreditarem que tudo isso seria possível.

Ao meu namorado Luís Felipe Pinheiro pelas correções e aulas de inglês que fizeram toda a diferença nesta etapa final de escrita da tese.

Não poderia deixar de agradecer à Viviane Pereira Abdalla, não apenas por me fornecer o instrumento principal de execução desta pesquisa, mas também por toda ajuda no decorrer da tese, e principalmente por toda a amizade.

Obrigada imensamente à Maria do Carmo Gomes Lustosa do Departamento de Química orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, que foi responsável por toda análise química de minhas amostras. Obrigada por todo trabalho feito durante os anos de 2020 e 2021 e pela disposição e atenção concedidas a mim.

Agradeço também a todos outros que estiveram comigo nesta etapa, me ajudando e fazendo parte desta rotina científica: Luís Felipe Garcia Fuentes, Edgar Oliveira Vicente, Leandro Kenji Takao e Simoni Anese.

Gostaria também de agradecer aos membros da minha banca de qualificação que foram de essencial importância neste processo: Viviane Pereira Abdalla, Carolina Rabal Biasetto e Simoni Anese.

Sem todos que estiveram comigo nesta jornada, durante esses 4 anos de execução da minha tese, onde metade deles foram anos pandêmicos, nada seria possível.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação e Recursos Naturais (PPGERN), e à CAPES pelo auxílio financeiro.

E por último e mais importante, agradeço a Deus pela força que me fez chegar até aqui com saúde mental e física.

nada disso  
nos pertence  
matéria  
nenhuma  
entre a carne  
e a unha  
nem mesmo  
a memória  
mais recente  
num instante  
tudo  
se expande  
tudo  
se desprende  
nada disso  
nos pertence  
nem o sol  
nem o sal  
nem a sede  
da semente  
nada disso  
nos pertence  
nesse arranjo

reticente

(arrudA)

## RESUMO

Fungos endofíticos possuem a capacidade de viver no interior ou exterior de um tecido vegetal, sem causar-lhe prejuízo. Estudos têm demonstrado que estes grupos de fungos são fontes promissoras na busca por novos compostos naturais, já que em muitos destes, foram constatadas atividades antifúngicas, antibacterianas, antioxidante e fitotóxica, sendo de grande interesse para aplicações na medicina, agricultura e biologia química. Neste trabalho, foi utilizado o fungo *Diaporthe phaseolorum*, extraído de folhas saudáveis de *Serjania lethalis* A.St-Hils, uma liana pertencente à família Sapindaceae comumente encontrada no cerrado brasileiro, cujos compostos extraídos de suas folhas possuem atividade fitotóxica conhecida e comprovada através de trabalhos já publicados. Os fungos do gênero *Diaporthe*, cujo estado assexuado é conhecido como *Phomopsis*, encontram-se como endofíticos e saprófitos em uma variedade de espécies vegetais, e produzem compostos com atividades fitotóxica e citotóxica conhecidas, como por exemplo, gulypyronas e phomoxantonas, porém ainda existem poucos estudos com a espécie *Diaporthe phaseolorum*. Sendo assim, os principais objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial fitotóxico de extratos e frações de *D. phaseolorum* sobre espécies-alvo indicadoras e daninhas, analisando o modo de ação dos mesmos, bem como identificar compostos do metabolismo secundários. Primeiramente foram preparados dois extratos sendo um micelial (EME) e outro do meio de cultura (EMC), extraídos com etanol e acetato de etila por partição líquido-líquido, respectivamente. Ambos extratos foram testados em bioensaios que avaliaram o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.), a germinação e crescimento de plântulas de espécies daninhas e indicadoras mono e eudicotiledôneas: amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), capim-colonião (*Megathyrsus maximus* J.), cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.), respectivamente, bem como também foram testados em um bioensaio que avalia o crescimento de células do metaxilema radicular de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Os extratos foram fracionados em coluna de sílica em fase normal e suas respectivas frações foram novamente testadas sobre o crescimento de coleótilos de trigo a fim de selecionar aqueles com maior fitotoxicidade. Levando-se em conta os resultados e rendimentos, a fração 9 (EME9) proveniente do extrato micelial (EME) foi selecionada para os bioensaios de crescimento e germinação de plântulas e para o bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular de gergelim. Ambos extratos brutos (EME e EMC) utilizados no bioensaio de crescimento

de coleóptilos de trigo foram capazes de inibir o crescimento destes, apresentando suas maiores porcentagens de inibição quando utilizados em suas maiores concentrações ( $0,8\text{mg/mL}^{-1}$ ), já as frações EME9 e EME3 provenientes do extrato bruto micelial foram aquelas a apresentar maiores percentuais inibitórios para o mesmo bioensaio. No bioensaio de crescimento de plântulas, o extrato bruto (EME) e sua fração (EME9) foram capazes de inibir o crescimento tanto as partes aéreas como as raízes de plântulas de amendoim bravo. O amendoim bravo também se mostrou-se mais sensível ao extrato micelial e sua fração com relação à porcentagem de germinação, apresentando os menores valores percentuais. O crescimento das células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim foram também inibidos, comprovando o efeito fitotóxico do extrato micelial e de sua respectiva fração a estes. Através de uma análise química por CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência) feita nas amostras EMC, EME e EME9, foram identificados 7 compostos majoritários, todos já descritos na literatura para o gênero *Diaporthe*, onde o composto fomoxantona A é aquele a estar presente em maior quantidade e em todas as amostras analisadas. Os extratos brutos EMC e EME e a fração EME9 apresentaram atividade fitotóxica nos bioensaios realizados neste estudo, inibindo o crescimento de coleóptilos de trigo, das raízes e partes aéreas das espécies-alvo e de células do metaxilema radicular de gergelim. Desta forma, compostos identificados nos extratos de *Diaporthe phaseolorum* mostram-se promissores no estudo de suas bioatividades, visto que na literatura estudos com a espécie relacionada a esta bioatividades encontram-se escassas.

**Palavras-chave:** *Diaporthe phaseolorum*; espécies daninhas; fitotoxicidade; fungos endofíticos; germinação.

## ABSTRACT

Endophytic fungi have the ability to live inside or outside a plant tissue, without harming it. Studies have shown that these groups of fungi are promising sources in the search for new natural compounds, since in many of them, antifungal, antibacterial, antioxidant and phytotoxic activities were found, being of great interest for applications in medicine, agriculture and chemical biology. In this work, the fungus *Diaporthe phaseolorum*, extracted from healthy leaves of *Serjania lethalis* A.St-Hils, a liana belonging to the *Sapindaceae* family commonly found in the Brazilian cerrado, was used. already published. Fungi of the genus *Diaporthe*, whose asexual state is known as *Phomopsis*, are found as endophytic and saprophytic in a variety of plant species, and produce compounds with known phytotoxic and cytotoxic activities, such as gulyprones and phomoxanthenes, but there are still few studies with the species *Diaporthe phaseolorum*. Therefore, the main objectives of this work were to evaluate the phytotoxic potential of extracts and fractions of *D. phaseolorum* on indicator and invasive target species, analyzing their mode of action, as well as identifying secondary metabolism compounds. First, two extracts were prepared, one mycelial (EME) and the other from the culture medium (EMC), extracted with ethanol and ethyl acetate by liquid-liquid partition, respectively. Both extracts were tested in bioassays that evaluated the growth of wheat coleoptile (*Triticum aestivum* L.), germination and seedling growth of mono and eudicotyledonous invasive and indicator species: wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.), colony grass (*Megathyrus maximus* J.), onion (*Allium cepa* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.), respectively, and were also tested in a bioassay that evaluates the growth of sesame (*Sesamum indicum* L.) root metaxylem cells. The extracts were fractionated on a silica column in normal phase and their respective fractions were again tested on the growth of wheat coleoptiles in order to select those with greater phytotoxicity. Taking into account the results and yields, fraction 9 (EME9) from the mycelial extract (EME) was selected for the seedling growth and germination bioassays and for the sesame root metaxylem cell growth bioassay. Both crude extracts (EME and EMC) used in the wheat coleoptile growth bioassay were able to inhibit their growth, showing their highest percentages of inhibition when used at their highest concentrations ( $0.8\text{mg/mL}^{-1}$ ), as the fractions EME9 and EME3 from the crude mycelial extract were those with the highest inhibitory percentages for the same bioassay. In the seedling growth bioassay, the crude extract



(EME) and its fraction (EME9) were able to inhibit the growth of both aerial parts and roots of wild poinsettia seedlings. Wild poinsettia was also more sensitive to mycelial extract and its fraction in relation to germination percentage, showing the lowest percentage values. The growth of sesame seedling root metaxylem cells was also inhibited, proving the phytotoxic effect of the mycelial extract and its respective fraction to them. Through a chemical analysis by CLUE (ultra-efficiency liquid chromatography) performed on samples EMC, EME and EME9, 7 major compounds were identified, all already described in the literature for the genus *Diaporthe*, where the compound fomoxantone A is the one to be present in larger quantity and in all analyzed samples. The crude extracts EMC and EME and the EME9 fraction showed phytotoxic activity in the bioassays performed in this study, inhibiting the growth of wheat coleoptiles, roots and aerial parts of the target species and sesame root metaxylem cells. Thus, compounds identified in the extracts of *Diaporthe phaseolorum* show promise in the study of their bioactivities, since studies with the species related to this bioactivities are scarce in the literature.

**Keywords:** *Diaporthe phaseolorum*; endophytic fungi; germination; invasive species; phytotoxycity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da fomoxantona A (PXA).....26
- Figura 2:** Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada de onde foram coletas as folhas de *Serjania Lethalis*.....30
- Figura 3.** Identificação micro e macroscópica do fungo *Diaporthe* sp. e sua sequência transcrita.....31
- Figura 4.** Placas de Petri de 10cm de diâmetro com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) no dia da incubação de *Diaporthe phaseolorum* (A), e após incubação de sete dias em temperatura ambiente (B).....33
- Figura 5.** Fluxograma das etapas de cultivo de *D. Phaseolorum* até o processo final de obtenção dos extratos brutos.....34
- Figura 6.** Frações colhidas após fracionamento do extrato bruto em coluna de sílica em fase normal.....35
- Figura 7:** processo de fracionamento dos extratos brutos EMC e EME e suas frações originadas.....35
- Figura 8:** Cromatoplasmas dos extratos brutos (EME e EMC) e fração EME9 provenientes do extrato EME após reveladas.....36
- Figura 9:** Coleóptilos de trigo já separados das sementes, após crescimento no escuro por 72h (A) e guilhotina de Van der Weij utilizada para os cortes, em ambiente com luz verde de segurança.....38
- Figura 10:** Coleóptilos de trigo após a realização do bioensaio, organizados em planilha a serem fotografados para posterior medição.....39
- Figura 11:** Recipiente plástico transparente utilizado na execução do bioensaio de crescimento e germinação de plântulas, contendo as sementes dispostas sobre papel filtro.....40
- Figura 12:** Lâminas contendo raízes de gergelim previamente tratadas com os extratos brutos EMC e EME nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>, prontas para serem fotografadas em microscópio.....42
- Figura 13:** Valores médios de percentual de inibição de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos brutos de *Diaporthe phaseolorum* em diferentes concentrações.....47
- Figura 14.** Valores médios de percentual de inibição/estímulo de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação das frações provenientes do extrato de meio de cultura (EMC) e do extrato micelial (EME) de *Diaporthe phaseolorum* em diferentes concentrações.....48

<b>Figura 15:</b> Percentual de germinação de espécies alvo tratadas com extrato micelial de <i>Diaporthe phaseolorum</i> (EME) e sua fração (EME9), em diferentes concentrações.....	51
<b>Figura 16:</b> Efeito do extrato bruto micelial (EME) de <i>Diaporthe phaseolorum</i> e sua fração (EME9) sobre o crescimento inicial de partes aéreas de plântulas de amendoim-bravo ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ), capim-colonião ( <i>Megathyrsus maximus</i> ), cebola ( <i>Allium cepa</i> ) e gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ) em diferentes concentrações.....	53
<b>Figura 17:</b> Efeito do extrato bruto micelial (EME) de <i>Diaporthe phaseolorum</i> e sua fração (EME9) sobre o crescimento inicial de raízes de plântulas de amendoim-bravo ( <i>Euphorbia heterophylla</i> ), capim-colonião ( <i>Megathyrsus maximus</i> ), cebola ( <i>Allium cepa</i> ) e gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ) em diferentes concentrações.....	53
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos de meio de cultura de <i>D. phaseolorum</i> (EMC) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL <sup>-1</sup> , (C) 0.4 mg.mL <sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL <sup>-1</sup> .....	55
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos miceliais de <i>D. phaseolorum</i> (EME) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL <sup>-1</sup> , (C) 0.4 mg.mL <sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL <sup>-1</sup> .....	56
<b>Figura 20:</b> Médias (µm) das células do metaxilema de plântulas de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ) tratadas com os extratos de <i>D. phaseolorum</i> em diferentes concentrações.....	57
<b>Figura 21:</b> Médias (µm) dos comprimentos das células do metaxilema de plântulas de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ) tratadas com o extrato micelial (EME) de <i>D. phaseolorum</i> e sua fração (EME9) em diferentes concentrações.....	57
<b>Figura 22:</b> Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com a fração EME9 de <i>D. phaseolorum</i> (EME) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL <sup>-1</sup> , (C) 0.4 mg.mL <sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL <sup>-1</sup> .....	58
<b>Figura 23:</b> Frequência relativa das classes de tamanho (µm) das células do metaxilema de raízes de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ) submetidas à ação do extrato bruto micelial (EME) de <i>Diaporthe phaseolorum</i> , e sua fração (EME9), em diferentes concentrações.....	59
<b>Figura 24:</b> Placas com as diluições utilizadas no bioensaio de avaliação de atividade microbiana dos extratos brutos (EMC e EME) e da fração EME9 de <i>Diaporthe phaseolorum</i> , sob o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> , revelados com resazurina.....	61

<b>Figura 25:</b> Plântulas normais de amendoim-bravo e gergelim (A) e plântulas anormais de amendoim-bravo e gergelim (B) apresentando anormalidades do tipo atrofia de raiz e parte aérea.....	62
<b>Figura 26:</b> Cromatograma do extrato bruto micelial EME de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	64
<b>Figura 27:</b> Cromatograma do extrato bruto do meio de cultura EMC de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	65
<b>Figura 28:</b> Cromatograma da fração EME de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	66
<b>Figura 29:</b> Cromatograma dos extratos brutos (EME e EMC), branco (etanol), meio de cultura Czapek e da fração EME9 de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	67
<b>Figura 30:</b> Espectros da substância Fomoxantona A.....	70
<b>Figura 31:</b> Formulas estruturais dos compostos encontrados nos extratos brutos EMC e EME e na fração EME9 de <i>Diaporthe phaseolorum</i> : Fomoxanthone A (A), Penexantona A (B), Tenellona A (C), Fomoxantona H (D), Oblongolideo G (E), methyl 5-[(1R)- 1-hidroxietil]-g-oxofuran-2-butanoato (F) e Diaporol P (G).....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Compostos com atividade herbicida isolados de fungos endofíticos.....	19
<b>Tabela 2.</b> Fonte de diversos compostos bioativos isolados do endofítico <i>Diaporthe</i> sp. e suas atividades biológicas potenciais (Nagarajan et al., 2021).....	21
<b>Tabela 3.</b> Valores em miligramas dos rendimentos dos extratos brutos (EMC e EME) e das frações provenientes destes, e da porcentagem de rendimento (%) em relação à quantidade de extrato utilizada no fracionamento.....	45
<b>Tabela 4.</b> Relação de extratos e frações utilizadas em bioensaios de crescimento de coleótilos de trigo (BCCT), de crescimento de células do metaxilema de gergelim (BCCMG) e de crescimento e germinação de plântulas (BCGP).....	45
<b>Tabela 5.</b> Valores de Velocidade de Germinação ( $h^{-1}$ ) e sincronia de plântulas submetidas à ação do extrato bruto micelial de <i>D. phaseolorum</i> (EME) e de sua fração (EME9) em diferentes concentrações.....	52
<b>Tabela 6.</b> Concentração inibitória de 50% (IC50) e índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos brutos EMC e EME e fração EME9 de <i>D. phaseolorum</i> . Quercetina e Ácido Gálico: referência industrial de composto antioxidante utilizado como controle positivo.....	62
<b>Tabela 7.</b> Metabólitos secundários de <i>Diaporthe phaseolorum</i> identificados por UPLC-QToFMS <sup>E</sup> em amostras dos extratos brutos (EMC e EME) e na fração (EME9).....	68

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
“ Estudo fitoquímico e alelopático de extratos de <i>Diaporthe phaseolorum</i> ” .....	16
1. Introdução .....	17
2. Objetivos	
2.1. Objetivos gerais.....	29
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. Materiais e Métodos .....	30
3.1. Material biológico.....	30
3.2. Isolamento de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	32
3.3. Preparo dos extratos brutos.....	33
3.4. Técnicas cromatográficas.....	35
3.4.1. Cromatografia em Coluna.....	35
3.4.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
3.4.3. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química.....	38
3.5. Bioensaios.....	37
3.5.1 Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	38
3.5.2. Bioensaio de crescimento e germinação de plântulas.....	40
3.5.3. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> L.).....	42
3.5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	43
3.5.5. Atividade antioxidante.....	44

3.6. Análises estatísticas.....	45
4. Resultados e Discussão.....	45
4.1. Rendimento dos extratos e frações de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	45
4.2. Bioensaio de crescimento de coleótilos de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).....	47
4.3. Bioensaio de crescimento e germinação de plântulas.....	51
4.4. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> L.).....	56
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	61
4.6. Atividade antioxidante.....	62
4.7. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química.....	64
5. Conclusões.....	73
6. Referências.....	74

**Estudo fitoquímico e alelopático de extratos de *Diaporthe phaseolorum***



## 1. Introdução

Organismos endofíticos também são conhecidos por produzirem metabólitos secundários que desempenham um papel importante em sua relação com a planta hospedeira e o meio ambiente (Aly, et al., 2011). Esses compostos bioativos, como alcalóides, diterpenos e flavonóides, aumentam a resistência das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Firáková et al., 2007; Rodriguez et al., 2009) além de aumentarem a aptidão e o crescimento das plantas hospedeiras (Jia et al., 2016). As relações entre fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras podem ser tão próximas que estes microrganismos são capazes de sintetizar os mesmos compostos químicos sintetizados pelas suas hospedeiras para uma melhor adaptação ao microambiente dos tecidos vegetais (Caruso et al., 2020).

Por outro lado, os fungos endofíticos também podem ter um papel na degradação dos metabólitos produzidos pelas plantas, como ocorreu com uma cepa de *Phomopsis liquidambari*, retirada do caule de *Bischofia polycarpa* da qual degradou o fitoestrogênio luteolina e compostos fenólicos adicionais, como o fenantreno (Wang et al., 2015), introduzindo o possível emprego de cepas de fungos endofíticos na biorremediação (Chan et al., 2013).

Diversos estudos recentes têm relatado os benefícios dos fungos endofíticos com relação às possíveis aplicações de seus metabólitos produzidos, dos quais mostraram ser importantes tanto na área médica (Tawfike et al., 2019; Wu et al., 2018) como na agricultura (Moura et al., 2020).

Dentre os métodos de controle e prevenção de pragas e doenças agrícolas, o uso de agroquímicos continua sendo o componente mais importante para aumentar o rendimento das colheitas e reduzir o trabalho nas culturas (Silva, 2009). No entanto, o uso continuado de pesticidas em áreas de monocultura tem levado ao crescente aparecimento, em escala mundial, de biótipos de organismos tolerantes e resistentes a esses produtos sintéticos, o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de produção e problemas graves de contaminação ambiental (Nebo et al.; 2014; Khaliq et al., 2013; Marangoni et al., 2012; Haig et al., 2009).

Com o desenvolvimento da sociedade humana, promovido pela evolução agrícola e pecuária, as áreas destinadas à atividade rural foram expandidas, ocasionando a ampla distribuição de pragas, patógenos e plantas indesejáveis. Nesse contexto, a

comunidade de plantas indesejáveis ou daninhas tornou-se cada vez mais densa e diversificada, com profunda especialização na ocupação dos agroecossistemas (Mortimer, 1990); sendo definida como qualquer planta que ocorre onde não é desejada, ou então uma planta sem valor econômico ou que compete, com o homem, pelo solo (Silva et al., 2007; Concenço et al., 2014). Em termos mais simples, uma planta pode ser considerada daninha se estiver direta ou indiretamente prejudicando determinada atividade humana (Concenço et al., 2014). Essas daninhas coevoluiram com as plantas cultivadas, porém, elas possuem várias características fisiológicas (crescimento rápido e resistência à outras espécies), agrônômicas (alta capacidade de competição e estabelecimento) e reprodutivas (elevada produção de sementes e capacidade de dispersão), que as tornam dominantes em comparação com as cultivadas. Nos agroecossistemas, elas competem pelos mesmos recursos das espécies cultivadas, reduzem a produtividade, deterioram a qualidade dos produtos dela resultantes, o que ocasiona enormes perdas financeiras (Kohli et al., 2004; Tanveer et al., 2012).

O amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae. Esta se caracteriza por ter uma alta capacidade de competição por recursos como água, luz, nutrientes, CO<sub>2</sub> e oxigênio (Oliveira Jr. et al., 2011), ocasionando perdas na qualidade e produtividade de sistemas agrícolas, como a soja (Carvalho et al., 2010, Lopes Ovejero et al., 2013), milho (Cury et al., 2012), cana-de-açúcar (Marques et al., 2012) algodão (Beltrão, 2004), feijão (Machado et al., 2015; Cury et al., 2011). É uma planta daninha nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas (Cronquist, 1981), apresenta ciclo anual, um rápido acúmulo de biomassa e uma elevada produção de sementes (Kissmann & Groth, 1999). Essa espécie é considerada de difícil controle, já que apresenta resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase – Protox, acetolactato sintase - ALS (Xavier et al., 2018; Trezzi et al., 2011) e recentemente foi relatada como resistente ao herbicida glifosato (inibidor da enzima 5-enolpiruvato- chiquimato-3-fosfato sintase - EPSPS) (Adegas et al., 2020). Sendo assim, a busca por herbicidas que tenham novos mecanismos de ação, assim como melhorias na aplicação, são fundamentais para controlar de maneira satisfatória esta planta daninha (Grigolli et al., 2011).

O capim-colonião (*Megathyrus maximus*), é uma gramínea que interfere em cultivos agrícolas, se destaca por ser uma planta vigorosa e com uma grande capacidade de ocupar ambientes rapidamente, devido a sua agressividade e pela intensa capacidade na produção e longevidade de sementes (Costa et al., 2002), sendo considerada como

uma planta daninha altamente competitiva (Lorenzi, 2008). A presença desta espécie é comum em lavouras de cana sendo considerada como infestante devido a supressão produzida pela palha (Correia et al., 2012), a sua interferência nas culturas contribui para a redução na produtividade. Kuva et al. (2003) observaram redução de até 40% da produtividade de colmos na cultura de cana-de açúcar, numa comunidade infestante de plantas daninhas, com espécies como capim colômbio (*Megathyrsus maximus*) e braquiária (*Brachiaria decumbens*).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (Brasil, IBAMA, 2018), e diferente dos herbicidas sistêmicos, os de ação seletiva controlam um grupo de plantas daninhas, sendo ineficazes para outros grupos. O oxifluorfen, cujo nome comercial é Goal® é um destes tipos de herbicida, sendo indicado para o controle de plantas daninhas, mono e eudicotiledôneas, em aplicações de pré-emergência ou pós-emergência inicial (Sălceanu et al., 2017).

O uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos tem contribuído para o aumento da resistência de plantas daninhas, além de conduzir a problemas de saúde e contaminação dos recursos naturais (Verdeguer et al., 2011). Atualmente, há 255 espécies de ervas daninhas resistentes a herbicidas (148 dicotiledôneas e 107 monocotiledôneas) relatadas em 92 safras e 70 países (Heap, 2018). Em função destas consequências, a continuidade e intensificação de estudos que objetivem encontrar fontes de herbicidas naturais como alternativas que causem menores impactos negativos para a população e meio ambiente são de extrema importância.

Compostos naturais capazes de suprimir o crescimento de ervas daninhas têm sido objeto de estudos com o objetivo principal de desenvolver novos herbicidas naturais, visto que muitas vezes são considerados ambientalmente corretos e facilmente biodegradáveis (Lima et al., 2018). Desta forma, os fungos são uma boa alternativa no controle de plantas daninhas devido à sua abundância e ao seu potencial de produção de fitotoxinas de interesse, podendo servir de base para a produção de novos herbicidas (Cimmino, 2015).

Uma ampla variedade de metabólitos isolados e identificados, com atividade herbicida comprovada, provenientes de fungos endofíticos, se encontra descrito na literatura. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Compostos com atividade herbicida isolados de fungos endofíticos.

<b>Espécie endofítica</b>	<b>Molécula / composto bioativo</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Brevianamida F	Zhang et al.; 2013
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetoglobosine A	Liu et al., 2014
<i>Diaporthe gulyae</i>	Gulypirona A e B Phomentrioloxina B e C Ácido nitropropionico	Andolfi et al., 2015
<i>Edenia gomezpompae</i>	Palmarumicine CP2, CP17 e CP19 Pressoumerine EG1, EG2, EG 3 e EG4 22-tetraen-3-one	Macias-Rubalcava et al., 2014
<i>Alternaria euphorbiicola</i>	Anhydromevalonolactone, Tyrosol, (R)-(-)-mevalonolactone Cycloglycylproline	Varejão et al., 2013
<i>Alternaria sp.</i>	Ácido indol-3-carboxílico	Pereira, 2018
<i>Aspergillus flavus</i>	2-(1, 4-dihydroxybutan-2-yl)-1, 3-dihydroxy-6, 8-dimethoxyanthracene-9, 10(4aH, 9aH)-dione	Khattak et al., 2017
<i>Alternaria alternata</i>	Tenuazonic acid	Sanodiyra et al., 2010
<i>Nodulisporium sp.</i>	Deoxysporotric acid Epideoxysporothric acid Deoxyisoporothric acid 1-undecen-2,3-dicarboxylic 5 acid	Cao et al., 2019
<i>Penicillium viridicatum</i>	Viridicatumone A Viridicatumone B Viridicatumone C	Wang et al., 2019

Os fungos endofíticos são uma boa fonte bioativa devido à sua capacidade em produzir bioativos em curto período e não requer grande área de cultivo (Budiono et al., 2019). Estes também vêm sendo intensamente explorados na busca por compostos antioxidantes (Elfita et al. 2021; Nagda et al., 2017).

O radical livre é uma espécie altamente reativa que pode interferir na integridade celular, reagir com componentes estruturais, como macromoléculas constituintes da membrana, e reagir com componentes funcionais, como enzimas e DNA. No corpo humano, o radical livre desencadeia várias doenças degenerativas, incluindo câncer, aterosclerose, hipertensão, reumatóide, artrite, diabetes, diminuição do sistema de imunodeficiência e acelera o processo de envelhecimento. A proteção do corpo humano contra os radicais livres geralmente requer uma substância específica, a saber, os antioxidantes (Mary et al., 2017; Yadav et al., 2014). Como exemplo de radicais livres podemos citar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH \cdot$ ), óxido nítrico ( $NO \cdot$ ) e peroxila ( $RO \cdot$ ).

Outro lado bastante explorado de microrganismos endofíticos é com relação à antimicrobiana destes. Diversos trabalhos recentes comprovam a atividade

antibacteriana (Ravimannan et al., 2021; Widjajanti et al., 2021; Obare et al., 2020;) e antifúngica (Munir et al., 2021; Erfandoust et al., 2020; Nurhaida et al., 2020) de metabólitos produzidos por fungos endofíticos.

Extratos de fungos do gênero *Diaporthe* também já foram analisados com relação à atividade herbicida destes (Brun et al., 2020; Abdalla et al., 2018; Souza et al., 2017), porém a atividade fitotóxica envolvendo o uso de extratos de *Diaporthe phaseolorum* ainda são escassas e a investigação do potencial herbicida de extratos de fungos desta espécie, como possível alternativa para a produção de herbicidas naturais é valiosa.

Até o momento, um grande número de compostos foi isolado de fungos endofíticos de plantas terrestres em *Diaporthe* e *Phomopsis*, alguns dos quais originários do ambiente marinho (principalmente manguezais e sedimentos). A maioria dos compostos são classificados como policetídeos, que é o principal tipo estrutural de metabólitos secundários desse gênero (Xu et al., 2021). Investigações químicas de alguns *Diaporthe* spp. têm proporcionado uma variedade de produtos naturais bioativos (Souza et al., 2016), como o agente citotóxico ácidos diapólicos (Yedukondalu et al., 2017), o derivado cetona anti-candidal (Yenn et al., 2017) e os compostos fenólicos com atividade antioxidante (Tanapichatsakul et al., 2018).

Os compostos relatados mostraram várias bioatividades, como pode ser observado na tabela 1, descrita por Nagarajan, 2021.

**Tabela 2.** Fonte de diversos compostos bioativos isolados do endofítico *Diaporthe* sp. e suas atividades biológicas potenciais (Nagarajan et al., 2021).

<i>Diaporthe</i> sp.	Planta hospedeira	Compostos	Natureza química	Tipo de atividade	Celula/alvo	Referência
<i>Diaporthe</i> sp. SNB-GSS10	<i>Sabicea cinerea</i>	Mycoepoxidieno (1); Altioxina A (2); Enamidina (3); Eremofortina F (4)	Mycoepoxidieno; Terpenoides; Enamidinas; Sesquiterpenoides	Citotóxica	KB (célula de carcinoma cervical uterino humano); MRC-5 (célula de fibroblasto de pulmão humano); MDA-MB-435 (célula de câncer de mama humano)	Mandavid et al., 2015
<i>Diaporthe</i> sp. LG23	<i>Mahonia fortunei</i>	19-nor-Lanosta-5(10),6,8,24-tetraene-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,22S-tetraol (5); 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -Trihidroxidiene-7,22-dien-6-one (6); 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -Tetrahidroxidiene(22E,24R)-ergosta-7,22-dieno-6-one (7); (22E,24R)-Ergosta-7,9(11),22-trieno-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -triol (8); Chaxine C (9); Demethyincisterol A <sub>3</sub> (10); Volemolide (11)	Triterpenoides	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva); <i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa); <i>Bacillus subtilis</i> (Gram-positiva); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-negativa); <i>Streptococcus pyogenes</i> (Gram-positiva)  <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (fungo); COLO 201 (célula adenocarcinoma de cólon humano);	Li et al., 2015
<i>Diaporthe</i> sp. 1308-05	<i>Aucuba japonica</i> var. borealis	Ácido homopetasínico (12)	Derivados de ácidos	Citotóxica	HL60 (célula de leucemia promielocítica humana)	Ito et al., 2016
<i>Diaporthe citri</i> G-01	<i>Mikania glomerata</i> Spreng	3-Ácido Nitropropionico (13)	Derivados de ácidos	Sub-letal	Larva de <i>Diatraea saccharalis</i> (broca da cana)	Polonio et al., 2016

<b><i>Diaporthe maritima</i> DAOMC628553</b>	<i>Picea rubens</i>	Phomopsolideos A-C (14-16); (S,E)-6-(4-hidroxi-3-oxopent-1-en-1-yl)-2H-pyran-2-one (17) Phomopsisporones A-B (18-19); (E)-1893A (20); 1893B (21); Micoepoxidieno (1); 2,3-Dihidromicoepoxidieno (22); Deacetylmycoepoxydiene (23); Nectriapyrone (24); Cytochalasin N (25); Diaporthalasin (26); (3R)-5-Metilmellein (27); (3R,4R)-cis-4-Hydroxy-5-metilmellein (28); (R)-(-)-5-Hidroximetilmellein (29); Dothiorelones A-C e E (30-33); Cytosporones B e D (34-35)	Pyranonas	Antibiótica	<i>Bacillus subtilis</i> (Gram-positiva)	Tanney et al., 2016
<b><i>Phomopsis</i> sp. PSU-H188</b>	<i>Hevea brasiliensis</i>		Cytosporonas; Mycoepoxydienas; Pyranonas; Citocalasinas; Melleinas; derivados de Pyridina	Bactericida; citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva); MRSA (Gram-positiva); KB (célula cancerosa da cavidade oral humana); MCF-7 (célula de câncer de mama humano); Vero (células de fibroblastos renais)	Kongprapan et al., 2017
<b><i>Diaporthe phaseolorum</i> SKS019</b>	<i>Acanthus ilicifolius</i>	Diaporphasinas A-D (36-39); Meyeroguillinas A, C e D (40-42); 5-Deoxybostrycoidina (43); Fusaristatina A (44)	Alcaloides	Citotóxica	MDA-MB-435 (célula de câncer de mama humano); HepG2 (human liver cancer cell); HCT116 (célula de câncer de cólon humano); NCI-H460 (célula de câncer de pulmão humanas); MCF10A (célula da mama humana normal)	Cui et al., 2017
<b><i>Diaporthe arengae</i> TATW2</b>	<i>Terminalia arjuna</i> (Roxb.)	Metil 3-(3,5-di-tert-butil-4-hidroxi-fenil)propionato (45); Pterin-6-acido	Fenólicos	Anti-hipercolesterolêmico	hRBC (glóbulos vermelhos)	Patil et al., 2017

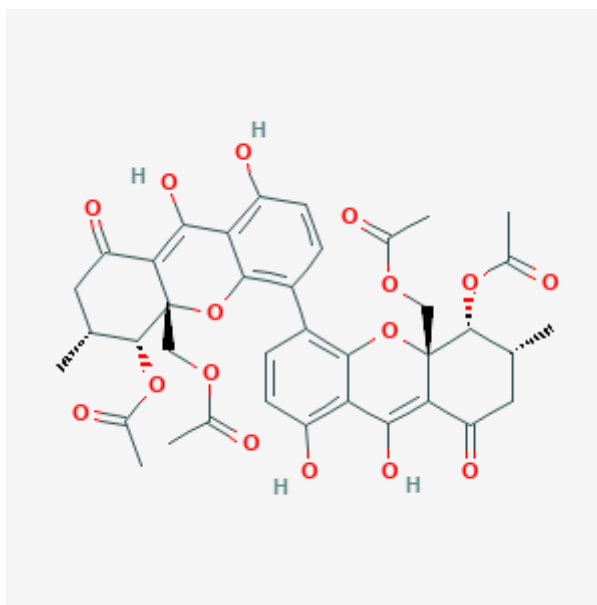
<i>Diaporthe toxica</i>	<i>Lupinus</i> sp.	carboxílico (46); 2,6-Ditert-butyl-4-fenol (47) Phomopsina F (48)	Hexapeptídeos	Citotóxica	HepG2 (célula de câncer de fígado humano) MptpB ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> proteína tirosina fosfatase B); RAW 264.7 (célula de macrófago murino)	Schlob et al., 2017
<i>Diaporthe</i> sp. SYSU-HQ3	<i>Excoecaria agallocha</i>	Diaporisoindoles A-E (49-53); Tenellonas C e D (54-55); Diaporindenones A-D (56-59); Isoprenylisobenzofuran A (60)	Alcalóides; Benzofenonas; Alcalóides	Anti-tuberculose; Produção de NO ativada por LPS		Cui et al., 2017; Cui et al., 2018
<i>Diaporthe</i> sp. SCSIO 41011	<i>Rhizophora stylosa</i>	Isochromophilones A-F (61-66); 5-Chloroisorotiorin (67); epi-Isochromophilone (68); Isochromophilone III (69); epi-Isochromophilone III (70); 6-((1E,3E)-3,5-Dimetilhepta-1,3-dieno-1-yl)-2,4-diidróxi-3-metilbenzaldeído (71); (2E,4E)-1-(2,6-Dihidroxy-3,5-dimetilfenil)hexa-2,4-dien-1-ona (72)	Derivados de azafilona	Citotóxica	células ACHN; OS-RC-2; 786-O (células de câncer de rim humano)	Luo et al., 2018
<i>Diaporthe</i> sp. ECN-137	<i>Phellodendron amurense</i>	Diaporthols A e B (73-74)	Policetideos	Anti-migration	TGF-β1-elicado MDA-MB-231 (célula de câncer de mama humano)	Nakashima et al., 2018
<i>Diaporthe</i> sp. ARL-09	<i>Anoectochilus roxburghii</i>	Citoskirina C (75); Epicytoskyrine (76)	Bisantraquinonas	Citotóxica	SMMC-7721 (célula de hepatoma humano)	Tian et al., 2018
<i>Diaporthe pseudomangiferaea</i>	<i>Tylophora ouata</i>	Acetoxidothiorelonas A e B (77-78); Dothiorelonas K-N (79-82); 16-Acetoxydothiorelone C	Thiorelone	Anti-fibrose; Citotóxica; Anti-diabética	MRC-5 (célula de fibroblastos de pulmão humano); BGC-823 (células de	Liu et al., 2018



		(83); Dothiorelones A-C (30-32); Dothiorelones G e I (84-85); Cytosporone D (35); Pestalotiopsone B (86); Mucorisocoumarina A (87); 5-Hydroxy-7-methoxy-4,6-dimethyl-2-phenylisoindoline-1,3-dione (88); Diaporphthalide A (89); Diaporlactona A (90)			carcinoma gástrico humano); PTP1B (proteína tirosina fosfatase 1B)	
<b><i>Diaporthe</i> sp.</b>	<i>Datura inoxia</i> Mill	Xylarolide (91); Xylarolides A e B (92-93); Diportharine A (94)	Nonenolides; Cumarinas	Antioxidante; Citotóxica	DPPH; MIAPaCa-2 (célula de câncer pancreático humano); PC-3 (células de câncer de próstata humana) SF-268 (célula de glioblastoma humano); MCF-7 (célula de câncer de mama humano); HepG2 (célula de câncer de fígado humano); A549 (célula de adenocarcinoma de pulmão humano)	Sharma et al., 2018
<b><i>Diaporthe lithocarpus</i> A740</b>	<i>Morinda officinalis</i>	Tenellone I (95); Lithocarins B-D (96-98); Tenellone H (99); Phomopene (100)	Benzofenonas; Eremofilanos; Monoterpentóides	Citotóxica		Liu et al., 2019
<b><i>Diaporthe</i> sp. GZU-1021</b>	<i>Chiromanteshaematochir</i>	Diaporthichalasin A-C (101-103); Phomopsichalasin G (104); 21-O-Deacetyl-L-696,474 (105); Citocalasina H (106); Biatriosporin N (107); Phomopsichin B (108); Penialidina A (109);	Citocalasinas; Dímeros de tetrahydroxantona	Produção de NO ativado por LPS; Citotóxica antiinflamatória	RAW 264.7 (célula de macrófago murino)	Liu et al., 2019

<b><i>Diapotha vochysiae</i> LGMF1583</b>	<i>Vochysia divergens</i>	Phomoxanthone A (110) Vochysiamides A e B (111-112); 2,5- Dihydroxybenzyl alcohol (113)			Carboxiamidas; Alcoóis	Antibacteriano; Citotóxica
<b><i>Phomopsis</i> sp. CFS42</b>	<i>Cephalotaxus fortunei</i> Hook	Phomotide A (114); 4- Acetyl-3,4-dihydro-6,8- dihydroxy- 3-methoxy-5- methylisocoumarin (115)	Policetídeos	-	-	Ma et al., 2020
<b><i>Diaporthe eucalyptorum</i> KY-9</b>	<i>Melia azedarach</i> Linn	Eucaliptacid A (116); Eucalactam B (117); Eugenitol (118); Cytosporone C (119); 4- Hidroxifenetil álcool (120); 1-(4-Hidroxifenil)etano- 1,2-diol (121); N-(2- Hidroxi-2- feniletil)acetamida (122); Phomopene (100)		Antifúngico	<i>Alternaria. solani</i> (fungo)	Gao et al., 2020

Dentre os diversos tipos de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Diaporthe*, a fomoxantona A é um dos compostos mais relatados na literatura. A fomoxantona A (*Phomoxanthone A*) (Figura 1), também chamada por PXA é uma micotoxina proveniente do fungo *Phomopsis* (estado anamorfo de *Diaporthe* sp.), do qual foi isolado pela primeira vez, possuindo estruturas semelhantes ao composto xantona (Böhler et al., 2018).



**Figura 1:** Estrutura química da fomoxantona A (PXA). Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

As fomoxantonas são dímeros de duas tetrahydroxantonas, consistindo em duas subunidades de xantonóides que têm quatro grupos hidroxila cada. As duas subunidades das fomoxantonas são covalentemente ligados uns aos outros. O próprio PXA é um homodímero, consistindo em duas subunidades idênticas. Ambas as subunidades são diacetilado tetrahydroxantonas, sendo que dois de seus grupos hidroxila foram substituídos por grupos acetil. A posição da ligação entre as duas subunidades do dímero é a única diferença estrutural entre PXA e seus isômeros menos tóxicos Fomoxantona B (PXB) e dicerandrol C: Em PXA, os dois monômeros xantonóides estão simetricamente ligados na posição C-4,4', enquanto em PXB, eles estão assimetricamente ligados em C-2,4', e em dicerandrol C, eles estão simetricamente ligados em C-2, 2'. Caso contrário, esses três compostos são estruturalmente idêntico (Rönsberg et al., 2013; Isaka et al., 2001).

As fomoxantonas estão, estruturalmente, intimamente relacionadas com o ácidos secalônicos, outra classe de micotoxinas diméricas tetrahidroxantona, com as quais compartilham várias propriedades. Notavelmente, tanto as fomoxantonas quanto os ácidos secalônicos são instáveis quando dissolvidos em solventes polares tal como DMSO, com a ligação covalente entre os dois monômeros mudando entre 2,2'-, 2,4'- e 4,4'-ligação (Qin et al., 2015). As duas fomoxantonas PXA e PXB podem, assim, lentamente isomerizar uns nos outros, bem como no dicerandrol C essencialmente não tóxico, resultando em uma perda de atividade de PXA ao longo do tempo quando dissolvido em um solvente polar (Böhler et al., 2018).

A fomoxantona A possui atividade antibiótica contra diversos organismos como bactérias, protozoários, fungos, plantas e células animais, incluindo células cancerosas humanas. Um estudo recente mostrou que o PXA afeta diretamente as mitocôndrias, interrompendo suas funções bioquímicas e sua arquitetura de membrana (Böhler et al., 2018).

A cromatografia é um método físico-químico de separação por conter uma fase móvel e uma estacionária, sendo que a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas das fases móvel e da estacionária. No outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatograma, sendo a área e a altura deste proporcionais a concentração do analito (Jin et al., 2008; Ciola, 1985).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que existe há pouco mais de uma década e meia, é uma técnica cromatográfica líquida avançada que oferece um tempo de análise significativamente curto e pequena quantidade de solvente (s) como fase móvel (Nováková et al., 2006). Esse método também fornece uma eficiência de separação e resolução muito melhor de misturas de analíticos. Este sistema utiliza uma coluna especial empacotada com partículas muito menores (tipicamente 1,5-1,7  $\mu\text{m}$ ), em vez de partículas de 3 ou 5  $\mu\text{m}$  usadas rotineiramente no empacotamento da coluna para análise fitoquímica. Como resultado, o tempo de execução em um sistema CLUE pode ser até três e nove vezes menor do que o dos sistemas CLAE usando colunas de 3 e 5 mm, respectivamente. O tamanho da coluna é geralmente de 50-100 mm. A separação em CLUE é obtida sob pressão extremamente alta (100 MPa ou 14,5 Kpsi). Como qualquer outro sistema CL moderno, CLUE pode ser hifenizado com vários tipos de técnicas de detecção, UV, PDA ou MS. Um sistema CLUE permite a detecção de

analitos em uma concentração muito baixa devido à sua relação sinal-ruído melhorada e requer um volume de injeção muito menor sem qualquer perda de sensibilidade. Apesar de uma série de vantagens de se usar a CLUE, como mais seletividade e sensibilidade com desempenho de alta resolução e poder de resolução mais rápido, tempo de ciclo de processo reduzido, qualidade de produto final aprimorada com custo de operação e tempo de execução reduzidos, menor consumo de solvente e melhor rendimento da amostra, melhorando a conveniência da análise em tempo real em sintonia com os processos de fabricação, a CLUE ainda apresenta algumas desvantagens. Uma grande desvantagem da CLUE são as contrapressões mais altas em comparação com a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) convencional, o que diminui a vida útil das colunas e as partículas com menos de 2 µm não podem ser regeneradas e, portanto, têm um uso restrito. (Nahar et al., 2019).

Assim, a investigação das propriedades fitotóxicas de *D. phaseolorum* podem representar uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas e compostos ativos com empregabilidade agrícola, farmacêutica podendo ser utilizadas como reguladores ou inibidores do crescimento de plantas daninhas.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos gerais**

- Comparar a atividade fitotóxica entre os extratos brutos e frações de *D. phaseolorum*;
- Verificar o modo de ação do extrato bruto e sua fração selecionada no crescimento de coleóptilos de trigo, no crescimento e germinação de espécies-alvo e no crescimento de células do metaxilema de raízes de gergelim.
- Verificar se os extratos brutos e a fração selecionada possuem atividade antioxidante e antimicrobiana.
- Identificar os principais compostos presentes nos extratos brutos e na fração selecionada de *D. phaseolorum*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar e comparar o modo de ação de ambos os extratos brutos sob o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum*) e sob o crescimento de células do metaxilema radicular de gergelim (*Sesamum indicum*).
- Selecionar o extrato com maior atividade fitotóxica e/ou aquele a apresentar maior massa, a fim de submetê-lo a um fracionamento.
- Avaliar se os compostos presentes nos extratos e frações possuem atividade sinérgica;
- Verificar se a ação dos extratos e frações se dá de maneira seletiva entre as espécies-alvo de mono e eudicotiledôneas;
- Selecionar o extrato bruto de interesse e sua(s) fração(ões) para caracterização química de seus compostos.
- Comparar os compostos identificados nos extratos e fração com aqueles já identificados no gênero *Diaporthe*;
- Identificar o composto majoritário presentes nas amostras analisadas;
- Relacionar a ação dos compostos identificados com a bioatividades já descritas na literatura.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Material biológico**

Os fungos *Diaporthe phaseolorum* foram isolados de folhas sadias de *Serjania lethalis* (A. St-Hil) coletadas no Cerrado da Universidade Federal de São Carlos-SP Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) durante o mês de agosto de 2014. (Figura 2).

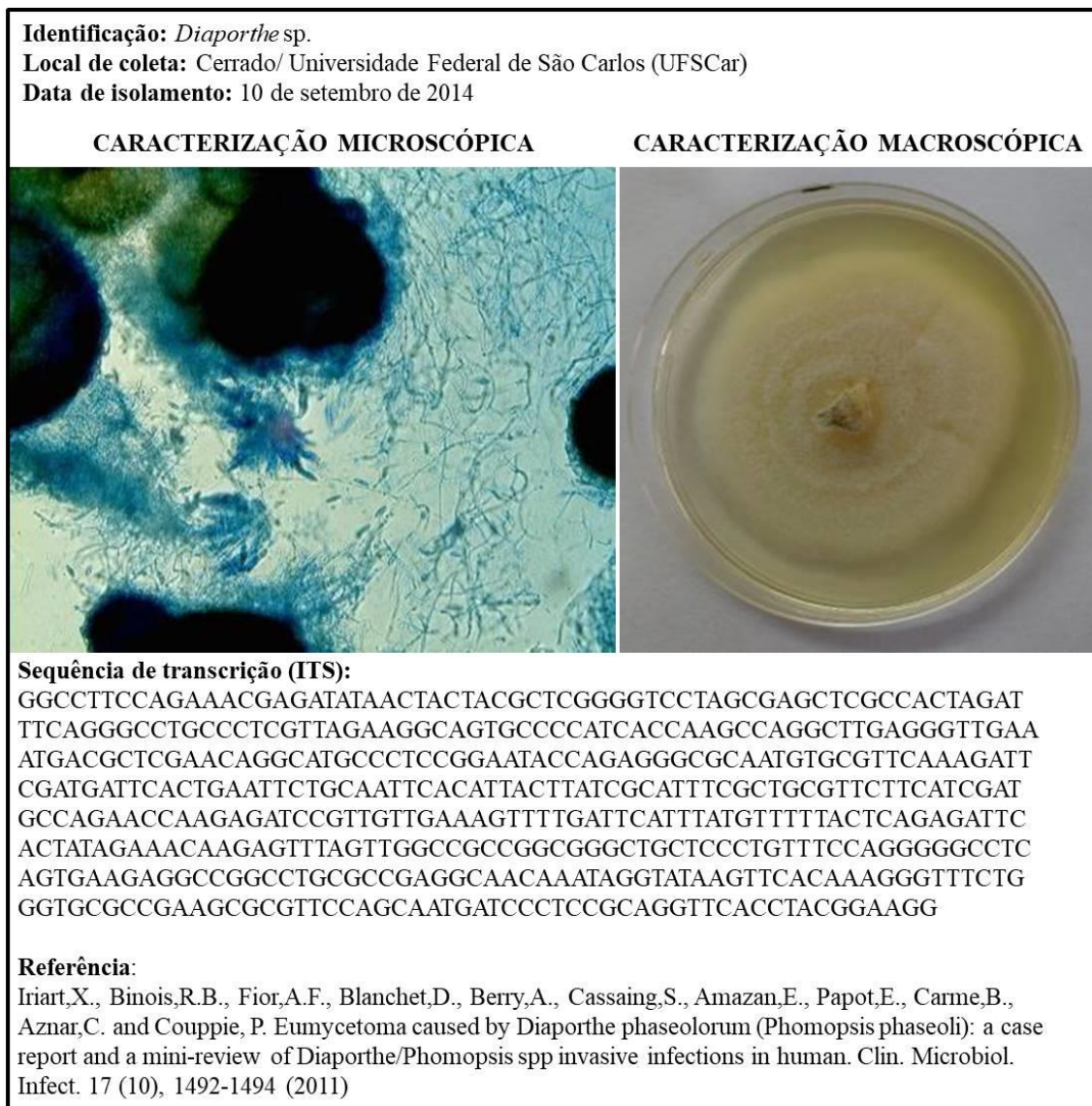


**Figura 2:** Vista aérea da UFSCar com a área de cerrado identificada de onde foram coletadas as folhas de *Serjania Lethalis*. (Fonte: Google Maps, 2021– modificado).

As folhas coletadas foram inicialmente lavadas com água corrente. Posteriormente, em câmara asséptica, imersas em uma solução de detergente e água por 10 minutos, seguida de imersão em água por 3 minutos, hipoclorito 1% por 10 minutos, etanol 70% por 3 minutos, água destilada por 3 minutos, sendo este processo repetido por 4 vezes. A água da última lavagem foi inoculada em placa de Petri com meio de cultura a fim de garantir a esterilização da microbiota epifítica da folha (Petrini et al, 1992; Abdalla et al., 2019).

O trabalho de isolamento e identificação dos fungos foi previamente feito e descrito por Abdalla, 2018; bem como as cepas utilizadas neste trabalho as quais foram cedidas pela mesma pesquisadora.

Para a identificação de *D. phaseolorum* foram utilizadas as seguintes técnicas: extração do DNA genômico, amplificação por PCR e sequenciamento da região espaçador interno transcrito (EIT), purificação do amplicon EIT, sequenciamento dos genes ITS e purificação de sequenciamento da reação (figura 3).



**Figura 3:** Identificação micro e macroscópica do fungo *Diaporthe* sp. e sua sequência transcrita. Fonte: Abdalla, 2018)

Para a realização do bioensaio de coleóptilos, foi utilizado diásporos de trigo (*Triticum aestivum* L., cultivar BRS Camboatá) e para a execução dos bioensaios de crescimento e germinação, foi utilizado diásporos de capim-colonião (*Megathyrus maximus* J.), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), gergelim (*Sesamum indicum* L.) e cebola (*Onion cepa* L.). O bioensaio de avaliação de células do metaxilema foi feito a partir de diásporos de gergelim.

### 3.2. Isolamento de *Diaporthe phaseolorum*



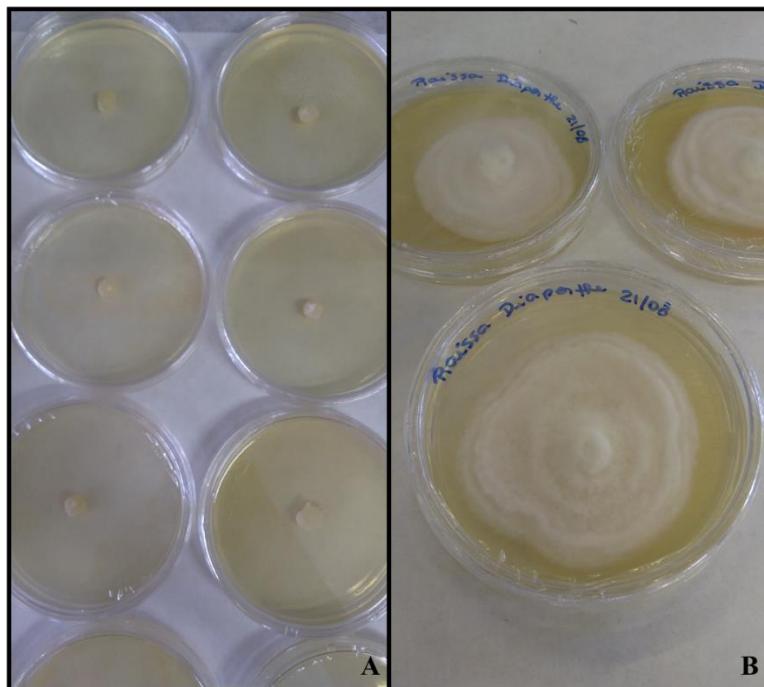
Os fungos *Diaporthe phaseolorum* foram isolados de folhas sadias de *Serjania lethalis*, coletadas no Cerrado da Universidade Federal de São Carlos-SP Brasil (21° 58' a 22° 00' S e 47° 51' a 47° 52' W) (Figura 1).

As folhas coletadas foram inicialmente lavadas com água corrente. Posteriormente, em câmara asséptica, imersas em uma solução de detergente e água por 10 minutos, seguida de imersão em água por 3 minutos, hipoclorito 1% por 10 minutos, etanol 70% por 3 minutos, água destilada por 3 minutos, sendo este processo repetido por 4 vezes. A água da última lavagem foi inoculada em placa de Petri com meio de cultura a fim de garantir a esterilização da microbiota epifítica da folha (Petrini et al, 1992).

O trabalho de isolamento e identificação dos fungos foi previamente feito e descrito por Abdalla, 2018; bem como as cepas utilizadas neste trabalho as quais foram cedidas pela mesma pesquisadora. Para a identificação de *D. phaseolorum* foram feitas as seguintes técnicas: extração do DNA genômico, amplificação por PCR e sequenciamento da região espaçador interno transcrito (EIT), purificação do amplicon EIT, sequenciamento dos genes ITS e purificação de sequenciamento da reação.

### **3.3. Preparo dos extratos brutos**

Primeiramente os fungos *Diaporthe phaseolorum* foram repicados em placas de Petri com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar), preparado de acordo com as instruções do fabricante (Figura 4).



**Figura 4:** Placas de Petri de 10cm de diâmetro com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) no dia da incubação de *Diaporthe phaseolorum* (A), e após incubação de sete dias em temperatura ambiente (B). (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

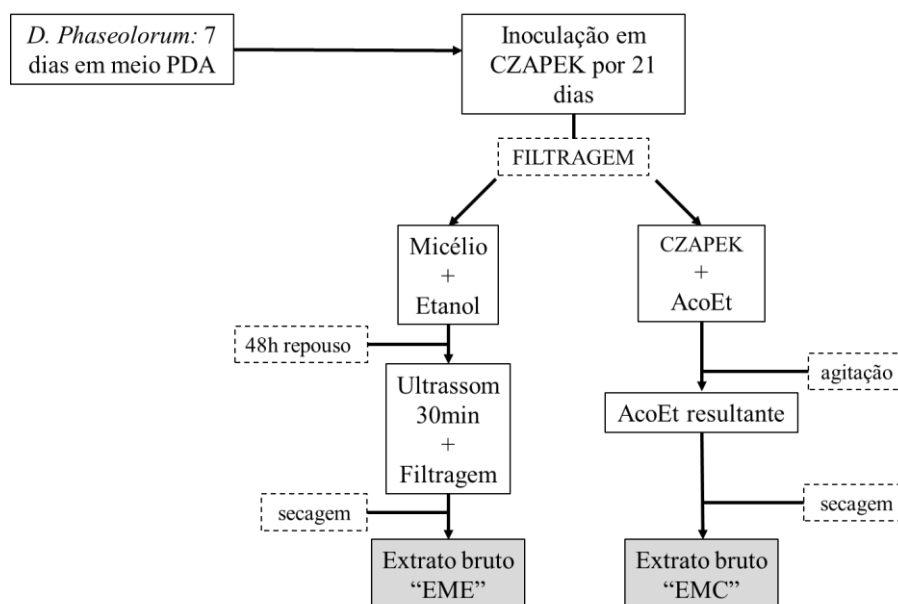
Os fungos foram incubados por um período de sete dias e então retirados das placas e transferidos para erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio de cultura estéril Czapek com 2% de extrato de levedura. Foi feito um tratamento controle contendo apenas meio de cultura para confirmar a esterilidade deste. Os erlenmeyers ficaram incubados sob bancada de laboratório em temperatura ambiente de aproximadamente 28°C, sendo agitados a cada 3 dias.

No 21º dia de inoculação, o meio de cultura contendo os fungos foi filtrado com o auxílio de uma bomba a vácuo, para a obtenção do micélio e do meio de cultura. Nos micélios foram adicionados 250 mL de etanol em cada, sendo deixado em repouso por 48 h e, após este período, colocados em ultrassom por 30 minutos para em seguida serem novamente filtrados. O filtrado obtido foi seco em capela, sendo assim obtido o extrato micelial (EME).

O extrato de meio de cultura (EMC) foi obtido por meio de partição líquido-líquido, onde utilizou-se o meio de cultura Czapek e acetato de etila. Em um funil de separação, foi adicionado acetato de etila na mesma proporção do volume do meio de cultura.

A seguir, o conteúdo foi agitado e deixado em repouso até que houvesse a separação do solvente e do meio de cultura Czapek, sendo coletado apenas a fase acetato de etila. Este foi colocado em béquer e deixado em capela para a evaporação do solvente, restando o extrato concentrado resultante do meio de cultura (EMC).

Toda metodologia acima descrita pode ser melhor visualizada no fluxograma esquematizado a seguir (Figura 5).



**Figura 5.** Fluxograma das etapas de cultivo de *D. Phaseolorum* até o processo final de obtenção dos extratos brutos.

### 3.4 Técnicas cromatográficas

#### 3.4.1 Cromatografia em Coluna

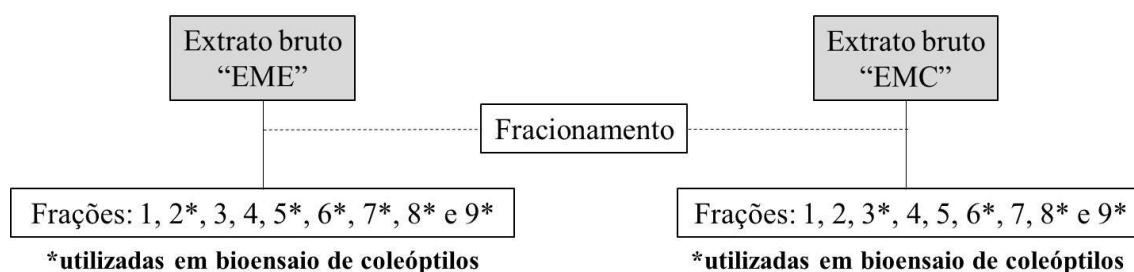
Foram realizadas separações cromatográficas em coluna de vidro utilizando como fase estacionária, sílica gel para separações no modo normal (70 – 230 mesh). Os extratos brutos foram adsorvidos à forma estacionária, em uma camada, denominada cabeça. Para o fracionamento do extrato do meio de cultura (EMC), foram utilizadas como fase móvel, eluições com solventes nas seguintes proporções: 100% hexano, hexano e acetona (7:3), hexano e acetona (1:1), hexano e acetona (3:7), 100% acetona, acetona e metanol (7:3), acetona e metanol (1:1), acetona e metanol (3:7) e 100% metanol, sendo este último para a limpeza dos possíveis resquícios de extrato que ficaram na sílica da coluna. Para o fracionamento do extrato micelial (EME), as eluições

foram: 100% hexano, hexano e acetona (7:3), hexano e acetona (1:1), hexano e acetona (3:7), 100% acetona, acetona e metanol (7:3), acetona e metanol (1:1), 100% metanol e 100% etanol. O fracionamento dos extratos EME e EMC deu origem a nove frações de cada um destes (Figura 6). O diâmetro da coluna de vidro utilizado foi proporcional à quantidade da amostra a ser fracionada.



**Figura 6:** Frações colhidas após fracionamento do extrato bruto em coluna de sílica em fase normal. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

Após os fracionamentos, as frações recolhidas foram secas em capela, analisadas por cromatografia de camada delgada, e tiveram seus rendimentos calculados. Apenas a fração EME9 (proveniente do extrato bruto micelial) foi selecionada para análise química devido a seu maior rendimento e maior atividade fitotóxica observada em bioensaios prévios. A figura 7 esquematiza o processo de fracionamento dos extratos brutos, dos quais originaram 9 frações cada.

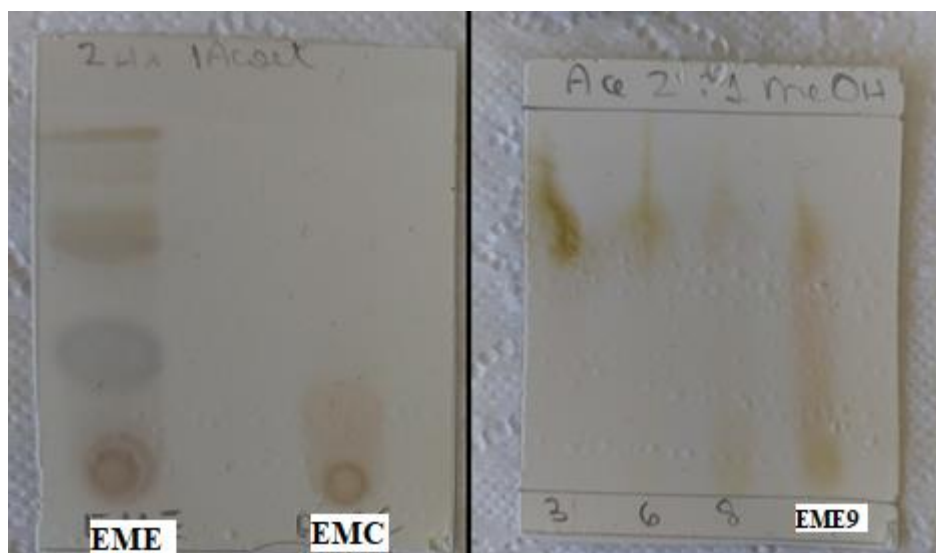


**Figura 7:** processo de fracionamento dos extratos brutos EMC e EME e suas frações originadas.

Ao final dos fracionamentos, foi realizada a técnica de cromatografia em camada delgada a fim de avaliar os compostos presentes para uma possível união de frações com perfis similares. A técnica é descrita no item a seguir.

### 3.4.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Esta técnica foi realizada mediante a diferença entre as forças de adesão das moléculas dos componentes, a uma fase móvel (solvente) e, a uma fase estacionária (placa de sílica de fase normal ou reversa). O desenvolvimento cromatográfico se procedeu de forma ascendente e unidimensional, em placas de sílica de fase normal (4,0 x 5,0cm) e com as eluições de solventes orgânicos hexano 2: 1 acetona e hexano 2: 1 acetato de etila. Cada cromatoplaça (placa de sílica com as substâncias separadas) foi observada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e revelada com Oleum (solução de 10 mL de ácido sulfúrico e 200 mL de ácido acético dissolvidos em 40 mL de água destilada) e posteriormente aquecidos a 150 °C (Ghisalberti, 2008). Após secas, as cromatoplaças foram fotografadas para fixação dos pontos e suas respectivas cores que aparecem após a revelação. Esta técnica foi empregada sempre ao final de cada extração e para avaliar o perfil de compostos presentes. (Figura 8).



**Figura 8:** Cromatoplaças dos extratos brutos (EME e EMC) e fração EME9 provenientes do extrato EME após reveladas.

### **3.4.3. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química.**

As análises dos extratos brutos EME, EMC e da fração selecionada EME9 foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters ACQUITY UPLC H-Class, acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (Xevo G2-XS Q TOF, Waters, EUA) com ionização por *electrospray* (ESI). Foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> ACQUITY UPLC®HSS T3 (dimensões: 1.8µm; 2.1 mm x 100 mm) e fase móvel composta por água + 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% ácido fórmico (B).

Um gradiente linear iniciando com 10% a 90% de B em 14 minutos, em seguida 100% de B em 3 minutos, com fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, com temperatura ajustada para 40 °C e volume de injeção de 1 µL. A aquisição de espectros de massas foi realizada em modo MS<sup>E</sup>, modo positivo, na faixa de 100 a 1500 m/z e para análise dos dados utilizou-se os softwares MassLynx e UNIFI a fim de comparar os dados processados com aqueles já identificados na literatura.

## **3.5. Bioensaios**

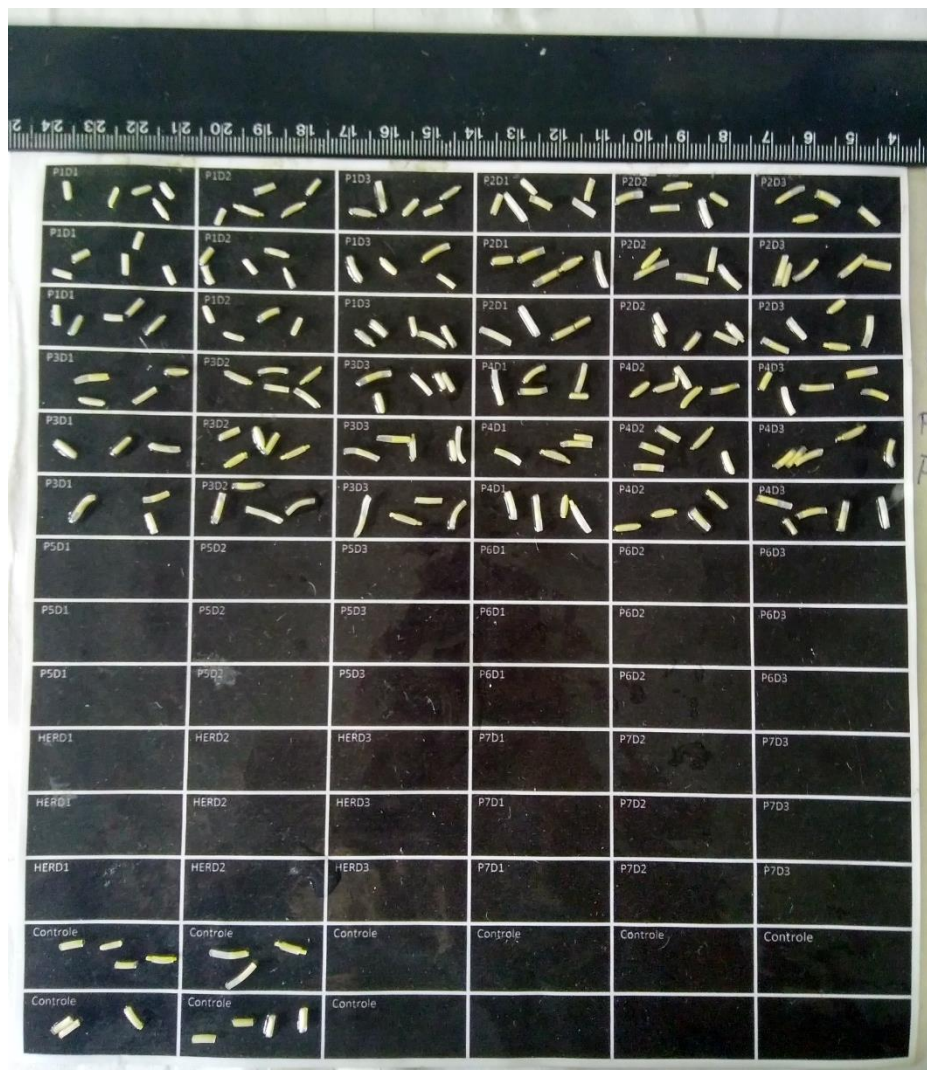
### **3.5.1. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.).**

Cariopses de trigo (*Triticum aestivum* L., cultivar BRS Camboatá) foram distribuídas em caixas tipo gerbox forradas com duas folhas de papel de filtro, umedecidas com 10 mL água, sendo tampadas e cobertas por papel alumínio. As caixas foram mantidas em câmara climatizada (estufa B.O.D) a 25°C no escuro, durante 72 h. Em seguida, as caixas foram conduzidas até uma sala com luz verde para que os coleóptilos das plântulas de trigo fossem selecionados e cortados utilizando-se uma guilhotina de Van der Weij. Os ápices dos coleóptilos foram cortados (2 mm) e descartados, enquanto do restante foi cortado um segmento de 4 mm e utilizado para o bioensaio (Macías et al., 2010) (Figura 9).



**Figura 9:** Coleóptilos de trigo já separados das sementes, após crescimento no escuro por 72h (A) e guilhotina de Van der Weij utilizada para os cortes, em ambiente com luz verde de segurança. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

As soluções foram preparadas a partir de 10 mg de cada extrato bruto pré-solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, 5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) e diluídos em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) e 2% de sacarose, nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em tubos de ensaio foram adicionados 2 mL das respectivas soluções, contendo cinco coleóptilos de trigo (Macías et al., 2010). Dois controles foram realizados, um negativo com meio de cultura CZAPEK estéril e outro positivo com o herbicida Goal® (240  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) solubilizado em solução tampão e DMSO (5  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), nas mesmas concentrações avaliadas para as frações. Esses tubos foram mantidos a 25 °C no escuro e sob constante rotação (1,2 Hz), sendo utilizadas três repetições por tratamento (Macías et al., 2010). Após 24 h, os coleóptilos foram medidos com auxílio do programa ImageJ (Figura 10).



**Figura 10:** Coleótipos de trigo após a realização do bioensaio, organizados em planilha a serem fotografados para posterior medição. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

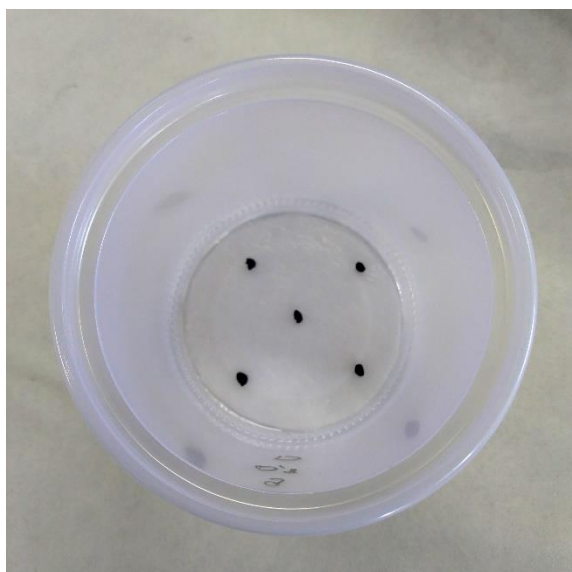
### 3.5.2. Bioensaio de germinação e crescimento de plântulas

Foram utilizadas como espécies alvo de hortaliças, cebola (*Allium cepa* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.), que, por serem geneticamente melhoradas apresentam respostas mais homogêneas aos extratos e, dessa forma, indicam se os bioensaios estão sendo conduzidos de forma correta. Além destas também foram selecionadas duas espécies daninhas, sendo uma de culturas de soja e cana-de-açúcar conhecida como capim colômbio (*Megathyrus maximus* Jacq.) e o amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L), que apresentam resistências a herbicidas (Adegas et al., 2020) e permitem avaliar o potencial fitotóxico dos extratos e frações da espécie doadora.



Neste bioensaio foram avaliados apenas o extrato bruto EME e sua fração 9 (posteriormente nomeada como EME9), devido à massa disponível destes e ao resultado apresentado no bioensaio de coleóptilos de trigo.

O extrato bruto e a fração EME9 foram diluídos em solução tampão (pH = 5,6) contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g/L) nas concentrações de 0,2; 0,4 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>. Para este bioensaio também foram utilizados dois controles, sendo o negativo feito com solução tampão e DMSO (5 µL/mL), e o positivo com o herbicida Goal® (240 µL/mL<sup>-1</sup>) solubilizado em solução tampão e DMSO (5 µL/mL). Estes bioensaios foram conduzidos em potes plásticos transparentes, de 250 mL de volume, contendo duas folhas de papel filtro ao fundo, umedecidas com 1,5mL das soluções controle negativo e positivo ou com as soluções dos extratos e da fração. Cada caixa recebeu 5 sementes das espécies alvo e foram feitas quatro repetições para cada tratamento. As caixas foram tampadas colocadas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. a 25 °C sob fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro (Anese et al., 2014 modificado) (Figura 11).



**Figura 11:** Recipiente plástico transparente utilizado na execução do bioensaio de crescimento e germinação de plântulas, contendo as sementes dispostas sobre papel filtro. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As leituras foram realizadas a cada 12h durante os três primeiros dias e, em intervalos de leituras a cada 24h até a germinação ser nula por duas leituras consecutivas. Foi adotado a protrusão de

no mínimo 2mm de raiz primária e gravitropismo positivo como critério de germinação (Brasil, 2009).

Foram avaliados a porcentagem, a velocidade de germinação e sincronia (Ranal & Santana, 2006).

O bioensaio de crescimento foi conduzido da mesma forma que o bioensaio de germinação, porém após completados sete dias em câmara B.O.D., as plântulas permaneceram em congelador por 24h e, em seguida foram dispostas em uma folha de papel milimetrado, e fotografadas com o auxílio do programa ImageJ. Além disso, as plântulas foram classificadas em normais e anormais de acordo com as especificações das Regras de Análises de Sementes (Brasil, 2009).

### **3.5.3. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**

Os extratos brutos (EMC e EME) e a fração EME 9 foram submetidos ao bioensaio que avalia o crescimento de células do metaxilema de gergelim que cresceram em contato com estes. Raízes obtidas de plântulas crescidas nos extratos citados acima, no controle negativo e positivo e mantidas nas mesmas condições do bioensaio de crescimento e germinação (Item 2.5) compuseram o material anatômico utilizado. Decorridos sete dias as plântulas de gergelim foram retiradas das caixas e com o auxílio de um estilete foi separado um segmento da raiz primária e colocado em álcool 70%. A coloração do material vegetal foi feita a partir do método Fuchs modificado (Kraus & Arduin 1997). As raízes foram imersas em álcool (70%) durante sete dias, lavadas com água destilada e mantidas em solução de hidróxido de sódio 25%, em estufa a 40°C por 48 h. Em seguida, o material vegetal foi corado com o corante Lacmóide a 25%, durante 24 h em temperatura ambiente, e lavados. O material vegetal foi então depositado em lâminas de vidro com xarope de Apathy e lamínula, sendo deixadas de repouso por sete dias para a secagem (Figura 12).



**Figura 12:** Lâminas contendo raízes de gergelim previamente tratadas com os extratos brutos EMC e EME nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8  $\text{mg.mL}^{-1}$ , prontas para serem fotografadas em microscópio. (Raíssa Accarini, arquivo pessoal).

A observação foi feita em microscópio óptico (Olympus-BX41) acoplado com câmara fotográfica (Sony CCD-IRIS). Foram utilizadas quatro raízes primárias provenientes de plântulas de gergelim crescidas em soluções controles negativo e positivo, e com os extratos mencionados para este bioensaio. De cada raiz foi fotografado 50% de seu comprimento total, partindo da região central em direção ao colo e o aumento utilizado foi de 20 vezes (Grisi et. al, 2016). As medidas foram feitas utilizando-se o programa ImageJ.

#### **3.5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Diaporthe phaseolorum***

Este bioensaio foi realizado em parceria com a UNESP de Araraquara, no Departamento de Análises Clínicas (Laboratório de Microbiologia Clínica), que gentilmente nos cedeu todo material utilizado, assim como as cepas dos

microrganismos. Assim, foi realizado um bioensaio piloto para avaliar se os extratos brutos (EME e EMC) e a fração EME9 apresentavam atividade antimicrobiana.

O ensaio foi realizado de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (CLSI, 2012). As cepas de referência utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os inóculos foram preparados em caldo Mueller Hinton (Kasvi - Curitiba, PR, Brasil) e foram ajustados em espectrofotômetro (aproximadamente  $1 \times 10^8$  cél/mL). A solução estoque dos extratos foi preparada em um microtubo estéril na concentração de 1 mg/mL em caldo Mueller Hinton e 2% de Dimethyl Sulfoxide (DMSO).

As concentrações de extrato avaliadas foram 0,95; 1,9; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Além das diferentes concentrações dos extratos, foram avaliados os seguintes grupos: Controle de crescimento: inóculo bacteriano sem tratamento; Controle de veículo: inóculo bacteriano e meio de cultura contendo 1 % de DMSO; Controle negativo: apenas caldo Mueller Hinton. Após o preparado das microplacas, as amostras foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, em cada poço foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da solução de resazurina (0,0001 g/mL - Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) em todos os poços. A seguir, as placas foram incubadas por 4 horas e após esse período, foi feita a revelação do resultado visualmente.

### 3.5.5. Atividade antioxidante

A Atividade antioxidantes dos extratos brutos e da fração EME9 foi avaliada utilizando-se DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) em solução metanólica na concentração  $30,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os extratos e a fração utilizadas nos testes foram solubilizados em seis concentrações (4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ). Assim, triplicatas com 1,95mL de DPPH e 0,05 mL de extrato permaneceram em temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) por 90 minutos, para posterior leitura em espectrofotômetro (HACH DR5000) a 517nm. O controle negativo foi feito com 1,95 mL de solução de DPPH e 0,05 mL de metanol e os controles positivos foram realizados com Quercetina HPLC (Sigma-Aldrich) e Ácido Gálico Anidro (Vetec) nas mesmas concentrações dos extratos. O índice de atividade antioxidante (AAI) foi

calculado pela fórmula:  $IAA = \text{concentração final do radical DPPH } (\mu\text{g.mL}^{-1}) / IC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$ . O  $IC_{50}$  foi calculado por regressão linear entre capacidade de sequestrar radical (I%) e a concentração do extrato. A capacidade de sequestrar radical (I%) foi definida usando a fórmula:  $I\% = (\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle negativo} \times 100$ . Scherer e Godoy (2009) definem escalas de atividade antioxidante em que  $AAI < 0,5$  (fraca),  $0,5 < AAI < 1,0$  (moderada) e  $1,0 < AAI < 2,0$  (forte) e  $AAI > 2,0$  (muito forte).

### 3.6. Análises estatísticas

Os comprimentos dos fragmentos de coleóptilo de trigo foram calculados como porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, sendo que os valores positivos representam estímulo e os valores negativos representam inibição (Novaes, et al., 2013). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Levene).

Dados normais e homogêneos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 0,05 de significância. Para dados não normais ou não homogêneos foi utilizado o teste de Welch seguido do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. (progr fez Dunn e Mann-Whitney).

Todas as análises foram realizadas no programa estatístico PAST v.3.18 (Hammer. O, Harper D. A. T., Ryan, P. D. 2001).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Rendimentos dos extratos e frações de *Diaporthe phaseolorum*

Finalizados os processos de extração dos extratos brutos EME e EMC, estes foram secos em capela e pesados em balança analítica, conforme procedimento citado no item 3.2. deste capítulo.

Os valores (descritos em miligramas) referentes aos rendimentos dos extratos brutos e suas respectivas frações estão organizados de acordo com a tabela 3.



	EME	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>BCCT</b>	X		X			X		X	X	X
<b>BCCMG</b>	X									X
<b>BGCP</b>	X									X

Diferentemente desta metodologia quando aplicada para cálculo de rendimento de extratos de botânico, onde o material seco do vegetal é previamente pesado para o cálculo da porcentagem de rendimento do extrato bruto, a pesagem do micélio e do meio de cultura não são possíveis, assim, não há um valor do percentual de rendimento, e sim do valor total (em miligramas) dos extratos brutos obtidos.

Extrações podem ter diferentes rendimentos que variam, por exemplo, devido a polaridade do solvente, tempo e temperatura de extração e proporção solvente/material biológico (Lukitaningsih et al., 2020; Vuong et al., 2015).

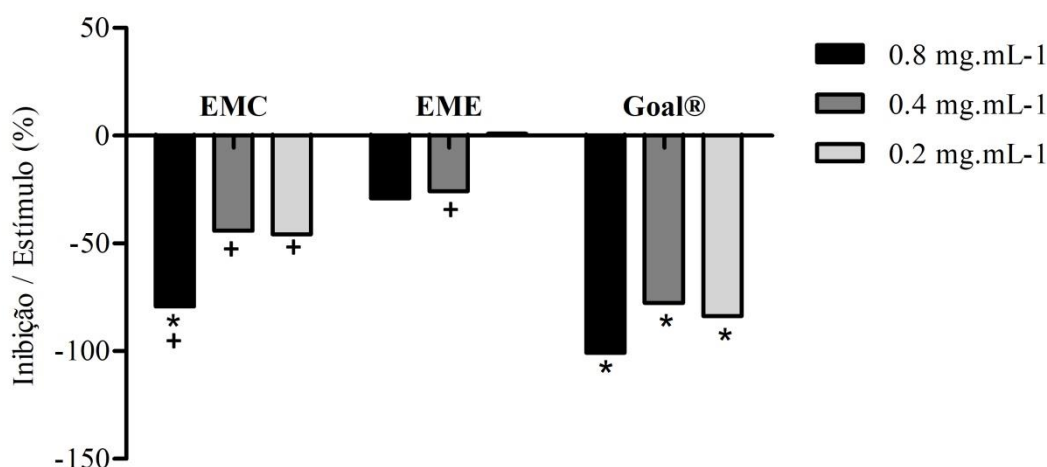
Compostos com polaridade mais elevada, tais como açúcares simples e polissacarídeos solúveis são bastante abundantes nas plantas (Vattuone et al., 2009), conseqüentemente, podendo ser mais abundantes também em organismos endofíticos hospedeiros destas, motivo este que pode ter explicado uma maior massa obtida do micélio de *D. phaseolorum*, extraído com etanol e que resultou no extrato EME.

A produção de extratos fúngicos é de elevado custo, visto que no processo de extração são necessárias grandes quantidades de etanol, metanol, acetato de etila e outros solventes eventualmente utilizados no processo de extração. Desta forma, a produção destes extratos acaba sendo financeiramente limitada, além de fatores como a demora no cultivo dos microrganismos e baixo rendimento dos extratos, que acabam dificultando a produção.

#### **4.2. Bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*)**

Este ensaio continua sendo amplamente utilizado (Anese et al., 2021; Cala et al., 2021; Vela et al., 2021; Rial et al., 2020) para avaliar a atividade de extratos vegetais e fúngicos, podendo direcionar para a identificação das substâncias bioativas presentes nos mesmos (Biasetto et al., 2019; Abdalla et al., 2018; Pereira et al., 2014).

Inicialmente, os extratos brutos EMC e EME foram submetidos ao teste que avalia o crescimento de coleóptilos de trigo (Figura 13). Os resultados encontram-se no gráfico 1.



**Figura 13:** Valores médios de percentual de inibição de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação dos extratos brutos de *Diaporthe phaseolorum* em diferentes concentrações. \* indicam tratamentos que diferiram estatisticamente do controle negativo, e + indicam tratamentos estatisticamente iguais ao herbicida comercial GOAL® na mesma concentração.

De maneira geral, todas concentrações do extrato do meio de cultura produziram inibição dos coleóptilos, diferindo estatisticamente do herbicida GOAL® na mesma concentração, porém apenas os coleóptilos tratados com o extrato do meio de cultura (EMC) em sua maior concentração diferiram estatisticamente do controle negativo, apresentando um percentual de inibição de 79,3%. Os coleóptilos tratados com o extrato micelial de *D. phaseolorum* não diferiram estatisticamente do controle negativo e apenas aqueles tratados com o extrato na concentração de 0.4mg/mL<sup>-1</sup> diferiram estatisticamente do herbicida em sua mesma concentração. Coleóptilos tratados com a menor concentração do extrato micelial exibiram leve estímulo de crescimento (0,87%) comparado com aqueles tratados com controle negativo. Os coleóptilos tratados com o herbicida GOAL® diferiram estatisticamente do controle negativo, para todas concentrações testadas. Nenhum extrato produziu efeito inibitório maior que o GOAL

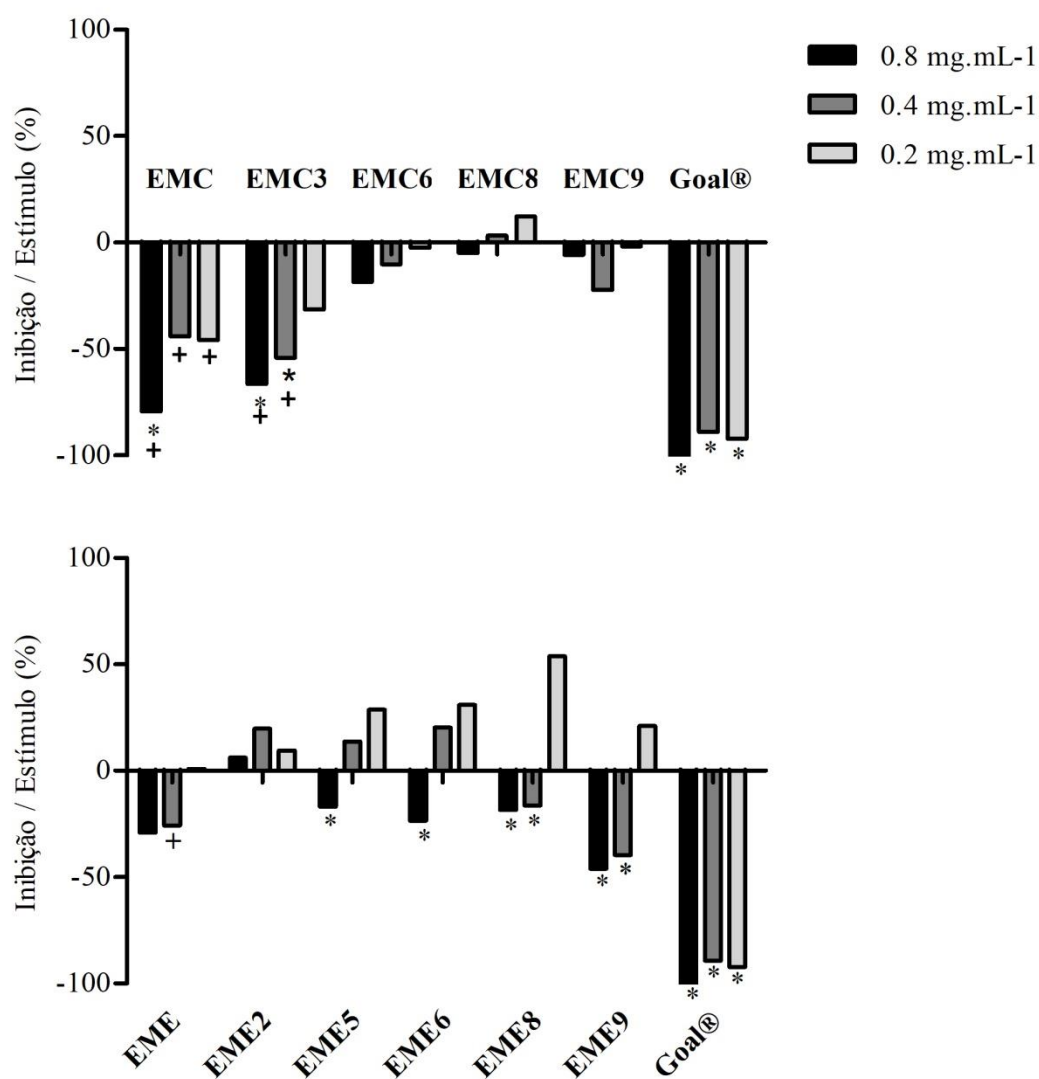
Dados similares aos obtidos no bioensaio de coleóptilos foram encontrados por Abdalla (2018), onde extratos brutos etanólicos e acetato-etílicos de fungos endofíticos do gênero *Alternaria* e *Diaporthe* também foram capazes de inibir o crescimento de coleóptilos de forma dose-dependente, indicando a presença de compostos fitotóxicos nestes, responsáveis pela inibição do crescimento dos coleóptilos.



Após ambos extratos brutos serem avaliados pelo bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*), das 9 frações provenientes do extrato do meio de cultura (EMC), 4 delas obtiveram massa suficiente para serem avaliadas e das 9 frações provenientes do extrato micelial (EME), 5 foram avaliadas, conforme figura x citada na metodologia deste capítulo.

Todas as frações, com exceção da EME9 apresentaram diminuição da atividade inibitória após o fracionamento quando comparadas com a atividade inibitória de seus extratos brutos. Em alguns casos esta perda de atividade pode ocorrer porque a interação entre os compostos presentes pode ser a responsável para observar o efeito biológico (Qiu et al., 2013).

Os percentuais de inibição de cada fração proveniente dos extratos EMC e EME, estão representados em gráficos (Figura 14).



**Figura 14.** Valores médios de percentual de inibição/estímulo de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum*) submetidos à ação das frações provenientes do extrato de meio de cultura (EMC) e do extrato micelial (EME) de *Diaporthe phaseolorum* em diferentes concentrações. \* indicam tratamentos que diferiram estatisticamente do controle negativo, e + indicam tratamentos estatisticamente iguais ao herbicida comercial GOAL® na mesma concentração.

A fração EMC3 foi a que produziu maiores percentuais de inibição dentre todas testadas, apresentando um padrão dose-dependente onde seu maior percentual de inibição foi de 66,3% para coleóptilos tratados com esta fração em sua maior concentração. Os coleóptilos tratados com esta fração nas concentrações de 0.8 e 0.4mg/mL<sup>-1</sup>, além, de diferirem estatisticamente do controle negativo, apresentaram uma inibição igual à aquela causada pelo herbicida GOAL em coleóptilos tratados por este na mesma concentração. Todas outras frações testadas não diferiram estatisticamente do controle negativo.

Grande parte das frações provenientes do extrato micelial (EME) testadas apresentaram estímulo no crescimento dos coleóptilos, porém, todas frações com inibição diferiram estatisticamente do controle negativo. A fração EME9 foi aquela a apresentar maiores valores de percentual de inibição, sendo estes de 45,9 e 39,6% para coleóptilos tratados com esta fração nas concentrações de 0.8 e 0.4mg/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Por este motivo, além de apresentar massa suficiente para a realização dos bioensaios subsequentes, foi a fração escolhida, juntamente com seu extrato bruto EME. Os coleóptilos tratados com o herbicida GOAL® diferiram estatisticamente do controle negativo em todas concentrações testadas.

Desta forma, fica evidente a perda da atividade fitotóxica nas frações após os extratos brutos EMC e EME passarem pelo processo de fracionamento cromatográfico, indicando que os constituintes presentes nestes, apresentam atividade sinérgica.

Um estudo similar foi realizado por Biasetto, 2019 onde metabólitos do fungo endofítico *Xylaria cubensis*, associados a *Eugenia brasiliensis*, também foi capaz de inibir o crescimento de coleóptilos de trigo, indicando potencial atividade fitotóxica destes.

Ao trabalhar com misturas complexas de produtos naturais, os constituintes responsáveis pela atividade geralmente não são conhecidos. Além disso, a composição dos extratos de produtos naturais varia dependendo de como e onde o material de

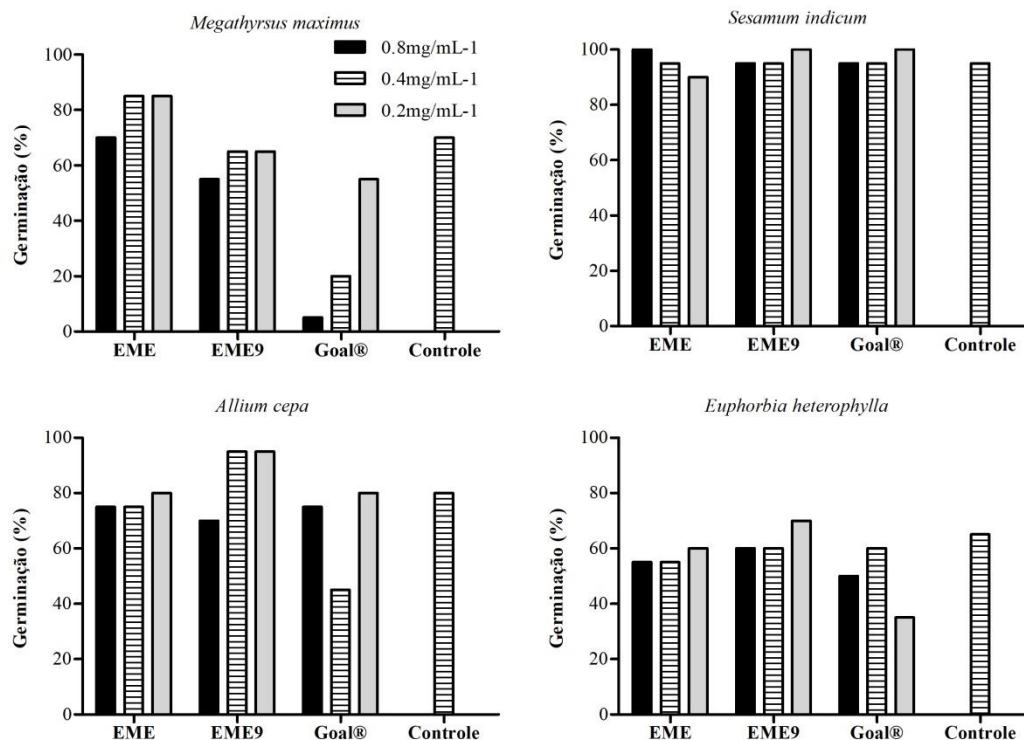
origem é cultivado, preparado, processado e armazenado (Caesar et al., 2019; Khan, 2006).

É conhecido que os fungos endofíticos podem produzir os mesmos metabólitos secundários que suas plantas hospedeiras (Fu et al., 2017) e a atividade fitotóxica de *Serjania lethalis* já foi evidenciada (Grisi et al., 2016; Pereira et al., 2015). Extratos naturais contém compostos de diversas classes como fenóis, carotenoides e antocianinas e tocoferóis (Altemimi et al., 2017) e identificar os compostos responsáveis por um determinado efeito biológico representa um desafio significativo, pois muitas vezes, presume-se que o comportamento de uma mistura pode ser descrito pela presença de apenas alguns constituintes conhecidos. No entanto, uma série de estudos têm mostrado que a atividade geral dos extratos pode resultar de misturas de compostos com atividade sinérgica, aditiva ou antagônica, e aqueles que trabalham no campo da pesquisa de produtos naturais percebem que é muito comum que os esforços de isolamento em um extrato falhem porque a atividade é perdida no fracionamento. Embora existam várias explicações possíveis para esta falha (incluindo adsorção irreversível de compostos para o empacotamento da coluna), certamente é verdade que em alguns casos ocorre perda de atividade porque múltiplos constituintes são necessários para observar o efeito biológico. (Caesar et al., 2019).

#### **4.3. Bioensaio de crescimento e germinação de plântulas**

Este bioensaio foi realizado apenas com o extrato micelial (EME) e sua fração EME9 uma vez que estes apresentavam um maior rendimento e atividade inibitória de coleóptilos, possibilitando assim, a execução deste bioensaio.

De maneira geral, o gergelim apresentou maiores valores de porcentagem de germinação, quando exposto ao extrato e fração, quanto para os controles negativo e positivo. Em contrapartida, os menores percentuais (55%) foram observados nas sementes das espécies de amendoim-bravo e capim-colonião tratadas tanto com o extrato micelial e a fração, respectivamente (Figura 15).



**Figura 15:** Percentual de germinação de espécies alvo tratadas com extrato micelial de *Diaporthe phaseolorum* (EME) e sua fração (Fr9), em diferentes concentrações.

Assim, é possível observar que o extrato micelial (EME) de *D. phaseolorum* e sua fração (EME9) alteraram de forma mais significativa os parâmetros do processo de germinação das espécies daninhas, demonstrando que estas são mais suscetíveis à ação do extrato e sua fração, possivelmente por estes apresentarem metabólitos secundários mais ativos no controle pré-germinativo destas espécies do que nas espécies indicadoras.

Algumas variáveis podem ser utilizadas para a avaliação da fitotoxicidade, como a velocidade e tempo médio de germinação, coeficiente de variação do tempo e sincronia do processo de germinação (Siddiqui et al., 2021; Grisi et al., 2013b; Ranal e Santana, 2006).

Neste mesmo bioensaio, foi possível verificar que o aumento da velocidade de germinação nem sempre influencia no aumento da sincronia, sendo assim, não há uma sincronia no processo de germinação das espécies-alvo (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de Velocidade de Germinação ( $h^{-1}$ ) e sincronia de plântulas submetidas à ação do extrato bruto micelial de *D. phaseolorum* (EME) e de sua fração (EME9) em diferentes concentrações.

	VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO			SINCRONIA		
	0.8mg.mL <sup>-1</sup>	0.4mg.mL <sup>-1</sup>	0.2mg.mL <sup>-1</sup>	0.8mg.mL <sup>-1</sup>	0.4mg.mL <sup>-1</sup>	0.2mg.mL <sup>-1</sup>
<b>Capim-colonião</b>						
<b>EME</b>	0,0467	0,0747	0,0784	0,2916	0,325	0,2416
<b>EME9</b>	0,0298	0,0520	0,0414	0,2083	0,25	0,5666
<b>Goal®</b>	0,0018	0,0146	0,0406	0	0	0
<b>Amendoim-bravo</b>						
<b>EME</b>	0,0499	0,0622	0,0777	0,25	0,2083	0,325
<b>EME9</b>	0,0684	0,0571	0,0760	0,2916	0,1666*	0,25
<b>Goal®</b>	0,0479	0,0805	0,0352	0,3333	0,4166	0
<b>Cebola</b>						
<b>EME</b>	0,0394	0,0474	0,0605	0,4333	0,2083	0,4416
<b>EME9</b>	0,0422	0,0689	0,0627	0	0,3083	0,4750
<b>Goal®</b>	0,0669	0,0444	0,0624	0,4166	0,2	0,725
<b>Gergelim</b>						
<b>EME</b>	0,1128	0,1041	0,1118	0,6	0,7333	0,6
<b>EME9</b>	0,1069	0,1145	0,1232	0,4	0,525	0,4
<b>Goal®</b>	0,0958	0,0937	0,1149	0,675	0,5833	0,325

Valores seguidos de \* diferem do controle negativo pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

O gergelim apresentou os maiores valores tanto velocidade de germinação como de sincronia; os menores valores de velocidade de germinação foram observados em plântulas de monocotiledôneas (capim-colonião e cebola), e os menores valores de sincronia em plântulas daninhas (capim-colonião e amendoim-bravo). O único tratamento a diferir estatisticamente do controle negativo, foi o de plântulas de amendoim-bravo tratadas com a fração EME9 a uma concentração de 0.4mg/mL<sup>-1</sup>.

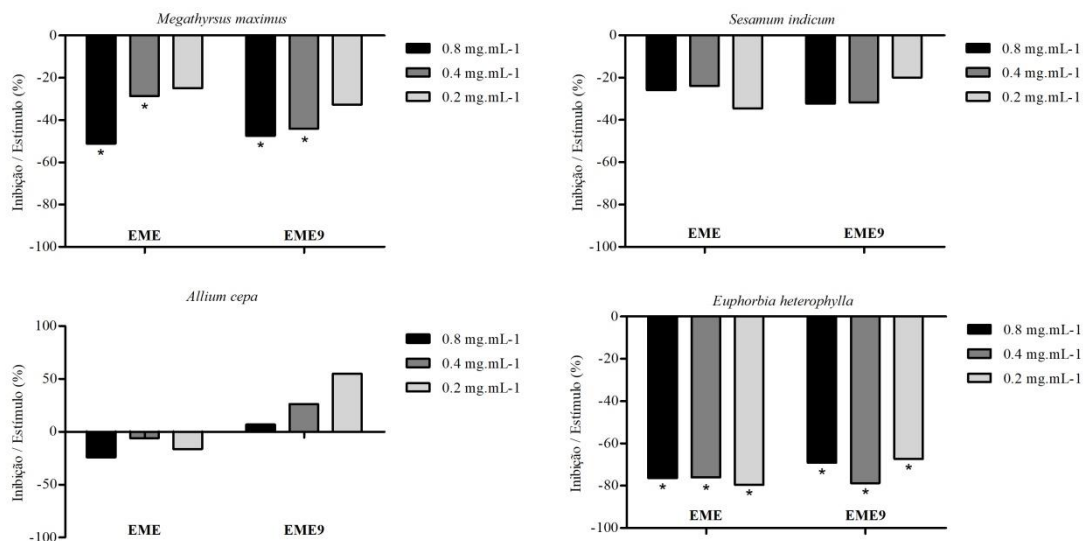
Resultados similares do processo de germinabilidade, velocidade e sincronia foram observados por Abdalla et al., 2018 em plântulas de capim-colonião e amendoim-bravo submetidas ao extrato de *Diaporthe sp.* Em outro trabalho realizado por Da Silva, 2020, extratos de dois fungos endofíticos (*Colletotrichum dianesei* e *Xylaria sp.*) também reduziram a velocidade e porcentagem de germinação de plântulas de alface.

Sementes que apresentam velocidade de germinação reduzida no ambiente demoram mais para germinar e, assim, ficam disponíveis no ambiente por mais tempo, aumentando suas chances de serem predadas (Jeferson e Pennachio, 2005).

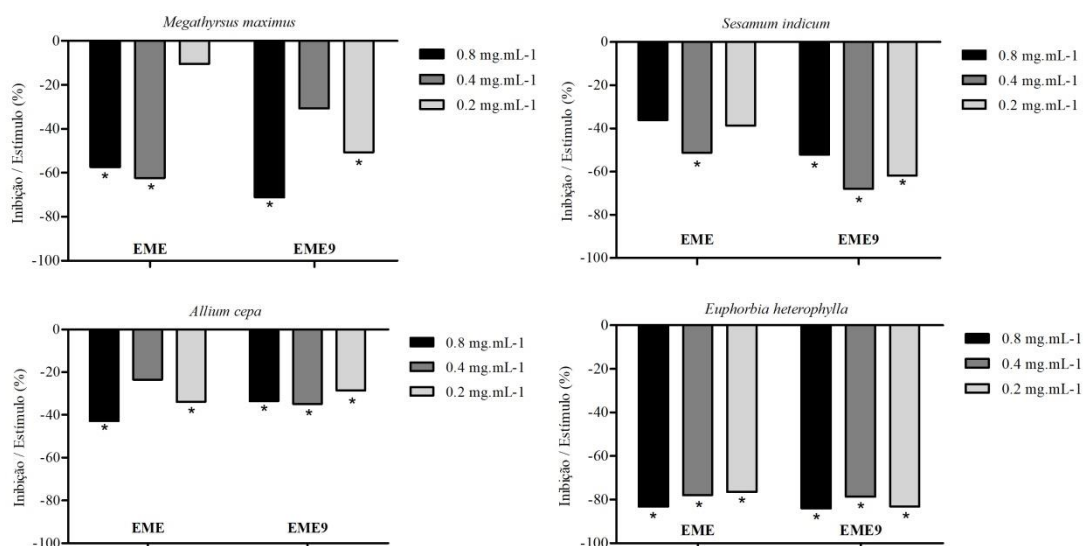
O bioensaio de crescimento de plântulas também foi realizado com os extratos micelial (EME) e sua fração EME9.

O amendoim-bravo foi a espécie que se mostrou mais sensível aos tratamentos, tanto em suas partes aéreas, como nas raízes, apresentando assim, maiores valores de porcentagem de inibição (Figuras 16 e 17). Por outro lado, as espécies indicadoras (cebola e gergelim) foram as únicas cujos tamanhos das partes aéreas não apresentaram

diferença estatística significativa comparadas ao controle negativo. As partes aéreas da cebola apresentaram estímulos no seu crescimento (Figura 16).



**Figura 16:** Efeito do extrato bruto micelial (EME) de *Diaporthe phaseolorum* e sua fração (EME9) sobre o crescimento inicial de partes aéreas de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (\*) indicam os extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO).



**Figura 17:** Efeito do extrato bruto micelial (EME) de *Diaporthe phaseolorum* e sua fração (EME9) sobre o crescimento inicial de raízes de plântulas de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), capim-colonião (*Megathyrus maximus*), cebola (*Allium cepa*) e gergelim (*Sesamum indicum*) em diferentes concentrações. (\*) indicam os

extratos nas concentrações que apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle negativo (Solução tampão com DMSO).

Os maiores valores de porcentagem de inibição tanto de parte aérea como raiz, foi observado em plântulas de amendoim-bravo submetidas ao crescimento em extrato micelial (EME) a uma concentração de  $0.2\text{mg/mL}^{-1}$  e com a fração 9 a uma concentração de  $0.8\text{mg/mL}^{-1}$ , sendo estes valores de inibição para partes aéreas e raízes iguais a 79,5 e 84,1%, respectivamente.

Em um estudo feito por Abdalla et al., 2018, extratos etanólicos de *Diaporthe sp.* também foram capazes de inibir o crescimento de raízes e partes aéreas de *M. maximus* e *E. heterophylla*, afetando mais intensamente as raízes destas, assim como observado no presente trabalho. A maior sensibilidade radicular, como apresentada pelas espécies-alvo é amplamente documentada na literatura e caracteriza um dos principais parâmetros para indicar a sensibilidade de plantas aos efeitos de fitotoxinas (Hossen et al., 2021; Muñoz et al., 2020; Vargas et al., 2019; Liu et al., 2018; Grisi et al., 2013). Isto pode ser explicado pelo fato de as raízes ficarem mais em contato com o extrato do que a parte aérea neste bioensaio, além de poderem apresentar maior permeabilidade aos compostos fitotóxicos, pois não possuem uma cobertura cuticular bem desenvolvida como a apresentada pela superfície do hipocótilo (Vargas et al., 2019; Yoshimura et al., 2011).

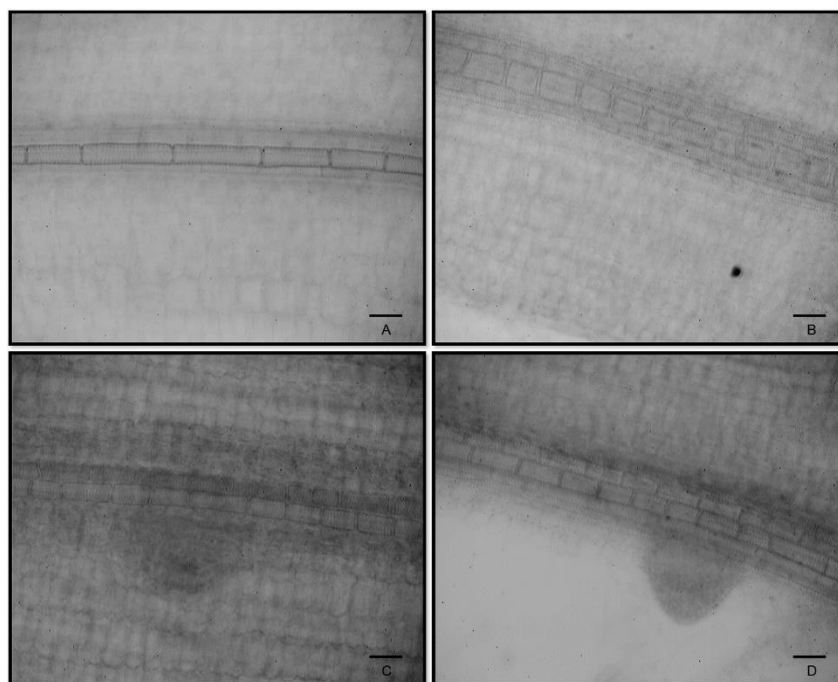
Não foi observado um padrão de inibição do tipo dose-dependente na maioria das plântulas.

Ao término do bioensaio de crescimento foi possível observar que grande parte das plântulas das espécies-alvo tratadas com o herbicida Goal® apresentavam-se necrosadas tanto nas partes aéreas quanto em suas raízes. Sendo assim, não foi possível realizar as medições nestas últimas.

Em um estudo feito por Maiquel, 2016, também foi avaliada a atividade herbicida de *Diaporthe sp.* em espécies de monocotiledônea e dicotiledônea. O caldo fermentado de *Diaporthe* foi capaz de inibir em 100% a germinação de *Glicine max*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Lolium multiflorum* e *Sorgum halepense* em um bioensaio de pré-emergência. Assim, seus metabolitos comprovaram um amplo espectro de ação, já que foram eficazes tanto em espécies de mono como eudicotiledôneas.

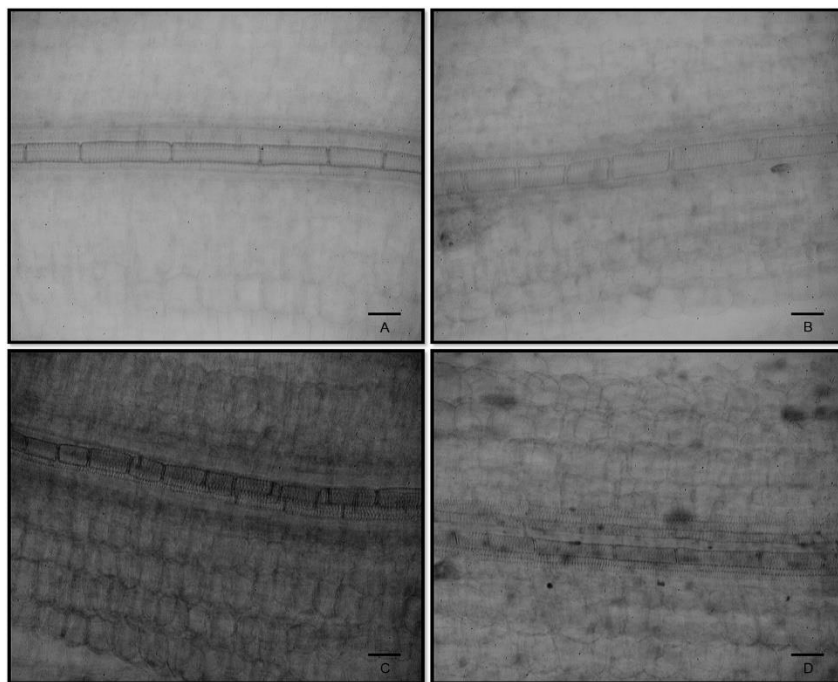
#### 4.4. Bioensaio de crescimento de células do metaxilema de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

O estudo anatômico das raízes de plântulas de gergelim possibilitou uma melhor visualização de um dos modos de ação dos efeitos fitotóxicos dos diferentes extratos, em nível celular. Os extratos brutos e a fração EME9 foram submetidos a um bioensaio de crescimento de células do metaxilema radicular, para verificar se a redução do comprimento das raízes ocorria a partir de alterações a nível celular. Os tamanhos das células do controle apresentaram um comprimento maior comparado ao metaxilema de células de plântulas que foram submetidos aos tratamentos. Porém, aquelas tratadas com o extrato de meio de cultura (EMC) não apresentaram um padrão de tamanho do tipo dose-dependente em relação às concentrações dos extratos utilizadas (Figuras 18 e 19).



**Figura 18:** Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos de meio de cultura de *D. phaseolorum* (EMC) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL<sup>-1</sup>, (C) 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL<sup>-1</sup>. As marcações equivalem à medida correspondente a 50 micrômetros.

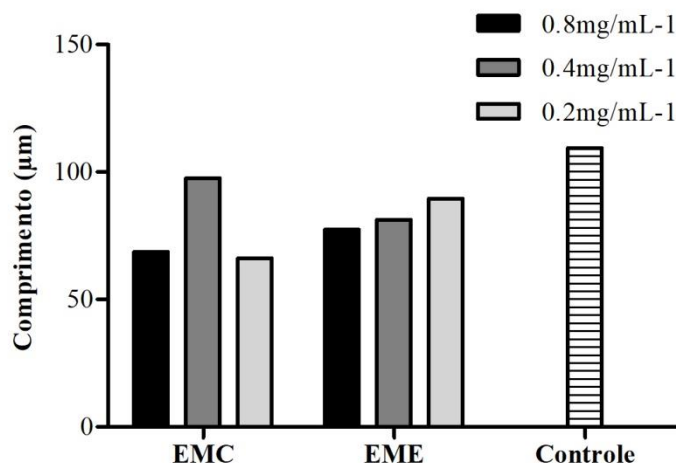




**Figura 19:** Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com os extratos miceliais de *D. phaseolorum* (EME) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL<sup>-1</sup>, (C) 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL<sup>-1</sup>. Escala: 50 micrômetros.

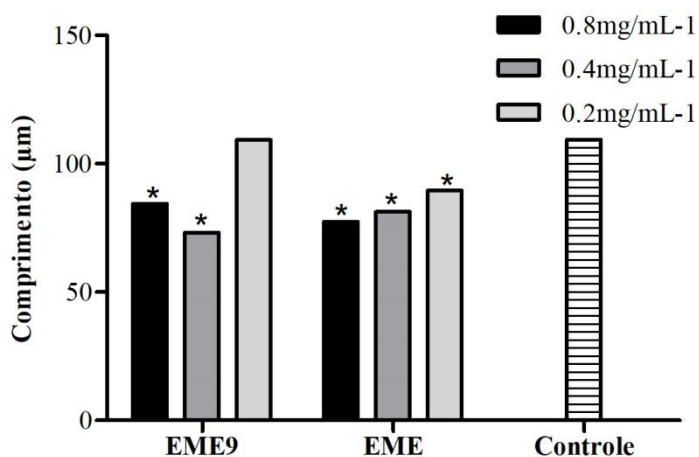
As células do metaxilema radicular das plântulas tratadas com o extrato micelial (EME) apresentaram um padrão de crescimento dose-dependente, onde a média dos comprimentos das células das plântulas que cresceram em contato com o extrato a uma concentração de 0.8, 0.4 e 0.2 mg/mL<sup>-1</sup> iguais a 77,42, 81,34 e 89,61  $\mu\text{m}$ . As raízes tratadas com o extrato do EMC em sua menor concentração foram aquelas a apresentar menor comprimento das células do metaxilema, com média de 66,2  $\mu\text{m}$ . Esta última bem como todas as células tratadas com EME diferiram estatisticamente do controle negativo.

A relação dos valores médios de comprimentos das células do metaxilema podem ser melhor visualizadas de acordo com o gráfico (Figura 20).



**Figura 20:** Médias ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) tratadas com os extratos de *D. phaseolorum* em diferentes concentrações. \*: diferem estatisticamente do controle negativo pelo teste de Tukey.

Ao comparar os comprimentos das células do metaxilema de raízes de gergelim tratadas EME e EME9, foi possível verificar que o tratamento destas com a fração EME9 resultou em menores tamanhos das células na menor e maior concentração testadas ( $0.2$  e  $0.8 \text{ mg/mL}^{-1}$ , respectivamente) (figura 21).

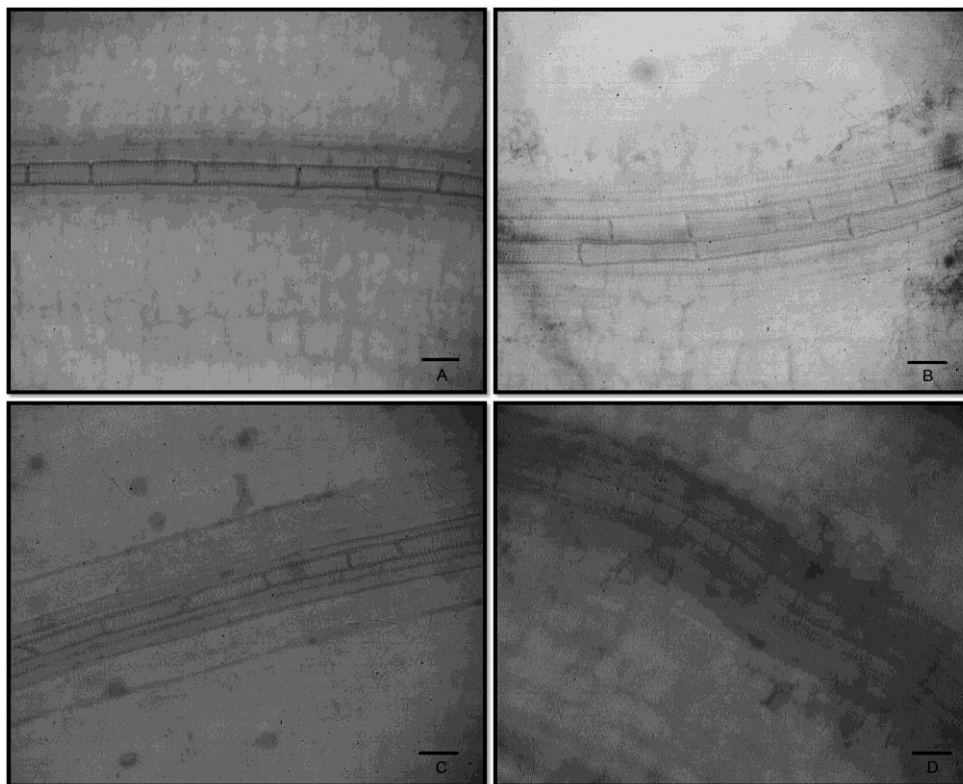


**Figura 21:** Médias ( $\mu\text{m}$ ) dos comprimentos das células do metaxilema de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum*) tratadas com o extrato micelial (EME) de *D. phaseolorum* e sua fração (EME9) em diferentes concentrações. \*: diferem estatisticamente do controle negativo pelo teste de Tukey.

As raízes em contato com fração EME9 em sua concentração intermediária foram aquelas a apresentar a menor média de tamanho ( $73,2 \mu\text{m}$ ). O extrato EME apresentou um padrão de inibição dose-dependente, e em todas concentrações tanto do

extrato como de sua fração, apresentando-se estatisticamente diferentes do controle negativo. Já as raízes tratadas com a fração EME9, apenas sua menor concentração não diferiu estatisticamente do controle negativo.

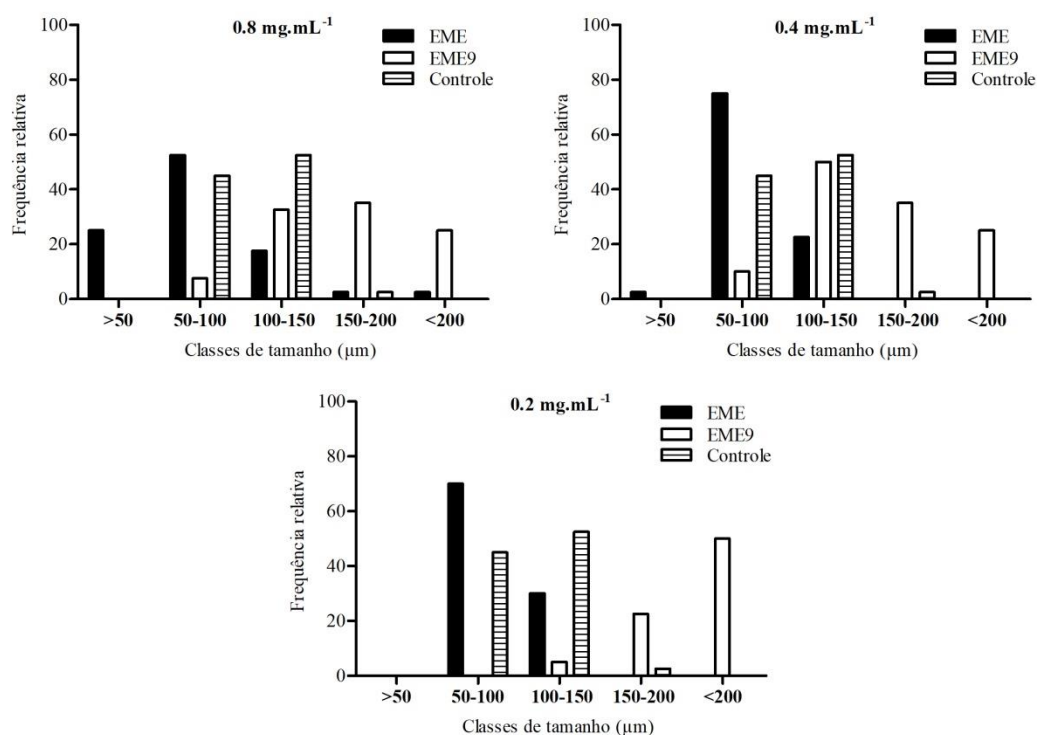
Também foram feitas fotomicrografias, que podem ser visualizadas na figura 22.



**Figura 22:** Fotomicrografia de células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim tratadas com a fração EME9 de *D. phaseolorum* (EME) em diferentes concentrações: (A) controle, (B) 0.2mg.mL<sup>-1</sup>, (C) 0.4 mg.mL<sup>-1</sup> e (D) 0.8mg.mL<sup>-1</sup>. Escala: 50 micrômetros.

Não foram realizadas fotomicrografias com plântulas submetidas ao tratamento com o herbicida Goal<sup>®</sup> pelo fato da totalidade das raízes apresentarem-se necrosadas, impedindo a execução do tratamento destas para a montagem das lâminas.

As menores classes de tamanhos (> 50  $\mu\text{m}$  e de 50 à 100  $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim foram mais frequentes naquelas submetidas aos tratamentos com o extrato micelial (EME). Em contrapartida, um maior número de plântulas tratadas com a fração EME9 obtiveram maiores tamanhos de células do metaxilema (150 à 200  $\mu\text{m}$  e < de 200  $\mu\text{m}$ ), em todas concentrações da fração (Figura 23).



**Figura 23:** Frequência relativa das classes de tamanho ( $\mu\text{m}$ ) das células do metaxilema de raízes de gergelim (*Sesamum indicum*) submetidas à ação do extrato bruto micelial (EME) de *Diaporthe phaseolorum*, e sua fração (EME9), em diferentes concentrações.

Os resultados aqui apresentados sugerem que os compostos presentes no extrato micelial podem apresentar maior fitotoxicidade para as células do metaxilema destas raízes que a fração por apresentarem efeito sinérgico. O comportamento de uma mistura pode ser descrito pela presença de alguns constituintes conhecidos, porém, uma série de estudos mostrou que a atividade geral de extratos pode resultar de misturas de compostos com atividade sinérgica, aditiva ou antagônica (Caesar et al., 2019). Isto pode explicar o fato de que a fração EME9 tenha menos atividade inibitória que os extratos brutos, que possuem uma maior quantidade de metabólitos agindo em conjunto, o que pode indicar atividade sinérgica destes, refletindo em um maior percentual inibitório.

A redução do crescimento radicular nas plântulas de gergelim pode também indicar uma possível interferência dos aleloquímicos nas concentrações de diferentes tipos de hormônios vegetais (Accarini, 2016). Resultados semelhantes foram

observados por Grisi (2015) em plântulas de gergelim, que se mostraram mais sensíveis à ação de aleloquímicos comparado às monocotiledôneas.

A auxina é crucial para a regulação do desenvolvimento do embrião zigótico e do desenvolvimento da raiz, incluindo a iniciação e emergência de raízes laterais e o desenvolvimento de folhas e flores (Revalska et al., 2015). Está envolvida nas respostas das plantas à luz e gravidade, arquitetura geral do caule e da raiz, padronização de órgãos, desenvolvimento vascular e regulação da dominância apical (Cleland, 2004; Woodward e Bartel, 2005; Revalska et al., 2015). Foi também demonstrado que a biossíntese localizada de auxina também desempenha papéis críticos no desenvolvimento da raiz (Zhao, 2010, 2018).

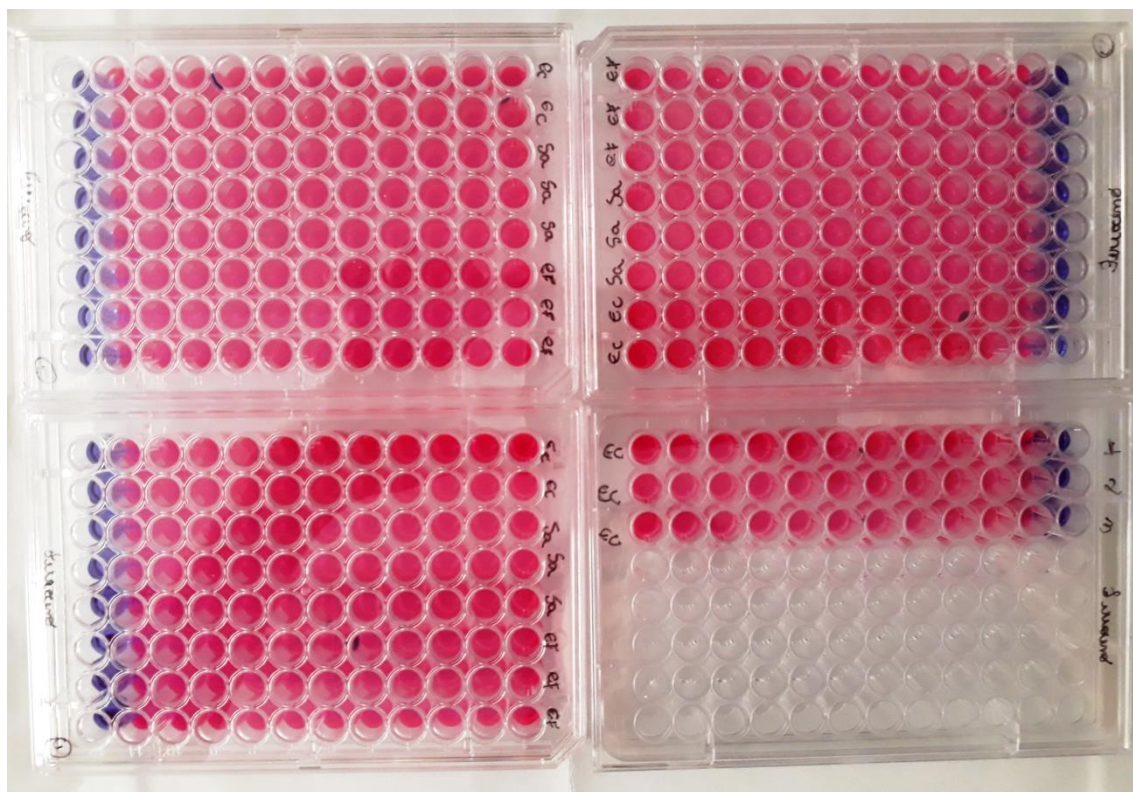
A auxina interage com outros hormônios vegetais para regular o crescimento e o desenvolvimento das raízes. Assim, a síntese e o transporte de auxinas bem como vias de sinalização são importantes para o desenvolvimento da raiz da planta. O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina de ocorrência natural e a via biossintética do AIA foi claramente compreendida (Zhao, 2018). Como as respostas das plantas às concentrações de auxina são dependentes de uma curva do tipo dose respostas, as concentrações de AIA devem ser reguladas com precisão durante o crescimento da planta em resposta a estímulos externos e internos. O ajuste da concentração de AIA dentro de células e tecidos é amplamente realizado por transporte direcional e biossíntese localizada (Brumos et al. 2018; Robert et al. 2018), bem como inativação de AIA (Zheng et al. 2016; Di Mambro et al. 2019)

Assim, as alterações observadas no crescimento celular das raízes de gergelim, podem ter ocorrido pela ação de metabólitos secundários, que interferiram na ação da auxina e de sua interação com outros reguladores de crescimento. Dessa forma, as alterações no crescimento celular provocadas pela ação de metabólitos secundários podem ser resultado da interferência na ação desse hormônio.

#### **4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Diaporthe phaseolorum***

O bioensaio que avalia a atividade antimicrobiana de extratos e fração de *Diaporthe phaseolorum* não obteve resultado satisfatório. Assim, tanto os extratos brutos como a fração EME9, em todas concentrações testadas (0,95; 1,9; 3,9; 7,81;

15,62; 31,25; 62,5; 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ), não apresentaram ação microbiana sob as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, como pode ser observado na figura 25, onde os poços de coloração avermelhada indicam atividade microbiana e os de coloração azul, que são os controles positivos (sem microrganismos), indicam inatividade (Figura 24).



**Figura 24:** Placas com as diluições utilizadas no bioensaio de avaliação de atividade microbiana dos extratos brutos (EMC e EME) e da fração EME9 de *Diaporthe phaseolorum*, sob o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, revelados com resazurina. \*Poços com coloração avermelhada indicam atividade microbiana e poços com coloração azul indicam inatividade.

#### 4.6. Atividade antioxidante

Foram submetidos ao bioensaio de atividade antioxidante os extratos brutos EMC e EME, e a fração EME9 nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Todos extratos e a fração apresentaram atividade antioxidante considerada fraca ( $\text{AAI} < 0,5$ ) e valor de  $\text{IC}_{50}$  acima de  $180 \text{mg.mL}^{-1}$  (Tabela 6).

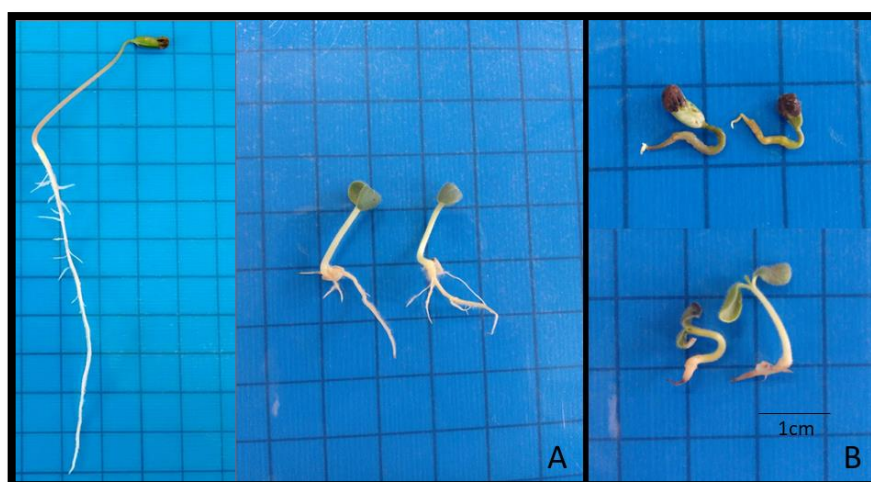
**Tabela 6.** Concentração inibitória de 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) e índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos brutos EMC e EME e fração EME9 de *D. phaseolorum*. Quercetina

e Ácido Gálico: referência industrial de composto antioxidante utilizado como controle positivo.

	IAA	IC50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<b>EMC</b>	0,166	185,39
<b>EME</b>	0,077	400,9
<b>EME9</b>	0,05	540,29
<b>Quercetina</b>	15,078	2,04
<b>Ác. Gálico</b>	30,986	0,99

Compostos antioxidantes de fontes naturais são importantes na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, no qual retardam ou previnem a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres (Santos et al., 2018). Compostos com atividades antioxidantes também são de grande importância nas indústrias que lidam com produtos petroquímicos, alimentos, cosméticos e medicamentos onde são usados para estabilização de produtos poliméricos (Sganzerla et al., 2020; Nirmala et al., 2018; PISOCHI & NEGULESCU, 2011).

O gergelim e, principalmente o amendoim-bravo, mostraram-se mais sensíveis à ação dos extratos de *D. phaseolorum* do que as espécies monocotiledôneas. Também foram observadas diversas anormalidades durante o desenvolvimento inicial de plântulas das espécies-alvo tanto daninhas como as indicadoras, como necrose de raízes e/ou de parte aérea, e atrofia. As anormalidades verificadas podem ser visualizadas de acordo com a Figura 25.



**Figura 25:** Plântulas normais de amendoim-bravo e gergelim (A) e plântulas anormais de amendoim-bravo e gergelim (B) apresentando anormalidades do tipo atrofia de raiz e parte aérea.

Fitormônios como a auxina e a citocinina controlam aspectos-chave do desenvolvimento da planta, incluindo o desenvolvimento dos meristemas da parte aérea e da raiz e a expansão celular, além do tempo de senescência da folha (Kurepa et al., 2018; Majda et al., 2018; Nadolska-Orczyk et al., 2017; Di Mambro et al., 2017).

Algumas fitotoxinas podem alterar a morfologia e a anatomia das plântulas, causando problemas como inibição do crescimento e necrose de raiz e diminuição no desenvolvimento vascular. Alguns pesquisadores atribuíram esses problemas a uma alteração no equilíbrio hormonal, principalmente auxina, etileno e giberelina que afetam a especificação, proliferação e expansão celular de plântulas, como já foi observado com milho e soja (Mekky et al., 2019). As anormalidades observadas impedem que a plântula se desenvolva normalmente, assim, seu crescimento fica comprometido a ponto de não permitir que ela se estabeleça ou reduza sua habilidade competitiva (Brasil, 2009).

#### **4.7. Análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e identificação química.**

Os cromatogramas dos extratos brutos EME e EMC e da fração EME9 estão ilustrados nas Figuras 26, 27, 28 e 29.



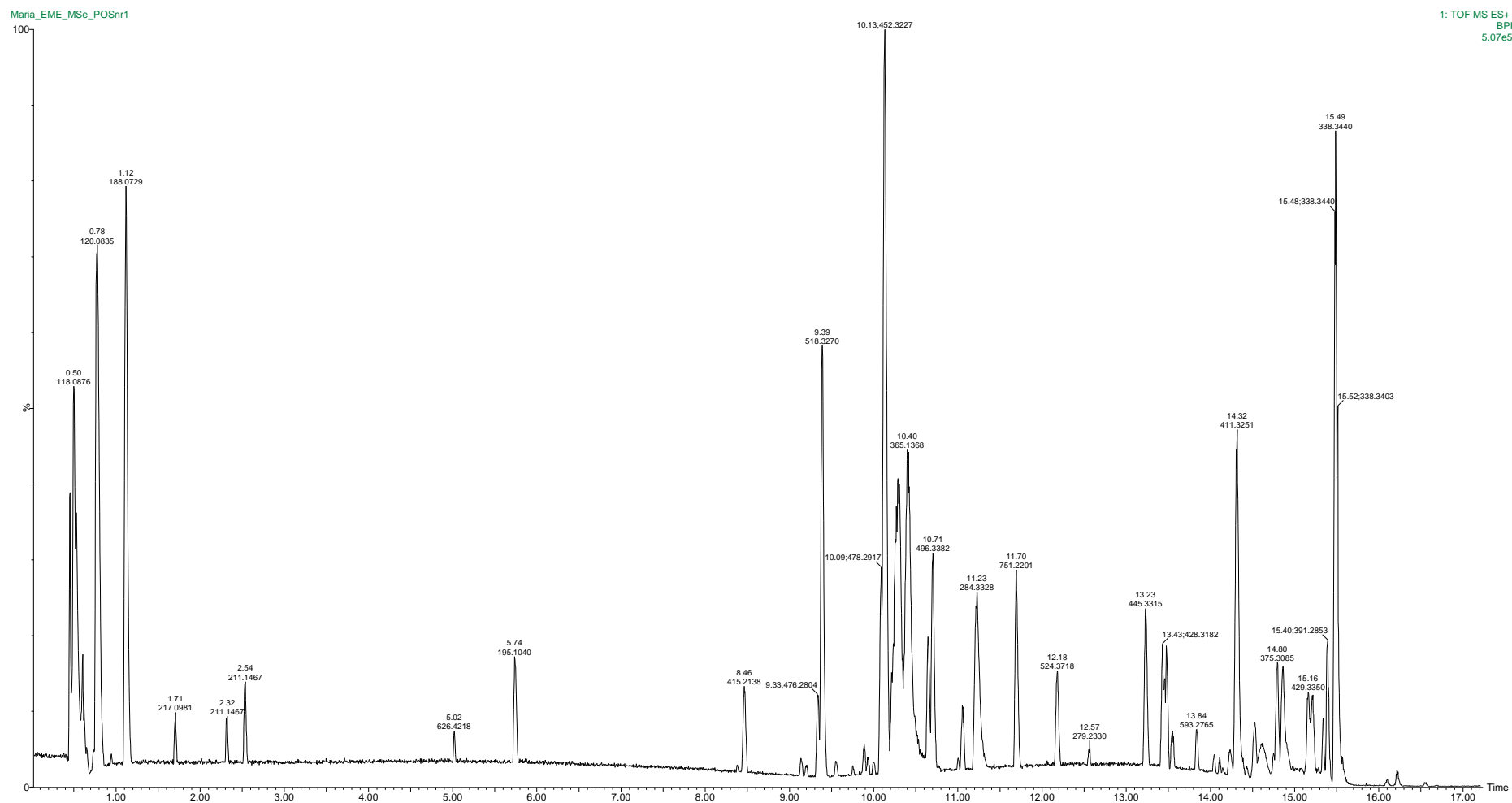


Figura 26: Cromatograma do extrato bruto micelial EME de *Diaporthe phaseolorum*.



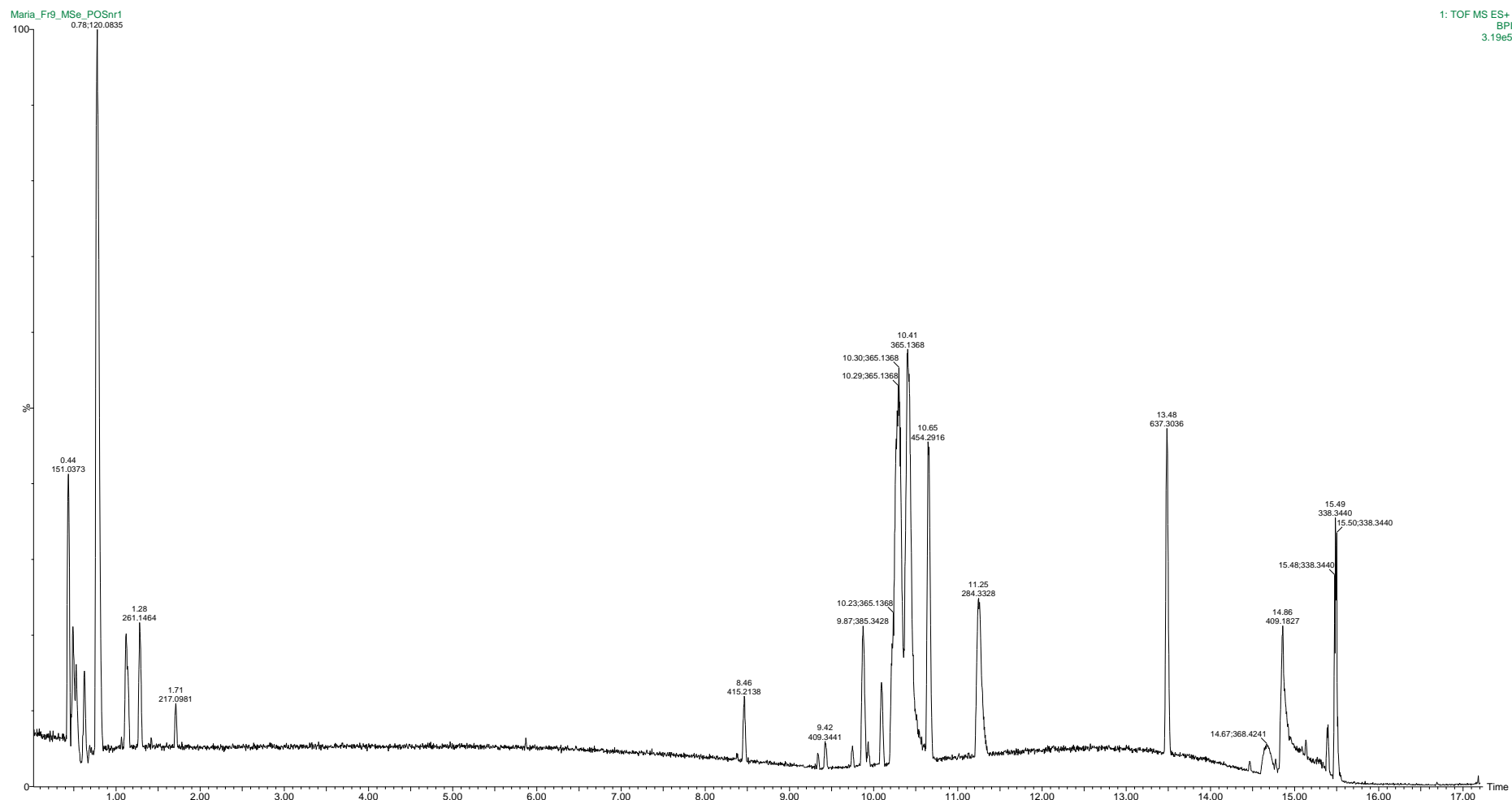
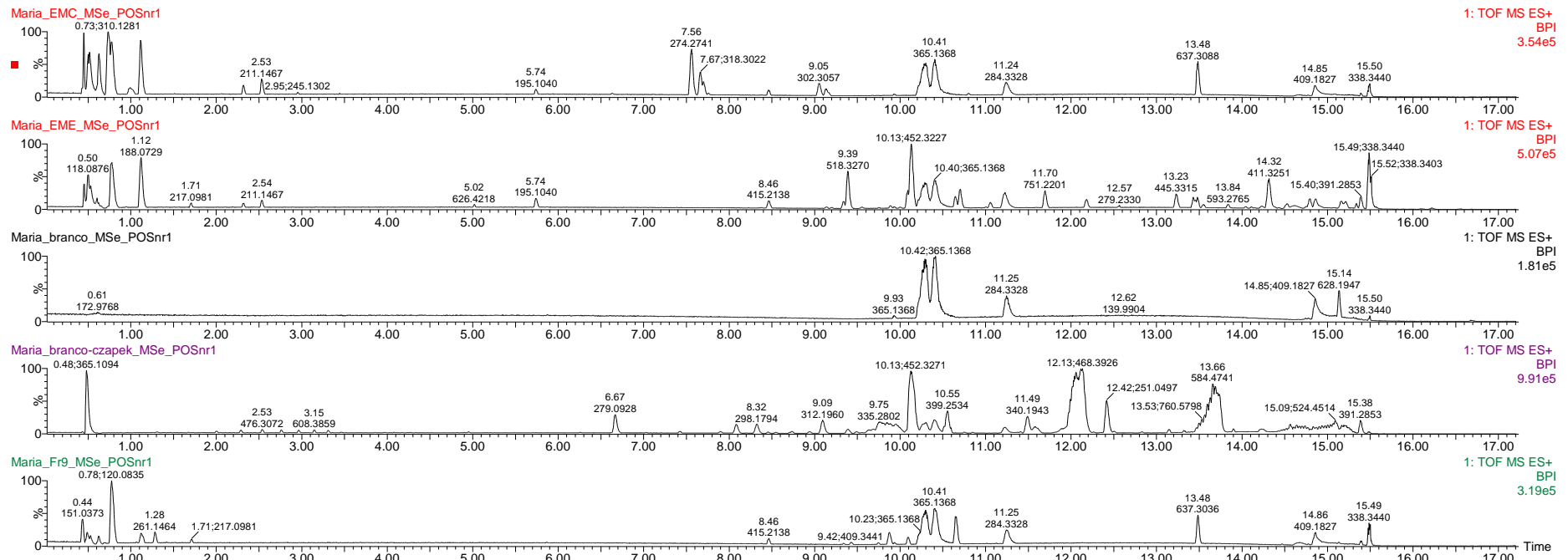


Figura 28: Cromatograma da fração EME de *Diaporthe phaseolorum*.



**Figura 29:** Cromatograma dos extratos brutos (EME e EMC), branco (etanol), meio de cultura Czapek e da fração EME9 de *Diaporthe phaseolorum*.

O sistema UNIFI permite a comparação de análises de espectros de massas em modo MS<sup>E</sup> com bibliotecas “in house” (Vieira et al., 2020). Para este estudo foi construída uma biblioteca com arquivos em formato .txt e .mol, para o gênero *Diaporthe* com 125 substâncias, que foi inserido no software UNIFI, objetivando realizar anotações de metabólitos nas frações estudadas. A tabela 7 a seguir, apresenta as anotações de metabólitos para as frações analisadas por UPLC-QToFMS<sup>E</sup>.

**Tabela 7.** Metabólitos secundários de *Diaporthe phaseolorum* identificados por UPLC-QToFMS<sup>E</sup> em amostras dos extratos brutos (EMC e EME) e na fração (EME9).

Nº	T <sub>R</sub>	Metabólitos anotados	m/z observada	Aduto	Massa neutra observada	Erro (mDa)	Extrato/fração
1	1,92	Diaporol P	243,1342614	[+Na]	220,1463	-1,28	EME
2	11,69	Phomoxanthone A	751,2221359	[+H]	750,2148	-1,12	EME
3	10,37	Penexanthone A	709,2122605	[+H]	708,2049	-0,61	EME
4	0,53	Phomoxanthone H	326,1241849	[+NH <sub>4</sub> ]	308,0904	0,76	EMC
5	0,75	Tenellone A	443,2025305	[+H]	442,1953	-3,89	EMC
6	11,23	Phomoxanthone A	751,2222209	[+H]	750,2149	-1,04	EMC
7	0,53	Diaporol P	243,1332	[+Na]	220,1439	-2,4	EME9
8	1,14	methyl 5-[(1R)-1-hydroxyethyl]-g-oxofuran-2-butanoate	244,1184	[+NH <sub>4</sub> ]	226,0846	0,4	EME9
9	10,74	Oblongolide G	278,1525	[+Na]	301,1417	0,7	EME9
10	11,23	Phomoxanthone A	751,2225	[+H]	750,2152	-0,7	EME9

**Nº: número da amostra, TR: tempo de retenção; m/z observada: razão massa/carga, Erro (mDa): erro (mili Dalton).**

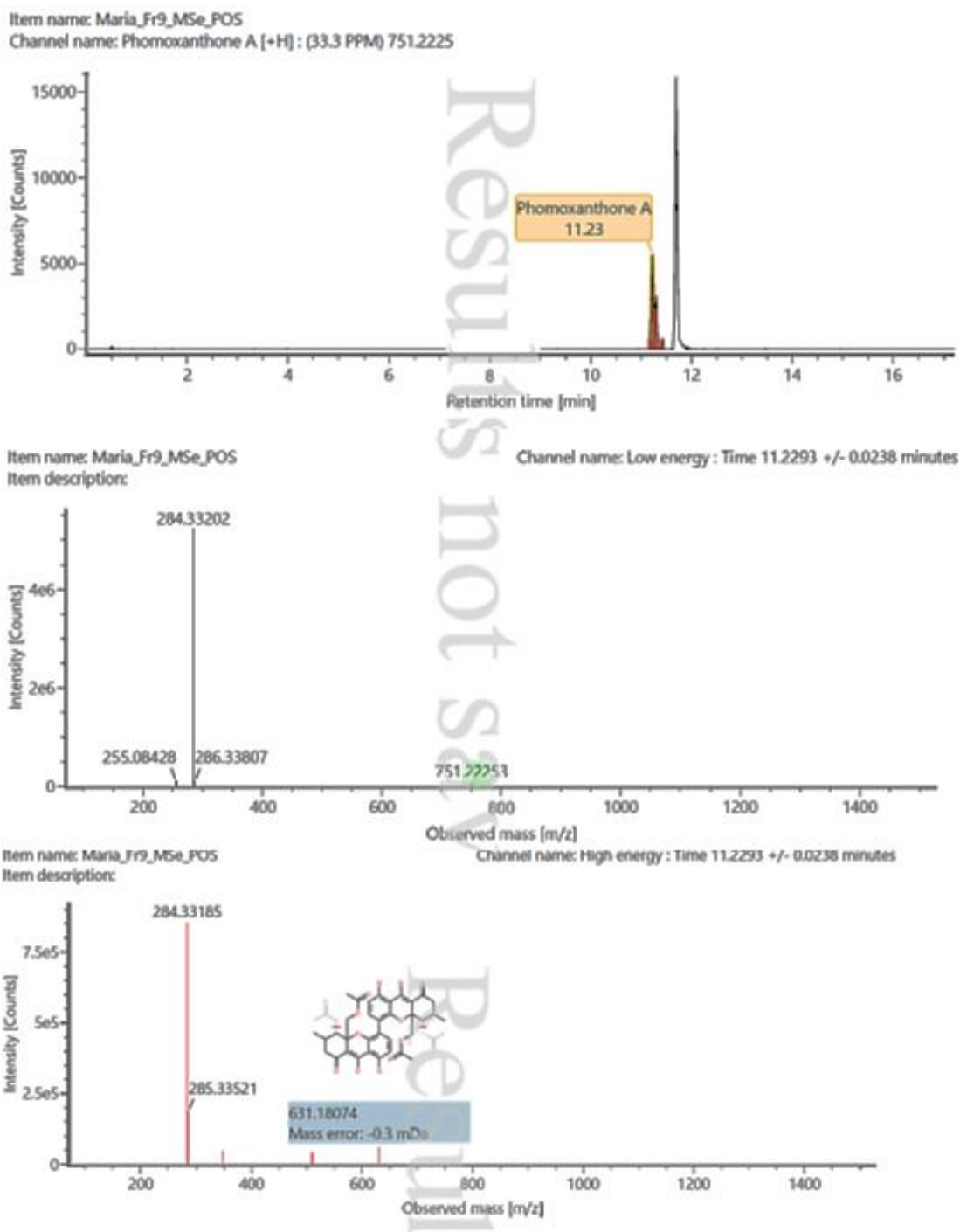
Utilizando a plataforma UNIFI foram assinalados 7 diferentes metabólitos, já descritos na literatura para o gênero *Diaporthe*, dentre os quais a fomoxantona A (*phomoxanthone* A) foi anotado em todos extratos e na fração EME9.

A fomoxantona A (ou PXA, como é conhecida) é um metabólito comumente encontrado em fungos do gênero *Phomopsis* (estado assexuado de *Diaporthe* sp.) e foi identificado pela primeira vez por Isaka, 2001 em extratos miceliais de *Phomopsis* sp., isolados de *Tectona grandis* em um estudo para triagem de compostos antimaláricos, mostrando forte atividade antibiótica contra uma cepa resistente de *Plasmodium*

*falciparum*. O mesmo estudo relatou a atividade antibiótica de PXA contra *Mycobacterium tuberculosis* e contra três linhas de células animais, duas das quais derivadas de células cancerosas humanas (Isaka et al., 2001).

Estudos recentes relatam a atividade antifúngica (Tong et al., 2017), anticâncer (Yang et al., 2020; Wang et al., 2019) e citotóxica (Niu et al., 2019) da fomoxantona A, porém, até o momento apenas o presente estudo analisou a atividade herbicida em extratos contendo este composto.

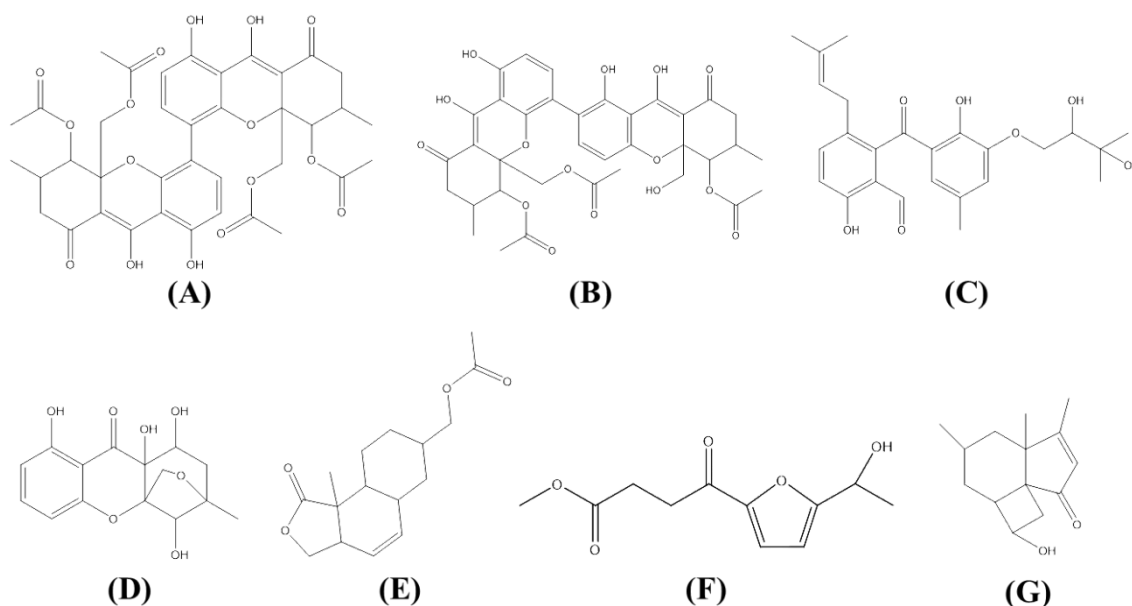
A figura 30 ilustra o cromatograma e os espectros de massas anotados na amostra e correlacionados com a biblioteca UNIFI.



**Figura 30:** Espectros da substância Fomoxantona A

O segundo metabólito identificado em maior quantidade foi a Penexantona A (penexanthone A) é um composto pertencente à mesma classe da fomoxantona A, sendo isolado de *Penicillium* sp. e identificado pela primeira vez por Cao, 2012. Assim como ocorre com a fomoxantona A, este metabólito apresenta atividade anticâncer (Ding et al., 2013) e também não há estudos que o relacionam a uma atividade herbicida.

As formulas estruturais dos 7 metabólitos encontrados e listados na tabela 2 podem ser visualizados na figura 31.



**Figura 31:** Formulas estruturais dos compostos encontrados nos extratos brutos EMC e EME e na fração EME9 de *Diaporthe phaseolorum*: Fomoxanthone A (A), Penexantona A (B), Tenellona A (C), Fomoxantona H (D), Oblongolideo G (E), methyl 5-[(1R)-1-hidroxi-etil]-g-oxofuran-2-butanoato (F) e Diaporol P (G).

Até o momento, vários compostos foram isolados de fungos endofíticos de plantas terrestres em *Diaporthe* e *Phomopsis*, alguns dos quais originários do ambiente marinho (principalmente manguezais e sedimentos). Investigações químicas de alguns *Diaporthe* sp. têm proporcionado uma variedade de produtos naturais bioativos (Souza et al., 2016), como os ácidos diapólicos (Yedukondalu et al., 2017), o derivado cetona anti-candidal (Yenn et al., 2017) e os compostos fenólicos com atividade antioxidante (Tanapichatsakul et al., 2018). A maioria dos compostos são classificados como policetídeos, que é o principal tipo estrutural de metabólitos secundários desse gênero (Xu et al., 2021).

Dentre as diversas bioatividades destes compostos, foi relatada a atividade citotóxica (Luo et al., 2018), antifúngica (Carvalho et al., 2018), antibacteriana (Niaz et al., 2020), antiviral (Yang et al., 2020), antioxidante (Da Rosa et al., 2020) e anti-inflamatória (Fan et al., 2020). A atividade herbicida de extratos de *Diaporthe* também vêm sendo bastante explorada, e estudos têm demonstrado sua eficácia no combate de plantas daninhas (Brun et al., 2020; Maiquel et al., 2016; de Souza et al. 2015), porém, estudos envolvendo a atividade herbicida de *Diaporthe phaseolorum* são escassos.



Uma diversidade de metabólitos secundários de *Diaporthe phaseolorum* já foram identificados até o presente momento (Niu et al., 2019; Brissow et al., 2017; Cui et al., 2017; Agusta et al., 2006; Sebastianes et al., 2012). Dentre os 7 compostos identificados, apenas a fomoxantona A (*phomoxanthone* A) foi relatada para *D. phaseolorum* em um estudo feito por Niu, 2019. Os outros 6 metabólitos identificados (penexanthone A, tenellone A, phomoxanthone H, oblongolide G, methyl 5-[(1R)-1-hydroxyethyl]-g-oxofuran-2-butanoate e Diaporol P) ainda não haviam sido relatados para a espécie estudada, mostrando-se inéditos para *Diaporthe phaseolorum* no presente trabalho.

É conhecido que muitos dos metabólitos produzidos por organismos endofíticos são semelhantes aos produzidos por suas plantas hospedeiras, indicando assim, potencial de fungos endofíticos como uma fonte alternativa de compostos bioativos (Patil et al., 2017). Neste contexto, o estudo de extratos fúngicos como fontes para a produção de bioherbicidas é uma estratégia interessante e ecologicamente correta para substituir pesticidas sintéticos tóxicos, visto que esses microrganismos geralmente apresentam baixa toxicidade para humanos e meio ambiente (Macías-Rubalcava et al., 2014; Cao et al., 2019). Assim, os compostos identificados no presente estudo merecem atenção, podendo futuramente ser isolados e testados em bioensaios para avaliar diversas bioatividades destes, que, se comprovadas possuem grande potencial na busca por novos compostos naturais que possam assim, substituir os prejudiciais herbicidas sintéticos utilizados, além da busca por novos medicamentos.

## 5. Conclusões

- Ambos extratos brutos (EME e EMC) apresentam atividade fitotóxica, já que foram capazes de inibir o crescimento dos coleótilos de trigo, apresentando maior percentual inibitório em suas maiores concentrações, além de também serem capazes de inibir o crescimento das células do metaxilema radicular de plântulas de gergelim.
- O extrato bruto micelial (EME) não apresentou perda de atividade após seu fracionamento.
- O amendoim-bravo (*Megathyrsus maximus*) foi a espécie-alvo a apresentar maior sensibilidade aos compostos presentes nos extratos bruto e na fração EME9. Não houve diferença de sensibilidade entre mono e eudicotiledôneas.

- Os extratos EMC, EME e fração EME9 não apresentaram atividade antimicrobiana.
- A atividade antioxidante dos extratos EMC, EME e fração EME9 foi considerada fraca para os extratos brutos e para a fração.
- Foi encontrado um composto já identificado para a espécie *Diaporthe phaseolorum* (fomoxantona A), além de compostos nunca mencionados nesta espécie (penexanthone A, tenellone A, phomoxanthone H, oblongolide G, methyl 5-[(1R)-1-hydroxyethyl]-g-oxofuran-2-butanoate e Diaporol P).

## 6. Referências

Abdalla, V.C.P., Santos, A.C.A., Kakazu S., Accarini R.B. and Gualtieri S.C.J. (2018). Phytotoxic potential of endophytic fungi from leaves of *Serjania lethalis* on wheat (*Triticum aestivum* L.) and weeds (*Euphorbia heterophylla* and *Megathyrus maximus*). **Allelopathy Journal** 44 (2): 269-284. doi: 10.26651/allelo.j/2018-44-2-1169.

Adegas, F. S. et al. *Euphorbia heterophylla*: um novo caso de resistência ao glifosato no Brasil. Embrapa, Circular Técnica, n. 98, 2020.

Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. role of cytokin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v.97, p.883-893, 2006.

Altemimi, Ammar; Lakhssassi, Naoufal; Baharlouei, Azam; Watson, Dennis; Lightfoot, David (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, 6(4), 42–. doi:10.3390/plants6040042

Aly, A.H.; Debbab, A.; Proksch, P. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 90, 1829–1845.

Andolfi, Anna; Boari, Angela; Evidente, Marco; Cimmino, Alessio; Vurro, Maurizio; Ash, Gavin; Evidente, Antonio (2015). Gulypyrones A and B and Phomentrioloxins B and C Produced by *Diaporthe gulyae*, a Potential Mycoherbicide for Saffron Thistle

(*Carthamus lanatus*). **Journal of Natural Products**, 78(4), 623–629. doi:10.1021/np500570h

Anese, S., Rial, C., Varela, R. M., Torres, A., Molinillo, J. M. G., & Macías, F. A. (2021). Search of New Tools for Weed Control Using *Piptocarpha rotundifolia*, a Dominant Species in the Cerrado. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. doi:10.1021/acs.jafc.1c01880

Biasetto, C. R., Somens, A., Abdalla, V.; Abreu, L.; Gualtieri, S. C. J.; Pfenning, L.; Bolzani, V. S. & Araujo, A. R. (2019). Phytotoxic constituents from endophytic fungus *Xylaria cubensis* associated with *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**. 42. Doi: 10.21577/0100-4042.20170367.

Brumos J, Robles LM, Yun J, Vu TC, Jackson S, Alonso JM, Stepanova AN. 2018. Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. **Dev Cell** 47: 306–318. e5. doi:10.1016/j.devcel.2018.09.022

Brun, Thiarles; Rabuske, Jéssica E.; Confortin, Tássia C.; Luft, Luciana; Todero, Izelmar; Fischer, Matheus; Zobot, Giovanni L.; Mazutti, Marcio A. (2020). Weed control by metabolites produced from *Diaporthe schini*. **Environmental Technology**, (), 1–10. doi:10.1080/09593330.2020.1780477

Budiono, B., Elfita, E., Muharni, M., Heni, Y., Hary, W., 2019. Antioxidant Activity of *Syzygium samarangense* L. and Their Endophytic Fungi. **Molekul**, Vol. 14. No. 1, Mei 2019: 48 – 55. doi: 10.20884/1.jm.2019.14.1.503

Caesar, Lindsay K.; Cech, Nadja B. (2019). *Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2*. **Natural Product Reports**, (), 10.1039.C9NP00011A–. doi:10.1039/Caesar, Lindsay K.; Cech, Nadja B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**. doi:10.1039/c9np00011a c9np00011a

Cala, A.; Salcedo, J.R.; Torres, A.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G.; Macías, F.A. A Study on the Phytotoxic Potential of the Seasoning Herb Marjoram (*Origanum*

*majorana* L.) Leaves. **Molecules** **2021**, **26**, 3356.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113356>

Cao, Lingling; Yan, Wei; Gu, Chenguang; Wang, Zhiyang; Zhao, Shuangshuang; Kang, Shuang; Khan, Babar; Zhu, Hai-Liang; Li, Jun; Ye, Yonghao (2019). New alkylitaconic acid derivatives from *Nodulisporium* sp. A21 and their auxin herbicidal activities on weed seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, (), acs.jafc.8b04996. doi:10.1021/acs.jafc.8b04996

Caruso, Gianluca; Abdelhamid, Magdi T.; Kalisz, Andrzej; Sekara, Agnieszka (2020). Linking Endophytic Fungi to Medicinal Plants Therapeutic Activity. A Case Study on Asteraceae. **Agriculture**, 10(7), 286–. doi:10.3390/agriculture10070286.

Chen, Yan; Wang, Hong-Wei; Li, Lei; Dai, Chuan-Chao (2013). The potential application of the endophyte *Phomopsis liquidambari* to the ecological remediation of long-term cropping soil. **Applied Soil Ecology**, 67(), 20–26. doi:10.1016/j.apsoil.2013.02.004.

Cimmino A, Masi M, Evidente M, et al. Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Nat Prod Rep**. 2015;32:1629–1653.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: approved standard. 9th. Wayne: CLSI; 2012. [acesso em: 2018 Nov. 21]. Disponível em: <file:///C:/Users/Home/Downloads/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>.

Correia, N. M.; Gomes, L. P.; Perussi, F. J. Control of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* by S-metolachlor as influenced by the occurrence of rain and amount of sugarcane straw on the soil. **Acta Sci. Agron**. vol.34 no.4 Maringá, 2012.

Costa, E. A. D.; Matallo, M. B.; Carvalho, J. C.; Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribaea morelet* var. hondurensis barr. et Golf. **Revista Árvore**, v. 26, p. 683-689, 2002.

Cui H, Liu Y, Li J, Huang X, Yan T, Cao W, et al. 2018. Diaporindenes A-D: four unusual 2,3-dihydro-1H-indene analogues with antiinflammatory activities from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe* sp. SYSU-HQ3. **J. Org. Chem.** 83: 11804-11813.

Cui H, Yu J, Chen S, Ding M, Huang X, Yuan J, et al. 2017. Alkaloids from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 27: 803-807

da Costa, E. A. D.; Matallo, M. B.; Carvalho, J. C.; Rozanski, A. Eficiência de nova formulação do herbicida oxyfluorfen no controle de plantas daninhas em área de *Pinus caribea morelet* var. hondurensis barr. et Golf. **Revista Árvore**, v. 26, p. 683-689, 2002.

da Rosa, B.V.; Kuhn, K.R.; Ugalde, G.A.; Zabot, G.L.; Kuhn, R.C. Antioxidant compounds extracted from *Diaporthe schini* using supercritical CO<sub>2</sub> plus cosolvent. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2020, 43, 133–141.

da Silva W, Lima L, Nunez C. Evaluation of the phytotoxic effect of extracts from endophytic fungi *Colletotrichum dianesei* and *Xylaria* sp. isolated from *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae). **Agrociencia Uruguay**. Doi: 10.31285/AGRO.24.423

Dayan, F. E.; Duke, S. O. Clues in the search for new herbicides. In: reigosa, M. J.; Pedrol, N.; González, L. (Eds.). Allelopathy – A Physiological Process With Ecological Implications. Netherlands, **Springer**, 2006. p. 63-83.

De Souza A. R. C.; Baldoni D. B.; Lima J.; Porto V.; Marcuz C.; Ferraz R. C.; Kuhn R. C.; Jacques R. J.; Guedes J. V.; Mazutti M. A. (2015). Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Vol. 4., 575-578. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.005

Di Mambro R, Svolacchia N, Dello Ioio R, Pierdonati E, SalviE, Pedrazzini E, Vitale A, Perilli S, Sozzani R, Benfey PN, et al. 2019. The lateral root cap acts as an auxin sink

that controls meristem size. **Curr Biol** 29: 1199–1205.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.02.022

Ding, B.; Yuan, J.; Huang, X.; Wen, W.; Zhu, X.; Liu, Y.; Li, H.; Lu, Y.; He, L.; Tan, H.J.M.D. New dimeric members of the phomoxanthone family: Phomolactonexanthones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. **Mar. Drugs** 2013, 11, 4961–4972

Elfita, E., Muharni, M., Heni Y., Fadhillah, F. 2021. Antioxidant activity of endophytic fungi isolated from the stem bark of *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. **IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.** 1011 012047. doi: 10.1088/1757-899x/1011/1/012047

Erfandoust, Roya; Habibipour, Reza; Soltani, Jalal (2020). Endophytic fungi from Cupressaceae inhibit human pathogenic Aspergilli. **Journal de Mycologie Médicale**, (), 100987–. doi:10.1016/j.mycmed.2020.100987

Fan, M.M.; Xiang, G.; Chen, J.W.; Gao, J.; Xue, W.W.; Wang, Y.X.; Li, W.H.; Zhou, L.; Jiao, R.H.; Shen, Y.; et al. Libertellenone M, a diterpene derived from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. S12, protects against DSS-induced colitis via inhibiting both nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation. **Int. Immunopharmacol.** 2020, 80.

Ferreira, A.G., Borguetti, F. 2004. Germination: from basic to advanced. Porto Alegre: **Artmed** p.323 (Portuguese).

Firáková, S.; Šturdíková, M.; Múčková, M. 2007. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia.** 62: 251–257.

Fu, Yu; Yin, Zhenhao; Yin, Chengri (2017). Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE 17-7 isolated from *Panax ginseng*. **Journal of Applied Microbiology**, (), –. doi:10.1111/jam.13435

G. Ulrich-Merzenich, D. Panek, H. Zeitler, H. Vetter e H. Wagner, Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. 2010. **Indian J. Exp. Biol.** 48(3), 208–219.

Gallei M, Luschnig C, Friml J. 2020. Auxin signalling in growth: Schrödinger's cat out of the bag. **Curr Opin Plant Biol** 53: 43–49.doi:10.1016/j.pbi.2019.10.003

Gao Y, Su YY, Sun W, Cai L (2015) Diaporthe species occurring on *Lithocarpus glabra* in China, with descriptions of five new species. **Fungal Biology** 119: 295–309.

Gao YQ, Du ST, Xiao J, Wang DC, Han WB, Zhang Q, et al. 2020. Isolation and characterization of antifungal metabolites from the *Melia azedarach*-associated fungus *Diaporthe eucalyptorum*. **J. Agric. Food Chem.** 68: 2418-2425.

Gatti, A. B.; Ferreira, A. G.; Arduin, M.; Perez, S. C. J. G. A. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Aristolochia esperanzae* O.Kuntze on development of *Sesamum indicum* L. seedlings. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 454-461, 2010.

Gatti, A.B.; Perez, S.C.J.G.A.& Lima, M.I.S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.459-472, 2004.

Gomes, R.R.; Glienke, C.; Videira, S.I.R.; Lombard, L.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia** 2013, 31, 1–41.

Gonçalves, V. D.; Coelho, M. F. B.; Camili, E. C.; Valentini C. M. A.; Azevedo, R. A. B.;Piton, L. P. Allelopathic activity of *Alibertia edulis* Rich. leaf extract. **Journal of Global Biosciences**, v. 5, p. 4166-4171, 2016..

Grisi, P.U.; Gualtieri, S.C.J.; Anese, S.; Pereira, V.C., Forim, M.R. Efeito do extrato etanólico de *Serjania lethalis* no controle de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 239-248, 2013.

Grisi, Patrícia Umeda; Imatomi, Maristela; de Cassia Pereira, Viviane; Anese, Simoni; Gualtieri, Sônia Cristina Juliano (2016). Influence of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. (Sapindaceae) leaf and stem crude extracts on diaspores and seedlings of different cultivated species. **South African Journal of Botany**, 105(), 97–105. doi:10.1016/j.sajb.2015.12.008

Heap, I. (2018): The international survey of herbicide resistant weeds. – <http://www.weedscience.org> (accessed 08.01.2018).

Hossen, K.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Kato-Noguchi, H. Phytotoxic Activity and Growth Inhibitory Substances from *Albizia richardiana* (Voigt.) King & Prain. **Appl. Sci.** 2021, 11, 1455. <https://doi.org/10.3390/app11041455>

Ikhlas A. Khan (2006). **Issues related to botanicals.**78(18), 0–2038. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.019.

Isaka, M.; Jaturapat, A.; Rukseree, K.; Danwisetkanjana, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. Phomoxanthonones A and B, Novel Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species. **J. Nat. Prod.** 2001, 64, 1015–1018.

Jeferson, L.V., Pennachio M. 2005. Allelopathic effects of foliage extracts from four *Chenopodiaceae* species on seeds germination. **Journal of Arids Environments**, v.55: 275- 285.

Jia, M.; Chen, L.; Xin, H.L.; Zheng, C.J.; Rahman, K.; Han, T.; Qin, L.P. 2016. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, 7: 906.

Khaliq, A., Matloob, A., Khan, M.B., Tanveer, A. Differential suppression of rice weeds by allelopathic plant aqueous extracts. **Planta Daninha**, v. 31, p. 21-28, 2013.

Khattak, Saeed Ullah; Lutfullah, Ghosia; Iqbal, Zafar; Rehman, Irshad Ur; Ahmad, Jamshaid; Khan, Abid Ali (2017). Herbicidal activity of pure compound isolated from



rhizosphere inhabiting *Aspergillus flavus*. **Natural Product Research**, (), 1–4. doi:10.1080/14786419.2017.1326038

Kim J. W. , et al. Bioactive secondary metabolites from an endophytic fungus *Phoma* sp. PF2 derived from *Artemisia princeps* Pamp. **J Antibiot**. 2019;72:174–7.

Kohli, R.K., Batish, D.R., Singh, H.P. Weeds and Their Management – Rationale and Approaches. In Singh HP, Batish DR, Kohli RK (eds) Handbook of Sustainable Weed Management, In Press. **Haworth Press**, Inc., USA, 2004.

Kongprapan T, Xu X, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, Sakayaroj J, Chen J, et al. 2017. Cytosporone derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-H188. **Phytochem. Lett.** 22: 219-223.

Kraus, J.E., Arduin, M., 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. **Seropedica**, EDUR.

Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography : A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants C Review.

Kuva, M. A.; Gravena, R.; Pitelli, R. A.; Christoffoleti, P. J.; Alves, P. L. C. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar: III - capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.1, p.37-44, 2003.

Leon, M.; Berbegal, M.; Rodriguez-Reina, J.M.; Elena, G.; Abad-Campos, P.; Ramon-Albalat, A.; Olmo, D.; Vicent, A.; Luque, J.; Miarnau, X.; et al. Identification and characterization of *Diaporthe* spp. associated with twig cankers and shoot blight of almonds in Spain. **Agronomy** 2020, 10, 1062.

Li G, Kusari S, Kusari P, Kayser O, Spiteller M. 2015. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **J. Nat. Prod.** 78: 2128-2132.

Lima, H. R. P.; Oliveira, S. C. C.; Ikeda, F. S.; Moraes, L. F. D. Alelopatia: potencialidades do seu uso no controle do mato. In: Oliveira, M. F.; Brighenti, A. M. (ed.). Controle de plantas daninhas: métodos físico, mecânico, cultural, biológico e alelopatia. Brasília, DF: **Embrapa**, 2018. p. 148-164.

Liu Y, Ruan Q, Jiang S, Qu Y, Chen J, Zhao M, et al. 2019. Cytochalasins and polyketides from the fungus *Diaporthe* sp. GZU-1021 and their anti-inflammatory activity. **Fitoterapia** 137: 104187.

Liu Z, Zhao J, Liang X, Lv X, Li Y, Qu J, Liu Y. 2018. Dothiorelone derivatives from an endophyte *Diaporthe pseudomangiferaea* inhibit the activation of human lung fibroblasts MRC-5 cells. **Fitoterapia** 127: 7-14.

Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 640 p, 2008.

Lukitaningsih, E. et al. In vivo antioxidant activities of *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza*: **A review. Food Research**, v. 4, n. 1, p. 13–19, 2020.

Luo X, Lin X, Tao H, Wang J, Li J, Yang B, et al. 2018. Isochromophilones A-F, cytotoxic chloroazaphilones from the marine mangrove endophytic fungus *Diaporthe* sp. SCSIO 41011. **J. Nat. Prod.** 81: 934-941.

Macías, F.A.; Lacret, R.; Varela, R.M.; Nogueiras, C.; Molinillo, J.M.G. Isolation and Phytotoxicity of Terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, pp. 396-404, 2010.

Macías-Rubalcava, M. L.; Ruiz-Velasco Sobrino, M. E.; Melendez-Gonzalez, C.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennsen, B. Selected Phytotoxins and Organic Extracts from Endophytic Fungus *Edenia Gomezpompa* as Light Reaction of Photosynthesis Inhibitors. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** 2014, 138, 17–26. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.003.

Macías-Rubalcava, Martha L.; Ruiz-Velasco Sobrino, M. Emma; Meléndez-González, Claudio; Hernández-Ortega, Simón (2014). Naphthoquinone Spiroketal and Organic

Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(16), 3553–3562. doi:10.1021/jf500965k

Maiquel, P. Pes; Marcio, A. Mazutti; Thiago, C. Almeida; Luis, E. Curioletti; Adriano, A. Melo; Jerson, V. C. Guedes; Raquel, C. Kuhn (2016). Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, 11(42), 9–. doi:10.5897/ajar2016.11639

Majda, M., Robert, S. 2018. The role of auxin in cell wall expansion. **Int. J. Mol. Sci.** 19, 951. doi:10.3390/ijms19040951.

Mandavid H, Rodrigues AMS, Espindola LS, Eparvier V, Stien D. 2015. Secondary metabolites isolated from the Amazonian endophytic fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. **J. Nat. Prod.** 78: 1735–1739.

Marangoni, C.; Moura, N.F.; Garcia, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 6, n. 2, p. 95-112, 2012.

Mary, L.M.K., George, N.S.P., Mathew, N., & Varghese, S.E. 2017. Antioxidant activity of wax jambu. **European Journal of pharmaceutical and Medical Research**, 4 (10), 227-234.

Mekky, M.S.; Hassanien, A.M.A.; Kamel, E.M.; Ismail, A.E.A. (2019). Allelopathic effect of *Ocimum basilicum* L. extracts on weeds and some crops and its possible use as new crude bio-herbicide. **Annals of Agricultural Sciences**, (), S0570178319300399–. doi:10.1016/j.aoas.2019.12.005

Moura, Mariana S.; Lacerda, Jhuly W. F.; Siqueira, Kátia A.; Bellete, Barbara S.; Sousa, Paulo T.; Dalláglio, Evandro L.; Soares, Marcos A.; Vieira, Lucas C. C.; Sampaio, Olívia M. (2020). Endophytic fungal extracts: evaluation as photosynthesis and weed growth inhibitors. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, (), 1–7. doi:10.1080/03601234.2020.1721981

Munir E., Yurnaliza Y. , Lutfia A. and Hartanto, A. (2021). Antifungal activity and IAA production by endophytic fungi isolated from *Elettaria* sp. IOP Conf. Series: **Earth and Environmental Science** 782 (2021) 042037. doi:10.1088/1755-1315/782/4/042037

Muñoz, Marta; Torres-Pagán, Natalia; Peiró, Rosa; Guijarro, Rubén; Sanchez-Moreiras, Adela M.; Verdeguer, Mercedes (2020). Phytotoxic Effects of Three Natural Compounds: Pelargonic Acid, Carvacrol, and Cinnamic Aldehyde, against Problematic Weeds in Mediterranean Crops. **Agronomy**, 10(6), 791–. doi:10.3390/agronomy10060791.

Nadolska-Orczyk A, Rajchel IK, Orczyk W, Gasparis S. Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. **Theor Appl Genet.** 2017;130(6):1081–98.

Nagarajan K, Tong W, Leong C, Tan W. **Potential of Endophytic *Diaporthe* sp. as a New Source of Bioactive Compounds.** J. Microbiol. Biotechnol. 2021;31:493-500. <https://doi.org/10.4014/jmb.2005.05012>

Nagda, Vipin; Gajbhiye, Archana; Chhatwani, Dinesh Kumar (2017). Isolation and characterization of endophytic fungi from *Calotropis procera* for their antioxidant activity. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 10(3), 254–. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i3.16125

Nahar, L., Sarker, S. (2019). UPLC in phytochemical analysis. *Trends in Phytochemical Research*, 3(1), 1-2.

Nakashima K, Tomida J, Kamiya T, Hirai T, Morita Y, Hara H, et al. 2018. Diaporthols A and B: bioactive diphenyl ether derivatives from an endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Tetrahedron Lett.** 59: 1212–1215.

Nebo, L.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G.; Sampaio, O.M.; Severino, V.G.P.; Casal, C.M.; Fernandes, M.F.G.; Fernandes, J.B.; Macías, F.A. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the Rutaceae and Meliaceae families. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 226-232, 2014.

Niaz, S.I.; Khan, D.; Naz, R.; Safdar, K.; Ul Abidin, S.Z.; Khan, I.U.; Gul, R.; Khan, W.U.; Khan, M.A.U.; Lan, L. Antimicrobial and antioxidant chlorinated azaphilones from mangrove *Diaporthe perseae* sp. isolated from the stem of Chinese mangrove *Pongamia pinnata*. **J. Asian Nat. Prod. Res.** 2020.

Nirmala, C.; Bisht, Madho S.; Bajwa, H. K.; Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. **Trends in Food Science & Technology**, (), S0924224417305198–. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.003

Niu, Z.; Chen, Y.; Guo, H.; Li, S.N.; Li, H.H.; Liu, H.X.; Liu, Z.; Zhang, W. Cytotoxic polyketides from a deep-sea sediment derived fungus *Diaporthe phaseolorum* FS431. **Molecules** 2019, 24, 3062.

Noriler SA, Savi DC, Ponomareva LV, Rodrigues R, Rohr J, Thorson JS, et al. 2019. Vochysiamides A and B: two new bioactive carboxamides produced by the new species *Diaporthe vochysiae*. **Fitoterapia** 138: 104273.

Nováková, L., Matysová, L., Solich, P., 2006. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta** 68(3), 908-918.

Nurhaida, Nurhaida; Rashid, Syarifah A.; Ibrahim, Darah; Gholib, G.; Sutriana, A.; Engelhardt, A.; Duboscq, J.; Sahara Zamzami, R. (2020). The Potency of endophytic fungi from the bark of *Syzygium cumini* (L.) Skeels as antifungal agents. **E3S Web of Conferences**, 151(), 01006–. doi:10.1051/e3sconf/202015101006

Obare, R. M; Stephen A. I. and Matasyoh J. 2020. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from leaves of medicinal Plant *Leucas martinicensis* L. growing in a Kenyan tropical forest. **African Journal of Biochemistry Research**. Vol. 14(3), pp. 81-91, July-September 2020.

Patil M, Patil R, Mohammad S, Maheshwari V. 2017. Bioactivities of phenolics-rich fraction from *Diaporthe arengae* TATW2, an endophytic fungus from *Terminalia arjuna* (Roxb.). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 10: 396-402.

Pereira, V. de C. ; Grisi, P. U. ; Dodonov, P. ; Anese, S. ; Toffano, L. ; Gualtieri, S. C. J. (2014). Phytotoxic activity of *Serjania lethalis* on the germination and growth of *Panicum maximum*. **Biotemas** 2014 Vol.27 No.1 pp.29-35 ref.32

Petrini, O.; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret O. 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins** 1:185-196.

Pisochi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, 1,1, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.

Polonio JC, Ribeiro MAS, Rhoden SA, Sarragiotto MH, Azevedo JL, Pamphile JA. 2016. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. **Fungal Biol.** 120: 1600-1608.

Qin, Tian; Iwata, Takayuki; Ransom, Tanya T; Beutler, John A; Porco, John A. (2015). "Syntheses of Dimeric Tetrahydroxanones with Varied Linkages: Investigation of" Shapeshifting "Properties". **Jornal da American Chemical Society** 137 (48): 15225–33. doi:10.1021 / jacs.5b09825

Ranal, M.A.; Santana, D.G. How and why to measure the germination Process? **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, n.1, p.11 -1, de 2006.

Ravimannan N.,; Sepali E., (2020). Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from mangroves of *Jaffna Peninsula*, Sri Lanka. **African Journal of Plant Science**, 14(6), 4–. doi:10.5897/AJPS2020.1987

Rehner, S.A.; Uecker, F.A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Can. J. Bot.** 1994, 72, 1666–1674.

Revalska, M., Vassileva, V., Zechirov, G., Iantcheva, A., 2015. Is the auxin influx carrier LAX3 essential for plant growth and development in the model plants *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* and *Arabidopsis thaliana*? **Biotechnology & Biotechnological Equipment** 29 (4), 786–797.

Rial, C., Tomé, S., Varela, R.M. et al. Phytochemical Study of Safflower Roots (*Carthamus tinctorius*) on the Induction of Parasitic Plant Germination and Weed Control. **J Chem Ecol** 46, 871–880 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10886-020-01200-7>

Robert HS, Park C, Gutiérrez CL, Wojcikowska B, Pěňčík A, Novák O, Chen J, Grunewald W, Dresselhaus T, Friml J, et al. 2018. Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in *Arabidopsis*. **Nat Plants** 4: 548–553. doi:10.1038/s41477-018-0204-z

Rodríguez R.J.; White Jr, J.F.; Arnold, A.E.; Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, 182:314-30.

Rönsberg, D.; Debbab, A.; Mándi, A.; Vasylyeva, V.; Böhrer, P.; Stork, B.; Engelke, L.; Hamacher, A.; Sawadogo, R.; Diederich, M.; Wray, V.; Lin, W.; Kassack, M. U.; Janiak, C.; Scheu, S.; Wesselborg, S.; Kurtán, T.; Aly, A. H.; Proksch, P. (2013). Pro-Apoptotic and Immunostimulatory Tetrahydroxanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis longicolla*. **The Journal of Organic Chemistry**, 78(24), 12409–12425. doi:10.1021/jo402066b

Rossmann, A.Y.; Adams, G.C.; Cannon, P.F.; Castlebury, L.A.; Crous, P.W.; Gryzenhout, M.; Jaklitsch, W.M.; Mejia, L.C.; Stoykov, D.; Udayanga, D.; et al. Recommendations of generic names in *Diaporthales* competing for protection or use. **IMA Fungus** 2015, 6, 145–154.

Sălceanu C., Olaru L. (2017). Researches concerning weed control on potato. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru* (Annals of the University of Craiova - **Agriculture, Montanology, Cadastre Series**) Vol. XLVI

Sanodiya, B.S.; Thakur, G.S.; Baghel, R.K.; Pandey, A.K.; Bhogendra, G.; Prasad, K.S.; Bisen, P.S. 2010. Isolation and characterization of tenuazonic acid produced by *Alternaria alternata*, a potential bioherbicidal agent for control *Lantana camara*. **Journal of Plant Protection Research**, v.50: 133–139.

Santos, J. A. S., Sena, T. J. O., Costa, M. L. A. da, Santos, K. C. B. S., & Santos, A. F. dos. (2018). Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentale* L. e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas Journal**, 3(2), 455-474. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v3i2.637>

Santos, J.M.; Vrandecic, K.; Cosic, J.; Duvnjak, T.; Phillips, A.J.L. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia** 2011, 27, 9–19.

Santos, L.; Alves, A.; Alves, R. Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. **PeerJ** 2017, 5.

Saravanakumar K, Sriram B, Anbazhagan S, Hu X, Anand Mariadoss AV, MubarakAli D, Wang M-Hyeon, Molecular identification, volatile metabolites profiling, and bioactivities of an indigenous endophytic fungus (*Diaporthe* sp.), **Process Biochemistry** (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.002>

Scherer, R.; Godoy, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, fev. 2009.

Schlob S, Hackl T, Herz C, Lamy E, Koch M, Rohn S, et al. 2017. Detection of a toxic methylated derivative of phomopsin A produced by the legume-infesting fungus *Diaporthe toxica*. **J. Nat. Prod.** 80: 1930–1934.

Sganzerla, W. G; Rosa, G. B.; Ferreira, Ana Letícia A.; da Rosa, C. G.; Beling, P. C.; Xavier, L. O.; Hansen, Caroline M.; Ferrareze, J. P.; Nunes, M. R.; Barreto, P. L. M.; de Lima Veeck, A. P. (2020). Bioactive food packaging based on starch, citric pectin and functionalized with *Acca sellowiana* waste by-product: Characterization and application in the postharvest conservation of apple. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147(), 295–303. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.074



Sharma V, Singamaneni V, Sharma N, Kumar A, Arora D, Kushwaha M, et al. 2018. Valproic acid induces three novel cytotoxic secondary metabolites in *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Datura inoxia* Mill. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 28: 2217-2221.

Siddiqui, Z. H.; Abbas Z. H.; Assessment of phytotoxicity of treated water of Tabuk wastewater plant by different technologies on seed germination of chick pea (*Cicer arietinum*). *Water Sci Technol* 2021; wst2021287. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2021.287>

Silva, K.F. Sapindaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. USP, 2011.

Soltani J., New Futur. Dev. **Microb. Biotechnol. Bioeng.**, Elseiver, 2016, pp. 275–292.

Sousa J.P.B., et al. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. *J Appl Microbiol.* 2016;120:1501–8.

Souza Filho, A.P.S.; Guilhon, G.M.S.P.; Santos, L.S. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão crítica. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

Souza, Angélica Rossana Castro de; Baldoni, Daiana Bortoluzzi; Lima, Jessica; Porto, Vitória; Marcuz, Camila; Machado, Carolina; Ferraz, Rafael Camargo; Kuhn, Raquel C.; Jacques, Rodrigo J.S.; Guedes, Jerson V.C.; Mazutti, Marcio A. (2016). Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, (), S1517838216309017. doi:10.1016/j.bjm.2016.09.004

Strader, L. C.; Chen, G. L.; Barte, B. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. **The Plant Journal**, v. 64, p. 874-884, 2010.

Tanapichatsakul C, et al. Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. **Curr Microbiol.** 2018;75:476–83

Tanase, Corneliu (2019). Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants. , **Polyphenols in Plants**, 45–58. doi:10.1016/B978-0-12-813768-0.00003-7

Taney JB, McMullin DR, Green BD, Miller JD, Seifert KA. 2016. Production of antifungal and antiinsectan metabolites by the Picea endophyte *Diaporthe maritima* sp. nov. **Fungal Biol.** 120: 1448-1457.

Tanveer, A.; Jabbar, M.K.; Kahliq, A.; Matloob, A.; AbbaS, R.N.; Javaid, M.M. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. on germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

Tawfike, Ahmed F.; Romli, Muhammad; Clements, Carol; Abbott, Gráinne; Young, Louise; Schumacher, Marc; Diederich, Marc; Farag, Mohamed; Edrada-Ebel, Ru Angelie (2019). Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. **Journal of Chromatography B**, (), S1570023218315666–. doi:10.1016/j.jchromb.2018.12.032.

Tian W, Liao Z, Zhou M, Wang G, Wu Y, Gao S, et al. 2018. Cytoskyrin C, an unusual asymmetric bisanthraquinone with cage-like skeleton from the endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Fitoterapia** 128: 253-257.

Tong, W. Y., Leong, C. R., Tan, W. N., Khairuddean, M., Zakaria, L., & Ibrahim, D. (2017). Endophytic *Diaporthe* sp. ED2 Produces a Novel Anti-Candidal Ketone Derivative. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27(6), 1065–1070. <https://doi.org/10.4014/jmb.1612.12009>

Van Rensburg JCJ, Lamprecht SC, Groenewald JZ, Castlebury LA, Crous PW (2006) Characterization of *Phomopsis* spp. Associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. **Studies in Mycology** 55: 65–74.

Varejão, E.V.V., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Barreto, R.W. 2013. Phytotoxic effects of metabolites from *Alternaria euphorbiicola* against its host plant *Euphorbia heterophylla*. **Química Nova**, v.36: 1004-1007.

Vargas, Sharmely Hilares et al. Phytotoxic potential of aqueous leaf extract of *Tocoyena formosa* and *Rudgea*. **Revista Ceres** [online]. 2019, v. 66, n. 5, pp. 380-386. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201966050007>.

Vattuone, M. A.; Sampietro, D.A; Soberón, R. ET AL. Plant sampling and sample preparation. IN: Sampietro, D.A.; Catalan, C.A.N.; Vattuone, M.A.; Narwal,S.S. (eds.) Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products. **Science Publishers, Enfield, NH, USA**. p. 377-398. 2009.

Vela, F.; Anese, S.; Varela, R.M.; Torres, A.; Molinillo, J.M.G.; Macías, F.A. Bioactive Diterpenes from the Brazilian Native Plant (*Moquiniastrum pulchrum*) and Their Application in Weed Control. **Molecules** 2021, 26, 4632. <https://doi.org/10.3390/molecules26154632>

Verdeguer, M.; García-Rellán, D.; Boira, H.; Pérez, E.; Gandolfo, S.; Blázquez, M. A. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. **Molecules**, v. 16, p. 403-411, 2011.

Vieira, N. C.; Cortelo, P. C.; Castro-Gamboa, I. Rapid qualitative profiling of metabolites present in *Fusarium solani*, a rhizospheric fungus derived from *Senna spectabilis*, using GC/MS and UPLC-QTOF/MSE techniques assisted by UNIFI information system. **European Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 281–291, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1469066720922424>

Vuong, Q. V. et al. Physicochemical, antioxidant and anti-cancer activity of a *Eucalyptus robusta* (Sm.) leaf aqueous extract. **Industrial Crops and Products**, v. 64, n. 1, p. 167–174, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.061>

Wang, Hong-Wei; Zhang, Wei; Su, Chun-Lun; Zhu, Hong; Dai, Chuan-Chao (2015). Biodegradation of the phytoestrogen luteolin by the endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. **Biodegradation**, 26(3), 197–210. doi:10.1007/s10532-015-9727-4

Wang, Z., Sun, Z., Xiao, L., Zhou, Y., & Du, F. (2019). Herbicidal Polyketides and Diketopiperazine Derivatives from *Penicillium viridicatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. doi:10.1021/acs.jafc.9b06116

Widjajanti, H., Handayani, C. V., & Nurnawati, E. (2021). Antibacterial Activity of Endophytic Fungi from Sembukan (*Paederia foetida* L.) Leaves. **Science and Technology Indonesia**, 6(3), 189–195. <https://doi.org/10.26554/sti.2021.6.3.189-195>

Wu Z. H., et al. Antioxidant xanthenes and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Chin J Nat Med**. 2018;16:219–24.

Wu, Y.Z.; Zhang, H.W.; Sun, Z.H.; Daí, J.G.; Hu, Y.C.; Li, R.; Lin, P.C.; Xia, G.Y.; Wang, L.Y.; Qiu, B.L.; et al. Bysspectin A, an unusual octaketide dimer and the precursor derivatives from the endophytic fungus *Byssochlamys spectabilis* IMM0002 and their biological activities. **Eur. J. Med. Chem**. 2018, 145, 717–725.

Xu, T.-C.; Lu, Y.-H.; Wang, J.-F.; Song, Z.-Q.; Hou, Y.-G.; Liu, S.-S.; Liu, C.-S.; Wu, S.-H. Bioactive Secondary Metabolites of the Genus *Diaporthe* and Anamorph *Phomopsis* from Terrestrial and Marine Habitats and Endophytes: 2010–2019. **Microorganisms** 2021, 9, 217. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020217>

Yadav, M., Yadav, A., & Yadav, J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 7 (Suppl 1), S256-S261.

Yang, R.; Dong, Q.; Xu, H.; Gao, X.; Zhao, Z.; Qin, J.; Chen, C.; Luo, D., (2020). Identification of Phomoxanthone A and B as Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors. **ACS Omega**, (), [acsomega.0c03315](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03315)–. doi:10.1021/acsomega.0c03315

Yang, Z.J.; Zhang, Y.F.; Wu, K.; Xu, Y.X.; Meng, X.G.; Jiang, Z.T.; Ge, M.; Shao, L. New azaphilones, phomopsones A-C with biological activities from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. CGMCC No.5416. **Fitoterapia** 2020, 145.

Yedukondalu N, et al. Diapolic acid A-B from an endophytic fungus, *Diaporthe terebinthifolii* depicting antimicrobial and cytotoxic activity. **J Antibiot.** 2017;70:212–5.

Yenn TW, et al. Endophytic *Diaporthe* sp. ED2 produces a novel anti-candidal ketone derivative. **J Microbiol Biotechnol.** 2017; 27:1065–70

Yoshimura, H., Sawa, Y., Tamotsu, S. & Sakai, A. 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of by-2 cultured tobacco cells. **Journal Chemical Ecology**, v.37, p.320-328, 2011.

Zhang, H.W.; Song, Y.C.; Tan, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, 23:753–771, 2006.

Zhao, Y. (2018). Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 417–435. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040226.

Zheng Z, Guo Y, Novák O, ChenW, Ljung K, Noel JP, Chory J. 2016. Local auxin metabolism regulates environmentinduced hypocotyl elongation. **Nat Plants** 2: 16025. doi:10 1038/nplants.2016.25