

VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA DO FUNGO ENDOFÍTICO *DIAPORTHE* SP. ISOLADO DE *CLITORIA GUIANENSIS* BENTH UTILIZANDO OSMAC

VARIATION OF THE METABOLIC PRODUCTION OF THE ENDOPHYTIC FUNGUS *DIAPORTHE* SP. OF *CLITORIA GUIANENSIS* BENTH USING OSMAC

BOAES, Tatiane da Silva¹; ARRUDA, Gabriel Leda de²; FERREIRA, Talita Pereira de Souza³; CHAGAS JUNIOR, Aloisio Freitas⁴; CHAPLA, Vanessa Mara^{5*}.

^{1,2,3,5} Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, Colegiado de Ciências Exatas e Biotecnológicas

⁴ Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, Colegiado de Ciências Agrárias

* Autor correspondente
e-mail: vmchapla@mail.uft.edu.br

Received 03 June 2019; received in revised form 15 July 2019; accepted 19 July 2019

RESUMO

O crescente número de genomas sequenciados de fungos tem revelado um grande número de *clusters* biossintéticos de metabólitos secundários que ainda são desconhecidos, o que revela a real e vasta capacidade biossintética ainda não explorada e permite ainda compreender novas rotas de síntese, substâncias e propriedades biológicas em grupamentos genéticos silenciados. O objetivo desse trabalho foi detectar novos produtos naturais oriundos do cultivo de microrganismos em diferentes condições de fermentação utilizando estratégias como o OSMAC. Foram analisados três extratos brutos (**A**, **B** e **C**), obtidos do fungo endofítico *Diaporthe* sp. isolado de *Clitoria guianensis*, por CLAE-DAD e RMN de ¹H. As análises mostraram diferença na produção de metabólitos secundários nos diferentes meios de cultivo. O extrato **C** produziu um maior número de metabólitos secundários. Os extratos brutos foram submetidos a atividade antioxidante e aleloquímica, os três extratos brutos apresentaram atividade positiva para os dois ensaios. Foram identificados flavonas, flavonóis e xantonas em todos os extratos bruos, alcaloides nos extratos **A** e **C**, e esteróides e triterpenóides no extrato **C**.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Atividade antioxidante. Atividade aleloquímica. OSMAC. *Diaporthe* sp.

ABSTRACT

The increasing number of sequenced genomes of fungi has revealed a large number of biosynthetic clusters of secondary metabolites that are still unknown, which reveals the real and vast biosynthetic capacity not yet explored and allows to understand new routes of synthesis, substances and biological properties in silenced genetic clusters. The objective of this work was to detect new natural products from the cultivation of microorganisms under different fermentation conditions using strategies as OSMAC. Three crude extracts (**A**, **B** and **C**) obtained from the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from *Clitoria guianensis*, were submitted to HPLC-DAD and ¹H-NMR analyses. The analyzes showed differences in the production of secondary metabolites in the different culture media. Extract **C** led to a higher number of secondary metabolites. The crude extracts were submitted to antioxidant and allelochemical activity, the three crude extracts presented positive activity for both assays. Flavones, flavonols and xanthonas were identified in all crude extracts, alkaloids in extracts **A** and **C**, and steroids and triterpenoids in extract **C**.

Keywords: Endophytic fungi. Antioxidant activity. Allelochemical activity. OSMAC. *Diaporthe* sp.

1. INTRODUÇÃO:

Compostos biologicamente ativos e únicos podem ser produzidos por microrganismos, como fungos e bactérias e terem aplicações em diversas áreas, como na agricultura: na prospecção e produção de novos compostos inibitórios ou estimulantes de crescimento vegetal; nas indústrias alimentícias e farmacêutica: em suplementação alimentar, produção de pigmentos e conservantes naturais, assim como novas substâncias antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas. Entretanto, a maioria dos genes responsáveis pela biossíntese desses compostos podem estar desativados sob condições de cultura padrão (Pang *et al.*, 2018; Seyedsayamdost, 2019). Desta forma, a abordagem de métodos, como o *one strain many compounds* (OSMAC), termo que foi introduzido em 1999 por Schiewe e Zeeck, são essenciais para ativar a expressão desses genes, onde pequenas alterações nas condições de cultivo, como por exemplo, diferentes temperaturas, meios de cultura, condições de luz, pH, fonte de carbono, nitrogênio e concentração de sal podem ser eficientes no acúmulo de produtos naturais (Pang *et al.*, 2018; Seyedsayamdost, 2019; Abdelwahab *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Zhang *et al.* (2019), comprova a eficiência do método OSMAC para gerar diversidade de compostos pelo fungo *Verticillium dahliae*, onde este produziu mais metabólitos quando acrescentado Mg^{2+} extra na fermentação, e que com a adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, sete novos diterpenóides tipo guanacastano foram produzidos.

A ocorrência de classes de metabólitos secundários como xantonas é relatada sendo produzida pelo gênero *Diaporthe* (Chepkirui, Sandler, 2017). Esses compostos apresentam múltiplas atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Mineiro *et al.*, 2017). Cui *et al.* (2017), relatam a identificação de seis novos alcalóides do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*, isolado de ramos da planta *Acanthus ilicifolius*, dois alcalóides mostraram efeitos inibidores do crescimento em linhagens celulares de câncer.

Já a presença de esteróides e triterpenóides citado por Li (2016), que identificou esteróides e triterpenóides produzidos por *Diaporthe* sp. isolados de folhas de *Mahonia fortunei* coletas em Xangai na China. Os esteróides são promissores para o tratamento de diferentes classes de cânceres (Nikolića *et al.*, 2018), enquanto os triterpenóides apresentam

atividades hepatoprotetora, hipoglicêmica, imunomoduladora, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (Zhou *et al.*, 2017). O gênero *Diaporthe* é uma rica fonte de novos compostos bioativos (Souza *et al.*, 2017), por isso a importância de se detectar os metabólitos secundários produzidos por este gênero de fungos, bem como utilizar estratégias que possam ativar genes para aumentar a produção metabólica. Neste intuito o objetivo deste trabalho foi utilizar o método OSMAC para maximizar a diversidade metabólica do fungo endofítico *Diaporthe* sp. Este trabalho descreve a variação na produção de metabólitos secundários de acordo com os diferentes meios de fermentação do fungo endofítico *Diaporthe* sp. bem como a avaliação das atividades antioxidante e aleloquímicas dos extratos obtidos.

2. DESENVOLVIMENTO:

2.1. Isolamento e Identificação do fungo endofítico

O fungo endofítico codificado como CG-F6 foi isolado de folhas sadias de *Clitoria guianensis* Benth, coletada na Estação Experimental da Universidade Federal do Tocantins no campus Universitário de Gurupi (11°43'45"S 49°04'07"W), de acordo com metodologia descrita (Silva *et al.*, 2005; Chapla *et al.*, 2013). Uma exsiccata da planta foi depositada no Herbário do Tocantins – UFT/Porto Nacional com o número 10.637.

Para caracterização molecular, foi realizado a extração do DNA do micélio do fungo seguindo o protocolo de cTAB adaptado (Venkateswarulu *et al.*, 2018). As amostras de DNA foram amplificadas usando os primers ITS-1 e ITS-4 e purificadas com Kit Purilink PCR Purification (Invitrogen®). A amostra de DNA foi sequenciada por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v.3.1.

A sequência de nucleotídeos obtida foi comparada com as depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa BLASTn. Foram escolhidas algumas sequências baseadas no melhor valor obtido relacionado à similaridade e também foi utilizado sequências utilizadas por Souza *et al.* (2017). Após as sequências determinadas foram submetidas ao alinhamento utilizando o programa MAFFT, e utilizando o programa MEGA versão 6.0 foi construído a

árvore filogenética pelo método *neighbor-joining* com bootstrap 2000.

2.2. Cultivo do fungo endofítico para obtenção dos extratos brutos

O fungo endofítico foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA (*Batata Dextrose Agar*) e incubado a temperatura de 25°C por 7 dias. A seguir foi realizado a inoculação em meio líquido e em meio sólido.

O fungo endofítico foi inoculado em 6 frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 300 mL de meio de cultivo CBD (*Caldo de Batata e Dextrose*), sendo que em 3 frascos foi adicionado NaBr (5 g.L⁻¹). Os 6 frascos foram mantidos em modo estático a temperatura 25°C por 15 dias. Após esse período os caldos foram separados do micélio por filtração. O filtrado dos meios líquidos CBD e CDB + NaBr foram submetidos a partição líquido/líquido com acetato de etila (3 x 300 mL AcOEt), a seguir foram secos com Mg₂SO₄, filtrados e concentrados em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto AcOEt CBD (0,172 g, **Extrato A**) e o extrato bruto AcOEt CBD + NaBr (0,308 g, **Extrato B**).

Em 3 sacos de polietileno foram adicionados 180 g de arroz (CRISTAL®) e 160 mL de água destilada que foram autoclavados durante 20 minutos a 121°C, por um período de dois dias consecutivos, a cada 24 horas. Após a esterilização do meio, o fungo endofítico foi inoculado no arroz esterilizado e incubado em câmara BOD (Demanda Bacteriológica de Oxigênio) por 21 dias a 25°C. Após este período, o meio de cultivo foi macerado com AcOEt (4x a cada 12 h). O líquido filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, fornecendo o extrato bruto AcOEt, que foi solubilizado em clorofórmio e submetido a uma partição líquido/líquido com água destilada (3 x 50 mL). A fração clorofórmio foi concentrada em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto CHCl₃. Este foi solubilizado em solução aquosa de metanol 80% e submetido novamente a uma partição líquido/líquido com hexano (3 x 50 mL). A fase hexânica e metanólica resultantes foram concentradas em evaporador rotativo, fornecendo os extratos brutos da fase hexano (1,450 g) e metanol (0,348 g, **Extrato C**).

2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN de ¹H)

Os cromatogramas dos extratos **A**, **B** e **C** foram obtidos em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Shimadzu: bomba Shimadzu LC-10AD; auto injetor Shimadzu SIL-10A; detector Ultravioleta, em arranjo de diodos, Shimadzu SPD-M10A. Foi utilizado gradiente exploratório com coluna analítica Phenomenex tipo Luna (C-18, 250 x 4,60 mm e 5 µm) e eluição com H₂O:CH₃OH (95:05 v/v a 0:100% em 45 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 min.), com uma vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Os espectros de RMN de ¹H (600 MHz) dos extratos **A**, **B** e **C** foram obtidos em espectrofotômetro Bruker Avance III HD 600 utilizando sinal de solvente residual não deuterado como referência.

2.4. Avaliação das classes de metabólitos secundários

Os extratos **A**, **B** e **C** foram analisados para detectar as principais classes de metabólitos secundários pelas reações químicas que resultam no aparecimento de cor ou precipitado. A presença da classe de metabólito secundário foi registrada como positivo (+) e a ausência de cor e precipitação como negativo (-) seguindo a metodologia de Barbosa *et al.* (2004).

As classes antocioninas, antocionidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chaconas, auronas e flavanonóis foram identificadas dissolvendo 20 mg dos extratos seco em 20 mL de água destilada e filtrando-o com algodão. Logo após 3 mL da solução foram transferidos para três tubos de ensaio, o primeiro tubo foi acidulado a pH 3 com solução de HCl 0,5 mol/L, e os dois restantes foram alcalinizados a pH 8,5 e 11 com solução de NaOH 0,5 mol/L. Observou-se a mudança de coloração (Barbosa *et al.*, 2004).

A Identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas foi realizada utilizando a solução dos extratos preparada anteriormente, adicionou-se 3 mL da solução em dois tubos de ensaio, o primeiro tubo foi acidificado com solução de HCl 0,5 mol/L a pH 1-3 e o segundo tubo foi alcalinizado com solução NaOH 0,5 mol/L a pH 11. Em seguida os tubos foram submetidos a um aquecimento durante 2 minutos e observou-se mudanças na coloração (Barbosa *et al.*, 2004).

Os esteróides e triterpenóides foram identificados pela dissolução de 5 mg dos extratos em 10 mL de clorofórmio. Filtrou-se com algodão e transferiu o filtrado para um tubo de

ensaio completamente seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente, logo em seguida foi adicionado 3 gotas de H₂SO₄ concentrado e tornou-se a agitar. Foi observado se havia rápido desenvolvimento de cores, que iam do azul efervescente, ao verde persistente que indicavam resultado positivo (Barbosa *et al.*, 2004).

Para a identificação de alcaloides, foi preparado previamente o reativo de Bouchardat (4 g de iodeto de potássio, 2 g de iodo ressublimado em 100 mL de água destilada). Foi então dissolvido 5 mg dos extratos em 2 mL de solução de HCl a 5%, filtrou com algodão e adicionou algumas gotas do reativo, onde a formação de um precipitado laranja avermelhado indicava resultado positivo (Barbosa *et al.*, 2004).

A presença ou ausência dos grupos de metabólitos secundários foi verificada a partir da observação da reação característica esperada ou não, indicando a presença de resultado positivo ou negativo para cada grupo e constituinte analisado (Barbosa *et al.*, 2004).

2.5. Avaliação da atividade antioxidante

Os extratos **A**, **B** e **C** foram avaliados quanto à reatividade com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) utilizando o método por cromatoplaça (Simões-Pires *et al.*, 2005). Os extratos foram aplicados em placa de sílica gel 60 F254 pré-prontas (Filter-Bio) e eluídas com acetato de etila:hexano (3:7 v/v). A cromatoplaça foi borrifada com uma solução metanólica 0,2% de DPPH, depois deixada sob a luz artificial por cerca de 20 minutos. O potencial antioxidante foi evidenciado pela presença de manchas amarelas.

2.6. Avaliação da atividade aleloquímica

Para avaliação da atividade aleloquímica dos extratos **A**, **B** e **C** foi seguindo a metodologia descrita por Paula *et al.* (2014) com algumas adaptações, onde foram utilizadas placas de Petri forradas com papel filtro, previamente autoclavadas por 20 minutos a 121° C, após foi adicionado 1 mL da solução dos extratos, que foram preparados nas concentrações de 2000, 1000, 500 e 100 µg.mL⁻¹, e deixado em bancada por 24 horas para a evaporação do solvente.

Após as 24 horas, foi adicionado 5 mL de água destilada em cada placa e sobre elas foram semeadas 15 sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) (ELBA®). Para controle, foi utilizado o mesmo

procedimento, no entanto apenas adicionando 5 mL de água destilada.

As placas de Petri foram deixadas sob bancada por 5 dias a ±35 °C com fotoperíodo de 12 horas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão da radícula. Após o período de 5 dias foi avaliado a porcentagem de sementes germinadas e comprimento da raiz e total das plântulas. O teste foi realizado em triplicata e os valores do comprimento da raiz e total das plântulas foram submetidos à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.6 e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise molecular da região ITS do fungo endofítico CG-F6 mostrou similaridade com diversas espécies do gênero *Diaporthe*. No entanto, não foram encontradas divergências significativas entre estas espécies nesta região para permitir a identificação ao nível de espécie. O clado filogenético formado não apoiou a separação das espécies (baixo valor de bootstrap) (Figura 1). Segundo Mattei *et al.* (2013) a identificação por morfologia, características culturais e associação com o hospedeiro das espécies do complexo *Diaporthe/Phomopsis* nem sempre são conclusivas e que a identificação desses fungos se baseia principalmente pela análise de sequências da região ITS, embora outras regiões genômicas também possam ser utilizadas.

Nos extratos brutos do fungo endofítico *Diaporthe* sp. analisados CLAE, foi observado a produção de diversos compostos que variaram de polaridade. Foi possível observar a sobreposição de picos (mesmo tempo de retenção) nos três extratos brutos, mas também foi observado picos com tempos de retenção distintos para cada extrato bruto, indicando dessa forma a produção variada de metabólitos secundários de acordo com o substrato da fermentação.

O cromatograma que apresentou maior número de picos foi o do extrato **C**, o que implica em uma maior diversidade na produção de substâncias em comparação com os demais perfis. Essa variabilidade pode estar ligada ao fato do meio de cultivo do extrato **C** ser o de arroz e ser um meio complexo. Assim a disponibilidade de água, nutrientes e salinidade podem levar a um ambiente diferente do de

habitat do fungo, onde o mesmo busca se adaptar as novas condições, e assim levando a produção de compostos que ajudem nessa adaptação (Specian *et al.*, 2014).

Comparando os espectros de RMN de ^1H , observou-se que os espectros dos extratos **A** e **B** apresentaram sinais semelhantes de compostos aromáticos e carbinólicos. Foi possível identificar o ácido nitropropiónico (**1**) como componente majoritário no extrato **A**, estando também presente no extrato **B**, contudo no extrato **C** não foi identificado a presença do ácido nitropropiónico. No espectro de RMN de ^1H do extrato **C** foi possível identificar um número maior de sinais, evidenciando uma produção metabólica variada, superior aos dos demais extratos.

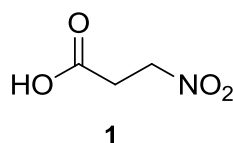


Figura 2. Estrutura do ácido nitropropiónico (**1**)

A avaliação fitoquímica realizada nos extratos **A**, **B** e **C** permitiu identificar a presença das classes de metabólitos secundários. O extrato **C** apresentou resultado positivo para um número de classes de metabólitos secundários superior aos demais extratos (Tabela 1), demonstrando assim que o fungo endofítico *Diaporthe* sp. quando cultivado em arroz foi capaz de produzir maior diversidade de metabólitos. O que está de acordo com as análises de CLAE e RMN de ^1H . O gênero *Diaporthe* é relatado pela produção de xantonas, alcaloides, esteróides e triterpenóides (Chepkirui *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2017; Li, 2016).

Tabela 1: classes de metabólitos secundários identificadas nos extratos brutos de *Diaporthe* sp.

Extrato bruto	Classes de metabólitos secundários identificados ¹⁸
A	Flavonas, flavonóis, xantonas e alcaloides.
B	Flavonas, flavonóis e xantonas.
C	Flavonas, flavonóis e xantonas, alcaloides, esteróides e triterpenóides.

A partir da avaliação qualitativa dos extratos **A**, **B** e **C** revelada com solução

metanólica do radical DPPH (0,2%), foi possível observar a presença de substâncias antioxidantes em todos os extratos avaliados. Esta atividade pode ser devido a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, substâncias estas que já foram identificadas e descritas como possuindo atividade antioxidante.

Em um estudo realizado por Tanapichatsakul *et al.* (2018), relata uma grande atividade antioxidante para extratos de dois endófitos identificados como sendo do gênero *Diaporthe* isolados de flores de *Melodorum fruticosum*. Já Nath, Raghunatha e Joshi (2012) relatam atividade antioxidante para extratos brutos de endofíticos isolados de *Embllica officinalis*, dentre eles o *Diaporthe* sp., com atividade antioxidante moderada, desta forma demonstrando que seu potencial antioxidante pode ser utilizado como antioxidante natural em indústrias alimentícias e outras preparações farmacêuticas.

Em relação a atividade aleloquímica (Tabela 2) os extratos brutos não influenciaram significativamente a germinação das sementes de alface quando comparado com seus respectivos controles. Isto pode ser devido a germinação normalmente ser o processo menos afetado pelos aleloquímicos e que em alguns casos o efeito destes podem ocorrer sobre outro parâmetro, como crescimento da plântula (Paula *et al.*, 2014).

Avaliando-se o crescimento das plântulas (Tabela 2), observou-se que quando comparado os valores obtidos com seus respectivos controles, os três extratos provocaram redução do comprimento, tanto da raiz, com exceção apenas da concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato **C**, quanto do crescimento total.

Comparando o efeito em cada concentração observou-se que a concentração $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que mais afetou tanto o crescimento da raiz quanto o crescimento total. Este efeito pode ser devido a maior concentração dos compostos químicos presentes. O extrato que mais contribuiu para a redução do comprimento da plântula foi o extrato **C** sob influência da concentração $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com 68,7% e 67,8 % de inibição do crescimento da plântula e da raiz, respectivamente, provavelmente o maior efeito aleloquímico deste pode estar ligado a presença de alcaloides, esteróides e triterpenóides (Oliveira *et al.*, 2014).

Estudos realizados por Zamberlam *et al.* (2012) relatam o efeito aleloquímico das citosporonas A, B e C que foram isoladas de

fungos endofíticos como o *Diaporthe* sp. A citosporona A foi a que apresentou melhores resultados inibindo 100% da germinação das sementes na concentração 2,5 mg.mL⁻¹, e reduzindo o crescimento da raiz e da parte aérea em todas as concentrações avaliadas.

4. CONCLUSÕES:

Os diferentes tipos de substrato para o cultivo influenciaram na produção metabólica do fungo endofítico *Diaporthe* sp., isolado de *Clitoria guianensis* Benth, demonstrando a eficácia em se utilizar o método OSMAC para gerar diversidade na produção de metabólitos secundários. Foi possível verificar que o cultivo do fungo em arroz foi o que gerou maior diversidade metabólica, sendo identificado, por ensaio químico, as classes flavonas, flavonóis, xantonas, esteróides, triterpenóides e alcaloides.

Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante qualitativa, esta atividade pode ser devido a presença de flavonas, flavonóis e xantonas presentes nos extratos. A atividade aleloquímica foi evidenciado em todos os extratos. No entanto a concentração de 2000 µg.mL⁻¹ do extrato **C** foi o que mais se destacou pela redução do crescimento das plântulas. Evidenciado o fungo endofítico *Diaporthe* sp. como uma fonte promissora de compostos bioativos.

5. AGRADECIMENTOS:

O desenvolvimento desta pesquisa contou com benefícios do Programa Novos Pesquisadores da UFT (Propesq/UFT). À Angela Regina Araújo do Instituto de Química da Unesp/Araraquara pelas análises espectrométricas e CLAE.

6. REFERÊNCIAS:

1. Abdelwahab, M. F.; Kurtán, T.; Mádin, A.; Muller, W. E.; Fouad, M. A.; Kamel, M. S.; Lui, Z.; Embrahim, W.; Deletos, G.; Proksch P. *Tetrahedron Letters* **2018**, 59, 2647.
2. Barbosa, W. L. R.; Quignard, E.; Tavares, I. C. C.; Pinto, L. N.; Oliveira, F. Q.; Oliveira, R. M. *Revista Científica da UFPA* **2004**, 4, 1.
3. Chapla, V. M.; Biasetto, C. R.; Araújo, A. R. *Revista Virtual de Química* **2013**, 5, 421.
4. Chepkirui, C.; Standler, M. *Mycol Progress* **2017**, 16, 477.
5. Cui, H. Yu, J.; Chen, S.; Ding, M.; Huang, X. Yuan, J.; Ela, Z. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27, 803.
6. Fan, B.; Parrot, D.; Blumel, M.; Labes, A. *Marine drugs* **2019**, 17, 1.
7. Frisvad, J. C. Em *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*; Zeilinger, S.; Martín, J. F.; Estrada, C. G.; eds.; Springer, 2015, cap. 7.
8. Li, G.; Dissertação de Mestrado, Technische Universität Dortmund, 2016.
9. Lima Neto, G. A.; Kaffashi, S.; Luiz, W. T.; Ferreira, Silva, W. R. Y. D.; Pazin, G. V.; Violante, I. M. P. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2015**, 17, 1069.
10. Mattei A.S.; Severo C. B.; Guazzelli L.S.; Oliveira F.M.; Gené J.; Guarro J.; Cano J.; Severo L.C. *Medical Mycology Case Reports*, **2013**, 2, 85.
11. Mineiro, T. Y. P.; Pires, T. P. R. S.; Mendonça, C. J. S.; Gomes, N. F.; Silva, F.C.; Maciel, A. P. *Resumo do 57º Congresso Brasileiro de Química*, Gramado, Brasil, 2017.
12. Nath, A.; Raghunatha, P.; Joshi, S. R. *Microbiology* **2012**, 40, 1, 8.
13. Nikolića, A. R.; Kuzminaca, I. Z.; Jovanović-Šantaa, S. S.; Jakimovb, D. S.; Aleksićb, L. D.; Sakač, N. M. *Steroids* **2018**, 135, 101.
14. Oliveira, A. K. M.; Pereira, K. C. L.; Muller, J. A. I.; Matias, R. *Horticultura Brasileira* **2014**, 32, 1, 41.
15. Paula, C. S.; Canteli, V. C. D.; Verdam, M. C. S.; Kalegari, M.; Campos, R.; Hirota, B. C. K.; Miguel, O.G.M.; Miguel, M. D. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2014**, 35, 47.
16. Pang, X.; Zhang, S.; Chen, H.; Zhao, W.; Yang, D.; Xian, P.; Xu, L.; Tao, Y.; Fu, H.; Yang, L. *Tetrahedron Letters* **2018**, 59, 4566.
17. Seyedsayamdost, M. R. Toward a global picture of bacterial secondary metabolism.

18. Silva, G. H.; Teles, H. L.; Trevisan, H. C.; Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Eberlin, M. N.; Haddad, R.; Costa-Neto, C. M.; Araujo, A. R. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, 16, 1463.
19. Simões-Pires, C. A.; Queiroz, E. F.; Henriques, A. T.; Hostettmann, K. *Phytochemistry Analysis* **2005**, 16, 307.
20. Souza, A. R. C.; Baldoni, D. B.; Lima, J.; Porto, V.; Marcuz, C.; Machado, C.; Ferraz, R. C.; Kuhn, R. C.; Jacques, R. J. S.; Guedes, J. V. C.; Mazutti, M. A. *Brazilian Journal of Microbiology* **2017**, 48, 101.
21. Specian, V.; Orlandelli, R. C.; Felber, A. C.; Azevedo, J. L.; Pamphile, J. A. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, **2014**, 16, 4, 345.
22. Tanapichatsakul C.; Monggoot S.; Gentekaki E.; Pripdeevech P. *Current Microbiology* **2018**, 75, 4, 476.
23. Venkateswarulu, N.; Shameer, S.; Bramhachari, P. V.; Thaslim Basha, S. K.; Nagaraju, C.; Vijaya, T. *Biotechnology Reports* **2018**, 20.
24. Zamberlam, C. E. M.; Meza, A.; Leite, C. B.; Marques, M. R.; Lima, D. P.; Beatriz, A. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, 23, 1, 124.
25. Zhang, H.; Yang, M.; Xiao, Y. Y. L.; Ling, B. C. Y.; Kong, Y. P. L. *Fitoterapia* **2019**, 133, 219.
26. Zhou, M.; Zhang, R. H.; Wang, M. Xu, G. B.; Liao, S.G. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 131, 222.

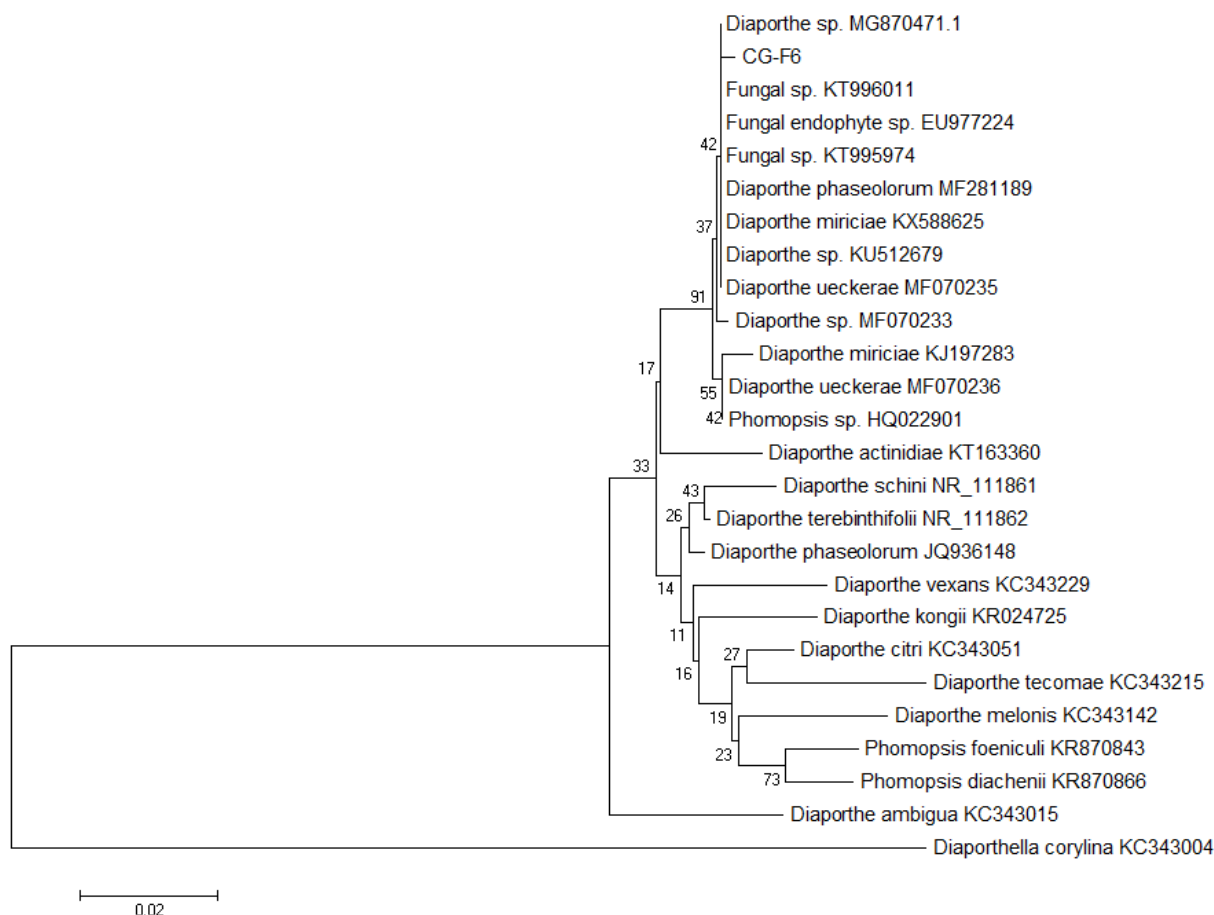


Figura 1: Árvore filogenética obtida a partir do método neighbor-joining com bootstrap 2000 utilizando sequências da região ITS de 26 estirpes fúngicas

Tabela 2. Valores médios do comprimento (mm) total de plântulas e da raiz de plântulas de alface frente aos extratos **A**, **B** e **C**.

Fator/tratamento		Controle [*]	2000µg.mL ^{-1*}	1000µg.mL ^{-1*}	500µg.mL ^{-1*}	100µg.mL ^{-1*}	CV(%) ^{**}
Extrato A	Germinação	71 %	62 %	66 %	66 %	64 %	-
	Plântulas total	47,80 a	18,80 e	29,60 d	38,50 c	43,60 b	6,62
	Raiz	23,60 a	13,20 d	12,00 d	16,00 c	18,00 b	7,42
Extrato B	Germinação	75 %	66 %	75 %	82 %	68 %	-
	Plântulas total	46,40 a	24,80 e	31,30 d	39,40 c	44,10 b	3,62
	Raiz	20,80 a	10,00 d	15,60 c	17,70 b	18,70 b	5,56
Extrato C	Germinação	75 %	60 %	80 %	75 %	77 %	-
	Plântulas total	45,10 a	14,10 d	15,30 d	36,10 c	43,20 b	4,61
	Raiz	24,20 a	7,80 d	10,30 c	16,70 b	24,00 a	7,90

* Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ** CV = Coeficiente de variação.