UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades
citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo
endofítico *Drechslera ravenelii***

Eliane de Oliveira Silva

Ribeirão Preto

2010

RESUMO

SILVA, E. O. **Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii***. 2010. 119f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O interesse na obtenção de novos fármacos a partir de micro-organismos endofíticos vem crescendo, uma vez que esta é uma fonte ainda pouco explorada. Além disso, o estudo das interações entre plantas e micro-organismos tem sido amplamente discutido ao longo dos últimos anos. No presente trabalho, o fungo endofítico *Drechslera ravenelii* (SS33), isolado das folhas de *Smallanthus sonchifolius* (yacon), foi cultivado sob diferentes condições fermentativas, objetivando a determinação das melhores condições para produzir metabólitos secundários com atividades antimicrobiana e/ou citotóxica. Para tal avaliaram-se dois parâmetros: meio fermentativo e tempo de incubação. Os meios fermentativos líquidos utilizados foram Czapek e caldo de batata (PDB), sob agitação (120 RPM), cultivados por 216 e 480 horas. Também foi desenvolvida cultura por fermentação em substrato sólido, meio de arroz-aveia, durante 720 horas. Todos os cultivos foram realizados em temperatura de 30 °C e precedidos por pré-fermentação. Dos cultivos em meio líquido foram obtidas frações em diclorometano e em acetato de etila. Já dos cultivos provenientes do meio fermentativo sólido foram obtidas frações em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Dessa forma, obtiveram-se 12 frações que foram concentradas em rotaevaporador até a secura, pesadas e identificadas. As frações tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada através de duas técnicas: técnica da bioautografia e técnica da microdiluição em microplaca (determinação da Concentração Inibitória Mínima), utilizando-se como indicadores biológicos as cepas *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação da atividade citotóxica foi realizada pela técnica do MTT, utilizando-se três linhagens de células tumorais MB435 (melanoma humano), HCT-8 (cólon humano) e SF-295 (glioblastoma humano). As frações tiveram também seus perfis químicos avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Após observação dos resultados obtidos, concluiu-se que a fração diclorometânica, proveniente do meio fermentativo sólido, foi a que apresentou maior rendimento, manejo mais simples e perfil cromatográfico mais interessante, quando comparada às outras frações obtidas dos meios sólido e líquido. Desse modo, foi realizada ampliação da escala fermentativa em meio sólido e a fração diclorometânica obtida foi submetida a processos cromatográficos visando o isolamento das substâncias majoritárias. Assim, foram isoladas a substância 1 (não identificada) e a substância 2, identificada como terpestacina, um sesterpeno incomum com conhecida atividade na inibição da formação de sincícios pelo vírus HIV. A terpestacina foi isolada pela primeira vez do fungo *Drechslera ravenelii* no presente estudo. A substância 2 não apresentou atividade antimicrobiana quando submetida ao ensaio da microdiluição em microplaca e apresentou atividade citotóxica discreta, frente a três linhagens de células cancerígenas humanas.

Palavras chave: *Drechslera ravenelii*, metabólitos secundários, fungo endofítico

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 A importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos

No início do século XX, antes da “Era Sintética”, 80% de todos os medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas de plantas. Nos últimos tempos, os produtos naturais continuam sendo significativas fontes de fármacos e protótipos, compondo aproximadamente 60% dos compostos anticancerígenos e 75% dos medicamentos para as doenças infecciosas. Análise do FDA sobre novos medicamentos aprovados revela que os produtos naturais continuam a desempenhar um papel central, mesmo diante da busca das indústrias por outras estratégias de descoberta. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2002, mais de 90% das atuais classes terapêuticas derivaram de um produto natural e, ainda hoje, grande parte da população depende desse tipo de medicamento (McCHESNEY, VENKATARAMAN, HENRI, 2007).

Nota-se que a atividade biológica da maioria dos compostos naturais do mundo ainda não foi testada e que há várias fontes inovadoras de biodiversidade disponíveis, incluindo uma gama de espécies de plantas, organismos marinhos e a diversidade microbiana (HARVEY, 2007). Tais espécies são conhecidas por produzirem moléculas com grande variedade em sua estrutura química e atividade biológica (CLAESON e BOHIN, 1997). A maioria dos produtos naturais possui estruturas complexas e com tantos centros de assimetria que provavelmente nunca será produzida comercialmente por síntese química (DEMAIN, 2000).

A descoberta de fármacos sempre confiou na riqueza da natureza para encontrar novas moléculas que tratem antigas e novas doenças (ZHANG, LIXIN, DEMAIN, 2006). Dessa forma, na descoberta de novos antibióticos, os produtos naturais têm desempenhado um papel crucial (BUTLER e BUSS, 2006).

Há muitos anos, os medicamentos de origem natural vêm contribuindo para diversas terapias, como o anti-inflamatório aspirina (1), o analgésico opióide morfina (2), o cardiotônico digitoxina (3), o antimalárico quinina (4), além da pilocarpina (5), utilizada para tratamento de glaucoma (BUTLER, 2004) (Figura 1). A terapia anticâncer também teve como base produtos naturais derivados de plantas como alcalóides da Vinca (6 e 7) e paclitaxel (8) (CALLERY, 2002) (Figura 1).

A grande abundância dos ainda não descobertos compostos bioativos naturais abastecerá os fármacos futuros, bem como as novas aplicações na agricultura e indústria. Uma fonte muito estimulante e promissora são os micro-organismos endofíticos que vivem nos tecidos das plantas (DEMAIN e DIJKHUIZEN, 2006).

A busca por compostos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de planta. O tratamento das infecções bacterianas foi revolucionado com descoberta da penicilina por Fleming, em 1928. Esta descoberta levou pesquisadores a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de micro-organismos, e esta busca resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO *et al.*, 2008).

Figura 1: Produtos naturais utilizados na terapêutica

1.2 Antimicrobianos e antitumorais derivados de micro-organismos

Quando comparados com fontes naturais, como plantas e animais, os micro-organismos são fontes mais facilmente renováveis e reprodutíveis de substâncias químicas. Mais de 130 fármacos comerciais em uso corrente são de origem microbiana. Além disso, 67 derivados de compostos microbianos estão atualmente em diferentes fases do desenvolvimento clínico nas áreas de antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais, anti-inflamatórios, antineoplásicos, neurológicos, cardiovasculares, doenças metabólicas e imunológicas (LAM, 2007).

Dentre os fármacos de origem microbiana estão os antibacterianos penicilinas, cefalosporinas, ácido clavulânico, carbapeninas e monobactamas, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas e peptídeos cíclicos; os utilizados na terapia anticancerígena, como bleomicinas, actinomicina D, mitomicina C, antraciclina e pentostatina; e os imunomoduladores ciclosporina A, rapamicina, tacrolimus, ascomicina e ácido micofenólico. Entretanto, entre os mais interessantes produtos naturais microbianos já descobertos estão os agentes redutores de colesterol derivados de fungos. Esses fármacos anti-hiperlipidêmicos, conhecidos como estatinas, estão entre os mais vendidos no mundo, e incluem mevastatina e lovastatina de origem natural, e análogos sintéticos, como atorvastatina e sinvastatina (PUPO *et al.*, 2006).

Um fato bem conhecido é que produtos naturais isolados de micro-organismos foram e continuam sendo fonte da maior parte dos antibióticos disponíveis no mercado. Muitos antibióticos descobertos até o início dos anos 1970 atingiram o mercado e suas estruturas químicas foram mais tarde utilizadas como molde para geração de outros antibióticos clinicamente úteis. Na verdade, antibióticos e produtos naturais são termos intimamente ligados (PELÁEZ, 2006).

Em geral, os antibióticos são produtos de fermentação produzidos durante a fase estacionária do crescimento dos micro-organismos. São definidos como produtos naturais de baixo peso molecular (metabólitos secundários) produzidos por certos micro-organismos e ativos contra outros em baixa concentração (ROBINSON, SINGH, NIGAM, 2001).

Uma cultura de micro-organismos em crescimento conduz frequentemente à produção de metabólitos secundários que se destinam à proteção do organismo produtor contra formas de vida co-existentes ou predadores do meio. Nisso fundamenta-se supor que os micro-organismos são promissoras fontes de antimicrobianos (SINGH e BARRET, 2006).

Antibióticos estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo inteiro, porém sua eficácia clínica tem enfrentado sérias preocupações especialmente devido ao aparecimento de bactérias resistentes (TAKAHASHI *et al.*, 2008), como por exemplo, a resistência exibida por *Staphylococcus aureus* à meticilina e à vancomicina (ANTHONY *et al.*, 2009).

Assim como em outras áreas de descoberta de fármacos, há duas fontes de antibióticos: produtos naturais e compostos sintéticos. Antibióticos provenientes de fontes naturais variam de pequenas a grandes moléculas, geralmente possuem complexas estruturas com grupos funcionais bem destacados, possibilitam o máximo de interações moleculares com o alvo e muitas vezes atuam somente nos patógenos e não no hospedeiro. Por outro lado, antibióticos de origem sintética têm desempenhado um papel menor como fontes de protótipos, podendo-se citar as sulfonamidas (1), as quinolonas (2) e oxazolidinonas (3) (SINGH e BARRET, 2006). Exemplos de antibióticos derivados de produtos naturais encontram-se nos β -

lactâmicos (4), glicopeptídeos (5) e daptomicina (6) (Figura 2) (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Figura 2: Representação estrutural de antibióticos de origem sintética (à esquerda) e natural (à direita)

Micro-organismos ainda não testados quanto a sua atividade antibacteriana, são uma fonte promissora na produção de moléculas inovadoras ou de modelos

para o desenvolvimento de novos antibióticos. Procurar fontes originais de micro-organismos é altamente aconselhável, uma vez que antibióticos já foram isolados das mais diversas fontes de micro-organismos, tais como endofíticos de plantas de habitat terrestres ou mesmo aqueles provenientes do meio marinho (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

1.3 Fungos endofíticos

Endofíticos colonizam e vivem em tecidos saudáveis de plantas sem causar sintomas por, ao menos, um período de seu ciclo de vida, podendo, após período de incubação ou de latência, causar doenças (SIKORA *et al.*, 2008). A maioria, senão todas as plantas estudadas no seu ecossistema natural estão infestadas por fungos sem nenhuma manifestação patogênica (KOGEL, FRANKEN, HÜCKELHOVEN, 2006).

Quando fungos endofíticos colonizam as raízes de seus hospedeiros, a interação pode ser mutualista, auxiliando no crescimento do hospedeiro e fornecendo nutrientes necessários para a sobrevivência do micro-organismo. Considera-se que o endófito sintetiza metabólitos para inibir plantas epífitas e agentes patogênicos que competem pelo mesmo hospedeiro, mas também para regular o metabolismo do hospedeiro (SCHULZ *et al.*, 2002).

Desde o surgimento do termo “endofítico” supõe-se que o fungo pode tornar-se parasita sob determinadas condições, visto que um fungo continuamente é afetado por fatores abióticos e bióticos, dentro dos limites da plasticidade de seu genótipo e fenótipo. Assim, a extensão do período de latência do fungo pode variar. Por exemplo, um fungo endofítico pode tornar-se parasita, patogênico ou saprófito devido a uma mutação em um único locus do seu genoma, alterações na composição das espécies da microflora foliar ou mudanças na planta hospedeira,

como consequência de alterações na disponibilidade de nutrientes do solo. Em termos evolutivos, supõe-se que fungos endofíticos evoluíram de parasitas ou de agentes patogênicos através da extensão nos períodos de latência e redução da virulência (SIEBER, 2007).

A planta garante nutrientes, abrigo e transferência dos endofíticos à próxima geração e, enquanto isso se torna mais vigorosa, resistente à seca, aos herbívoros, aos parasitas e aos nematóides que possam atacá-la. Como consequência dessa interação, os micro-organismos realizam interações metabólicas que os possibilitam produzir substâncias comuns ao metabolismo de seu hospedeiro e que podem possuir aplicações no exterior da planta hospedeira. Recentemente, além dos metabólitos secundários, os endofíticos têm sido fonte de enzimas aplicadas em processos biotecnológicos para a biotransformação de moléculas e na alimentação do homem. A diversidade química das substâncias produzidas por endofíticos é notável e inclui policetídeos, derivados do chiquimato, terpenos, esteróides, alcalóides e peptídeos, geralmente dotados de atividade antimicrobiana e citotóxica (tabela 1) (BORGES *et al.*, 2009).

Durante a evolução dos fungos endofíticos no interior da planta hospedeira, eles podem adquirir capacidade de produção de algumas substâncias tipicamente produzidas pela planta. Tal fato pode ser explicado quando se observa a captação de parte do DNA do hospedeiro para o interior do genoma fúngico. Como exemplo, observa-se a produção de paclitaxel (Taxol[®]) pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* cujo hospedeiro é a *Taxus brevifolia*, planta de onde originalmente foi isolado o Taxol[®] (BORGES *et al.*, 2009). No entanto, a fonte de Taxol[®] é um problema frustrante devido à dificuldade e ao baixo rendimento obtido em sua síntese. Atualmente, busca-se contornar tal problema procurando novas fontes

desse anticancerígeno, sendo que seria fascinante se os baixos rendimentos de Taxol® pudessem ser supridos através de uma fermentação de endofíticos em larga escala (TAN e ZOU, 2001).

Tabela 1: Exemplos de metabólitos secundários de fungos endofíticos incluídos em diversas classes químicas

Fungo endofítico	Classe química	Metabólito secundário	Atividade biológica
<i>Neotyphodium sp.</i>	Alcalóide	Chanoclavina	Inseticida
<i>Colletotrichum sp.</i>	Esteróide	3-oxoergosta-4,6,8(14), 22-tetraeno	Antifúngico
<i>Taxomyces andreanae</i>	Terpeno	Taxol®(paclitaxel)	Anticancerígeno
<i>Pezicula sp.</i>	Derivados de isocumarina	(<i>R</i>)-Mellein	Herbicida, fungicida e algicida
<i>Hormonema dematioides</i>	Quinona	Rugulosina	Inseticida
Endofíticos do capim-azul (<i>Poa ampla</i>)	Flavonóide	Tricina	Tóxico para larvas de mosquitos
<i>Acremonium sp.</i>	Peptídeo	Leucinostatina A	Anticancerígeno e antifúngico
<i>Phoma sp.</i>	Fenol	Ácido 2-Hidroxi-6-metilbenzóico	Antibacteriano
<i>Phyllosticta sp.</i>	Compostos clorados	Criptosporiopsina	Antimicrobiano e algicida

Atualmente, a busca por novos metabólitos fúngicos está concentrada principalmente na análise aleatória de isolados. A seleção deveria ser baseada em um “screening” inteligente, através da investigação de biótopos dos quais os fungos não tenham sido previamente isolados e onde ocorram interações metabólicas ambiente/micro-organismo. Fungos endofíticos são fontes para “screening” inteligente por atenderem a ambos os critérios, já que crescem no interior de seus vegetais hospedeiros onde estabelecem interações metabólicas. Além disso, em comparação com fungos patógenos de plantas e fungos isolados do solo, os endofíticos apresentam maior quantidade de metabólitos secundários (SCHULZ *et al.*, 2002). Na figura 3 ilustram-se algumas substâncias bioativas e inéditas isoladas a partir de micro-organismos endofíticos (BORGES *et al.*, 2009; GUNATILAKA, 2006; GUO *et al.*, 2008).

Figura 3: Substâncias bioativas e inéditas isoladas de micro-organismos endofíticos

1.4 O gênero *Drechslera*

Espécies de *Drechslera* são taxonomicamente relacionadas a espécies de *Bipolaris*, *Exserohilum* e *Curvalia* e ecologicamente semelhantes a Deuteromicetos, importantes patógenos de plantas (PRATT, 2006).

O gênero *Drechslera* é capaz de produzir pigmentos amarelo-alaranjados. Tais pigmentos possuem dois tipos de estrutura, antraquinônica e derivados de xantona. O pigmento denominado ravenelina é um derivado de xantona (1,8-diidroxixantona) e pode ser isolado de *Drechslera ravenelii*, *Drechslera holmii*, *Drechslera monoceras* e *Drechslera turcica*. Já os pigmentos crisofanol e helmintosporina possuem estrutura antraquinônica, isto é, possuem grupo metila no sistema policíclico e fórmula molecular com ao menos 15 átomos de carbono (Figura 4) (EIJK e ROEYMANS, 1981).

Figura 4: Pigmentos produzidos por *Drechslera ravenelii*

Drechslera sp. é utilizada na biorremediação da poluição por óleo cru no Kuwaiti, devido à sua capacidade de crescer e degradar o hidrocarboneto em meios com altas concentrações de NaCl (10 %) e em altas temperaturas, condições estressantes encontradas no deserto do Kuwaiti (OBUEKWE *et al.*, 2005).

Algumas espécies já foram estudadas e forneceram bons resultados, incluindo *Drechslera siccanis* que fornece herbicida natural para ervas daninhas (EVIDENTE *et*

al., 2005), *Drechslera avenacea* que produz bioerbicida para aveia selvagem (HETHERINGTON *et al.*, 2002) e *Drechslera gigantea*, de onde é extraído um micoerbicida (EVIDENTE *et al.*, 2006).

Estudos realizados por GALLO e colaboradores, revelaram que 12 % de 186 extratos obtidos do cultivo de 32 fungos endofíticos, isolados da planta *Smallanthus sonchifolius*, apresentavam moderada ou alta atividade citotóxica contra células tumorais e foram considerados promissoras fontes de compostos anticancerígenos. Entre tais fungos, o *Drechslera ravenelii* (SS33), isolado como endofítico das folhas de *Smallanthus sonchifolius*, chamou a atenção já que o extrato em acetato de etila proveniente de seu cultivo por 20 dias foi capaz de inibir o crescimento celular de três linhagens tumorais testadas: inibição de 86,7 % em cólon humano, 71,2 % em melanoma humano e 84,5 % glioblastoma humano (GALLO *et al.*, 2009). Tais resultados constituíram base para realização dos estudos com o fungo endofítico *Drechslera ravenelii* aqui descritos.

2. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos do trabalho desenvolvido com o fungo endofítico *Drechslera ravenelii*, conclui-se que:

- O cultivo por fermentação em substrato sólido apresentou frações com maior rendimento em massa que as obtidas em meio fermentativo submerso (líquido).
- Foram empregadas duas técnicas na determinação da atividade antimicrobiana: bioautografia e microdiluição em microplaca para determinação da concentração inibitória mínima. No ensaio da bioautografia, as frações provenientes do meio Czapek apresentaram a maior quantidade de substâncias com potencial antimicrobiano contra *S. aureus* e *K. rizophila*, pois a quantidade de Rfs, correspondentes aos halos de inibição formados por essas frações foi superior ao observado nas frações obtidas dos dois outros meios fermentativos (PDB e arroz-aveia). No ensaio de microdiluição em microplaca, as frações mais ativas contra *S. aureus* foram provenientes do meio sólido, enquanto contra *K. rizophila*, os três meios fermentativos forneceram frações bastante ativas.

As bactérias Gram – positivas (*Kocuria rhizophila* e *Staphylococcus aureus*) foram sensíveis a maioria das frações testadas, nos dois ensaios. Por outro lado, as bactérias Gram – negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) apresentaram resistência a todas as frações. Tal fato pode dever-se às características diferenciadas das bactérias Gram – negativas em relação às Gram - positivas, envolvendo diferentes mecanismos de ação antimicrobiana das amostras analisadas.

- Para a avaliação da atividade citotóxica frente a células tumorais, as frações foram submetidas ao teste do MTT. A análise dos resultados mostra que o meio fermentativo líquido Czapek produz as substâncias mais indicadas para inibir as três

linhagens celulares testadas, pois todas as frações apresentaram atividade moderada ou muito alta, não aparecendo nenhuma fração sem atividade ou com pouca atividade.

A fração mais ativa foi a diclorometânica proveniente do cultivo por 480 horas em meio PDB, cuja inibição celular atingiu 100 % contra as três linhagens de células tumorais, atividade observada pela primeira vez nos estudos aqui descritos.

A comparação entre as atividades citotóxicas das frações e os resultados demonstrados inicialmente por GALLO *et al.* (2009) aponta que a utilização de pré-fermentação, a adição de aveia e a extensão do período de cultivo do meio fermentativo sólido proporcionaram a produção de substâncias com atividade citotóxica superior. Foi possível observar também maior atividade citotóxica na fração em acetato de etila proveniente do meio Czapek cultivado por 480 horas que a descrita por GALLO *et al.* (2009).

- Os perfis cromatográficos em CLAE revelaram que as frações obtidas dos cultivos em meio fermentativo sólido ofereceram as melhores condições para isolamento e obtenção de metabólitos secundários. O perfil cromatográfico das frações obtidas do meio fermentativo Czapek tornou-se mais complexo com o aumento do tempo de cultivo. Já as frações provenientes do meio fermentativo PDB tiveram seus perfis cromatográficos menos complexos com o aumento do tempo de cultivo. Após observação de todos os cromatogramas, nota-se que a mudança de meio fermentativo e de tempo de cultivo altera o perfil das substâncias produzidas.

- Levando-se em conta que a fração diclorometânica mostrou-se promissora no ensaio de atividade antimicrobiana e, como mencionado acima, o cultivo em meio sólido apresentou rendimento bastante superior ao cultivo em meio líquido, optou-se por desenvolver a ampliação de escala de cultivo utilizando a fermentação em

substrato sólido (arroz-aveia), através da estratégia de cultivo em batelada. Dessa forma, foi possível obter a fração diclorometânica do meio sólido com perfil cromatográfico semelhante ao obtido quando do cultivo em pequena escala. Assim, tal fração foi submetida aos procedimentos de isolamento das substâncias majoritárias.

- Para o isolamento das substâncias majoritárias foram empregadas três técnicas cromatográficas: cromatografia líquida a vácuo (precedida por partição líquido-líquido), cromatografia em coluna clássica e cromatografia Líquida de Alta Eficiência na modalidade preparativa. A técnica de cromatografia líquida a vácuo mostrou-se uma excelente opção como técnica inicial de fracionamento, sendo que a amostra empregada passou previamente por partição com solventes de polaridades crescentes, o que otimizou ainda mais o processo cromatográfico. O emprego das três técnicas cromatográficas possibilitou o isolamento de duas substâncias: substância 1 com rendimento de 11,5 mg e substância 2 com rendimento de 19,0 mg.

- A substância 1 encontra-se em fase de identificação estrutural. Já a substância 2 foi identificada como terpestacina, um sesterpeno incomum isolado pela primeira vez em 1993 e possuidor de conhecida atividade na inibição da formação de sincícios causados pelo vírus HIV em células T4 humanas. Recentemente, a terpestacina, tem sido utilizada como antiangiogênica.

- A terpestacina mostrou discreta atividade no ensaio antimicrobiano (CIM) e citotóxico. Os resultados modestos das atividades antimicrobiana e citotóxica da terpestacina tornam-na mais promissora na inibição da formação de sincícios e angiogênese, pois não se trata de uma substância com atividade citotóxica indiscriminada.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p 5-16, 2001.
- ANTHONY, T.; RAJESH, T; KAYALVIZHI, N; GUNASEKARAN, P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 872 - 877, 2009.
- ATLAS, R. M. (1995) Handbook of microbiological media. Boca Raton: CRC Press, p. 280.
- BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. **Journal of Chromatography**, v. 78, p. 41-51, 1973.
- BERGER, G. O.; TIUS, M. A. Terpestacin Core Structure. Control of Stereochemistry. **Organic Letters**, v. 7, n. 22, p. 5011 - 5013, 2005.
- BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141 - 2153, 2004.
- BUTLER, M.S.; BUSS, A. D. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 919 - 929, 2006.
- CALLERY, P.; GANNETT, P. Cancer and cancer chemotherapy. In: WILLIAMS, D. A., LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 5. ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 924-951.
- CANNELL, R. J. P. (ed.). Scale-up of natural products isolation. In: **Natural products isolation**. New Jersey, Humana Press, cap. 14, p. 409 – 424, 1998.
- CHAN, J.; JAMISON, T. F. Synthesis of (-)-terpestacin via catalytic, stereoselective fragment coupling: siccanol is terpestacin, not 11-epi-terpestacin. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 11514-11515, 2004.
- CLAESON, P.; BOHLIN, L. Some aspects of bioassay methods in natural-product research aimed at drug lead discovery. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 7, p. 245 - 248, 1997.
- COLE, M. D. Key Antifungal, Antibacterial and Anti-insect Assays-a Critical Review. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 8, p. 837 - 858, 1994.
- COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The Application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934-936, 1986.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.499 - 514, 2000.

DEMAIN, A.L.; DIJKHUIZEN, L. Ecology and industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 237- 239, 2006.

EIJK, G.W.; ROEYMANS, H.J. Revenelin, chrysophanol, and helminthosporin, pigments from *Drechslera holmii* and *Drechslera ravenelii*. **Experimental Mycology**, v. 5, n. 4, p. 373 - 375, 1981.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R.; MOT, A.; Ophiobolin E and 8-epi-ophiobolin J produced by *Drechslera gigantea*, a potential mycoherbicide of weedy grasses. **Phytochemistry**, v. 67, n. 20, p. 2281 - 2287, 2006.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R.; MOT, A. Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccans*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 6, p. 715 - 721, 2005.

FURTADO, N. A. J. C.; FONSECA, M. J. V.; BASTOS, J. K. The potential of na *Aspergillus fumigatus* brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 357 - 362, 2005.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, 2008. p. 139-168.

GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; 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. 48, p. 1-10, 2009.

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.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136 – 142, 2008.

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480 - 484, 2007.

HETERINGTON, S.D.; SMITH, H.E.; SCANES, M.G., AULD, B. A. Effects of some environmental conditions on the effectiveness of *Drechslera avenacea* (Curtis ex Cooke) Shoem.: a potential bioherbicidal organism for *Avena fatua* L. **Biological Control**, v.24, n. 2, p.103 - 109, 2002.

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*. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 34-38, 1993.

JUNG, H. J.; LEE, H. B.; KIM, C. J.; RHO, J.; SHIN, J.; KNOW, H. J. Anti-angiogenic Activity of Terpestacin, a Bicyclo Sesterterpene from *Embellisia chlamydospora*. **The Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 5, p. 492-496, 2003.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358 - 363, 2006.

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

LUND, B.M; LYON, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola* on thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography**, v. 110, p. 193 - 196, 1975.

McCHESNEY, J. D. VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

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

MYERS, A. G.; SIU, M.; REN, F. Enantioselective synthesis of (-)-terpestacin and (-)-fusaproliferin: clarification of optical rotation measurements and absolute configurational assignments establishes a homochiral structural series. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, p. 4230 - 4232, 2002.

NIHASHI, Y; LIM, C. H.; TANAKA, C., MIYAGAWA, H.; UENO, T. Phytotoxic sesterterpene, 11-epiterpestacin, from *Bipolaris sorokiniana* NSDR-011. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 685 – 688, 2002.

OBUEKWE, C.O.; BADRUDEEN, A.M.; AL-SALEH, E.; MULDER, J. L. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 4, p. 197-205, 2005.

OKA, M.; LIMURA, S.; TENMYO, O.; SAWADA, Y.; SUGAWARA, M.; OHKUSA, N.; YAMAMOTO, H.; KAWANO, K.; HU, S.; FUKAGAWA, Y.; OKI, T. Terpestacin, a new syncytium formation inhibitor from *Arthrimum* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 3, p. 367-374, 1993.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 981 - 990, 2006.

PRATT, R.G. Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. **Mycopathologia**, n. 162, p.133 - 140, 2006.

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

RANDAZZO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; MANNINA, L.; ROSSI, E.; SCARALLO, A.; SEGRE, A. L. Proliferin, a new sesquiterpene from *Fusarium proliferatum*. **Tetrahedron**, v. 49, n. 47, p. 10883 - 10896, 1993.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Microbiol Biotechnology**, v. 55, p. 284 – 289, 2001.

SANTINI, A. RITIENI, A.; GLIANO, V.; RANDAZZO, G.; MANNINA, L.; LOGRIECO, A.; BENEDETTI, E. Structure and Absolute Stereochemistry of Fusaproliferin, a Toxic Metabolite from *Fusarium proliferatum*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 109 – 112, 1996.

SCHLEGEL, B., SCHMIDTKE, M.; DÖRFELT, H.; KLEINWÄCHTER, P.; GRÄFE, U. (-)-Terpestacin and L-tenuazonic acid, inducers of pigment and aerial mycelium formation by *Fusarium culmorum* JP 15. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 179 – 183, 2001.

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

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SIKORA, R. A.; POCASANGRE, L.; FELDE, A. Z.; NIERE, B.; VU, T. T.; DABABAT, A.A. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, v. 46,n. 1, p. 15-23, 2008.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SINGH, S. B; BARRET, J. F. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1006-1015, 2006.

SHI, J.; CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6556–6564, 2008.

SHU, C. H. Fungal Fermentation for Medicinal Products. In: Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Taiwan, 2007, cap. 17, p. 447 – 463.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 517 – 554, 2008.

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

TAKAHASHI, J. A.; CASTRO, M. C. M.; SOUZA, G. G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.; OLIVEIRA, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

TATSUTA, K.; MASUDA, N.; NISHIDA, H. The first total synthesis of Terpestacin HIV syncytium formation inhibitor. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 83 – 86, 1998.

VENZKE, D.; SERPA, R.; LIMA, M. C.; RIBEIRO, G. A.; FREITAG, R. A.; BRETANHA, L. C.; GOUVÊA, D. P. Eficiência do Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio em teste de atividade antibacteriana “in vitro”. **16º Encontro de Química da Região Sul**. 2008.

ZHANG; LIXIN; DEMAINE, A.L. Natural Products, Drug Discovery and Therapeutic Medicine. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9 - 10, p. 747, 2006.

WANG, L; YANG, S. (ed.). Solid State Fermentation and Its Applications. In: Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Ohio, 2007. cap. 18, p. 465 – 489.