UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de
Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em
*Caenorhabditis elegans***

Denise Oliveira Guimarães

Ribeirão Preto
2009

RESUMO

GUIMARÃES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans***. 2009. 186f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O estudo de fontes naturais pouco exploradas e que exibem interações ecológicas específicas no seu habitat tem sido enfatizado como estratégico para a descoberta de novas substâncias bioativas. Microrganismos endofíticos são fontes de produtos naturais relativamente pouco estudadas. Estes microrganismos vivem no interior de um vegetal sem causar danos aparentes ao hospedeiro. A interação ecológica específica entre os microrganismos endofíticos e sua planta hospedeira pode estimular a biossíntese de novos produtos naturais bioativos. Os fungos endofíticos *Glomerella cingulata* e *Guignardia mangiferae* foram isolados das folhas de *Viguiera arenaria*. O fungo *G. mangiferae* foi cultivado em diferentes condições: meios líquidos Czapek, extrato de malte e caldo batata-dextrose e meio sólido de arroz. Extratos e frações obtidas com o cultivo de *G. mangiferae* foram avaliados em ensaios antimicrobianos, citotóxicos e enzimáticos. Foram realizados procedimentos cromatográficos com os extratos brutos, obtendo-se 13 substâncias puras, sendo cinco delas inéditas na literatura. Entre as novas substâncias, quatro são derivados trícicloalternarenos. O extrato bruto etanólico oriundo do cultivo em extrato de malte foi o mais promissor nos ensaios biológicos realizados. A partir desse extrato foi isolado a chaetoglobosina D, um composto já descrito na literatura como citotóxico em células cancerígenas. Os demais extratos, frações e substâncias ensaiadas apresentaram apenas atividade fraca ou moderada. O fungo *G. cingulata* foi investigado sobre a produção do metabólito secundário tirosol, previamente isolado de várias linhagens de fungos endofíticos. Devido à ampla ocorrência em fungos endofíticos, o tirosol pode estar correlacionado com uma função sinalizadora para a produção de outros metabólitos secundários. Para a determinação da quantidade de tirosol produzido por *G. cingulata*, um método analítico quantitativo foi desenvolvido obedecendo-se padrões descritos pelo Guidance of Industry. Foi realizada a análise dos fluídos das culturas de *G. cingulata* em diferentes condições de cultivo em meio líquido Czapek. Observou-se que a melhor condição para produção do tirosol ocorre em pH 5,0, 120 rpm, 30 °C, seis dias de incubação. O cultivo de *G. cingulata* com e sem adição de tirosol no meio líquido Czapek não permitiu resultados conclusivos sobre a possível função sinalizadora do tirosol na produção de metabólitos secundários em fungos endofíticos. Durante o período de estágio sanduíche no Department of Molecular Biology do Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School), sob a supervisão do Prof. Dr. Frederick M. Ausubel, foram avaliadas cerca de 170 amostras de origem natural do Brasil, sendo a maioria delas oriundas de fungos endofíticos, frente ao nematóide *Caenorhabditis elegans* infectado com linhagem patogênica de *Enterococcus faecalis*. Cerca de 29% das substâncias puras e 2% dos extratos ensaiados apresentaram boa capacidade de recuperação do nematóide infectado. Os policetídeos chaetoviridinas foram os compostos mais ativos neste modelo de ensaio antibacteriano *in vivo*.

Palavras-chave: fungos endofíticos, *Guignardia mangiferae*, *Glomerella cingulata*, *Caenorhabditis elegans*, trícicloalternarenos.

ABSTRACT

GUIMARÃES, D. O. **Natural products from endophytic fungi found in association with Asteraceae species and antibiotic assay in the *Caenorhabditis elegans* infection model.** 2009. 186f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The search for small bioactive molecules from under-explored natural sources that possess specific ecological interaction in their respective habitat has been emphasized as strategic for the discovery of bioactive compounds. Endophytic microorganisms are still relatively under-explored sources of natural products. These microorganisms live inside the host plant tissues without causing symptoms of disease to the host. The specific ecological interaction between the endophytes and their host plants may trigger the biosynthesis of new small bioactive molecules. The endophytic fungi *Glomerella cingulata* and *Guignardia mangiferae* were isolated from *Viguiera arenaria* leaves. *G. mangiferae* was cultured using different conditions: Czapek, malt extract and potato-dextrose broth liquid media and rice solid medium. Crude extracts and fractions obtained after *G. mangiferae* cultivation were evaluated in antimicrobial, cytotoxic and enzymatic assays. Chromatographic procedures were carried out with crude extracts and led to the isolation of 13 compounds, five of them new in the literature. From the novel compounds four are tricycloalternarene derivatives. The crude ethanolic extract obtained from malt extract cultivation was the most promising extract in the biological assays. Chaetoglobosin D, a cytotoxic compound against cancer cell lines previously described in the literature, was isolated from this bioactive extract. The other extracts, fractions and compounds assayed showed weak or moderate activity in the performed assays. The production of tyrosol by *G. cingulata* was investigated, since several endophytic fungal strains from Asteraceae species had already produced this compound. Tyrosol may act as a signaling molecule for the production of other metabolites in endophytic fungi. In order to quantify the production of tyrosol by *G. cingulata*, an analytical method was validated under Guidance of Industry recommendations. Fluid culture analyses were performed after the cultivation of *G. cingulata* under different conditions using Czapek liquid medium. The best condition for tyrosol production occurred at pH 5.0, 120 rpm, 30 °C, six days of incubation. Cultivation of *G. cingulata* with and without tyrosol addition in the Czapek liquid medium did not allow the conclusion that tyrosol act as a signaling molecule for metabolite production by endophytic fungi. During sandwich training at Department of Molecular Biology of Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School), under Dr. Frederick M. Ausubel supervision, 170 samples from Brazil, the most part obtained from endophytic fungi, were assayed using the nematode *Caenorhabditis elegans* infected with the pathogen *Enterococcus faecalis*. About 29% of pure compounds and 2% of extracts assayed were able to promote the survival of the infected nematode. The polyketides chaetoviridins were found to be the most active compounds in this *in vivo* antibacterial assay.

Keywords: endophytic fungi, *Guignardia mangiferae*, *Glomerella cingulata*, *Caenorhabditis elegans*, tricycloalternarenes.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

I.1 Produtos naturais como fonte de fármacos

A teoria da evolução indica que um organismo que vive em associação com outros indivíduos é sujeito a mutações. Como resultado dessas mutações novas enzimas podem ser responsáveis por novas substâncias químicas. Porém, essa modificação só será efetivamente justificada se o custo para a produção de um composto for compensatório em relação aos benefícios deste composto em favorecer a adaptação do organismo ao ambiente em que vive (FIRN; JONES, 2009).

A alta diversidade química em produtos naturais, moléculas produzidas por organismos vivos, está relacionada com a disponibilidade de precursores e reações biossintéticas, além da sua função num determinado sistema biológico. A evolução das rotas biossintéticas dos produtos naturais está ligada às necessidades funcionais de seus ligantes, por isso há uma grande expectativa quanto à afinidade dos produtos naturais pelos diversos alvos biológicos existentes (MOLINARI, 2009). Os produtos naturais possuem alta diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade quanto à ligação com receptores específicos (MOLINARI, 2009). Além disso, possuem outras características que ilustram a sua importância na busca de novos fármacos, como a complexidade e singularidade estrutural, associada ao amplo potencial biológico (CLARDY; WALSH, 2004); são importantes ferramentas bioquímicas, servindo como guia para a biologia molecular e estudos biossintéticos e investigação das funções celulares (CLARDY; WALSH, 2004); são as principais fontes de farmacóforos (KNIGHT et al., 2003); auxiliam na descoberta de novos mecanismos de ação de fármacos (URIZAR et al., 2002) e no desenho de compostos sintéticos (KNIGHT et al., 2003).

Comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e coleções virtuais de compostos), a mais ampla diversidade química está associada às substâncias de origem natural (HARVEY, 2008). Além disso, os produtos naturais, seus derivados sintéticos e compostos modelados em substâncias naturais representam grande contribuição dentre os fármacos aprovados no período de 1981-2006 (Figura 1, pag. 2) (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Figura 1. Novas substâncias químicas entre 1981 e 2006 (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A contribuição dos produtos naturais na medicina ao longo dos anos é bem evidente. A obtenção de diversas moléculas contemplando várias classes químicas, bem como diferentes atividades biológicas, ilustra o potencial dos produtos naturais para o tratamento de doenças (figura 2, pag. 2): o potente analgésico morfina (**1**); a quinina (**2**) que serviu como guia para o desenho sintético de vários antimaláricos; a salicina (**3**) que motivou o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico (**4**) - fármaco amplamente utilizado como analgésico e antiinflamatório; o cardiotônico digitoxina (**5**), os anticancerígenos paclitaxel (**6**) e alcalóides da vinca (vincristina, **7** e vimblastina, **8**). Recentemente, a galantamina (**9**), foi aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer (BUTLER, 2005; VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Figura 2. Produtos naturais vegetais, com as respectivas fontes produtoras, e semi-sintéticos importantes na terapêutica.

A exploração de microrganismos como fontes de substâncias terapeuticamente úteis tem uma história muito mais curta em relação ao uso de

plantas na medicina. Desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, surgiram vários fármacos importantes baseados em metabólitos de fungos, incluindo os antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos e estreptograminas) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2009) antibióticos antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina) (PUPO et al., 2006), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A, rapamicina), e antiinflamatório (ascomicina) (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; DEMAÏN, 1999; MANN, 2002; PEARCE, 1997; KOEHN; CARTER, 2005) (Figura 3, pags. 3-4).

Figura 3. Produtos naturais microbianos e derivados semi-sintéticos utilizados na terapêutica.

Apesar do grande sucesso dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos, as indústrias farmacêuticas demonstraram declínio em pesquisas de produtos naturais entre os anos de 1990s – 2000s. Isso se deve ao fato da

introdução de tecnologias como a química combinatória e ensaios em larga escala conhecidos como *High Throughput Screening (HTS)* (BAKER et al., 2007). Porém, apenas um único fármaco oriundo da química combinatória com ação antitumoral sorafenibe (Nevaxar®, Bayer) foi introduzido no mercado farmacêutico em 2005 (NEWMAN; CRAGG, 2007). Mesmo com a diminuição de pesquisas focando produtos naturais em indústrias nota-se que número de patentes geradas por substâncias naturais teve valores crescentes neste período (KOEHN; CARTER, 2005). Além disso, a introdução de 53 novos fármacos nessa mesma época ressalta a continua contribuição de produtos naturais para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (ALLAN, 2002).

A figura 4 (pag. 6) ilustra alguns exemplos de produtos naturais de origem microbiana que estão em desenvolvimento como agentes antibacterianos e antitumorais, exemplificando a continua contribuição dos produtos naturais microbianos na busca por protótipos com aplicações farmacêuticas importantes, como o tratamento de doenças infecciosas que se destacam em segundo lugar como causa de morte no mundo (LAM, 2007).

O desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais é bem evidente na medicina moderna, particularmente para o tratamento de doenças infecciosas, imunoterapia e terapia anticâncer (NICOLAOU, CHEN, DALBY, 2009). Atualmente há vários novos compostos derivados de produtos naturais em fase de desenvolvimento clínico, especialmente anti-infecciosos e anticancerígenos (HARVEY, 2008) (Tabela 1, pag. 5).

Tabela 1 – Fármacos derivados de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento (adaptado de HARVEY, 2008).

Área terapêutica	Pré-clínico	Fase I	Fase II	Fase III	Pré registro	- Total
Anticancerígenos	34	15	26	9	2	86
Anti-infecciosos	25	4	7	2	2	40
Neurofarmacologia	6	3	9	4	0	22
Doenças Cardiovasculares/gastrointestinais	9	0	5	6	0	20
Anti-inflamatórios	6	2	9	1	0	18
Fármacos que atuam no metabolismo	7	3	6	1	0	17
Doenças na pele	7	1	2	0	0	10
Hormônios	3	0	2	1	0	6
Imunossupressores	2	2	0	2	0	6
Total	99	30	65	26	4	225

Figura 2. Produtos naturais microbianos em desenvolvimento clínico como antimicrobianos e anticâncer* (LAM, 2007).

Cerca de metade dos 20 medicamentos mais vendidos são de origem natural

e totalizam aproximadamente US\$ 16 bilhões. (BARREIRO, BOLZANI, 2009). Os fármacos baseados em produtos naturais (derivados, mímicos e análogos de produtos naturais) correspondem a 57,7% de todos os fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (OJIMA, 2008). Com relação aos fármacos utilizados para tratamento de doenças infecciosas (antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários e antivirais) e câncer, cerca 68,3% e 79,8% são classificados como derivados ou inspirados em produtos naturais para fármacos anti-infecciosos e anticancer, respectivamente (CRAGG, GROTHAUS, NEWMAN, 2009).

Um levantamento dos cinco medicamentos mais vendidos mundialmente entre o período de agosto/2005 a agosto/2006 destaca o agente hipolipemiante Lipitor (Pfizer) - atorvastatina (IMS, 2006). A atorvastatina é um fármaco derivado do produto natural lovastatina, o qual é um metabólito produzido pelo fungo *Aspergillus terreus*, (MANZONI; ROLLINI, 2002).

O desenvolvimento de resistência nos microrganismos patogênicos e células tumorais tem sido um dos maiores problemas de saúde da população, portanto, existe uma necessidade contínua e cíclica por novos agentes antibióticos e antitumorais (CLARDY, FISCHBACH, WALSH, 2006; DEMAÏN, SANCHEZ, 2009). Além disso, a toxicidade de antimicrobianos e antitumorais utilizados em tratamentos clínicos é responsável por uma série de efeitos colaterais, justificando assim a busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas (DEMAÏN, SANCHEZ, 2009).

Os microrganismos são uma fonte promissora na busca de diversos metabólitos bioativos e têm originado alguns dos mais importantes produtos para a indústria farmacêutica com aplicações em diversas áreas: antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da mobilidade gástrica, fármacos hipocolesterolêmicos, inseticidas, herbicidas, antiparasitários entre outras (DEMAÏN, SANCHEZ, 2009).

Para atender a certas urgências na terapêutica, estudos com produtos naturais têm sido conduzidos sob novas perspectivas, especialmente inovações metodológicas. Os ensaios em larga escala tornaram-se cada vez mais difundidos. O rápido progresso do genoma humano proporcionou fácil acesso para uma grande variedade de alvos moleculares relacionados a várias doenças não infecciosas (BÉRDY, 2005).

Programas de pesquisas envolvendo sequenciamento genético têm revelado o grande potencial biossintético ainda não explorado que os microrganismos

apresentam. Isso pode ser ilustrado pelos genes silenciosos que muitas vezes não são expressos devido ao uso de meios de cultivo inapropriados. Entre as novas abordagens que têm sido recentemente discutidas na literatura como promissoras na busca de compostos bioativos a partir de microrganismos, destacam-se o cultivo simultâneo de microrganismos (co-culturas), o remodelamento epigenético da biossíntese através de agentes químicos, o estudo sobre moléculas sinalizadoras ou “*quorum-sensing*” e o uso de métodos genômicos para acessar e manipular as vias biossintéticas (SHERLACH, HERTWECK, 2009). Acredita-se que através do uso de co-culturas ocorra um estímulo para a comunicação química entre as diferentes espécies, o que pode ampliar a diversidade química produzida em comparação com culturas individuais. Tem sido proposto que processos epigenéticos exerçam importantes funções regulatórias silenciadoras em *clusters* de genes biossintéticos, principalmente em policetídeo sintetases e peptídeo sintetases não ribossomais. De fato, a manipulação destas vias com agentes químicos, principalmente inibidores de histona desacetilase, tem levado a um remodelamento de vias biossintéticas e à produção de novos produtos naturais em fungos (HENRIKSON et al., 2009). Com o controle epigenético consegue-se uma modificação no controle da biossíntese sem a interferência direta no material genético. Por outro lado, com o uso de técnicas baseadas em genômica interfere-se na biossíntese de produtos naturais através da manipulação do material genético. Atualmente, os métodos genômicos permitem a identificação de genes responsáveis pela biossíntese de determinada classe de compostos bioativos (exploração genômica ou *genome mining*); a clonagem de fragmentos de DNA de um determinado ambiente permitindo o acesso a genes não expressos por métodos tradicionais de cultivo (metagenômica); a ativação de *clusters* de genes envolvidos na biossíntese de uma via metabólica de interesse; a expressão heteróloga de genes silenciosos com auxílio de vetores e a engenharia genética de genes biossintéticos (McALPINE, 2009; SHERLACH, HERTWECK, 2009).

Outro aspecto importante para o sucesso na busca de novos fármacos é a utilização de ensaios biológicos mais robustos e confiáveis. Atualmente ensaios HTS tem sido amplamente empregados para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Esses ensaios são realizados por equipamentos automatizados, comumente conhecidos como robotizados, que permitem triagens *in vitro* e *in vivo* de grandes coleções de compostos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2009).

Organismos com a genética bem caracterizada, como *Drosophylla*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* e *Danio rerio* (zebrafish) têm sido utilizados como hospedeiros de microrganismos patogênicos caracterizando novos modelos biológicos na busca de agentes antimicrobianos (SÉGALAT, 2007).

Além das novas abordagens citadas anteriormente para a busca de novos fármacos, pesquisadores têm voltado atenção para a investigação de fontes ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química. Uma ampla diversidade de organismos tem sido explorada nos mais diversos habitats, especialmente em locais de condições ambientais extremas (ambientes que possuem alterações drásticas de temperatura, pH, umidade e/ou luminosidade). Neste contexto, podem-se citar os microrganismos marinhos, endofíticos e bactérias *gliding* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2009).

Dentro deste contexto, este trabalho baseou-se principalmente em duas estratégias para a identificação de produtos naturais: a) a pesquisa em fungos endofíticos, considerados relativamente pouco estudados e prolíficos produtores de novas substâncias bioativas; e b) uso de um novo ensaio antibacteriano baseado no modelo de infecção de *Enterococcus faecalis* no nematóide *Caenorhabditis elegans*.

Para facilitar a discussão e compreensão dos assuntos, o texto foi dividido em 2 capítulos.

II. CAPÍTULO I

Estudos químicos e biológicos sobre a produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos *Glomerella cingulata* e *Guignardia mangiferae*.

Cap. I - Introdução

II. 1. INTRODUÇÃO

II.1.1 Fungos endofíticos

O conceito utilizado neste trabalho é o que define fungos endofíticos como aqueles fungos que podem ser detectados em um momento particular associados à tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável (SCHULZ; BOYLE, 2005). Há um gradiente entre as distinções dos termos endofíticos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas), portanto às vezes torna-se difícil descrever limites para distinguir cada categoria (AZEVEDO et al., 2000).

Se o endofítico foi isolado de uma planta saudável, pressupõe-se uma relação simbiótica entre as espécies. A simbiose entre a planta e endofítico pode ser observada pela proteção, alimentação e transmissão do fungo que, em contrapartida, produz substâncias que aumentam o crescimento, reprodução e resistência do hospedeiro no ambiente (LU et al., 2000; SAIKKONEN et al., 2004). Porém, há a hipótese que a interação fungo-planta hospedeira seja caracterizada por um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Caso esse balanço seja alterado, uma diminuição da defesa da planta ou aumento da virulência do fungo pode desenvolver-se (SCHULZ, 2002; SAIKKONEN et al., 2004).

Alguns dados da literatura têm reportado a habilidade dos fungos endofíticos em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (STROBEL et al., 1996) (Figura 5, pag. 11). O primeiro exemplo e o mais marcante deles foi o isolamento do paclitaxel (taxol[®], **6**) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). O taxol[®] ou paclitaxel é um potente agente terapêutico antineoplásico e foi identificado inicialmente em *Taxus brevifolia* (WANI, 1971). Recentemente, a vincristina (**7**), substância anticâncer, foi isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). Outros exemplos de microrganismos endofíticos produtores dos mesmos metabólitos que a planta hospedeira podem ser ilustrados pelo fungo *Gibberella fugikuroi*, associado à planta *Curcubita maxima* (Cucurbitaceae) que produz derivados do ácido giberélico (**53**) (STOWE; YAMAKI, 1957), e pelos fungos *Fusarium* e *Myrothecium* (TRAPP et al., 1998), produtores de tricotecenos macrocíclicos (**54**) os quais foram isolados das

plantas *Baccharis megapotamica* (JARVIS et al., 1988) e *B. coridifolia* (JARVIS et al., 1988; RIZZO et al., 1997). Os exemplos mais recentes de metabólitos de fungos endofíticos idênticos ao do hospedeiro podem ser ilustrados pelos compostos anticancerígenos podofilotoxina (**55**) obtido a partir do endofítico *Trametes hirsuta*, associado ao hospedeiro *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2006); campetotecina (**56**), isolada de um fungo endofítico não identificado encontrado em associação com *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005) e a hipericina (**57**) isolada do fungo INFU/Hp/KF/34B associado a *Hypericum perforatum* (KUSARI et al., 2008).

Figura 5. Metabólitos secundários de fungos endofíticos idênticos aos da planta hospedeira.

Na busca por novos compostos bioativos é relevante considerar que os metabólitos secundários biossintetizados por fungos podem estar correlacionados com seus respectivos nichos ecológicos, assim como as interações metabólicas podem influenciar as vias biogénicas. Como resultado da função que os metabólitos secundários bioativos de endofíticos exercem na natureza, eles podem apresentar aplicações na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002).

A diversidade química obtida a partir de fungos endofíticos contempla diversas classes químicas incluindo policetídeos, derivados do ácido chiquímico, terpenos, alcalóides e peptídeos (PUPO et al., 2006). Alguns artigos de revisão têm destacado a ampla diversidade de produtos naturais produzidos por endofíticos (TAN, ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006). Borges et al. (2009) ilustraram uma ampla variedade de novos compostos, bem como substâncias bioativas isolados

recentemente de fungos endofíticos. Além disso, abordam a importante contribuição de fungos endofíticos como agentes de biotransformação, o que tem sido bastante valorizado em processos biotecnológicos quanto à obtenção de moléculas biotransformadas que seriam dificilmente obtidas via síntese convencional em laboratório.

A tabela 2 (pag. 12) ilustra alguns dos principais metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Tabela 2 – Alguns dos principais metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabólito secundário/ Atividade biológica	Referência
<i>Phoma medicaginis</i>	<i>Medicago sativa</i> <i>Medicago lupulina</i>	58 brefeldina A Antibiótica, inibidora de apoptose em células cancerígenas	WEBER et al., 2004a
<i>Phomopsis phaseoli</i> <i>Melanconium etulinum</i>	<i>Betula pendula</i> <i>Betula pubescens</i>	59 ácido 3-hidroxipropiônico	SCHAWARZ et al., 2004
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Erythrina crista-galli</i>	Nematicida 60 fomol	WEBER et al., 2004b
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Erythrina crista-galli</i>	Antifúngica, antibacteriana e antiinflamatória 61 ácido mevedínico Antiinflamatória	WEBER et al., 2004b

<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	<p>62 isopestacina</p>	HARPER et al., 2003
		Antimicrobiana e antioxidante	
<i>Aspergillus fumigatus</i> CY018	<i>Cynodon dactylon</i>	<p>63 asperfumoidina</p>	LIU et al., 2004
		Inibite crescimento de <i>Candida albicans</i>	
<i>Aspergillus niger</i> IBF-E003	<i>Cynodon dactylon</i>	<p>64 aurasperona A</p>	SONG et al., 2004
		Inibidora de xantina oxidase; células cancerígenas de cólon e antimicrobiana	
<i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001 <i>Microsphaeropsis olivacea</i>	<i>Trichospermum jasminoides</i> <i>Pigrodendron uviferum</i>	<p>65 grafislactona A</p>	HORMAZABAL et al., 2005; SONG et al., 2005
		Antioxidante	
<i>Xylaria</i> sp. F0010	<i>Abies holophylla</i>	<p>66 griseofulvina</p>	PARK et al., 2005
		Antibiótica	
<i>Apiospora montagnei</i>	<i>Polysiphonia violacea</i>	<p>67 (+)- epiepodiona</p>	KLEMKE et al., 2004.
		Citotóxica frente células tumorais	

Eupenicillium sp. *Murraya paniculata* FÁBIO et al., 2005

68 alantripineno

Inseticida

E00175 *Cistus salvifolius* WEBER et al., 2007

69 arundifungina

Antifúngico

E99291 *Cistus salvifolius* WEBER et al., 2007

70 ascosterosideo A

Antifúngico

E99291 *Cistus salvifolius* WEBER et al., 2007

71 ascosterosideo B

Antifúngico

E99297 *Cistus salvifolius* WEBER et al., 2007

72 5-(1,3-butadien-1-il)-3-(propen-1-il)-2(5H)-furanona

Antifúngico

73 malformina A1

Citotóxico

O sucesso de programas de bioprospecção em endofíticos envolve as estratégias adotadas para a seleção da planta hospedeira. Esta seleção pode basear-se no histórico etnobotânico, pode envolver plantas de biomas únicos, que desenvolvem estratégias adaptativas, pode ainda ser dirigida pelo endemismo da planta ou pela busca em regiões de elevada biodiversidade (STROBEL et al., 2004).

Em estudos prévios realizados com a espécie *Viguiera arenaria*, no laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP foi identificada a lactona sesquiterpênica (LST) budleína A (**74**), nas glândulas das inflorescências (Figura 6, pag. 15). A LST **74** apresentou atividade citotóxica significativa sobre linhagens SK-BR3 (adenocarcinoma de mama). Foram isolados ainda diterpenos pimarânicos (**75-80**) (Figura 6, pag. 15) das partes subterrâneas, sendo que alguns deles apresentaram ação inibitória da contração de músculo liso da artéria carótida de rato, relacionada a um possível efeito sobre a pressão arterial sanguínea, além de atividade antimicrobiana e tripanocida (AMBROSIO et al., 2006; AMBROSIO et al., 2002; AMBROSIO, 2001).

74 - Budleína A (LST)

diterpenos pimarânicos

- 75 R₁: COOH; R₂ = R₃ = R₄: H
76 R₁: COOH; R₂ = R₄: H; R₃: OH
77 R₁: CH₂OH; R₂: OH; R₃ = R₄: H
78 R₁: COOH; R₂ = R₄: H; R₃: OH
79 R₁: CH₃; R₂: OH; R₃: H; R₄: OH
80 R₁: COOH; R₂: OH; R₃: OH; R₄: H

Figura 6. *V. arenaria* e estruturas de LST (**74**) e diterpenos (**75-80**) isolados de *V. arenaria*.

Há uma busca constante por novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos que sejam mais eficazes, com reduzida toxicidade e que causem menor impacto ambiental. Essa busca tem sido realizada devido ao contínuo desenvolvimento da resistência humana a microrganismos patogênicos como *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus*. Novos fármacos também são necessários para o tratamento de infecções por protozoários, como malária, leishmaniose, tripanossomíases e filariose, pois o arsenal terapêutico para o tratamento destas doenças é reduzido (STROBEL; DAISY, 2003).

Os produtos naturais são considerados as fontes majoritárias para a busca de agentes terapêuticos para infecções causadas tanto por fungos quanto bactérias, câncer, desordens lipídicas e imunomodulação (CLARDY; WALSH, 2004). Neste contexto, os fungos endofíticos são fontes naturais de crescente interesse industrial e acadêmico para a busca de substâncias bioativas (CLARDY; WALSH, 2004), por serem organismos relativamente ainda pouco explorados e que podem oferecer oportunidades de inovação na descoberta de novos agentes terapêuticos e agroquímicos (STROBEL; DAISY, 2003). Desta forma, os microrganismos endofíticos devem ser enfatizados em programas de bioprospecção na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

II.1.2 Moléculas sinalizadoras ou “quorum-sensing”

As células monitoram sua densidade populacional através da liberação de moléculas sinalizadoras, às quais elas respondem. O termo usado para denominar este processo é “*quorum-sensing*”, que envolve regulação da expressão gênica em resposta a oscilação da densidade de populações celulares. Em bactérias estes compostos auto-estimulatórios são geralmente pequenas moléculas, e suas concentrações aumentam em função do aumento populacional. Estas moléculas sinalizadoras funcionam como sinais químicos na regulação de vários processos fisiológicos como virulência, metabolismo secundário, bioluminescência, formação de biofilme, competência, esporulação em resposta a densidade populacional celular (WHITEHEAD et al., 2001; CHEN et al., 2004)

Muitas classes de moléculas sinalizadoras originadas de microrganismos ainda não foram identificadas. Geralmente, essas moléculas podem ser divididas em duas categorias principais: (1) aminoácidos e pequenos derivados peptídicos,

comumente utilizados por bactérias Gram-negativas (LAZAZZERA; GROSSMAN, 1998; SHAPIRO, 1998), (2) derivados de ácidos graxos, conhecidos como lactonas homoserinas (HSLs) frequentemente utilizadas por microrganismos Gram-negativos (DUNNY; WINANS, 1999; WHITEHEAD et al., 2001).

Diversos microrganismos utilizam sistemas sinalizadores para a regulação de fenótipos variando de sistemas de reprodução até virulência frente ao hospedeiro, produção de antibióticos e outros metabólitos (Tabela 3, pag. 17) (GERA; SRIVASTAVA, 2006).

Tabela 3 – Exemplos de sistemas sinalizadores em bactérias.

Microrganismo	Fenótipo	Molécula sinalizadora	Referência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Protease extra-celular, formação de biofilme	C ₄ -HSL	SWIFT et al., 1997.
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Protease extra-celular	C ₄ -HSL	SWIFT et al., 1997.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Conjugação	3-oxo-C ₈ -HSL	WINANS; ZHU; MORÉ, 1999.
<i>Bacillus</i>	Desenvolvimento, adaptação	Peptídeos	DUNNY; LEONARD, 1997.
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Antibióticos, violaceína, exoenzimas, cianídeo	C ₆ -HSL	BLOSSER; GRAY, 2000.
<i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>Caratovora</i>	Antibióticos carbapenêmicos, exoenzimas	3-oxo-C ₆ -HSL	RAINA et al., 2009
<i>Erwinia stewartii</i>	Exopolissacarídeos	3-oxo-C ₆ -HSL	BECK VON BODMAN; FARRAND, 1995.
<i>Escherichia coli</i>	Divisão celular	?	SHARMA et al., 1986.
<i>Lactococcus</i> e outras bactérias lácticas	Produção de bacteriocina	Peptídeos	KLEEREBEZEM; DE VOS; KUIPERS, 1999.

<i>Myxococcus xanthus</i>	Desenvolvimento	Peptídeos, aminoácidos	DUNMIRE; TATAR; PLAMANN, 1999.
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Desenvolvimento da fase de latência	3-oxo-C ₆ -HSL	BATCHELOR et al., 1997.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exoenzimas múltiplas, formação de biofilme, cianídeo, lectina, piocianina, ramnolípido	3-oxo-C ₁₂ -HSL C ₄ -HSL	PEARSON et al., 1995.
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Antibiótico fenazina	C ₆ -HSL	PIERSON; PIERSON, 1996;
<i>Ralstonia solanacearum</i>	?	C ₈ -HSL	FLAVIER et al., 1997.
<i>Rhizobium elti</i>	Restrição no número de nódulos	?	ROSEMEYER et al., 1998.
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Vantagem na sobrevivência	7-cis-C ₁₄ -HSL	PUSKAS et al., 1997.
<i>Serratia liquefaciens</i>	Aglomerção, protease	C ₄ -HSL	EBERL et al., 1996.
<i>Streptococcus</i>	Adaptação, virulência	Peptídeos	LAZAZZERA; GROSSMAN, 1998.
<i>Streptomyces</i>	Produção de antibióticos	γ -butirolactona	HORINOUCI, 1999.
<i>Vibrio (Photobacterium) fischeri</i>	Bioluminescência	3-oxo-C ₁₀ -HSL	EBERHARD et al., 1981.
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Virulência, lípase bacteriaba	3-hidroxi-C ₄ -HSL	DUNPHY; MIYAMOTO; MEIGHEN, 1997.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	?	C ₆ -HSL	THROUP et al., 1995.
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	?	3-oxo-C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	ATKINSON et al., 1999.

Em fungos o processo de sinalização celular é pouco estudado. O tirosol, um derivado da tirosina, foi identificado como molécula sinalizadora com importantes implicações na dinâmica do crescimento e morfogênese de *Candida albicans*. A atividade do tirosol demonstrou ser específica na fase de latência - *lag phase* - (o microrganismo se adapta às novas condições físico-químicas do meio: pH, temperatura, salinidade, presença de inibidores, nutrientes, etc. Nesse período, o fungo modifica seu metabolismo para poder crescer no novo meio) não apresentando efeito no crescimento exponencial de *C. albicans*. Além disso, o tirosol mostrou contribuir na aceleração da conversão da fase leveduriforme para a fase filamentosa (CHEN et al., 2004) e sua secreção por *C. albicans* protege o microrganismo contra morte por fagocitose. Outro fator interessante é a maior produção de tirosol por *C. albicans* e *C. tropicalis* do que por *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, sugerindo uma possível relação no poder de virulência destes microrganismos (CREMER; VATOU; BRAVENY, 1999).

Outro estudo envolvendo o mecanismo *quorum sensing* em fungos foi recentemente descrito (BROEN et al., 2009). Oxilipinas, uma classe de ácidos graxos insaturados derivados de oxigenases, possuem importante função reguladora em vários processos biológicos no fungo *Aspergillus flavus*. A caracterização do gene *lox* mostrou influência na manutenção da densidade celular. Além disso, a identificação de quatro outros genes (PpoA, PpoB, PpoC e PpoD) envolvidos na geração de oxilipin-oxigenases em *A. flavus*, está relacionada com a capacidade de colonização e produção de aflatoxina (BROEN et al., 2009).

A produção de peptídios antimicrobianos, como as bacteriocinas, é regulada pelo mecanismo *quorum sensing*. Esses peptídios secretados no meio podem atuar como autoindutores ou feromônios que atuam na produção dos peptídios antimicrobianos. A produção do antibiótico β -lactâmico carbapenem por *Erwinia caratovora*, e dos metabólitos antimicrobianos e antiparasitários fenazinas (produzidas por *Pseudomonas* spp.; *Streptomyces* spp. e *Pantoeae agglomerans*) são também reguladas pelo mecanismo *quorum sensing* (RAINA et al., 2009).

Além de estudos correlacionando a produção de moléculas *quorum sensing* sobre alguma função fisiológica em um determinado microrganismo há estudos sobre a degradação destas moléculas por fungos, como fungos endofíticos e ectomicorizas. Algumas bactérias possuem atividades antibióticas reguladas pelo mecanismo *quorum sensing* e caso essas moléculas fossem degradadas poderia-se

sugerir que fungos que habitam ambientes comuns aos da bactéria poderiam interferir em funções deletérias à comunidade bacteriana. Compostos produzidos por fungos filamentosos como patulina e ácido penicílico foram descritos por sua habilidade de influenciar funções *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* (RASMUSSEN et al., 2005). Isso indica que uma nova abordagem com relação às funções ecológicas de fungos endofíticos e ectomicorrizas no interior ou na superfície de raízes de plantas, pois eles estariam influenciando em mecanismos para o controle de crescimento de comunidades bacterianas do mesmo ambiente. Ou seja, os fungos endofíticos poderiam atuar como controladores biológicos naturais frente às bactérias, ilustrando uma nova abordagem de interação fungo-bactéria (UROZ, HEINONSAALO, 2008).

Além do fenômeno *quorum sensing* estar correlacionado com funções biológicas em microrganismos há estudos recentes que demonstram que este fenômeno também possa estar presente em células cancerígenas, ocorrendo alterações quanto ao mecanismo de regulação multicelular e colonização por metástase (HICKSON et al., 2009).

A identificação de novas relações *quorum sensing* está em crescimento contínuo, sugerindo que a pesquisa nessa área pode representar importantes aplicações práticas. Por exemplo, se uma molécula é sinalizadora para a produção de metabólitos secundários bioativos, sua produção no meio pode ser monitorada para se obter uma maior produção das substâncias de interesse.

III. CAPÍTULO II

**Avaliação antibacteriana de produtos naturais e sintéticos utilizando o modelo
Caenorhabditis elegans infectado com o patógeno *Enterococcus faecalis***

Cap. II - Introdução

III.1. INTRODUÇÃO

III.1.1 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans é um nematóide de vida livre que pode ser encontrado no solo em várias partes do mundo. Alimenta-se de bactérias e têm ciclo de vida consideravelmente rápido, cerca de 3 dias, sob condições apropriadas em laboratório. Podem ser encontrados como hermafroditas ou machos, cada um com aproximadamente 1 mm de comprimento, porém diferem-se quando adultos (WOOD, 1988) (Figura 84 A, pag. 129).

O ciclo vida pode variar dependendo da temperatura de incubação utilizada para o desenvolvimento de *C. elegans*. Pode ser menor que três dias quando incubados à 25 °C e demorar até seis quando incubados à 16 °C. O desenvolvimento entre o período após fertilização até rompimento da parede dos ovos é chamado embriogênese. Após esse período obtêm-se as larvas em estágio conhecido como L1, as quais possuem formato similar de um adulto, porém são bem menores – 250 µm. O período conhecido como pós-embriológico envolve os estágios de crescimento até a formação de larvas L4 (L1 – L4). Após esse período os nematóides desenvolvem-se para as fases jovens adultos e adultos e estão preparados para a autofertilização (HOPE, 1999; WOOD, 1988) (Figura 80 B, pag. 129). Pode haver a formação de um estágio de “dormência”, conhecido como *dauer*, que é caracterizado por alterações fisiológicas que levam a formação de estrutura capaz de sobreviver por longo período sem se alimentar. As larvas do estágio larval são capazes de sobreviverem cerca de três a oito vezes mais que um animal sem ter passado por essa fase (RIDDLE, 1988).

A

xx hermaphrodite

XO male

B

Figura 84. A - Diferenças estruturais entre *C. elegans* hermafroditas e machos (ZARKOWER, 2006). **B** - Ciclo de vida do nematóide *C. elegans* (www.wormbase.org).

O interesse de pesquisadores para o uso do nematóide *C. elegans* como modelo para pesquisas biológicas teve um considerável aumento especialmente após o término do completo do seu sequenciamento genético. *C. elegans* foi o

primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado, em 1998, (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Os resultados do sequenciamento revelaram uma considerável conservação de mecanismos biológicos quando comparado ao reino animal, e isso tem sido um dos principais fatores que contribuíram para o interesse de estudos envolvendo *C. elegans* como sistema biológico. Recentemente, *C. elegans* tem sido amplamente selecionado como modelo biológico pelas facilidades laboratoriais que este pequeno nematóide apresenta e pela semelhança de mecanismos biológicos, comparados aos mamíferos, que podem apresentar grande equivalência em todas as espécies de animais (BRENNER, 1974).

C. elegans é um animal com vários tipos de células, como musculares e nervosas, e possui uma organização semelhante às células equivalentes nos vertebrados. Cerca de 84 genes relacionados a doenças humanas foram estudados geneticamente, dos quais 25 possuem relação direta com o genoma de *C. elegans* e 43 possuem consideráveis similaridades com os genes deste nematóide (MUSHEGIAN et al., 1998).

Estudos genéticos utilizando *C. elegans* têm sido bastante convenientes. Seu pequeno tamanho permite que em uma triagem genética, uma grande população possa ser examinada após metagêneses para raras mutações. A autofertilização dos hermafroditas contribui para a obtenção de homozigotos sem a necessidade de cruzamentos, o que também contribui para a obtenção de um grande número de indivíduos a serem estudados (HOPE, 1999).

Algumas das várias vantagens que ainda podem ser citadas para trabalhos envolvendo *C. elegans* são: baixo custo para manutenção dos nematóides, já que permanecem viáveis por cerca de sete anos sob congelamento; pode ser facilmente manipulado em laboratório utilizando placas de Petri com ágar ou em culturas líquidas com *Escherichia coli* como fonte de alimento (WOOD, 1988); há uma grande facilidade de acesso à informação sobre *C. elegans*, especialmente através dos sites da web www.wormbase.org e www.wormbook.org. Além disso, a alta homologia genética entre *C. elegans* e humanos significa que o entendimento deste nematóide contribuirá para significativas descobertas acerca do genoma humano.

Com o advento dos ensaios em robotizados em larga escala (HTS) foi possível a automação de um grande número de ensaios envolvendo apenas análises em células individuais, sendo ainda difícil transpor esse ensaio em nível de

tecidos ou outras estruturas mais complexas. Infelizmente, as triagens para uma grande variedade de patologias têm sido comprometidas especialmente devido às seguintes razões: 1) algumas doenças afetam um organismo como um todo, e a maioria dos organismos não podem ser reconstituídos *in vitro*, principalmente tecidos musculares e nervosos; 2) células e organismos estão fisiologicamente correlacionados e esta interface pode ser crítica para o desenvolvimento de algumas doenças e este aspecto não pode ser reconstituído *in vitro*; 3) o progresso de uma doença também não pode ser construído *in vitro*. Uma alternativa bastante significativa para a solução desses problemas destacados anteriormente tem sido o emprego de animais invertebrados como *C. elegans* (SÉGALAT, 2007). Este nematóide pode ser utilizado em ensaios HTS e assim contribuir para um ensaio *in vivo* bem informativo. Pode ser detectada a atividade de compostos *in vivo*, incluindo pró-farmacos; podem ser identificados compostos que atuem sobre a virulência do microrganismo utilizado no ensaio ou compostos que estariam aumentando a resposta imune do hospedeiro. Além disso, podem-se detectar possíveis efeitos tóxicos dos compostos e também a possibilidade de se ter informações da ação *in vivo* das substâncias ensaiadas (MOY et al., 2006).

C. elegans, um nematóide não parasita que vive no solo, é facilmente mantido em laboratório em placas de Petri contendo ágar inoculadas com *Escherichia coli*, fonte de alimento para o nematóide. Além disso, é um modelo de hospedeiro simples, que pode ser letalmente infectado por um grande número de patógenos humanos, incluindo as bactérias Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella entérica*, as bactérias Gram-positivo *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus*, e o fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* (MOY et al., 2006). Para os estudos de ação antimicrobiana, a fonte de alimento usual (*E. coli*) é substituída pelos microrganismos patogênicos. Assim, *C. elegans* se alimentará dos patógenos e desenvolverá uma infecção persistente, que pode ser letal se não for tratada com antibióticos. Portanto, o ensaio antimicrobiano usando *C. elegans* infectado com patógenos humanos pode fornecer informações úteis que não são obtidas nos ensaios antimicrobianos convencionais *in vitro*.

Vale mencionar que muitos protótipos não são adequados ao futuro desenvolvimento de fármacos devido a problemas relacionados à farmacocinética. Com estas características, este ensaio pode levar a identificação de novas substâncias ativas com maior quantidade de informações agregadas, o que pode

agilizar o processo de desenvolvimento de eventuais fármacos a partir dos protótipos descobertos. Os ensaios antimicrobianos tradicionais *in vitro* não fornecem estas informações.

O desenvolvimento e a validação do ensaio em placas de microtitulação de 96 poços foram realizados no laboratório do Professor Ausubel (MOY et al., 2006). São utilizados dois modelos de infecção de *C. elegans* com diferentes linhagens de *E. faecalis* nos ensaios. Para avaliação da ação antimicrobiana, *C. elegans* é infectado com a linhagem virulenta MMH594 de *E. faecalis*, a qual foi inicialmente isolada de pacientes com infecções hospitalares (HUYCKE, SPIEGEL, GILMORE, 1991). A linhagem Δ fsrB PAT18 sofreu deleção de um gene relacionado à virulência de *E. faecalis*. Portanto, a infecção de *C. elegans* com a linhagem Δ fsrB PAT18 não é letal para o nematóide. Assim, esse modelo de infecção é utilizado para avaliação da toxicidade das amostras, pois se houver morte do nematóide o agente causativo certamente estará presente na amostra testada (extratos ou substâncias).

Conclusões

IV. CONCLUSÕES

Foram isoladas 13 substâncias a partir do cultivo do fungo *Guignardia mangiferae*, sendo cinco delas inéditas na literatura. O meio de cultivo mais eficaz no isolamento de compostos inéditos foi o Czapek. A fração *n*-butanólica obtida do caldo da cultura em meio Czapek levou ao isolamento e identificação de quatro novos derivados tricloalternarenos, dois deles clorados. Com o cultivo em meio sólido de arroz foi possível a obtenção de quatro substâncias fenólicas sendo três estruturalmente semelhantes ao tirosol. O cultivo em meio líquido extrato de malte levou ao isolamento da chaetoglobosina D, única substância que apresentou atividade biológica significativa por ser um potente agente citotóxico frente células tumorais. Os dados de RMN associados aos dados de EM de alta resolução foram fundamentais para elucidação e/ou identificação estrutural das substâncias isoladas.

É interessante destacar que o fungo endofítico *G. mangiferae* foi cultivado em quatro diferentes meios, sendo três líquidos (PDB, Czapek e extrato de malte) e um sólido (arroz parbolizado). Observou-se um maior rendimento relativo de extrato para o cultivo em arroz, porém no meio Czapek o fungo produziu a maior quantidade de substâncias inéditas, enquanto no meio de extrato de malte a única substância atividade biológica significativa, entre as atividades testadas. Estes dados ilustram a grande versatilidade dos fungos, pois dependendo da condição de cultivo o metabolismo secundário pode ser completamente alterado. Desta forma, a determinação das condições de cultivo ideais para o objetivo de um trabalho em química de produtos naturais microbianos é uma etapa de fundamental importância.

Foi desenvolvido um método analítico para a quantificação do tirosol em meio Czapek dentro dos parâmetros recomendáveis pela Food and Drug Administration (GUIDANCE FOR INDUSTRY). Esse método desenvolvido foi aplicável para quantificação do tirosol em diferentes condições de cultivo utilizando meio líquido Czapek. Estudos foram conduzidos na tentativa de se determinar uma possível função sinalizadora (*quorum sensing*) do tirosol na biossíntese de metabólitos secundários por duas diferentes linhagens do fungo endofítico *G. cingulata*. Apesar de terem sido observadas algumas diferenças nos perfis cromatográficos em CLAE, os resultados não foram conclusivos, pois não foi possível isolar nenhum metabólito secundário induzido pela presença de tirosol. Porém, o fato do tirosol ser produzido

por uma ampla variedade de fungos endofíticos claramente sugere uma possível função biológica para esta substância. O método de quantificação do tirosol desenvolvido poderá, portanto, contribuir para outros estudos sobre a importância do tirosol como sinalizador do metabolismo secundário em outros fungos endofíticos ou ainda auxiliar na elucidação de outras funções sinalizadoras.

O ensaio antibacteriano *in vivo* utilizando o nematóide *C. elegans* é um ensaio rápido, eficaz e bastante informativo, já que algumas vias bioquímicas deste nematóide são bem conservadas quando comparadas com as dos mamíferos. Comparando-se os resultados obtidos na triagem de extratos de fungos endofíticos com dados previamente publicados na literatura observou-se uma maior *hit rate* para os extratos oriundos de fungos endofíticos de espécies de Asteraceae isolados durante os trabalhos de prospecção química e biológica no Laboratório de Química Farmacêutica de Ribeirão Preto – USP. Além disso, 14 produtos naturais apresentaram boa atividade na triagem inicial, sendo dois triterpenos de origem vegetal (ácidos ursólico e oleanólico) e 12 azafilonas de origem fúngica (chaetoviridinas). Esses dados ilustram a grande oportunidade de se encontrar substâncias bioativas a partir do estudo com fungos endofíticos.

O trabalho realizado permitiu, portanto, evidenciar que a pesquisa com fungos endofíticos pode gerar novos produtos naturais e substâncias bioativas. A função sinalizadora de pequenas moléculas nestes microrganismos é uma área que merece ser mais pesquisada, já que praticamente não existem informações sobre moléculas sinalizadoras em fungos endofíticos. A associação de ensaios robustos e informativos às pesquisas em produtos naturais é fundamental para aumentar as possibilidades de descoberta de novas aplicações para as substâncias isoladas. O ensaio antibiótico usando *C. elegans* desenvolvido neste trabalho ilustrou que novas atividades biológicas podem ser descobertas para substâncias novas e conhecidas.

Referências Bibliográficas

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, E. L. Balancing quantity and quality in drug discovery. **Drug Discovery World**, Winter, p. 71, 2002/3.

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 propranolol. **Mycopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; DA COSTA, F. B.; DE OLIVEIRA, A. M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v.79, p.925-933, 2006.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; BONAVENTURA, D.; DE OLIVEIRA, A. M.; DA COSTA, F. B. Pimarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v.73, p.484-489, 2002.

AMBROSIO, S.R. **Investigação fitoquímica das raízes de *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae) e ensaios farmacológicos em útero de ratas**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 150 pp., 2001.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, suppl.S1, p.5-16, 2001.

ATKINSON, S.; THROUP, J. P.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B. A hierarchical quorum sensing in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. **Molecular Microbiology**, v.33, p.1267-1277, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W.; PEREIRO, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.

AYER, W. A.; SINGER, P. P. Metabolites of birds nest fungi. 14. Phenolic metabolites of the birds nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*. **Phytochemistry**, v.19, n.12, p.2717-2721, 1980.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Reports**, v.24, p.1225-1244, 2007.

BATCHELOR, S. E.; COOPER, M.; CHHABRA, S. R.; GLOVER, L. A.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P.; PROSSER, J. I. Cell-density regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, n.63, p.2281-2286, 1997.

BECK VON BODMAN, S.; FARRAND, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acyl homoserine lactone inducer. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.5000-5008, 1995.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of Antibiotics**, v.58, n.1, p.1-26, 2005.

BLOSSER, R. S.; GRAY, K. M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducer. **Biochemical Journal**, v. 40, p.40-55, 2000.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v.13, n.12, p.1137-1163, 2009.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes e metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 350 pp., 2008.

BREGER, J.; FUCHS, B. B.; APERIS, G.; MOY, T. I.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. Antifungal chemical compounds identified using a C-elegans pathogenicity assay. **Plos Pathogens**, v.3, n.2, p.168-178, 2007.

BRENNER, S. Genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v.77, n.1, p.71-94, 1974.

BROEN, S. H.; SCOTT, J. B.; BHAHEETHARAN, J.; SHARPEE, W. C.; MILDE, L.; WILSON, R. A.; KELLER, N. P. Oxygenase coordination is required for morphological transition and the host-fungus interaction of *Aspergillus flavus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, n.7, p.882-894, 2009.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D.; Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.7, p.919-929, 2006.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v.22, n.2, p.162-195, 2005.

BYRNE, K. M.; SMITH, S. K.; ONDEYKA, J. G. Nodulisporic acid A: precursor studies. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, n.24, p.7055-7060, 2002.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC. Fundamentos, Estratégias e Validação. Editora da UFSCar, 77p., 2001.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v.689, p.175-180, 1997.

CEDEÑO, L.; CARRERO, C. Antracnosis en plántulas de macadamia causada por *Glomerella cingulata*. **Interciencia**, v.27, n.10, p.559-562, 2002.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.14, p.5048-5052, 2004.

CISAR, C. R.; TeBEEST, D. O. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. **Current Genetics**, v.35, p.127-133, 1999.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v.24, n.12, p.1541 – 1550, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829-837, 2004.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v.24, n.5, p.936-943, 1985.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press., 1981.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, n.2, p.157-160, 2004.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v.109, p.3012-3043, 2009.

CREMER, J.; VATOU, V.; BRAVENY, I. 2,4-(hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidant agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. **FEMS Microbiological Letters**, v.170, p.319-325, 1999.

CUNHA, L. C. S.; SILVA, M. L. A. E.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHOLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G.; DA SILVA, A. A.; CUNHA, W. R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C**, v.62, n.9-10, p.668-672, 2007.

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

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v.62, p.5-16, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. England: John Wiley & Sons, LTD, 2nd ed, 2002, 507 p.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUNMIRE, V.; TATAR, L. D.; PLAMANN, L. Genetic suppression analysis of an *asgA* missense mutation *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, v.145, n.6, p.1299-1306,

1999.

DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. **Cell-cell signaling in Bacteria**. Eds. Dunny, G.M. and Winans, S.C. ASM Press, Washington, pp.1-5, 1999.

DUNNY, G. M.; LEONARD, B. A. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.527-564, 1997.

DUNPHY, G.; MIYAMOTO, C.; MEIGHEN, E. A homoserine lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Journal of Bacteriology**, n.179, p.5288-5291, 1997.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; DE ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v.161, n.3, p.273-280, 2006.

EBERHARD, A.; BURLINGAME, A. L.; KENYON, G. L.; NEALSON, K. H.; OPENHEIMER, N. J. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, v.20, p.2444-2449, 1981.

EBERL, L. WINSON, M. K.; STERNBERG, C.; STEWART, G. S. A. B.; CHRISTIANSEN, G.; CHHABRA, S. R.; BYCROFT, B.; WILLIAMS, P.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Involvement of N-acyl homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behavior of *Serratia liquefaciens*. **Molecular Microbiology**, v.20, n.1, p.127-136, 1996.

FÁBIO, A.; PROENÇA, B.; EDSON, R. F. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, n.3, p.257-268, 2005.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. A Darwinian view of metabolismo: molecular properties determine fitness. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.3, p.719-726, 2009.

FLAVIER, A. B.; GANOVA-RAEVA, L. M.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Hierarquichal autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.7089-7097, 1997.

GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFFO, L. V.; PESSOA, C. O.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, p.142-151, 2009.

GERA, C.; SRIVASTAVA, S. Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. **Current Science**, v.90, n.5, p.666-676, 2006.

Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, Center for Drug Evaluation and Research, United states Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/eder/guidance/index.htm>.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, aceito, 2009.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.1, p.188-194 2009.

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 *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, n.1, p.134-144, 2008.

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto/ SP, 208 pp., 2006.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v.69, p.509-526, 2006.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A. PORCO, J. A.; TOMER, D. P.; ONEIL, K. L.; HEIDER, E. M.; GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v.59, n.14, p.2471-2476, 2003.

HARVEY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19/20, p.894-901, 2008.

HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JOYNER, P. M.; CICHEWICZ, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.7, p. 435-438, 2009.

HICKSON, J.; YAMADA, S. D.; BERGER, J.; ALVERDY, J.; O'KEEFE, J.; BASSLER, B.; SCHAEFFER, C. R. Societal interactions in ovarian cancer metastasis: a quorum-sensing hypothesis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v.26, p.67-76, 2009.

HIROTA, A.; HORIKAWA, T.; FUJIWARA, A. Isolation of Phenylacetic Acid and Indolacetic Acid from a Phytopathogenic Fungus, *Glomerella cingulata*. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v.57, n.3. p.492, 1993.

HOPE, I. A. **Background on *Caenorhabditis elegans***. In: *C. elegans*. A Practical Approach. Edited by Hope, I. A. Oxford University Press, New York, NY, 1999.

HORINOUCHI, S. **Cell-cell signaling in Bacteria**. Eds. Dunny, G.M. and Winans,

S.C.). ASM Press, Washington, pp.193-204, 1999.

HORMAZABAL, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea* an Endophytic Fungus of *Pilgerodendron uviferum* **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.60, n.1-2, p.11-21, 2005.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei*, *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, p.163-167, 2001.

HUYCKE, M. M.; SPIEGEL, C. A.; GILMORE, M. S. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n.8, p.1626-1634, 1991.

IMS HEALTH. **IMS retail drug monitor**. Tracking 13 key global pharma markets. 12 months to august 2006, 2006.

ITO, S.; HIRATA, Y. Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Tetrahedron Letters**, v.18, n.28, p.2429-2430, 1977.

JACKSON, M.; KARWOSWSKI, 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.

JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O.; BEAN, G. A.; ABOULNASR, M. B.; BARROS, C. S. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v.51, p.736-744, 1988.

KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M.; KUIPERS, O. P. **Cell-cell signaling in Bacteria**. Eds. Dunny, G.M. and Winans, S.C. ASM Press, Washington, pp.67-82, 1999.

KLEMKE, C.; KEHRAUS, S.; WRIGHT, A. D.; KONIG, G. M. New Secondary Metabolites from the Marine Endophytic Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.6, p.1053-1058, 2004.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. -J.; DiTULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.62, p.446-458, 2003.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.206-220, 2005.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, p.69-90, 2004.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin. **Journal of Natural Products**,

v.71, n.2, p.159-162, 2008.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n.6, p.279-289, 2007.

LAZAZZERA, B. A.; GROSSMAN, A. D. The ins and outs of peptide signaling. **Trends in Microbiology**, v.7, p.288-294, 1998.

LEWIS, J. A.; FELMING, J. T. **Basic Culture Methods**. In: Methods in Cell Biology, vol 48. *Caenorhabditis elegans*: Modern Biological Analysis of an Organism. Eds: Epstein, H. F.; Shakes, D. C. Academic Press, p. 3-29, 1995, San Diego, CA, USA.

LIEBERMANN, B.; NUSSBAUM, R. -P.; GÜNTHER, W.; TEUSCHER, J. -M. Biosynthesis of the bicycloalternarenes, mixed terpenoids of *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v.56, p.551-557, 2001.

LIEBERMANN, B.; ELLINGER, R.; GÜNTHER, W.; IHN, W.; GALLANDER, H. Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* related to ACTG-toxins. **Phytochemistry**, v.46, n.2, p.297-303, 1997.

LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUI, Z. J.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n.3, p.279-287, 2004.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p.277-282, 2001.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

LUNEL, M. -C.; ARPIN, N.; FAVRE-BONVIN, N. Structure de la Nor-Mycosporine Glutamine, nouvelle substance isolée de *Pyronema omphalodes* (Bull ex Fr.) fückel. **Tetrahedron Letters**, v.2, n.49, p.4715, 1980.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.143-148, 2002.

MANZONI, M.; ROLLINI, N. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.5, p.555-564, 2002.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as endophytic fungi from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.2, p.280-283, 2005.

McAlpine, J. B. Advances in the Understanding and Use of the Genomic Base of Microbial Secondary Metabolite Biosynthesis for the Discovery of New Natural Products. **Journal of Natural Products**, v.72, p.566-572, 2009.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.655, p.13-27, 2009.

MOMESSO, L. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; NOMIZO, A.; GOLDMAN, G. H.; PUPO, M. T. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Química Nova**, v.31, n.7, p.1680-1685, 2008.

MOMESSO, L. S. **Bioprospecção em fungos endofíticos associados a *Viguiera robusta* (Asteraceae) e citocalasanas produzidas por *Guignardia bidwelli***. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Ribeirão Preto/SP, 176 pp., 2004.

MOY, T. I.; BALL, A. R.; ANKLESARIA, Z.; CASADEI, G.; LEWIS, K.; AUSUBEL, F. M. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.27, p.10414-10419, 2006.

MUSHEGIAN, A. R., GAREY, J. R., MARTIN, J., LIU, L. X. Large-scale taxonomic profiling of eukaryotic model organisms: A comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode, and yeast genomes. **Genome Research**, v.8, n.6, p.590-598, 1998.

NATORI, S.; YAHARA, I. **Mycotoxins and phytoalexins**. Eds: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. CRC Press: Boca Raton, cap. 12, 1991.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível do site: http://www.sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM7_A6.pdf

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v.17, p.215-234, 2000.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.2290-2303, 2009.

NUSSBAUM, R.-P.; GÜNTHER, W.; HEINZE, S.; LIEBERMANN, B. New tricycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v.52, p.593-899, 1999.

OJIMA, I. Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.9, p.2587-2588, 2008.

PALMUCCI, H. E.; WOLCAN, S. M. *Bougainvillea glabra* and *Bougainvillea spectabilis*: new hosts of *Glomerella cingulata* in Argentina. **Australasian Plant Pathology**, v.34, p.615-616, 2005.

PARK, J. H.; CHOI, G. L.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. W. JANG, K. S.; CHO, K. Y.; KIM, J. C. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p.112-117, 2005.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v.44, p.1-68, 1997.

PEARSON, J. P.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B. H.; GREENBERG, E. P. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.1490-1494, 1995.

PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathology suppression. **FEMS Microbiology Letters**, v.136, p.101-108, 1996.

POUPKO, R.; LUZ, Z. Carbon 13-NMR of citrinin in the solid state and in solutions. **Journal of Physical Chemistry A**, v.101, p.5097-5102, 1997.

POWELL, R. J.; AUSUBEL, F. M. Model of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. **Methods in Molecular Biology**, v.415, p.403-427, 2008.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds**. Tables of Spectral Data. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2000.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. **Microbial natural products: A promising source of bioactive compounds**. In: Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Research Signpost. Editor: Carlton A. Taft, pp.197 In: Microbial natural products: A promising source of bioactive compounds. Ed. Research Signpost, Kerala, Índia, 2006, p. 51-78.

PURI, S. C; NAZIR, A.; CHAWLA R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNAA, T.; AHMEDA, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v.122, p.494-510, 2006.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v.68, n.12, p.1717-1719, 2005.

PUSKAS, A.; GREENBERG, E. P.; KAPLAN, S.; SCHAEFER, A. L. A quorum-

sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology**, n.179, p.7530-7537, 1997.

QIAO, L. -R.; YUAN, L.; GAO, J. -M.; ZHAO, P. -J.; KANG, Q.-J.; SHEN, Y. -M. Tricycloalternare derivatives produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. **Journal of Basic Microbiology**, v.47, p.340-343, 2007.

RAINA, S.; DE VIZIO, D.; ODELL, M.; CLEMENTS, M.; VANHULLE, S.; KESHAVARZ, T. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? **Biotechnology Applied Biochemistry** v. 54, p. 65-84, 2009.

RASMUSSEN, T. B.; SKINDERSOE, M. E.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R. K.; CHRISTENSEN, K. B.; JENSEN, P. O.; ANDERSEN, J. B.; KOCH, B.; LARSEN, T. O.; HENTZER, M.; EBERL, L.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. **Microbiology**, v.151, n.5, p. 1325-1340, 2005.

RIDDLE, D. L. **The Dauer Larva**. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Edited by William B. Wood. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1988.

RIZZO, I.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides*. **Toxicon**, v.35, n.5, p.753-757, 1997.

RODRIGUES, K. F.; COSTA, G. L.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. A. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1617-1621, 2005.

RODRIGUES, K. F.; SIEBER, T. N.; GRUNIG, C. R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, v.108, n.1, p.45-52, 2004.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.261-267, 2000.

ROSEMEYER, V.; MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium elti* CNPAF512 contribute to síntesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.815-821, 1998.

ROY, S.; SHARMA, A.; DHOTARE, B.; VICHARE, P.; CHATTOPADHYAY, A.; CHATTOPADHYAY, S. Na efficient asymmetric route to tertiary carbinols: synthesis of (*R*)-Mevalonolactone. **Synthesis**, n.7, p.1082-1090, 2007.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, n.6, p.275-280, 2004.

SANTOS, R. G.; RODRIGUES-Fo, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp. found in

association with *Mellia azedarach*. **Phytochemistry**, v.61, p.907-912, 2002.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. L. **Methods in Biotechnology**, vol.20, "Natural Products Isolation". 2nd Ed, 515p., 2006.

SÉGALAT, L. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. **Chemical Biology**, v.2, n.4, p.231-236, 2007.

SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S.; KUWANO, H. Structures of chaetoglobosins-C, chaetoglobosin-D, chaetoglobosin-E, chaetoglobosin-F, cytotoxic indol-3-yl-[13]cytochalasans from *Chaetomium globosum*. **Tetrahedron Letters**, v.17, p.1351-1354, 1976.

SCHERLACK, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.7, p.1753-1760, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.6, p.661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.

SCHWARZ, M.; KOPCKE, B.; WEBER, R. W. S.; STERNER, O.; ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi **Phytochemistry**, v.65, n.15, p.2239-2245, 2004.

SÉGALAT, L. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. **Chemical Biology**, v.2, n.4, p.231-236, 2007.

SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organism. **Annual Review of Microbiology**, v.52, p.81-104, 1998.

SHARMA, S.; STARK, T. F.; BEATTIE, W. G.; MOSES, R. E. Multiple control elements for the *uvrC* gene unit of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v.14, p.2301-2318, 1986.

SHAO, C.; GUO, Z.; PENG, H.; PENG, G.; HUANG, Z.; SHE, Z.; LIN, Y.; ZHOU, S. A new isoprenyl phenyl ether compound from mangrove fungus. **Chemistry of Natural Compounds**, v.43, n.4, p.377-380, 2007.

SIEBER, T. N.; DORWORTH, C. E. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British-Columbia- in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, v.72, n.10, p.1397-1402, 1994.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5^a edição. Âmbito Cultural Edições LTDA. Rio de Janeiro-RJ, 336p., 1995.

SILVERTON, J. V.; AKIYAMA, T.; KABUTO, C.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S.

Tetrahedron Letters, v.17, n.17, p.1349-1350, 1976.

SOFIA, M.; TURNES-GIL; FENICAL, W. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. **Biological Bulletin**, v.182, p.105-108, 1992.

SONG, Y. C.; LI, H.; YE, Y. H.; SHAN, C. Y.; YANG, Y. M.; TAN, R. X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths **FEMS Microbiology Letters**, v.241, n1, p.67-72, 2004.

SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. Characterization of Graphis lactone A as the Antioxidant and Free Radical-Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.3, p.506-509, 2005.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.

STOESSL, A. 8- hidroxy-6-methoxy-3-methylisocoumarin and other metabolites of *Ceratocystis fimbriata*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.35, n.2, p.186-191, 1969.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.8, p.181-216, 1957.

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

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.491-502, 2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.17, p. 417-423, 1996.

SWIFT, S.; KARLYSHEV, A. V.; FISH, L.; DURANT, E. L.; WINSON, M. K.; AHHABRA, S. R.; WILLIAMS, P.; MACINTYRE, S.; STEWART, G. S. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5271-5281, 1997.

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

TAYLOR, J. E.; HYDE, K.D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v.142, p.335-346, 1999.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology, 232, 2012-2018.

THROUP, J. P.; CAMARA, M.; BRIGGS, G. S.; WINSON, M. K.; CHHABRA, S. R.; BYCROFT, B. W.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B. Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. **Molecular Microbiology**, v.17, p.345-356, 1995.

TRAPP, S. C.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S.; JARVIS, B. B. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. **Molecular and General Genetics**, v.257, n.4, p.421-432, 1998.

TRISCHMAN, J. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Guaymasol and epiguaymasol: aromatic triols from a deep-sea *Bacillus* isolate. **Natural Products Letters**, v.11, p.279-284, 1998.

TSUJINO, I.; YABE, K.; SEKIKAWA, I.; HAMANAKA, N. Isolation and structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. **Tetrahedron Letters**, v.19, n.16, p.1401-1402, 1978.

URIZAR, N. L.; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F.V.; ORDENTLICH, P.; YAN, Y.; GONZALEZ, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D. D. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. **Science**, v.296, p.1703-1706, 2002.

UROZ, S.; HEINONSALO, J. Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.65, p.271-278, 2008.

VAJNA, L.; BAGYINKA, T. Occurrence of privet anthracnose in Hungary caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Pathology**, v.51, p.403, 2002.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G.; ALBUQUERQUER, S.; OLIVA, G.; PAVAO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, n.3, p.617-622, 2001.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v.9, p.15-32, 2003.

WANI, M.W. Plant tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American**

Chemical Society, v.93, p.2325, 1971.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, n.4, p.365-404, 2001.

WEBER, D.; GORZALCZANY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C.; STERNER, O.; ANKE, T. Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n.5-6, p.467-477, 2005.

WEBER, R. W.; STENGER, O.; MEFFERT, A.; HAHN, M. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? **Mycological Research**, v.108, p.662-671, 2004a.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **Journal of Antibiotics**, v.57, p. 559-563, 2004b.

WEBER, R. W. S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MÖSKER, E.; ANKE, H. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v.68, n.6, p.886-892, 2007.

WINANS, S. C.; ZHU, J.; MORÉ, M. I. **Cell-cell signaling in Bacteria**. Eds. Dunny, G. M. and Winans, S. C. ASM Press, Washington, pp.117-128, 1999.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; KANJANA, K. D.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.265-272, 2004.

WOOD, W. B. **Introduction to *C. elegans* Biology**. In: The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Edited by Willian B. Wood. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1988.

www.wormbase.org, acessado em outubro de 2007.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S.; Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v.35, n.1, p.79-81, 2004.

YOUNG, H.; PATTERSON, V. J. A UV protective compound from *Glomerella cingulata* – a mycosporine. **Phytochemistry**, v.21, n.5, p.1075-1077, 1982.

YUAN, L.; ZHAO, P. -J.; MA, J.; LI, G. -H.; SHEN, Y. -M. Tricycloalternarenes A-E: Five new mixed terpenoids from the endophytic fungal strain *Alternaria alternata* Ly83. **Helvetica Chimica Acta**, v.91, p.1588-1594, 2008.

ZARKOWER, D. **Somatic sex determination**. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.84.1, <http://www.wormbook.org>, 2006.

ZHAN, J.; GUNAHERATH, G. M. K. B.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. **Phytochemistry**, v.68, p.368-372, 2007.