UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo do fungo *Papulaspora immersa*
para produção de substâncias bioativas.

Glaucia Hollaender Braun

Ribeirão Preto
2008

RESUMO

BRAUN, G. H. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Papulaspora immersa* para produção de substâncias bioativas.** 2008. 60 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Os antibióticos vem sendo empregados por décadas no combate as infecções bacterianas mas, muitos deles são usados como agentes antitumorais, imunossuppressores, lipocolesterológicos, inibidores de enzimas e agentes antiparasitários. Os microrganismos, e dentre eles os fungos, são produtores de metabólitos secundários, com atividades biológicas, cuja produção é regulada para impedir uma superprodução desnecessária. O aumento na produção de uma substância só é conseguido desregulando tal processo o que é possível através de manipulação genética ou nutricional. O presente projeto teve por objetivo otimizar as condições de cultivo do fungo endofítico *Papulaspora immersa* para incrementar a produção de metabólitos secundários com atividades antibacteriana, antiparasitária, antifúngica e antitumoral. O fungo foi cultivado em duas etapas: inicialmente em meio pré-fermentativo por 48 horas seguido de transferência da massa micelial obtida para meio fermentativo Czapek e nesta etapa vários parâmetros que alteram as condições de cultivo foram variados. Os cultivos foram realizados assepticamente a 30°C e sob agitação constante e o filtrado das culturas foram particionados com solventes orgânicos obtendo-se os extratos, aceto etílico, butanólico, etanólico e aquoso. Nos estudos iniciais o tempo de cultivo no meio fermentativo foi de 20 dias (condição padrão) e sob esta condição, o extrato aceto etílico apresentou a melhor atividade antibacteriana para *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 90 µg/mL) e não foi detectada atividade frente a *Escherichia coli*, assim como não foi observada atividade antifúngica para estes extratos. As seguintes variáveis foram testadas nas condições de cultivo no meio fermentativo: período de incubação, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH, temperatura e a proporção das fontes carbono/nitrogênio do meio. Cada extrato obtido proveniente das diferentes condições de cultivo foi avaliado para atividade antibacteriana, antitumoral, antifúngica e inibidora das enzimas gGAPDH de *Trypanosoma cruzi* e APRT de *Leishmania tarentolae* em ensaios de CIM. O extrato que apresentou a melhor atividade antibacteriana foi obtido das seguintes condições de cultivo: meio suplementado com 3,0% de sacarose; 0,2% de Nitrato de sódio; pH inicial 5,0, após 9 de incubação a 30 °C, ou seja, CIM de 90 µg/mL para *P. aeruginosa* e de 100 µg/mL para *E. coli*. Nestas mesmas condições obteve-se os melhores níveis de atividade antitumoral frente as três linhagens humanas avaliadas (HCT-8, MDA-MB435 e SF295). A melhor atividade inibitória da enzima parasitária APRT de *L. tarentolae* (79,82 %) foi obtida do extrato aceto etílico proveniente do cultivo em meio fermentativo nas mesmas condições anteriores, porém quando a cultura era incubada a 35°C e não a 30°C. Significativa atividade inibitória sobre esta enzima (79,25 %) foi também obtida de extrato aceto etílico proveniente da mesma condição de cultivo anteriormente citada, porém em pH 4,0 a 30°C, condição na qual a atividade antibacteriana mostrou-se insignificante. Nenhum dos extratos analisados apresentou atividade inibitória significativa para a enzima parasitária gGAPDH de *T. cruzi*. A otimização das condições de cultivo do fungo *Papulaspora immersa* demonstrou que 9 dias de

cultivo em meio fermentativo eram suficientes para a produção de metabólitos secundários com atividades biológicas e que é possível obter-se uma determinada atividade em maior concentração dependendo por exemplo do pH ou da temperatura em que se cultiva esse fungo.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, atividade biológica, meio de cultivo fermentativo, Papulaspora immersa.

INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos e Fungos Endofíticos como Fonte de Fármacos

Dentre as diversas fontes naturais, os metabólitos secundários de microrganismos são citados como componentes estruturais e compostos biologicamente ativos importantes, o que torna os microrganismos fontes promissoras na contínua busca de novas substâncias protótipos ao desenvolvimento de fármacos (DONADIO et al., 2002; CORRADO; NEWMAN et al., 2003; STROBEL, 2003; RODRIGUES, 2004)

A maioria dos antibióticos comumente utilizados no mercado de origem microbiana são originários de actinomicetos e de fungos.

Nos últimos 60 anos esses microrganismos tem sido o foco de pesquisas em laboratórios industriais e acadêmicos e modelos matemáticos estimam que o número de antibióticos a serem descobertos a partir de culturas com actinomicetos, está em torno de 10^5 , evidenciando a importância desse grupo para o estudo da bio e quimiodiversidade, mas outros grupos, como as cianobactérias e as myxobactérias, também têm demonstrado importância na produção de metabólitos secundários bioativos.

A busca por produtos naturais tem esbarra no grande tempo e nos gastos despendidos para essas pesquisas e na possibilidade de se isolar uma substância já anteriormente conhecida (WILDMAN, 2003). Acredita-se no entanto que com o avanço das técnicas de biologia molecular, da avaliação de bibliotecas de DNA e de bibliotecas químico-estruturais, rotas alternativas e complementares na realização de “screening” de produtos naturais, venham a constituir novos métodos para descoberta de novos (SEYMOUR et al., 2004).

Sabe-se que 6 dos 20 medicamentos mais prescritos mundialmente são originários de fungos (DEMAIN, 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005) como por exemplo, penicilina, tetraciclina e cefalosporina. Fungos também apresentam grande aplicação industrial, na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos e de corantes naturais (ADRIO; DEMAIN, 2003). No entanto, apesar desse enorme

potencial apenas 5% das espécies de fungos presentes na natureza já foram descritos (HAWKSWORTH, 2001).

A vantagem em se trabalhar com produtos naturais produzidos por microrganismos e dentre eles com fungos, é a facilidade em cultivá-los em laboratório e em alterar suas condições de cultivo, além disso ressalta-se que crescem rapidamente quando comparados com espécies vegetais e animais.

Uma parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam o interior de plantas (SCHULZ; BOYLE, 2005). Por definição fungos endofíticos são aqueles que colonizam, em algum período de seu ciclo de vida, os tecidos sadios de plantas, sem causarem visíveis sintomas de doenças (PETRINI, 1992). Estes fungos podem habitar seu hospedeiro intracelularmente (CABRAL *et al.*, 1993) ou intercelularmente (BOYLE *et al.*, 2001).

A interação do endofítico com uma planta hospedeira pode ser caracterizada como uma simbiose mutualística (READMAN *et al.*, 2002), uma relação de comensalismo (DECKERT *et al.*, 2001) ou mesmo um fitopatógeno latente que pode estabelecer colonização inicialmente como endofítico (PHOTITA *et al.*, 2004). Nesta interação, observa-se um frágil equilíbrio entre antagonistas caracterizado por um estado momentâneo de colonização assintomática, relacionada com a produção de diversos metabólitos secundários. Esta produção é permeada pelo fator de virulência do fungo, assim como pelo fator de defesa da planta, notando-se que fungos secretam enzimas e outros metabólitos, necessários ao processo de infecção, e que a planta produz metabólitos responsáveis pela contenção da infecção, (SCHULZ; BOYLE, 2005). Este processo de produção de substâncias é também influenciado pelo nicho ecológico que o fungo e a planta ocupam e por fatores ambientais existentes (PALKOVÁ, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). Portanto essa interação evidencia certa plasticidade fenotípica, presente em ambos os organismos envolvidos. (SCHULZ; BOYLE, 2005; TEJESVI *et al.*, 2006)

Fungos endofíticos também produzem metabólitos bioativos que agem na planta como hormônios de crescimento (de BATTISTA *et al.*, 1990), aumentam a tolerância a estresses abióticos (GAO *et al.*, 2005), influenciam na fotossíntese (SCHARDL *et al.*, 2004) e inibem a herbivoria e a infecção por patógenos (ARNOLD

et al., 2003). Em troca são supridos com nutrientes e favorecidos em sua dispersão e reprodução (RUDGERS *et al.*, 2004), evidenciando o benefício de ambos nesta interação endofítico-hospedeiro.

Uma ampla diversidade de metabólitos secundários microbianos pode ser encontrada a partir de uma única espécie vegetal, já que todas as plantas são colonizadas por mais de um endofítico (STROBEL, *et al.*, 2004). Relatos científicos preconizam que endofíticos são promissores para a descoberta de novos compostos bioativos, pois 80% dos isolados de fungos endofíticos produziram compostos com algum tipo de atividade detectada em testes biológicos (SCHULZ, *et al.*, 2002). A proporção de isolamento de novas substâncias e estruturas produzidas por endofíticos (51%) é maior que a encontrada em fungos isolados de solos (38%) e demais organismos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos pertencem a diversos grupos estruturais, como esteróides, xantonas, isocumarinas, quinonas, terpenóides, lignanas, flavonóides, alcalóides, fenilpropanoides, fenóis, peptídeos, compostos alifáticos e clorados. (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Muitos destes compostos apresentaram diversas atividades biológicas, como as substâncias globosumonas, isoladas do endofítico *Chaetomium globosum*, com atividade citotóxica contra células tumorais (BASHYAL *et al.*, 2005), a substância antibacteriana guanascatepeno A, a qual apresentou atividade frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* resistentes (BRADY; BONDI; CLARDY, 2001), a substância brefeldina A, isolada do fungo endofítico *Aspergillus clavatus*, com atividade antifúngica e antiviral, e uma atividade citotóxica maior que a apresentada pelo taxol (WANG *et al.*, 2002) e compostos com atividade antimalárica como o metabólito secundário produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis phaseoli* (ISAKA, 2001), o qual possui uma enorme importância farmacológica necessitando de uma aplicabilidade efetiva em países subdesenvolvidos, já que a malária se trata de um problema de saúde pública.

1.2 Resistência Microbiana a Antibióticos

A resistência aos fármacos atualmente utilizados em tratamentos antimicrobianos e antitumorais (LEVY, 2005) demonstra que além de uma correta manipulação dos fármacos disponíveis, é relevante o enfoque em pesquisas que abordem a prospecção em produtos naturais com atividade biológica para se descobrir agentes mais efetivos, menos tóxicos e com diferentes mecanismos de ação. (ANDERSON, 2005).

Sabe-se que essa resistência microbiológica desenvolve-se, não somente em bactérias, mas também em fungos, vírus e parasitas (LEVY, 2005) e que é o resultado de fatores como mutações genéticas, trocas de material genético entre microrganismos, seleções evolutivas e proliferação de clones bacterianos com múltiplas resistências (TENOVER, 2001). Essa resistência genética, uma vez adquirida, não é facilmente perdida, integrando-se ao genoma do microrganismo (LEVY, 2005).

No caso de infecções fúngicas o problema agrava-se pela pequena diversidade de agentes antifúngicos utilizados atualmente em tratamentos (ANDERSON, 2005).

O sucesso na descoberta de novos compostos produzidos por microrganismos requer a utilização de condições de cultivo adequadas para a produção de metabólitos desejados (PELAEZ, 2006). Em fungos a produção de compostos bioativos de fungos ocorre normalmente na fase estacionária de seu crescimento, ou na idiofase.

Metabólitos bioativos de fungos endofíticos são potencialmente relevantes em pesquisa de novos antibióticos, antifúngicos, agentes antitumorais, imunossupressores, hipoglicemiantes, antiparasitários e enzimas inibitórias (DEMAIN, 1999).

1.3 Doença de Chagas e Leishmaniose

A doença de Chagas, que tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 16 milhões de pessoas (FREITAS *et al*, 2002), e a Leishmaniose, cujo agente etiológico são espécies de gênero *Leishmania*, são doenças que afetam

principalmente populações da África e das Américas Central e do Sul, constituindo-se em graves problemas de saúde pública. No entanto, não há nenhum fármaco eficaz para seu tratamento, além de que os poucos fármacos disponíveis apresentam efeitos colaterais elevados e alta toxicidade. Em relação a Leishmaniose entre os anos de 1985 a 1999, foram registrados no Brasil 388.155 casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana. Comparando-se os dados de 1985 (13.654 casos) com os de 1999 (30.550), observa-se que o coeficiente de detecção da Leishmaniose no Brasil aumentou de 10,45/100.000 hab. para 18,63/100.000 habitantes, em função da melhoria do fluxo de informação.

As espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* utilizam três enzimas fosforribosil-transferases para a reciclagem de purino-nucleotídeos, adenina-fosforribosil-transferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) e xantina-fosforribosil-transferase (XPRT). Os mamíferos possuem via de síntese de purinas denominadas *de novo*, já as espécies do gênero *Leishmania* são exclusivamente dependentes desta via de recuperação citada acima (TUTTLE; KRENISTKY, 1980), tornando estas enzimas interessantes alvos para desenvolvimento de novos fármacos para o combate da Leishmaniose.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima glicolítica que catalisa a fosforilação oxidativa de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfatoglicerato, na presença de fosfato inorgânico e de NAD⁺ como coenzima (ENGEL et al., 1987). A forma infectante de *T. cruzi*, denominada forma tripomastigota metacíclica, é dependente da via glicolítica para a produção de ATP. A inibição da enzima GAPDH resulta em inibição da via glicolítica (BAKKER et al., 1999), tornando-se assim um interessante alvo para desenvolvimento de fármacos antichagásicos.

1.4 Família Asteraceae e *Smallanthus sonchifolius* (yacón)

Dentre as Angiospermas a família Asteraceae apresenta um grande número de representantes no Brasil, sendo composta por 1.533 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, agrupadas em 3 subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994). Os representantes desta família encontram-se predominantemente em regiões de

cerrado, onde se observa uma enorme diversidade vegetal (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996). São plantas herbáceas, subarbustivas, arbustivas e raramente arbóreas, podendo ser perenes ou anuais.

Diversas espécies possuem importância biológica e econômica, como a alface (*Lactuca sativa*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), a carqueja (*Baccharis trimera*), o guaco (*Mikania laevigata*), a alcachofra (*Cynara scolymus*), dentre muitos outros igualmente empregados na terapêutica, como fitoterápicos, na medicina popular e na alimentação.

O yacón é uma planta herbácea, pertencente à família Asteraceae, de clima tropical de altitude. Foi introduzida em diversos países devido ao seu potencial alimentício e por ser substrato para produção de inulina. Possui como características morfológicas folhas largas e escuras, flores amareladas ou alaranjadas e suas raízes e caules apresentam grande quantidade de inulina (FUKAI *et al.*, 1993). Porém, pouco se conhece sobre a morfologia do seu sistema subterrâneo, não havendo consenso sobre a denominação dos órgãos que o compõem. Neste estudo foi utilizada a denominação proposta por Machado *et al.* (2004), segundo a qual um sistema subterrâneo é espessado e de natureza mista representado por rizóforos e raízes, sendo o sistema radicular formado por raízes adventícias as quais podem permanecer delgadas ou sofrerem intensa tuberificação.

Na revisão proposta por Wells em 1967, o yacón e as plantas próximas estão inseridos no gênero *Polymnia*. De acordo com as revisões propostas por Robinson em 1978, as espécies anteriormente consideradas como *Polymnia* foram separadas em dois gêneros, *Smallanthus* e *Polymnia*, sendo o yacón pertencente ao gênero *Smallanthus*. Esta última classificação vem sendo a mais aceita por diversos autores e herbários (GRAU; REA, 1997).

A presença de compostos fenólicos antioxidantes foi relatada em estudos de atividades biológicas em extratos de folhas e raízes tuberosas de yacón, e pode-se citar também que suas partes aéreas são utilizadas tradicionalmente como chás hipoglicemiantes (YAN, *et al.*, 1999). Isolou-se de suas folhas seis compostos identificados como lactonas sesquiterpênicas com atividade contra *Bacillus subtilis*, sendo dois destes novos compostos, inéditas na literatura, (LIN *et al.*, 2003).

Durante a realização do Programa de Atualização por mim desenvolvido, sob supervisão da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, do laboratório de Química Farmacêutica, FCFRP-USP, foi isolado das raízes delgadas de *Smallanthus sonchifolius* um fungo endofítico, inicialmente designado PS-1 e posteriormente identificado pela “Coleção de Culturas -Micoteca URM- Departamento de Micologia/CCB/ UFPE”, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n Cidade Universitária, CEP 50670-420 Recife/PE, como *Papulaspora immersa*.

1.5 Regulação Metabólica para a Produção de Metabólitos Secundários

As condições do meio ambiente exercem uma importante influência nas propriedades de comunidades formadas por diferentes microrganismos, ou seja, no ecossistema existente. Microrganismos são capazes de modificarem suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com a condição nutricional a que são expostos (PALKOVÁ, 2004). Portanto as fontes de carbono presentes em meios fermentativos estão nitidamente relacionadas com a produção de antibióticos e demais metabólitos secundários pelos microrganismos. Para produção de metabólitos secundários, geralmente, o meio de cultivo é primeiro suplementado com uma fonte de carbono rapidamente metabolizável, o que permite proliferação celular com aumento da massa microbiana e em seguida, uma fonte de carbono utilizada mais lentamente é adicionada quando o microrganismo já se encontra na idiofase, a fase estacionária do crescimento. Da mesma forma a fonte de nitrogênio e fósforo exercem papel fundamental na produção de metabólitos secundários (ADRIO; DEMAÍN 2003; SANCHEZ e DEMAÍN, 2002).

A temperatura e luminosidade são fatores que também devem ser considerados na otimização dos meios fermentativos, interferindo na fisiologia e bioquímica do fungo, no crescimento e na produção de esporos (MELLO *et al.*, 2004).

É sabido que a produção de metabólitos secundários está submetida a um sistema de regulação gênica eficiente influenciada por fatores ambientais. Foi relatado que em *Aspergillus fumigatus* restos de bactérias autoclavadas atuaram

como substâncias elicitoras no metabolismo secundário de fungos. (FURTADO, 2002).

Além disso sabe-se que a biosíntese de produtos naturais está geralmente associada com o desenvolvimento morfológico do microrganismo. Muitos metabólitos secundários são produzidos por organismos que apresentam hifas desenvolvidas e morfologia complexa. Os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não estão muito claros. Sabe-se que em *Aspergillus nidulans* existe mecanismos envolvidos em sinalizações intracelulares desencadeadas por proteínas G, por proteínas quinase A (PKA) e por AMP cíclico as quais regulam ambos, esporulação assexuada e a biosíntese de metabólitos secundários (Calvo *et al*, 2002).

Diferentemente dos genes envolvidos no metabolismo primário, os genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários estão localizados no genoma em forma de clusters. A regulação desses clusters de genes é controlada através de genes estruturais e por duas classes de fatores reguladores de transcrição. Uma classe específica para determinadas vias metabólicas, como por exemplo, em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* o gene *aflR* codifica para o fator de transcrição Zinco (II)₂-Cys₆ responsável pela produção de aflotoxina, e outra classe global, a qual media fatores ambientais , como temperatura, pH (PacC), fontes de nitrogênio (AreA) e fonte de carbono (CreA) . O envolvimento destas proteínas (CreA, PacC e AreA) no metabolismo secundário garantem que as vias metabólicas do metabolismo secundário respondam às demandas do metabolismo celular fúngico, de acordo com as condições ambientais. E podem refletir nas diferenças encontradas na produção de metabólitos secundários quando fungos são submetidos ao crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperatura e valores de pH, (KELLER *et al*, 2005)

A maioria dos produtos naturais provenientes de fungos é originária de policetídeos, peptídeos ou de combinações de ambos. Estes produtos derivam de Acetil-coA, Malonil-CoA e aminoácidos, sendo agrupados por enzimas multidomínios denominadas policetídeos sintases (PKSs), peptídeos não ribossomal sintases (NRPSs) ou sistemas híbridos PKSs-NRPSs.(MISIEK; HOFFMEISTER, 2007).

Segundo Melentiades et al. (2000), o fator que mais influência no crescimento do microrganismo é a composição nutricional, assim como permite um crescimento sem restrições, favorecendo a total expressão fenotípica do microrganismo. Sendo assim, tanto a produção de certos metabólitos que possuam um maior interesse quanto à supressão daqueles que não sejam produtivamente desejáveis, podem ser manipuladas de acordo com características do meio fermentativo utilizado.

CONCLUSÕES

O fungo *Papulaspora immersa*, isolado em associação endofítica com *Smallanthus sonchifolius*, mostrou ser produtor de metabólitos secundários com atividades antibacteriana, antitumoral e inibitória de enzimas dos parasitas *T. cruzi* e *L. tarentolae*. Modificações nas condições de cultivo deste fungo influenciaram a produção desses metabólitos secundários, assim como otimizaram sua produção.

A melhor atividade antibacteriana promovida por extratos aceto etílicos foi obtida quando esse fungo foi cultivado em presença de 3,0% de sacarose, 0,2% de nitrato de sódio, em pH 5 à 30 °C por 9 dias, sob agitação constante. Nestas condições obteve-se concentração inibitória mínima de 100 µg/mL para *E. coli* e 90 µg/mL frente a *P. aeruginosa*.

A condição de cultivo que resultou na produção da melhor atividade antitumoral foi também a mesma responsável pela melhor atividade antibacteriana. Nesta condição o fungo endofítico *Papulaspora immersa* produziu metabólitos secundários que inibiram em mais de 90% o crescimento das três linhagens tumorais humanas avaliadas, HCT-8, MDA-MB435 e SF295, sugerindo que substâncias contidas neste extrato apresentam concomitantemente atividade antibacteriana e antitumoral.

O fungo *P. immersa* não apresentou extratos com atividade antifúngica, frente a *N. crassa*, *A. fumigatus* e *C. albicans*, resultados estes, em concordância com a literatura, a qual reporta ausência de atividade antifúngica em extratos de cultivo de *Papulaspora* sp. frente a *C. albicans*.

Dentre os 19 extratos avaliados nenhum apresentou atividade inibitória significativa para gGAPDH e 11 apresentaram atividade inibitória significativa para a enzima APRT, ou seja inibiram a enzima em mais de 90%. Os extratos que apresentaram as melhores atividades foram obtidos do cultivo em meio fermentativo após 9 dias, suplementado com 3% de sacarose e 0,2 % de nitrato de sódio, em pH 5,0 à 35°C apresentando atividade inibitória de 79,8 %, para esta enzima, e do cultivo obtido nas mesmas condições acima, exceto pelo pH 4,0 e temperatura 30°C com atividade enzimática inibitória de 79,25 %.

Atividades antibacteriana, antitumoral e inibitória de enzimas parasitárias foram detectadas nos distintos extratos obtidos dos cultivos em meio fermentativo, sugerindo que o fungo *Papulaspora immersa* possivelmente produza distintas substâncias bioativas. Esses dados foram obtidos de ensaios com extratos brutos, possivelmente ao se isolar os compostos desses extratos se obtenham valores ainda mais relevantes em ensaios biológicos.

Ressalta-se a importância dos estudos das condições de cultivo de fungos para produção de metabólitos secundários, pois além de adequar o tempo de cultivo e os outros parâmetros permitem detectar que a simples mudança da temperatura de 30°C para 35°C fez com que preferencialmente substâncias com atividade inibitória da enzima APRT fossem produzidas em detrimento das atividades antitumorais e antibacterianas. Por outro lado a mudança de 30°C para 25°C alterou muito pouco a atividade antitumoral e reduziu a atividade antibacteriana. O mesmo raciocínio pode ser feito se compararmos o efeito do pH. Esses dados são, sem dúvidas, muito importantes para o isolamento destas substâncias.

Conforme as figuras 8,10 e 12, onze extratos apresentaram atividade inibitória significativa para a enzima APRT. Dentre os extratos avaliados, 7 apresentaram atividade inibitória moderada e somente 1 extrato apresentou atividade pouco significativa.

Os melhores valores de inibição foram obtidos por extratos aceto etílicos, do cultivo após 9 dias em meio fermentativo suplementado com 3% de sacarose e 0,2% de nitrato de sódio, em pH 5,0 à 35°C (79,82 %), do cultivo após 9 dias em meio fermentativo suplementado com 3% de sacarose e 0,2 % de nitrato de sódio, em pH 4,0 à 30°C (79,25 %) e do cultivo após 9 dias em meio fermentativo suplementado com 3% de sacarose e 0,2 % de nitrato de sódio, em pH 7,0 à 30°C (71,12 %).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v.6, p.191-19, 2003.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER. J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with

emphasis on sclerotic cells induced by propanol. **Micopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

AMEUR, R. M. B; MELLOULI, L; CHABCHOUB, F.; FOTSO, S.; BEJAR, S. Purification and structure elucidation of two biologically active molecules from a new isolate *Streptomyces* sp. US 24 stain. **Chemical Natural Compounds**, v.40 (5), p.510-513, 2004.

ANDERSON, J.B. Evolution of Antifungal-Drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews**, v.3, p.547-555, 2005.

ARNOLD, A. E; MEJIA, L C; KYLLO, D; ROJAS, E I.; MAYNARD, Z; ROBBINS, N; HERRE, E A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p.15649-15654, 2003.

BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOE, F. R.; WESTERHOFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream from *Trypanosoma brucei*? **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.551-559, 1999.

de BATTISTA, J. P.; BACON, C. W.; SEVERSON, R.; PLATTNER, R. D.; J. H. Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. **Agronomy Journal**, v.82, p.878-880, 1990.

BASHYAL, B. P.; WIJERATINE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUANATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Journal Natural Products**, v.68 (5), p.724-8, 2005.

BORDJIBA, B.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUND, P. Removal of Herbicides from Liquid Media by Fungi Isolated from a Contaminated Soil. **Journal Environmental Microbiological**, v.30, p.418-426, 2001.

BOYLE, C.; GÖTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interaction III Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, v.31, p.259-281, 2001.

BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. **Jornal of the American Chemical Society**, v.123 (40), p. 9900-1, 2001.

BREMER, K. Asteraceae: cladistics and classification. Portland: Timber Press, 1994.

BUTLER, M. S. The role of natural products chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141-2153, 2004.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66 p. 447-459. 2002.

CABRAL, D.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. The internal mycoflora of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. **Mycological Research**, v.97,p. 367-376,1993.

CORADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic of Microbioogycal**, v.44, p.157-16, 2004.

DECKERT, R. J.; MEVILLE, L.; PETERSON, R. L. Structural features of a Lophodermium endophyte during the cryptic life-cycle in the foliage of *Pinus strobus*. **Mycological Research.**, v.105, p.991-997, 2001.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.52, p.455-463, 1999.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA. R.;MAZZA, P; CHIONCHINI, C.; COVALETTI, L.; SOSIO, M.;PUGLIA, A. M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolitos. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.187-198, 2002.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**, v.26, p.49-80, 1994.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v.161, p.273-280, 2006.

ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F. de; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.26, p.1-10, 1987.

FREITAS, T. P. S.; FURTADO, N. A J. C.; BASTOS, J. K.; SAID, S. Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiological Research**, v.157, p.201-206, 2002.

FUKAI, K.; MIYAZAKI, S.; NANJO, F.; HARA, Y. Distribution of carbohydrates and related enzymes activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v.39, p.567-571, 1993.

FURTADO, N. A J. C.; SAID, S.; ITO, I. Y.; BASTOS, J. K. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiological Research**, v.157, p.207-211, 2002.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibióticas e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. Dissertação de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 256 pp, 2004.

GADEN E L Jr Fermentation process kinetics. Reprinted from Journal of Biochemical Microbiological Technology and Engineering, v.1, p. 413-29, 1959. **Biotechnology and bioengineering**, v.67, p.629-635, 2000.

GAO, X. X.; ZHOU, H.; XU D. Y.; YU, C. H.; CHEN, Y. Q.; QU, L. H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v.249, p.255-266, 2005.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

GRAU, A & REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon (M. Hermann & J. Heller, eds.). **International Plant Genetic Resources Institute**, p.200-242, 1997.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Vigueria arenaria* e *Thitonia diversifolia*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, p. 134-144, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. **Mycological Research**, v.105, p.1422-1431, 2001.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products**, v.64 (8), p. 1015-8, 2001.

JACKSON, M.; KARWOWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W.L.; BARLOW, G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. **Journal of Antibiotics**, v.46, p.34-38, 1993.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews**, v.3, p.937-947, 2005.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance- the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1446-1450, 2005.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and Identification of Antimicrobial Sesquiterpenes Lactones from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Leaves. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.67, p.2154-2159, 2003.

MACHADO, S. R.; OLIVEIRA, D. M.T.; DIP, M. R.; MENEZES, N. L. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae) **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.115-123, 2004.

MACCHERONI-Jr, W.; ARAUJO, E. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colleotrichum*. **Scientia Agricola**, v.61 (3), p. 298-302, 2004.

MANOCH, L.; JEAMIJITT, O.; DETHOUP, T.; EAMVIJARN, A.; PIKULKLIN, S.; MORIGUCHI, M. Thermotolerant and heat resistant fungi from soil in Thailand and Japan and their utilization in agriculture. Proceeding of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 3), 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MELENTIADES, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W.; VERWEIJ, P. E. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. **Journal of Clinical Microbiology**, p.478-484, 2000.

MELLO, A. F. S. M.; MACHADO, A. C. Z.; BEDENDO, I. P. Development of *Colleotrichum gloesporidioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Scientia Agricola**, v.6 (5), p.542-544, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER K.M. Natural Products as source of new drugs over period 1981-2002. **Natural Products Reports**, v.66, p.1022-1037, 2003.

MIJTS, B. N.; SCHIMIDT-DANNERT, C. Engineering of secondary metabolite pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.597-602, 2003.

MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Medica**, v.73, p. 103-115, 2007.

PALKOVÁ, Z.; Multicelular microorganism: laboratory versus nature. **EMBO Reports**, v.5, p.470-476, 2004.

PELAEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.981-990, 2006.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N., TOTI, L; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v.1, p.185-196, 1992.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.;HYDE, K. D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v.16, p.131-140, 2004.

RAVIRAJA, N.S.; MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Antimicrobial Evaluation of Endophytic Fungi Inhabiting Medicinal Plants of the Western Ghats of India. **Eng. Life Sci**, v.5, p. 515-520, 2006.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Termotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v.298, p.1581, 2002.

RUDGERS, J. A.; KOSLOW, J. M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v.7, p.42-51, 2004.
SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. **Metabolic of fermentation processes**. Enzyme and Microbiol Technology, v. 31, p. 895-906, 2002.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.315-340, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, p.996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p.661-686, 2005.

SEYMOUR, A. F.; CRESSWELL, J. E.; FISHER, P. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HAAG, H.; TALBOT, N. J. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. **Fungal Genetics and Biology**, v.41, p.721-734, 2004.

SHEARER, J. F. Recovery of endophytic fungi from *Myriophyllum spicatum*. **ERDC TN-APCRP-BC**, v. 3, p1-11, 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535-534, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p.257-268, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

TANSUWAN, S.; PORNPAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; MUANGSIN, N.; SIHANONTA, P.; CHAICHIT, N. Antimalarial Benzoquinones from Endophytic Fungus, *Xylaria* sp. **J. Nat. Prod**, v. 70, p. 1620-1623, 2007.

TEJESVI, M. S.; MAHESH, B.; NALINI, M. N.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmaceutically important medicinal trees. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.427-435,2006.

TENOVER, F. C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p. 108-115, 2001.

TRIGOS, A.; SANDOVAL, F. Diketopiperazines from cultures of Fungus *Papulaspora immersa*. **Micologia Aplicada Internacional**, v.14 (1), 7-10, 2002.

TUTTLE, J. V.; KRENISTSKY, T. A. Purine Phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v.255, p.909-916. 1980.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, p.617-622, 2001.

VOGEL, H.J. A convenient medium for *Neurospora* (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-43, 1956.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. And *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, p.51-57, 2002.

WILDMAN, H. G. The fall and rise of natural products screening for drug discovery. **Fungal Divers**, v.13, p. 221-231, 2003.

YAN, X.; SUZUKI, M.; O-KAMEYAMA, M.; SADA, Y.; NAKANISHI, T. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p. 4711-4713, 1999.

ZHAO, K.; PING, W.; ZHOU, D. Recent advance and prospect on taxol production by endopytic fungus fermentation- A Review. **Acta Microbiologica Sinica**, v.48 (3), p.403-407, 2008.