UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum*

Luciano da Silva Momesso

RIBEIRÃO PRETO
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Luciano da Silva Momesso

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

RIBEIRÃO PRETO
2008

RESUMO

MOMESSO, L. S. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum***. 2008. 126 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2008.

Três fungos endofíticos isolados de *Viguiera robusta* (Asteraceae) foram cultivados em três meios de cultivo distintos (Czapek, arroz e extrato de malte) e também em culturas binárias em extrato de malte. Para a extração dos cultivos em extrato de malte foi utilizada a resina diaion HP-20, que promove a adsorção dos metabólitos produzidos pelo fungo, aumentando o rendimento dos extratos. Os extratos e frações obtidos foram submetidos à análise química por meio de técnicas cromatográficas e RMN ^1H e a ensaios diversos biológicos para a comparação de seus perfis. O estudo químico do extrato de *Chaetomium globosum* (VR-10), cultivado em arroz, levou a isolamento da substância **S1** (chaetoglobosina E), que apresenta elevada atividade citotóxica e é uma ferramenta importante em biologia química. Também de *C. globosum* foi isolado a substância **S2** (dimetil-tereftalato), o qual já foi identificado como metabólito de fungo endofítico e também de planta. De *Pestalotiopsis guepini* (VR-8), cultivado em Czapek, foi isolada a substância **S3** (tirosol), relatado na literatura como molécula sinalizadora em *Candida albicans*. Do fungo *Cladosporium sphaerospermum* (VR-2), após cultivo em arroz, foram isoladas três substâncias: marcfortina A (**S4**), a marcfortina B (**S5**) e a marcfortina C (**S6**) e (**S7**), substâncias com pronunciada atividade antiparasitária. Foi desenvolvido um método via CLAE-DAD-MS/MS para identificação rápida de derivados de marcfortina, o qual possibilitou a identificação da substância **S7** (marcfortina D) no extrato bruto de *C. sphaerospermum*. A análise conformacional da marcfortina A (**S4**) foi realizada através de experimentos de NOE-diff e técnicas de modelagem molecular. Os resultados obtidos nos bioensaios após diferentes cultivos dos fungos endofíticos indicaram que estes são fontes promissoras de substâncias bioativas, constituindo ferramentas importantes na busca por novos compostos.

Palavras chave: fungos endofíticos, ensaios biológicos, marcfortina, *Cladosporium sphaerospermum*, *Chaetomium globosum*

ABSTRACT

MOMESSO, L. S. **Chemical and biological study of the endophytic fungi *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* and *Chaetomium globosum***. 2008. 126 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2008.

Three endophytic fungi isolated from *Viguiera robusta* (Asteraceae) were cultivated in three different culture media (Czapek, rice and malt extract) and also in mixed cultures in the malt extract medium. Diaion HP-20 resin was used for the malt extract cultures extraction increasing the yields of the extracts. Extracts and fractions have been submitted to chemical analyses by chromatographic techniques and ^1H NMR, and also to several bioassays for the comparison of their chemical and biological profiles. Chemical study of the rice culture extract from *Chaetomium globosum* (VR-10) gave the citotoxic compound **S1** (chaetoglobosin E), an important chemical biology tool. *C. globosum* also led to the isolation of compound **S2** (dimethyl-terephthalate), previously isolated from an endophytic fungus and also from plants. Compound **S3** (tyrosol) has been isolated from the Czapek culture extract of *Pestalotiopsis guepini* (VR-8). Tyrosol has been reported as a quorum sensing molecule in *Candida albicans*. Three compounds have been isolated from *Cladosporium sphaerospermum* (VR-2) rice culture extract: marcfortine A (**S4**), marcfortine B (**S5**) and marcfortine C (**S6**). Marcfortines have been reported as potent antiparasitic compounds. A HPLC-DAD-MS/MS was developed for the rapid identification of marcfortine derivatives, which allowed the identification of compound **S7** (marcfortine D) in the crude extract from *C. sphaerospermum*. The conformational analysis of marcfortine A (**S4**) was carried out by NOE-diff experiments and molecular modeling techniques. Bioassays results showed that the endophytic fungi should be considered as promising sources of novel and bioactive compounds.

Key words: endophytic fungi, biological assays, marcfortine, *Cladosporium sphaerospermum*, *Chaetomium globosum*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiversidade: um componente essencial na busca por novos compostos

Biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos, ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida. Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico, significando que a abundância de espécies é variável em um determinado ambiente e que existem gradientes geográficos da biodiversidade. A implicação óbvia disso relaciona-se com a necessidade de serem tomadas medidas urgentes para a conservação dos ecossistemas nos quais as diferentes espécies ocorrem e interagem. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (NODARI; GUERRA, 2000).

A natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos e continua sendo uma abundante fonte de novos quimiotipos e farmacóforos. Dentre os microrganismos, menos de 5% das espécies de fungos são atualmente conhecidas e o potencial de novas fontes microbianas, particularmente aquelas encontradas em ambientes extremos, parece ilimitado (NEWMAN; CRAGG, 2007).

O registro de rastreamento da descoberta de fármacos de produtos naturais, associado com a contínua ameaça à biodiversidade através da destruição dos ecossistemas terrestre e marinho e o atual baixo número de novas entidades químicas desenvolvidas nas indústrias farmacêuticas, proporcionam o argumento irrefutável em favor da maior colaboração multidisciplinar e internacional na exploração da natureza como fonte de novos indícios para o desenvolvimento de fármacos e outros valiosos agentes bioativos (NEWMAN; CRAGG,

2007). Neste aspecto, a diversidade biológica imensamente rica do Brasil oferece um potencial único e incomparável.

1.2. Produtos naturais como fontes de substâncias bioativas

Os produtos naturais representam a principal fonte de agentes terapêuticos para doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas), câncer, distúrbios lipídicos e imunomodulação (CLARDY; WALSH, 2004).

Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos utilizados para sua sobrevivência. Como consequência de seu papel biológico, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de atividades biológicas. De fato, produtos naturais tiveram um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos por um longo tempo (PUPO et al., 2006). Além disso, a complexidade estrutural dos produtos naturais inspirou químicos orgânicos sintéticos e também forneceu úteis ferramentas de pesquisa para a compreensão de muitas rotas bioquímicas (GALLO et al., 2007).

Estudos clínicos, farmacológicos e químicos dos medicamentos tradicionais, predominantemente derivados de plantas foram a base de muitos fármacos como o anti-inflamatório aspirina, o cardiotônico digitoxina, o analgésico opióide morfina, o antimalárico quinina, e a pilocarpina utilizada para tratamento de glaucoma (BUTLER, 2004). Mais recentemente, a terapia anticâncer foi beneficiada pelos produtos naturais derivados de plantas como os alcalóides da vinca (vinblastina e vincristina) e o paclitaxel (Taxol[®]), assim como por produtos naturais derivados de podofilotoxina (etoposídeo e tenoposídeo) e camptotecina (topotecan e irinotecan) (CALLERY, 2002).

Uma análise da origem dos fármacos desenvolvidos nos últimos 25 anos indica que 67% das 877 pequenas moléculas das novas entidades químicas são formalmente sintéticas, mas 16,4% correspondem a moléculas sintéticas contendo grupo farmacofórico derivado

diretamente de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Além disso, 12% são, na verdade, modeladas a partir de um inibidor, produto natural, de um alvo molecular de interesse, ou mimetizam o substrato endógeno do sítio ativo. Então, somente 39% das novas entidades podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas em sua origem (NEWMAN; CRAGG, 2007).

1.3. Substâncias bioativas obtidas de microrganismos

A busca por compostos produzidos por microrganismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1929, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Esta descoberta levou pesquisadores acadêmicos e de indústrias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de microrganismos, e esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2007).

A importância da quimiodiversidade dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de fármacos é amplamente discutida na literatura (NEWMAN; CRAGG, 2007; GALM; SHEN, 2007; LAM, 2007; CHIN et al., 2006; DEMAINE, 2006; GULLO et al., 2006; VIEGAS-Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006; PATERSON; ANDERSON, 2005; BUTLER, 2004). Entre todos os conhecidos produtores de pequenas moléculas de produtos naturais, os microrganismos representam uma fonte rica de metabólitos bioativos que apresentam larga escala de aplicações como agroquímicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e agentes anticâncer (GUNATILAKA, 2006).

Fármacos antibacterianos baseados em produtos naturais microbianos em uso atualmente incluem os antibióticos β -lactâmicos como penicilinas, cefalosporinas, ácido clavulânico, carbapeninas e monobactamas, assim como as tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas e peptídeos cíclicos (PUPO et al., 2006).

A descoberta da penicilina a partir do fungo filamentosso *Penicillium notatum* por Fleming em 1929 e a observação de seu amplo uso terapêutico na década de 1940 introduziu a medicina a uma nova era, a chamada Era Dourada dos Antibióticos (MANN, 1994). Essa descoberta promoveu uma intensiva investigação de microrganismos como fonte de metabólitos bioativos estruturalmente diversos, os quais têm fornecido alguns dos mais importantes produtos da indústria farmacêutica. Estes incluem: agentes antibacterianos como a penicilina (de espécies de *Penicillium*), cefalosporinas (*Cephalosporium cryptosporium*), aminoglicosídeos, tetraciclina e poliketídios de vários tipos estruturais (*Actinomycetales*); agentes imunossupressores, tais como metabólitos fúngicos, as ciclosporinas e a rapamicina (espécies de *Streptomyces*); agentes redutores do colesterol sanguíneo, tais como a mevastatina (compactina) e lovastatina (de espécies de *Penicillium*); anti-helmínticos e antiparasitários, tais como as ivermectinas (*Streptomyces*) (GALLO et al., 2007; NEWMAN; CRAGG, 2007; PUPO et al., 2006).

Os antibióticos antitumorais estão entre os mais importantes agentes quimioterápicos, os quais incluem membros das famílias das antraciclinas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas e ácido aureólico. Agentes isolados de várias espécies de *Streptomyces* como a daunomicina e relacionados, as bleomicinas, a actinomicina, a mitomicina C, a mitramicina (antraquinona glicosilada), a estreptozocina e a deoxicoformicina são compostos clinicamente úteis (NEWMAN; CRAGG, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2006).

As epotilonas isoladas de *Myxomycetales* estão em fase de desenvolvimento clínico e são de grande interesse como potenciais agentes antitumorais devido ao seu mecanismo de ação ser o mesmo do paclitaxel. A vancomicina, geralmente referida como o fármaco de último recurso no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes, juntamente com o paclitaxel mobilizaram cerca de 1 bilhão de dólares anuais em vendas (ANGELL et al., 2006).

Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies e apesar das importantes substâncias biologicamente ativas utilizadas na terapêutica, os fungos e bactérias constituem um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL et al., 1996). Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os fungos têm sido reconhecidos como um dos mais prolíficos produtores de metabólitos secundários. Tem sido sugerido que fungos são fundamentais para a saúde e prosperidade de todos ecossistemas terrestres, sendo essenciais para sua sustentabilidade e biodiversidade (GUNATILAKA, 2006).

Um recente desenvolvimento no campo de produtos naturais microbianos é a demonstração do potencial para produção de uma variedade de novos metabólitos a partir de uma única cepa de microrganismo através de alterações sistemáticas dos parâmetros de cultivo (BODE et al., 2002). Isso realça que ainda existem muitos compostos a serem descobertos, mesmo a partir de linhagens já estudadas. Porém, para aumentar as chances de sucesso na descoberta de novas substâncias bioativas, novos nichos de biodiversidade devem ser investigados (CLARDY; WALSH, 2004).

Até recentemente, microbiologistas ficavam bastante limitados em seus estudos de ecossistemas microbiológicos devido à incapacidade de cultivar a maioria dos microrganismos de ocorrência natural (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Segundo estimativas recentes, somente de 5% a 10% das espécies de fungos filamentosos já foram caracterizados. Nesse aspecto, uma das maiores fontes naturais que devem ser explorados são os fungos (MACCHERONI-JR; ARAÚJO; LIMA, 2004).

Dentre todas as classes de fungos, os endofíticos merecem destaque especial, uma vez que produzem substâncias químicas inéditas e biologicamente ativas, com elevada diversidade estrutural (GUO et al., 2008; FIRAKOVA; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007; GALLO et al., 2008; VALACHOVA; MUCKOVA; STURDIKOVA, 2007; GUNATILAKA, 2006; PUPO et al., 2006; ZHANG; SONG; TAN, 2006;).

1.4. Os fungos endofíticos e suas associações com as plantas hospedeiras

Desde a descoberta dos endofíticos em Darnel, Alemanha, em 1914, vários cientistas têm definido os endofíticos de diferentes formas, que dependem de como são isolados e examinados. Por definição, estes microrganismos vivem nos espaços intercelulares dos tecidos das plantas hospedeiras (STROBEL, 2002) e que podem ser detectados em um momento particular associado a esses tecidos em uma planta hospedeira aparentemente saudável (SCHULZ; BOYLE, 2005). Colonizam os tecidos intra e/ou intercelulares da planta hospedeira, durante sua vida toda ou parte dela, sem causarem-lhe sintomas aparentes de doenças (STROBEL et al., 2004; ZIKMUNDOVÁ et al., 2002; TAN; ZOU, 2001). Eles podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira (PETRINI et al., 1992).

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para as espécies incapazes de conseguir por si mesmas os seus meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predatórias.

A simbiose entre planta e endofítico pode ser observada pela proteção e alimentação do fungo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores de crescimento, antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, antivirais, inseticidas, etc.) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU et al., 2000; TAN; ZOU, 2001; SCHULZ et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005). Portanto, novas atenções vêm sendo dadas para a química e bioatividade dos metabólitos dos endofíticos, e também para sua biodiversidade e funções ecológicas (TAN; ZOU, 2001).

Há a hipótese que a interação fungo endofítico e planta hospedeira seja caracterizada por um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Se o balanço é perturbado por um dos envolvidos ou por ambos, uma diminuição da defesa da planta ou aumento do poder de virulência do microrganismo pode desenvolver. Como resultado dessa estreita relação, há possibilidade de que alguns microrganismos endofíticos tenham sistemas genéticos planejados para permitir a transferência de informações entre eles próprios e a

planta hospedeira, implicando importância prática com relação à descoberta de novos metabólitos secundários bioativos (GALLO et al., 2007; HELLWIG et al., 2002).

Muitos destes metabólitos, uma vez isolados e caracterizados, possuem um grande potencial a ser utilizado na medicina, agricultura, e na indústria. Novos antibióticos, antimicóticos, imunossupressores, e compostos anticâncer são exemplos do que se pode encontrar depois de se isolar e cultivar endofíticos individualmente, seguido de purificação e caracterização de alguns de seus produtos naturais (STROBEL et al., 2004).

Alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por endofíticos ilustram que algumas cepas são capazes de produzir os mesmos compostos produzidos pelas plantas hospedeiras. Um exemplo clássico disso consiste na obtenção do paclitaxel (**1**) produzido por *Taxomyces andreanae* associado a *Taxus brevifolia* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). O fungo *Seimatoantlerium tapuiense* isolado de *Maguireothammus speciosus* (Rubiaceae) também produz paclitaxel, além de diversos outros fungos endofíticos (STROBEL, 2002). Estes resultados apontam para novas fontes potenciais para a obtenção de paclitaxel e sugerem que este seja um metabólito de ocorrência comum em endofíticos. Exemplos mais recentes do isolamento de metabólitos vegetais de endofíticos associados envolvem a camptotecina (**2**), obtida de um fungo endofítico de *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005a); podofilotoxina (**3**), produzida pelo endofítico *Trametes hirsuta*, isolado de *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2005b); vincristina (**4**), isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004) e hipericina (**5**) de um fungo associado a *Hypericum perforatum* (KUSARI et al., 2008). A Figura 1 destaca os metabólitos produzidos por fungos endofíticos.

Figura 1. Metabólitos secundários anticancerígenos obtidos de fungos endofíticos.

A bioprospecção em fungos endofíticos associados a espécies da família Asteraceae vem sendo desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP-USP há 5 anos. Foram obtidos os microrganismos endofíticos associados às plantas que foram quimicamente investigadas no Laboratório de Farmacognosia e Princípios Ativos Naturais da FCFRP-USP (MOMESSO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2008; GALLO et al., 2008; BORGES; PUPO, 2006).

Os ensaios biológicos feitos nestes laboratórios, bem como os demais realizados em colaboração com outros grupos de pesquisa e com os grupos da Rede *BIOProspecTA*-Biotafapesp constituem valiosos resultados na bioprospecção em microrganismos endofíticos.

OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho envolveram o estudo químico de *Cladosporium sphaerospermum* (VR-2), *Pestalotiopsis guepini* (VR-8) e *Chaetomium globosum* (VR-10), fungos endofíticos obtidos das folhas de *Viguiera robusta* (Asteraceae), através de:

- cultivo dos três fungos endofíticos em três meios de cultura diferentes (arroz, Czapek e extrato de malte);
- cultivo dos três fungos endofíticos em misturas binárias como estratégia para diversificação na produção de metabólitos secundários;
- avaliação dos extratos e frações em bioensaios antimicrobianos, de inibição da atividade enzimática e de citotoxicidade frente a linhagens celulares tumorais;
- isolamento de substâncias através de métodos cromatográficos;
- identificação das substâncias isoladas através de técnicas de RMN 1D, RMN 2D e EM;

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos nos bioensaios, de um modo geral pode-se concluir que o fungo *C. globosum* (VR-10) é um bom produtor de substâncias bioativas, uma vez que os extratos e frações provenientes de seu cultivo em diferentes meios mostraram-se ativos na maioria dos ensaios, com destaque para suas atividades citotóxicas frente às linhagens de células tumorais. No ensaio antimicrobiano *in vivo*, os extratos de VR-10 e de *C. sphaerospermum* (VR-2), ambos cultivados em Czapek, promoveram uma maior taxa de sobrevivência do nematóide *C. elegans*. Assim, pode-se inferir que os fungos endofíticos estudados são capazes de produzir substâncias com promissor potencial biológico.

O emprego de três diferentes meios para o cultivo dos fungos endofíticos permitiu a comparação entre seus perfis químicos, inclusive quando cultivados em misturas binárias. Porém, o metabolismo de VR-10 parece não ser afetado, mesmo alterando-se as condições de cultura. Esse fato foi justificado pela obtenção da substância **S1** (chaetoglobosina E) após o cultivo desse fungo em arroz, a qual já havia sido obtida do cultivo de VR-10 em meio Czapek (MOMESSO et al., 2008). Substâncias desta classe são importantes ferramentas em Biologia Química (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007) para estudo do citoesqueleto.

O cultivo em arroz permitiu a obtenção de extratos com maiores rendimentos, porém com misturas mais complexas de substâncias. Meios de cultivos mais simples, como é o caso do Czapek que contém apenas de sais inorgânicos e sacarose, induzem os fungos a produzirem substâncias apenas tendo o açúcar como fonte de carbono. Em geral os extratos obtidos do cultivo em Czapek são obtidos em menores quantidades e são menos complexos em termos de misturas de substâncias. Quando foram realizados cultivos em extrato de malte, ocorreu um aumento relativo no rendimento dos extratos. Isso provavelmente ocorreu devido à utilização da resina diaion HP-20 que, quando adicionada ao meio de cultura, permitiu a adsorção dos produtos excretados pelo fungo para o meio de cultivo.

A obtenção de derivados de marcfortina pelo fungo *C. sphaerospermum* (VR-2) indicou que esse microrganismo é capaz de produzir substâncias que apresentam elevada complexidade estrutural, as quais apresentam relevante atividade antiparasitária (LEE et al., 2002). Foi proposto um método de CLAE-DAD-MS/MS para análise do padrão de fragmentação das marcfortinas **S4**, **S5** e **S6**, que se mostrou eficiente para a identificação destas substâncias em mistura, permitindo a identificação de **S7** (marcfortina D) no extrato bruto de VR-2. Também, estudos de modelagem molecular permitiram a verificação das proximidades entre os núcleos de hidrogênio, o que corroborou com os dados experimentais observados nos espectros de NOE-diff, evidenciando a importância da associação das técnicas de modelagem molecular na análise estrutural de produtos naturais complexos.

De uma forma geral, pode-se concluir que o metabolismo secundário dos fungos endofíticos, tanto em monocultura quanto em culturas mistas, constitui fonte promissora de substâncias com atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEM, M. A. S.; OTEEF, M. D. Y.; FLOWERS, H.; DOUGLAS, L. J. **Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development.** *Eukaryotic Cell*, **5**, 1770-1779, 2006.

ALVI, K. A.; NAIR, B.; PU, H.; URSINO, R.; GALLO, C.; MOCEK, U. **Phomacins: Three Novel Antitumor Cytochalasan Constituents Produced by a *Phoma* sp.** *Journal of Organic Chemistry*, **62**, 2148-2151, 1997.

ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J. C. ***Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2421-2428, 2004.

ANGELL, S.; BENCH, B. J.; WILLIAMS, H.; WATANABE, C. M. H. **Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action.** *Chemistry & Biology*, **13**, 1349-1359, 2006.

BIN, L.; YONGMING, L. **Studies on chemical constituents of *Camellia oleifera* Abel.** *Chemistry Journal on Internet*, **5**, 20-22, 2003.

BINDER, M.; TAMM, C. **The cytochalasans: a new class of biologically active microbial metabolites.** *Angewandte Chemie, International Edition*, **12**, 370-380, 1973.

BLANCHFLOWER, S. E.; BANKS, R. M.; EVERETT, J. R.; READING, C. **Further novel metabolites of the paraherquamide family.** *The Journal of Antibiotics*, **46**, 1355-1363, 1993.

BLIZZARD, T. A.; MROZIK, H. **Preparation of marcfortine derivatives useful as antiparasitic agents.** U.S. Patent CODEN: USXXAM US 4923867 A 19900508 CAN 114:62467 AN 1991:62467, 1990.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HOF, R.; ZEECK, A. **Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity.** *ChemBioChem*, **3**, 619-627, 2002.

BODE, H. B. **No need to be pure: mix the cultures!** *Chemistry & Biology*, **13**, 1245-1246, 2006.

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

CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. **Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae).** *Química Nova*, **28**, 991-995, 2005.

CALLERY, P.; GANNETT, P. **Cancer and cancer chemotherapy.** In: WILLIAMS, D. A., LEMKE, T. L. (eds). **Foye's principles of medicinal chemistry.** 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 924-951, 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*, **101**, 5048-5052, 2004.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. **Drug discovery from natural sources.** *AAPS Journal*, **8**, E239-E253, 2006.

CHINWORRUNGSEE, M; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. **Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11**, 1965-1969, 2001.

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

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPLE, M. **Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*.** *Phytochemistry*, **24**, 937-943, 1985.

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

CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. **Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge.** *Journal of Natural Products*, **64**, 1444-1446, 2001.

DEMAIN, A. L. **From natural products discovery to commercialization: a success story.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, 486-495, 2006.

DING, G.; SONG, Y. C.; CHEN, J. R.; XU, C.; GE, H. M.; WANG, X. T.; TAN, R. X. **Chaetoglobosin U, a cytochalasan alkaloid from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019.** *Journal of Natural Products*, **69**, 302-304, 2006.

FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. **Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase.** *Protein Expression and Purification*, **48**, 98-103, 2006.

FIRAKOVA, S.; STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. **Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants.** *Biologia*, **62**, 251-257, 2007.

FOGLE, M. R.; DOUGLAS, D. R.; JUMPER, C. A.; STRAUS, D. C. **Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*.** *Mycopathologia*, **164**, 49-56, 2007.

GACZYNSKA, M.; OSMULSKI, P. A. **Characterization of noncompetitive regulators of proteasome activity.** *Methods in Enzymology*, **398**, 425-438, 2005.

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*, 2008. Aceito para publicação.

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

GALM, U.; SHEN, B. **Natural product drug discovery: the times have never been better.** *Chemistry & Biology*, **14**, 1098-1104, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMAN, 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*, **52**, 134-144, 2008.

GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. **Drug discovery from natural products.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **33**, 523-531, 2006.

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

- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. **Bioactive natural products from endophytes: a review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**, 136-142, 2008.
- HELLWIG, V.; GROTHE, T.; MAYER-BARTSCHMID, A.; ENDERMANN, R.; GESCHKE, F.U.; HENKEL, T.; STADLER, M. **Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp.** *The Journal of Antibiotics*, **55**, 881-892, 2002.
- HOPE, I. A. (editor). ***C. elegans: a practical approach***. New York: Oxford University Press, 1999.
- 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*, **46**, 34-38, 1993.
- JIANG, Z. Y., HUNT, J. V., WOLFF, S. P. **Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.** *Analytical Biochemistry*, **202**, 384-389, 1992.
- JIAO, W.; FENG, Y.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. **Chaetoglobosins Q, R, and T, three further new metabolites from *Chaetomium globosum*.** *Journal of Natural Products*, **67**, 1722-1725, 2004.
- KAKEYA, H.; MORISHITA, M.; ONOZAWA, C.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; KIMURA, K.; YOSHIHAMA, M.; OSADA, H. **RKS-1778, a new mammalian cell-cycle inhibitor and a key intermediate of the [11]cytochalasin group.** *Journal of Natural Products*, **60**, 669-672, 1997.
- KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. **Diversifying microbial natural products for drug discovery.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, **62**, 446-458, 2003.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. **Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp.** *Journal of Natural Products*, **62**, 155-157, 1999.
- KUO, M. S.; WILEY, V. H.; CIALDELLA, J. L.; YUREK, D. A.; WHALEY, H. A.; MARSHALL, V. P. **Biosynthesis of Marcfortine A.** *The Journal of Antibiotics*, **49**, 1006-1013, 1996.
- KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. **An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin.** *Journal of Natural Products*, **71**, 159-162, 2008.

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

LEE, B. H.; CLOTHIER, M. F.; DUTTON, F. E.; NELSON, S. J.; JOHNSON, S. S.; THOMPSON, D. P.; GEARY, T. G.; WHALEY, H. D.; HABER, C. L.; MARSHALL, V. P.; KORNIS, G. I.; MCNALLY, P. L.; CIADELLA, J. I.; MARTIN, D. G.; BOWMAN, J. W.; BAKER, C. A.; COSCARELLI, E. M.; ALEXANDER-BOWMAN, S. J.; DAVIS, J. P.; ZINSER, E. W.; WILEY, V.; LIPTON, M. F.; MAURAGIS, M. A. **Marcfortine and paraherquamide class of anthelmintics: Discovery of PNU-141962.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2**, 779-793, 2002.

LONG, R. A.; AZAM, F. **Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4975-4983, 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* **151**, 67-73, 2000.

MACCHERONI-JR, W; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. **Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias.** In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (orgs.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Educs, 2004.

MANN, J. **Murder, magic and medicine.** Oxford: Oxford University Press, 1994.

MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; TIMMERMAN, H. **Molecular modeling.** Boca Raton: CRC Press, 1996.

MOLLOY, S. **Fungal quorum sensing: in vivo veritas?** *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 1-1, 2006.

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, 176 pp., 2004.

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 à *Viguiera robusta* (Asteraceae).** *Química Nova*, 2008. Aceito para publicação.

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 of the United States of America*, **103**, 10414-10419, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.** *Journal of Natural Products*, **66**, 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Plants as a source of anti-cancer agents.** *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 72-79, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products from Marine Invertebrates and Microbes as Modulators of Antitumor Targets.** *Current Drug Targets*, **7**, 279-304, 2006.

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

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2000.

OH, D. C.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. **Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**, 5267-5273, 2005.

OH, D. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. **Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture.** *Journal of Natural Products*, **70**, 515-520, 2007.

OVERY, D. P.; SEIFERT, K. A.; SAVARD, M. E.; FRISVAD, J. C. **Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts.** *International Journal of Food Microbiology*, **88**, 69-77, 2003.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. **Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production.** *Nature Letters*, **437**, 884-888, 2005.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. **The renaissance of natural products as drug candidates.** *Science*, **310**, 451-453, 2005.

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

POLONSKY, J.; MERRIEN, M. A.; PRANGÉ, T.; PASCARD, C.; MOREAU, S. **Isolation and structure (x-ray-analysis) of marcfortine A, a new alkaloid from *Penicillium roqueforti*.** *Journal of the Chemical Society – Chemical Communications*, **13**, 601-602, 1980.

PRANGÉ, T.; BILLION, M. A.; VUILHORGNE, M.; PASCARD, C.; POLONSKY, J.; MOREAU, S. **Structures of Marcfortine B and C (X-ray analysis), alkaloids from *Penicillium roqueforti*.** *Tetrahedron Letters*, **22**, 1977-1980, 1981.

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*. Taft, C. A. Ed. Research Signpost, Kerala. pp. 51-78, 2006.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. **Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais.** *Química Nova*, **30**, 1446-1455, 2007.

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*, **68**, 1717-1719, 2005a.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. **The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans.** *Journal of Biotechnology*, **122**, 494-510, 2005b.

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

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

SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S.; KUWANO, H. **Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. I. Production, isolation and some cytological effects of Chaetoglobosins A - J.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **30**, 1609-1617, 1982.

SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins.** Boca Raton: CRC Press, 1991.

SILVERTON, J. V.; AKIYAMA, T.; KABUTO, C.; SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S. **X-ray analysis of chaetoglobosina A, an indol-e-yl-[13]cytochalasan from *Chaetomium globosum*.** *Tetrahedron Letters*, **17**, 1349-1350, 1976.

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

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

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

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*, **17**, 417-423, 1996.

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

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

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

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSY, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. **Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derivate fungus *Penicillium citrinum*.** *Organic Letters*, **6**, 3087-3089, 2004.

TUTTLE, J. V.; KRENISTSKY, T. A. **Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*.** *Journal of Biological Chemistry*, **255**, 909-915, 1980.

VALACHOVA, M.; MUCKOVA, M.; STURDIKOVA, M. **Metabolity endofyticky mikroorganizmov ako biologicky ucinne latky.** *Chemicke Listy*, **101**, 486-494, 2007.

VIEGAS-Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química Nova*, **29**, 326-337, 2006.

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 the Rutales.** *Pure and Applied Chemistry*, **73**, 617-622, 2001.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. **Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella***. *Journal of Natural Products*, **63**, 1692-1695, 2000.

www.shigeminmr.com. Acessado em 24/06/2008.

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

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Report*, **23**, 753-771, 2006.

ZHU, F.; LIN, Y. C. **Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea**. *Chinese Science Bulletin*, **51**, 1426-1430, 2006.

ZHU, F.; LIN, Y. C.; DING, J. H.; WANG, X. P.; HUANG, L. S. **Secondary metabolites of two marine-derived mangrove endophytic fungi (strains Nos. 1924# and 3893#) by mixed fermentation**. *Linchan Huaxue Yu Gongye*, **27**, 8-10, 2007.

ZIKMUDOVÁ, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. **Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona***. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4863-4870, 2002.