

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state*
of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos
secundários com atividades biológicas

Henrique Pereira Ramos

Ribeirão Preto
2008

RESUMO

RAMOS, H. P. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas** 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O presente projeto teve por objetivo a otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para incrementar a produção de metabólitos secundários com atividades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral. O fungo foi cultivado em meio líquido em duas etapas distintas, primeiramente em 200 mL de meio pré-fermentativo de Jackson por 48 horas a 30 °C sob agitação constante (120 rpm), e posteriormente, reinoculando a massa micelial assepticamente obtida na etapa pré-fermentativa, em 400 mL de meio fermentativo Czapek, seguido de reincubação a 30 °C sob agitação constante (120 rpm). Após filtração do fluido da cultura e partição com solventes orgânicos obteve-se os extratos, aceto etílico, butanólico, etanólico e aquoso. A condição de cultivo padrão, cultivo inicial em meio fermentativo Czapek, foi realizada por 20 dias de incubação. Os extratos provenientes desta condição de cultivo foram avaliados quanto às atividades antibacteriana e antifúngica. O extrato aceto etílico apresentou, nesta condição de cultivo, a melhor atividade antibacteriana com concentração inibitória mínima (CIM) de 270 µg/mL para *Escherichia coli*, não sendo observada atividade antifúngica nestes extratos. Após avaliação inicial foram realizadas modificações na condição de cultivo padrão em meio fermentativo, objetivando a otimização da atividade antibacteriana, anteriormente reportada. Avaliou-se as variáveis, período de incubação, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH, temperatura e proporção carbono/nitrogênio do meio, respectivamente. Cada variável foi aferida realizando ensaios de CIM dos extratos provenientes dos diferentes cultivos realizados, selecionando a melhor condição para a otimização da variável seguinte. A melhor condição para a produção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana foi obtida em 9 dias de incubação utilizando-se sacarose (3,1%) como fonte de carbono e nitrato de sódio (0,1%) como fonte de nitrogênio, em pH 4 a 30 °C com valor de CIM de 90 µg/mL para *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* atividade esta superior a detectada sob a condição de cultivo padrão. Para a atividade antifúngica, anteriormente não detectada, a melhor condição de cultivo foi com a utilização de sacarose (3,1%) e nitrato de sódio (0,1%) em pH 4 a 30 °C para *Aspergillus fumigatus* (CIM de 130 µg/mL) e sacarose (3,0%) e nitrato de sódio (0,2%), em pH 4 a 30 °C para *Candida albicans* (CIM de 140 µg/mL). A melhor condição de cultivo para a produção de metabólitos secundários com atividade antitumoral foi obtida com a utilização de sacarose (3,0%) como fonte de carbono e nitrato de sódio (0,2%) como fonte de nitrogênio, em pH 4 a 30 °C para as três linhagens tumorais humanas avaliadas (HCT-8, MDA-MB435 e SF295) nas quais detectou-se 100% de inibição de crescimento celular, esta condição foi também responsável pela melhor atividade inibitória da enzima APRT de *L. tarentolae*, apresentando 66,41% de inibição, indicando possível atividade antiparasitária. A otimização de condições de cultivo do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. mostrou-se relevante para a produção de metabólitos secundários bioativos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc., atividade biológica.

INTRODUÇÃO

Substâncias bioativas e fungos endofíticos

Nos últimos anos, a resistência a antibióticos por microrganismos tem-se intensificado, devido em parte ao surgimento de novas doenças, à evolução de patógenos resistentes e à ausência de opções eficientes para o tratamento de algumas doenças. A correta manipulação dos fármacos existentes, o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, assim como a prospecção de novos agentes terapêuticos, necessários para controlar e talvez reverter o problema de saúde pública mundial, fazem-se necessários (LEVY, 2005; ANDERSON, 2005).

Produtos naturais constituem estratégias promissoras no desenvolvimento de novos fármacos (HARVEY, 2000). Entre os novos fármacos aprovados pelo “U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION” (FDA) entre 1981 e 2002, aproximadamente 50% eram originários de produtos naturais ou derivados (NEWMAN et al., 2003), e entre as 35 drogas mais vendidas em 2000, 2001 e 2002, 15 correspondem a produtos naturais ou derivados (BUTLER, 2004).

No Brasil a maioria das investigações de fontes de novos fármacos concentram-se em plantas (BRAZ-F^o, 1994). Mas, microorganismos são considerados uma das fontes mais promissoras de novos metabólitos, os quais apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas (STROBEL et al., 2004). Microrganismos são produtores de enzimas de interesse industrial e farmacêutico, de agentes antibióticos, antitumorais, imunossuppressores, antiparasitários e outros (DEMAIN, 1999).

Os fungos constituem um dos grupos menos estudados quanto aos seus metabólitos secundários (STROBEL et al., 1996). Estimativas apontam que apenas 5% das espécies de fungos estejam descritas (HAWKSWORTH, 2001) e entre essas, a maioria não foi avaliada como fonte de substâncias bioativas (PEARCE, 1997), evidencia-se assim, a grande potencialidade desses organismos em programas de bioprospecção.

Aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem substâncias que são ativas em bioensaios, 51% dessas substâncias são estruturalmente desconhecidas, contra 38% observada para fungos de solos (SCHULZ; BOYLE, 2005). Portanto, fungos endofíticos são uma das fontes mais promissoras de novos protótipos para

desenvolvimento de fármacos entre microrganismos (STROBEL, 2003).

Consideram-se fungos endofíticos aqueles que vivem toda ou uma parte do seu ciclo de vida no interior de plantas sem causar, aparentemente, sintomas de doenças (TAN; ZOU, 2001). Estes fungos podem habitar seu hospedeiro intracelularmente (CABRAL et al., 1993) ou intercelularmente (BOYLE et al., 2001), presentes em quaisquer órgãos das plantas e em todos os estágios de seu desenvolvimento, colonizando todos os nichos ecológicos existentes (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os fungos endofíticos podem ser taxonomicamente ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos e oomicetos, apresentando alta especificidade quanto a planta hospedeira ou podem ser colonizadores mais generalistas (SAIKKOMEN et al., 1998).

A reprodução dos fungos endofíticos ocorre assexuadamente através da produção de esporos ou através de reprodução sexuada, sendo os esporos transmitidos verticalmente pela presença em sementes, ou através da infecção de folhas, horizontalmente (WILSON, 1995).

Os esporos podem ser transferidos de seu substrato original através do ar e depositados sobre o novo hospedeiro. Essa distribuição é fortemente influenciada por ventos e chuvas, que contribuem para o caráter sazonal de distribuição dos endofíticos em regiões temperadas.

As interações entre fungos endofíticos e plantas são dinâmicas variando de simbiose mutualística (READMAN et al., 2002) a comensalismo (DECKERT et al., 2001) e até mesmo um fitopatógeno latente pode estabelecer colonização como fungo endofítico (PHOTITA et al., 2004). Em todas as interações endofíticas, o caráter assintomático de colonização dá-se através de um equilíbrio de antagonismos, entre a virulência do fungo e a defesa da planta, na qual há produção de metabólitos de interesse opostos por parte de ambos, pois fungos secretam enzimas e outros metabólitos, necessários ao processo de infecção, e a planta por sua vez, produz metabólitos responsáveis pela contenção da infecção (SCHULZ; BOYLE, 2005). Isto não impede que a interação seja benéfica para ambos, pois fungos endofíticos produzem uma ampla diversidade de metabólitos bioativos que agem na planta, como hormônios de crescimento (de BATTISTA et al., 1990), promovendo tolerância a estresse abióticos (GAO et al., 2005) e influenciando na fotossíntese (SCHARDL et al., 2004) além de inibirem herbivoria e infecção por

patógenos (ARNOLD et al., 2003), em troca são supridos com nutrientes e favorecidos quanto a reprodução e dispersão (RUDGERS et al., 2004)

A síntese de metabólitos secundários por fungos endofíticos é correspondente ao respectivo nicho ecológico ocupado na planta e as interações metabólicas entre fungo e planta, assim como o bioma no qual encontram-se inseridos, podem influenciar as vias biogénicas da produção de metabólitos secundários (SCHULZ et al., 2002).

A família Asteraceae, Angiospermas

Dentre as Angiospermas a família Asteraceae (Cosmopositae) apresenta um grande número de representantes no Brasil, predominantemente em regiões de cerrado onde se observa uma enorme diversidade vegetal (GOTTLIEB et al., 1996). São plantas herbáceas, subarborescentes, arbustivas e raramente arbóreas, podendo ser perenes ou anuais, diversas espécies possuem importância biológica e econômica, sendo alguns de seus representantes a alface (*Lactuca sativa*), a camomila (*Matricaria chamomilla* L.), a carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.), o guaco (*Mikania laevigata* Sch. Bip. Ex. Bak.), entre muitos outros.

Originalmente o yacon e outras plantas relacionadas, foram classificadas pertencendo ao gênero *Polymnia* (Asteraceae, Heliantheae, subtribo Melampodiinae). Entre as últimas revisões, restabeleceu-se o gênero *Smallanthus* e separou-se espécies anteriormente consideradas como *Polymnia* em dois gêneros, *Smallanthus* e *Polymnia*, ambos inseridos na subtribo Melampodiinae. Esta última classificação vem sendo aceita por autores e adotada por herbários, especialmente nos Estados Unidos da América, Peru e Equador. (GRAU; REA, 1997).

Smallanthus sonchifolius é uma espécie herbácea de clima tropical de altitude, tendo sido introduzida em diversos países, incluindo o Brasil, devido ao seu potencial alimentício, forrageiro e, principalmente como fonte de inulina, concentrada nos órgãos subterrâneos (FUKAI et al., 1993).

Esta espécie apresenta sistema subterrâneo complexo, não havendo consenso sobre a denominação dos órgãos que o compõem. Assim, encontram-se referências a tubérculo, a caule rizomatoso, rizoma simpodial, a raiz tuberosa, a raiz comestível e tuberosa, rizoma lenhoso, rizoma carnoso e raiz de reserva. Neste estudo foi utilizada a denominação proposta por Machado et al (2004), consistindo

de um sistema subterrâneo espessado de natureza mista representado por rizóforos e raízes, o sistema radicular é formado por raízes adventícias, sendo que algumas permanecem delgadas e outras sofrem intensa tuberificação.

Tradicionalmente as partes aéreas destas plantas são utilizadas em forma de chá com finalidade hipoglicemiante, entre as atividades biológicas de extratos de folhas e raízes tuberosas, reportadas na literatura, destacam-se a presença de compostos fenólicos antioxidantes (YAN et al., 1999; VALENTOVA et al., 2003; TAKENAKA et al., 2003) e de lactonas sesquiterpênicas com atividades antimicrobianas (LIN et al., 2003) e antiinflamatória (SCHORR et al 2007).

Doença de Chagas e Leishmaniose

A doença de Chagas, que tem por agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, e a Leishmaniose, cujo agente etiológico são espécies do gênero *Leishmania*, são graves problemas de saúde pública que afetam principalmente populações das Américas Central e do Sul e da África. Não há, entretanto, nenhum fármaco eficaz para o tratamento destas doenças, e entre os poucos fármacos disponíveis reporta-se alta toxicidade e efeitos colaterais elevados.

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

As espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* utilizam-se de três enzimas fosforribosil-transferases para a reciclagem de purino-nucleotídeos, adenina-fosforribosil-transferase (APRT), hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPR) e xantina-fosforribosil-transferase (XPRT), ao contrario de mamíferos que possuem via de síntese de purinas *de novo*, as espécies do gênero *Leishmania*, são exclusivamente dependentes desta via de recuperação (TUTTLE; KRENISTKY, 1980), o que tornam estas enzimas em interessantes alvos para desenvolvimento de novos fármacos anti-leishmanióticos.

Fungos isolados de *Smallanthus sonchifolius*

Em trabalhos anteriores realizados durante o programa de atualização desenvolvido pelo autor deste projeto, durante o ano de 2005 no Departamento de Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP, isolou-se das raízes delgadas de *S. sonchifolius* quatro fungos inicialmente designados PS-1, PS-2, PS-3 e PS-4 e selecionou-se o fungo PS-2 para o desenvolvimento deste projeto, este fungo foi posteriormente identificado como *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.

Gênero *Arthrinium*

O gênero *Arthrinium* é composto por cerca de 20 espécies, presentes nos mais diversos habitats, apresentando distribuição cosmopolita, possuem hábitos saprofíticos e fitopatógenos e desenvolvem-se particularmente sob gramíneas. O mecanismo de dispersão de seus conídios é principalmente aéreo pela ação dos ventos, sendo também dispersos por insetos e moluscos.

As colônias destes gênero caracterizam-se por apresentarem-se compactas ou dispersas, possuindo coloração esbranquiçadas, rosada, acinzentadas ou levemente amarronzadas. Os conídios são normalmente isolados, laterais e em algumas espécies terminais, possuem formas e tamanhos diversos, com coloração amarronzadas ou enegrecidas, sem septos e possuindo geralmente paredes lisas. A formação de conídios é lenticular e em algumas espécies elipsóides alargadas, poligonais, curvos e outros (LARRONDO et al., 1995)

A literatura reportada ao gênero *Arthrinium*, ou por cepas em estado teleomórfico, pertencente ao gênero *Apiospora*, a produção de metabólitos secundários bioativos com atividades antimicrobiana e antitumoral.

Metabólitos secundários e influências de condições de cultivo sob a sua produção

A produção de metabólitos secundários por fungos é um processo complexo, estes produtos secundários pertencem a diversos grupos estruturais, como esteróides, xantonas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenos, citocalasanas, alcalóides e diversos outros grupos estruturais

A maior parte dos produtos naturais provenientes de fungos são originários de policetídeos, peptídeos ou combinações de ambos. Eles derivam de Acetil-coA, Malonil-CoA e aminoácidos e são agrupados por enzimas multidomínios denominadas policetídeos sintases (PKSs), peptídios não ribossomal sintases (NRPSs) ou sistemas híbridos PKSs-NRPSs (MISIEK; HOFFMEISTER, 2007).

Diferente do metabolismo primário, os genes envolvidos nas vias biossintéticas do metabolismo secundário apresentam-se, normalmente, agrupados em um único cromossomo. A regulação destes genes dá-se por genes estruturais que controlam os fatores de transcrição, distinguindo-se os genes relacionados a uma via metabólica específica e uma segunda classe de genes, que são mediadores de fatores de sinalizações ambientais, como pH, fonte de carbono e nitrogênio, temperatura do ambiente e presença de luz. Essa regulação sob diferentes níveis, associadas a fatores de transcrição específicos e fatores de transcrição de grande espectro, garantem que as vias metabólicas do metabolismo secundário sejam respondíveis as demandas gerais do metabolismo celular fúngico (KELLER et al., 2005).

Os estímulos de sinalizações ambientais são mediados por proteínas G heterodiméricas responsáveis pela elicitação de respostas fisiológicas e bioquímicas e por proteínas Zinco-Cys₂His₂, estas são fatores globais de transcrição associados a sinalizações de carbono (CreA), nitrogênio (AreA) e pH (PacC), a expressão dos genes relacionados ao metabolismo secundário é então regulada de forma positiva e negativa por essas proteínas (YU; KELLER, 2005).

É sabido que em condições de fermentação, fatores como tempo de incubação (FREITAS et al., 2002), pH, temperatura, aeração, concentração de substrato e de inócuo influenciam os processos de síntese de substâncias de interesse (GADEN, 2000). Fonte de carbono, nitrogênio e fósforo também exercem papel fundamental na produção de metabólitos secundários dos fungos endofíticos (ADRIO; DEMAINE, 2003). As características do meio de cultivo podem, dessa forma, privilegiar ou não, a produção de certos metabólitos, como também o uso de elicitadores pode direcionar a produção de certas substâncias de interesse (FURTADO et al., 2002).

Estudos sobre otimização de condições de cultivo podem além de propiciar incremento na produção de substâncias com atividades biológicas, contribuir para o entendimento de aspectos bioquímicos e fisiológicos desses organismos.

CONCLUSÕES

O fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. isolado em associação endofítica com *Smallanthus sonchifolius* é produtor de metabólitos secundários com atividades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral.

Modificações nas condições de cultivo deste fungo influenciaram a produção de metabólitos secundários e otimizaram sua produção.

A atividade antibacteriana promovida por extratos aceto etílicos provenientes do cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. é passível de otimização. Obteve-se em cultivo fermentativo padrão (3,0% de sacarose, 0,2% de nitrato de sódio, pH 5.0, 30 °C por 20 dias) valores de CIM frente a *E. coli* e frente a *P. aeruginosa* em 270 µg/mL e 170 µg/mL, respectivamente, e após a otimização das condições de cultivo (3,1% de sacarose , 0,1% de nitrato de sódio, pH 4, 30 °C por 9 dias) em 90 µg/mL para ambas bactérias.

A atividade antifúngica em extratos aceto etílicos, provenientes do cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc., foi também passível de otimização. O cultivo desta cepa em meio fermentativo, na condição padrão, não apresentou em seus extratos atividade antifúngica. No entanto quando a cepa foi cultivada nas condições otimizadas, em meio fermentativo suplementado em 3,0% de sacarose, 0,2% de nitrato do sódio, pH 5.0, 30 °C após 27 dias e em meio fermentativo suplementado em 3,1% de sacarose, 0,1% de nitrato do sódio, pH 4.0, 30 °C após 9 dias, detectou-se atividade antifúngica frente *Aspergillus fumigatus* (130 µg/mL). Para *Candida albicans* a melhor atividade foi detectada nos extratos de cultivo em meio fermentativo com sacarose (3,0%) e nitrato de sódio (0,2%), após 9 dias de cultivo a 30 °C, nos seguintes valores de pH 3; 4; 6 e 7.

A condição de cultivo que resultou na produção da melhor atividade antitumoral, contida no extrato aceto etílico, foi meio fermentativo suplementado com sacarose (3,0%) e nitrato de sódio (0,2%), por 9 dias em pH 4 a 30 °C. Nesta condição o fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. produziu metabólitos secundários que inibiram 100% o crescimento das três linhagens tumorais humanas avaliadas, HCT-8, MDA-MB435 e SF295.

Diferentes extratos do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. apresentaram atividade inibitória de enzimas parasitárias, sendo a melhor atividade para a enzima APRT de *L. tarentolae*, assim como para a atividade antitumoral,

resultante do cultivo em meio fermentativo suplementado com sacarose (3,0%) e nitrato de sódio (0,2%), por 9 dias em pH 4 a 30 °C, apresentando 66,41% de inibição enzimática. Não há relatos anteriores na literatura de atividade antitumoral e antiparasitária proveniente do fungo *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc.

Atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral, detectadas em extratos distintos, como aqui relatado, sugerem que o fungo *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. pode produzir substâncias bioativas distintas.

O fungo *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. é promissor na busca de substâncias bioativas, e como potencial fonte de produção de manitol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALFATAFTA, A. A.; GLOER, J. B. Apiosporamide, a new antifungal agent from the coprophilus fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v.57, p.1696-1702, 1994.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propanol. **Micopathologia**, v.119, p.17-23, 1992.

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

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

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

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

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

BRAZ-F^o, R. Química de Produtos Naturais. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**, v.17, p.405, 1994.

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

CABELLO, M. A.; PLATAS, G.; COLLADO, J.; DÍEZ, M. T.; MARTÍN, I.; VICENTE, F.; MEINZ, M.; ONISHI, J. C.; DOUGLAS, C.; THOMPSON, J.; KURTZ, M. B.;

SCHWARTZ, R. E.; BILLS, G. F.; GIACOBBE, R. A.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; PELÁEZ F. Arundifungin, a novel antifungal compound produced by fungi: biological activity and taxonomy of the producing organisms. **International Microbiology**, v.4, p.93-102, 2001.

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

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

CHONG, L. M.; SHERIDAN, J. E. Mycoflora of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v.20, p.187-189, 1982.

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

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

DENMARK, S. E; REGENS, C. S; KOBAYASHI, T. Total Synthesis of Papulacandin D. **Journal of American Chemical Society**, v.129, p.2774-2776, 2007.

ELIAS, B. C. **Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos das culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck**. 2003. 186 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

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

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

FREITAS, T. P. S.; FURTADO, N. A J. C.; BASTOS, J. K.; SAID, S. Active substances

against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. **Microbiological Research**, v.157, p.201-206, 2002.

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

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

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

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

GARBAYO, I.; VÍLCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.629-634, 2003.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygrosopicus*. **Microbiological Research**, v.160, p.243-248, 2005.

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

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

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 208 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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 Medical Microbiology**, v.52, p.134-144, 2008.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovering Today**, v.5, p.294-300, 2000.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.2435-3442, 1996.

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

HUTCHISON, L. J. Wood-inhabiting microfungi isolated from *Populus tremuloide* from Alberta and northeastern British Columbia. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.898-905, 1999.

ISHIYAMA, T.; FURUTA, T.; TAKAI, M.; OKIMOTO, Y.; AIZAWA, S.; SHIMAZU, A.; YONEHARA, H. L-threo-beta-hydroxyaspartic acid as an antibiotic amino acid. **Journal of Antibiotics**, v.28, p.821-823, 1975.

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

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

KLEMKE, C., KEHRAUS, S., WRIGHT, A. D., KÖNIG, G. M. New Secondary Metabolites from the Marine Endophytic Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1058-1063, 2004.

KOHNO, J.; KOGUCHI, Y.; NISHIO, M.; NAKAO, K.; KURODA, M. SHIMIZU, R.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S. Structures of TMC-95A-D: Novel Proteasome Inhibitors from *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. **Journal of Organic Chemistry**, v.65, p.990-995, 2000.

LARRONDO, J.; CALVO, M. R.; AGUT, M.; CALVO, A. M. Inhibitory activity of strains

of the genus *Arthrinium* on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Microbios**, v.82, p.115-126, 1995.

LARRONDO, J.; CALVO, R. M.; AGUT, M.; CALVO, M. A. Antibiotic activity of strains of the genus *Arthrinium* on bacteria and yeasts. **Microbios**, v.89, p.163-170, 1997.

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

LI, G-H.; YU, Z-F.; LI, X.; WANG, X-B.; ZHENG, L-J.; ZHANG, K-Q. Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichium* sp. AL4. **Chemistry and Biodiversity**, v.4, p.1520-1524, 2007.

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

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

MAGGI, O.; PERSIANI, A. M.; GALLO, F.; VALENTINI, P.; PASQUARIELLO, G.; SCLOCCHI, M. C.; SCORRANO, M. Airborne fungal spores in dust present in archives: proposal for a detection method, new for archival materials. **Aerobiologia**, v.16, p.429-434, 2000.

MIAO, L.; KWONG, T. F. N.; QUIAN, P. Y. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p. 1063-1073, 2006.

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

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard NCCLS document M7-A6 **NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA.**

Sixth edition, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentos; norma aprovada. Documento M38-A do NCCLS. **NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA**. 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; norma aprovada. Documento M27-A2 do NCCLS. **NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA**. Segunda edição, 2002.

NETTO, C. E. **Estudo químico e atividade biológica de extratos obtidos das culturas de *Penicilium waksmanii* Zaleski**. 2004. 138 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

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

NOAMAN, N. H.; FATTAH, A.; KHALEAFA, M.; ZAKY; S. H. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. **Microbiological Research**, v.159 p.395-402, 2004.

OSONO, T.; TAKEDA, H. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. **Mycologia**, v.94, p.421-427, 2002.

OSONO, T.; MORI, A. Colonization of Japanese beech leaves by phyllosphere fungi. **Mycoscience**, v.44, p.437-441, 2003.

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

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

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

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

ROKEM, J. S.; LANTZ, A. E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v.24 p.1262-1287, 2007

ROY, K. W.; BAIRD, R. E.; ABNEY, T. S. A Review of Soybean (*Glycine max*) Seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. **Mycopathologia**, v.150, p.15-27, 2000.

RUDGERS, J. A.; KOSLOW, J. M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v.7, p.42-51, 2004.

RUIJTER, G. J. G.; BAX, M.; PATEL, H.; FLITTER, S. J.; van de VONDERVOORT, P. J. I.; de VRIES, R. P. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. **Eukaryotic Cell**, v.2, p.690-698, 2003.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Evolution Systematics**, v.29, p.319-343, 1998.

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

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

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

SHIBAZAKI, M.; TANIGUCHI, M.; YOKOI, T.; NAGAI, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO, T. YM-215343, a novel antifungal compound from *Phoma* sp. QN04621. **Journal of Antibiotics**, v.57, p.379-382, 2004.

SHIOMI, K.; ÔMURA, S. Antiparasitic agents produced by microorganisms. **Proceeding of the Japan Academy, Series B**, v.80, p.245-258, 2004.

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

SIMERAY, J.; MANDIN, D.; MERCIER, M.; CHAUMONT, J. P. Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. **Aerobiologia**, v.17, p.19-24, 2001.

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.

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

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

TALBOT, N. J.; VINCENT, P.; WILDMAN, H. G. The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum*. **Fungal Genetics and Biology**, v.20, p.254-267, 1996.

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

TANSUWAN, S.; PORNPAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; MUANGSIN, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v.70, p.1620-1623, 2007.

TAKENAKA, M.; YAN, X. J.; ONO, H.; YOSHIDA, M.; NAGATA, T.; NAKANISHI, T. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.793-796, 2003.

TSUKAMOTO, S.; YOSHIDA, T.; HOSONO, H.; OHTA, T.; YOKOSAWA, H. Hexylitaconic acid: A new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.69-71, 2006.

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

VALENTOVA, K.; CVAK, L.; MUCK, A.; ULRICHOVA, J.; SIMANEK, V. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **European Journal of Nutrition**, v.42, p.61–66, 2003.

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

VIJAYAKUMAR, E. K. S.; ROY, K.; CHATTERJEE, S.; DESHMUKH, S. K.; GANGULI, B. N. Arthrichitin. A new cell wall active metabolite from *Arthrinium phaeospermum*. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, p.6591-6593, 1996.

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

WILLIAMS, D. R.; KAMMLER, D. C.; DONNELL, A. F.; GOUNDRY, W. R. F. Total synthesis of (+)-Aposporamide: assignment of relative and absolute configuration. **Angewandte Chemie**, v.117, p.6873-6876, 2005.

WILSON, D. Endophytes-the evolution of term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v.73, p.274-275, 1995.

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

YU, H-JAE.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Reviews Phytopathology**, v.43, p.437-458, 2005.