UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família
Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de
biotransformações

Warley de Souza Borges

Ribeirão Preto

2008

RESUMO

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008. 350 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Fungos endofíticos constituem uma fonte promissora e ainda pouco explorada de novas substâncias potencialmente bioativas, que podem ter aplicações na medicina, agricultura e biologia química. Neste trabalho foram isolados cinco fungos endofíticos das folhas de *Tithonia diversifolia*, os quais foram cultivados em pequena escala e avaliados em diversos bioensaios. O fungo endofítico *Phoma sorghina* foi cultivado em escala ampliada, produzindo nove substâncias, sendo três derivados antraquinônicos inéditos na literatura. Três fungos endofíticos associados à *Viguiera robusta* foram estudados. De *Colletotrichum gloeosporioides* foram isoladas oito substâncias, sendo um derivado dicetopiperazínico e um derivado iminoaçúcar inéditos na literatura. *Diaporthe phaseolorum* produziu três derivados dicetopiperazínicos, um inédito na literatura. *Chaetomium globosum* produziu treze substâncias, sendo oito derivados azafilônicos inéditos. Algumas linhagens endofíticas foram avaliadas em experimentos de biotransformação de três naftoquinonas e da 1-tetralona, catalisando reações de oxidação e redução. O fungo *Diaphorte phaseolorum* catalisou uma reação de metilação inédita na literatura de biotransformação.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Biotransformação; Metabólitos secundários; Chaetoviridinas; Antraquinonas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais bioativos de origem microbiana

A busca por novos produtos para as indústrias, farmacêutica e agroquímica, é um processo que requer otimização contínua. Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos. Comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e bibliotecas virtuais), a mais ampla diversidade química encontrada está associada às substâncias de origem natural (HARVEY, 2000). A importância da quimiodiversidade dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de fármacos é discutida amplamente na literatura (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BUTLER, 2004; PATERSON; ANDERSON, 2005; CHIN et al., 2006; DEMAINE, 2006; GULLO et al., 2006; VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006; LAM, 2007; GALM; SHEN, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2007).

A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos por triagem de fontes naturais, tem levado a descoberta de fármacos potentes com um papel importante no tratamento das doenças humanas (SHU, 1998). Aproximadamente 63% e 75% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para combate do câncer e doenças infecciosas, respectivamente, são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Cerca da metade de todos os fármacos utilizados são de origem natural (PATERSON; ANDERSON, 2005). Este número não é surpresa se for assumido que estes produtos são desenvolvidos pelos organismos produtores para autodefesa (ROUHI, 2003).

Com a contínua necessidade de novos protótipos para ensaios contra um número crescente de alvos moleculares, a diversidade química dos produtos naturais permanecerá relevante no futuro da descoberta de fármacos (HARVEY, 2000), uma vez que a natureza está continuamente desenvolvendo a sua versão de química combinatória, fornecendo estruturas ricas em estereoquímica, anéis concatenados e grupos funcionais reativos (VERDINE, 1996; PATERSON; ANDERSON, 2005).

Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies e, apesar das inúmeras aplicações biológicas reportadas na literatura (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; BUTLER, 2004; CHIN et al., 2006; LAM, 2007; GALM; SHEN, 2007), os fungos e bactérias constituem um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL et al., 1996).

Os fungos constituem uma fonte excepcionalmente rica de importantes fármacos, incluindo: antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclínas, macrolídeos, glicopeptídeos e estreptograminas), antibióticos antitumorais (antraciclínas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas e ácidos aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), entre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; DEMAINE, 1999). Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos de fungos (KONGSAEREE et al., 2003)

Existem diferentes estimativas em relação a quantidade de espécies de fungos que habitam nosso planeta (MUELLER; SCHMIT, 2007). Hawksworth (2001) estima que haja cerca de 1,5 milhões de fungos, dos quais apenas 5% das espécies estão descritas (PEARCE, 1997). Entre as espécies descritas (69.000), somente 16% (11.500) têm sido cultivadas (DEMAINE, 1999). Estes dados ilustram o grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudos de metabólitos secundários produzidos por fungos.

Uma das vantagens em se trabalhar com microrganismos é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração) podem ser modificadas a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos de interesse (PEARCE, 1997). Alguns estudos têm mostrado a influência de certos fatores ambientais como alternativa na melhoria dos sistemas de fermentação, pois o metabolismo microbiano requer gasto energético, é altamente regulado e normalmente submetido ao controle fisiológico que responde a fatores ambientais (ALDRED; MAGAN; LANE, 1999).

Dentre toda as classes de fungos, uma que merece destaque é a dos fungos endofíticos devido a grande diversidade química, ineditismo de moléculas e suas atividades biológicas (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ et al., 2002; STROBEL, 2002; STROBEL; DAISY, 2003; GUNATILAKA, 2006; PUPO et al., 2006; ZHANG; SONG; TAN, 2006; VALACHOVA; MUCKOVA; STURDIKOVA, 2007; FIRAKOVA; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007; GALLO et al., 2007; GUO et al., 2008). As figuras 1 e 2 mostram algumas substâncias isoladas de fungos endofíticos.

Figura 1. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos. **I** – LIN et al., 2008. **II** – RUKACHAISIRIKUL et al., 2008. **III** – WIJERATNE et al., 2008. **IV** – HUANG et al., 2007. **V** – HU et al., 2008. **VI** – LOSGEN et al., 2008. **VII** – DAI et al., 2007. **VIII** – KOCK et al., 2007. **IX** – PONGCHAROEN et al., 2007. **X** – SETO et al., 2007.

Figura 2. Fármacos produzidos por fungos endofíticos. Camptotecina – REHMAN et al, 2008. Hipericina – Kusari et al., 2008. Podofilotoxina – PURI et al., 2006. EYBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2007. Taxol – GUO et al., 2006. GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008. Vincristina – YANG et al., 2004.

1.2 Fungos endofíticos

A associação entre os seres vivos é um fenômeno bastante difundido na natureza. Os organismos vivos procuram condições de vida mais favoráveis à sobrevivência, incluindo maior quantidade de nutrientes, proteção contra espécies predatórias e abrigo, vencendo as dificuldades do ambiente e se adaptando a ele, constituindo o fenômeno muito difundido na natureza e conhecido com simbiose. Símiose “viver junto” é, portanto, a associação entre organismos de espécies diferentes. Existem vários tipos de relações simbióticas.

Um exemplo bastante comum de simbiose que ocorre na natureza é entre fungos e plantas (KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006). Fungos vivem em mutualismo, comensalismo ou antagonismo com uma ampla faixa de organismos (KRIEL; SWART; CROUS, 2000). Estes diferentes estilos de vida dependem do hospedeiro (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; FAETH, 2002) e de interações bióticas e abióticas (MULLER; KRAUSS, 2005; FAETH, 2002). Os fungos não produzem clorofila (são heterotróficos), então, em alguns casos, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas (ZOBERI, 1972).

As interações mais comuns são as parasitárias e mutualísticas (RICHARDSON, 1999). Nas associações parasitárias o fungo vive no interior dos tecidos da planta, de onde obtém proteção e nutrientes necessários para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas a planta. O parasitismo está relacionado a patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta a morte (AGRIOS, 1988).

No caso das associações mutualísticas, a convivência entre fungo e planta é pacífica, uma vez que os dois organismos sobrevivem assintomaticamente à associação, ambos sendo beneficiados. O fungo recebe nutrição e abrigo da planta hospedeira, aumentando sua sobrevivência, a planta aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). Outro benefício ao fungo é sua disseminação à próxima geração do hospedeiro quando ocorre transmissão vertical (FAETH; FAGAN, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005). O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho do seu hospedeiro é através da excreção de metabólitos (SCHULZ et al., 1995). Este caso pode ser chamado de mutualismo defensivo, pois o fungo protegendo a planta estará

protegendo a si próprio (CLAY, 1988a), de alguma forma sugerindo uma adaptação recíproca que vem de longa data.

A pesquisa de novos produtos que sejam eficazes contra as mais diversas doenças é um processo contínuo. Schulz et al. (2002) sugerem que a busca por novos metabólitos secundários, oriundos da natureza, deveria ser feita em organismos que habitem nichos ecológicos ainda pouco explorados, e neste contexto se inserem os fungos endofíticos.

O termo endofítico vem sendo usado desde o começo do século XIX (AZEVEDO, 1999; GIMENEZ et al., 2007) e começou a ser citado com mais frequência durante os anos de 1980 sendo, primeiramente, empregado para designar fungos que foram encontrados vivendo em plantas (WENNSTRON, 1994), não levando em conta o status da relação, pois no sentido mais básico da palavra, endofítico poderia somente se referir à localização do microrganismo (endo=dentro e fítico=planta), não distinguindo um endofítico de um fitopatógeno (WILSON, 1995). Bary (1866) foi quem primeiro delineou a diferença entre os endofíticos e os fitopatógenos.

O microrganismo que habite todo, ou pelo menos um período de seu ciclo de vida, o interior de uma planta hospedeira e não lhe cause doenças com sintomas aparentes pode ser considerado endofítico (ZIKMUNDOVA et al., 2002; TAN; ZOU, 2001), podendo a colonização ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma geração para outra. Excluindo-se os fungos endofíticos de gramíneas, a grande maioria destes fungos parece ser transmitida horizontalmente, por esporos (CARROLL, 1988), diferentemente dos fungos que são transmitidos verticalmente através de sementes do seu hospedeiro (CLAY, 1988a) ou propágulos vegetativos (CARROLL, 1988). Os endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira (PETRINI et al., 1992), possuindo as exoenzimas necessárias para colonizar seus hospedeiros (SCHULZ et al., 2002), mas, usualmente,

habitam as partes superiores de plantas como folhas, galhos, casca, pecíolo e estruturas reprodutivas (FAETH & FAGAN, 2002). Estes microrganismos foram descobertos em todas as plantas examinadas até o momento (ARNOLD et al., 2000), sendo capazes de colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, alguns mostrando especificidade a certas plantas (KRIEL; SWART; CROUS, 2000). A diversidade de fungos endofíticos em uma planta pode ser muito alta. Algumas espécies de plantas podem ter mais de 100 espécies de fungos associados em somente um tecido, mas, geralmente, estas comunidades são dominadas por poucas espécies que são hospedeiro-específicas.

Já que muitas destas associações têm se mostrado benéficas para ambos os organismos, o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo (FAETH; HAMONN, 1997) pois o principal fator para serem considerados como tal se deve ao fato destes fungos produzirem substâncias que são tóxicas aos herbívoros da planta hospedeira, porém alguns fungos encontrados em plantas lenhosas não desempenham nenhum efeito sobre patógenos do seu hospedeiro (FAETH; FAGAN, 2002).

Há um gradiente entre as distinções dos termos endofíticos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas), portanto às vezes torna-se difícil descrever limites para distinguir cada categoria (AZEVEDO et al., 2000). Devido a esta dificuldade de distinção, muitos fungos que não são endofíticos podem ser classificados como tal (WENNSTROM, 1994). Então a natureza da relação torna-se fator importante na descrição de um endofítico (WILSON, 1995). Schulz e Boyle (2005) descrevem o termo endofítico como sendo fungos que podem ser detectados, em um momento particular, em tecidos de plantas aparentemente saudáveis, descartando o futuro status da relação. Ocorre um balanço dinâmico de antagonismos entre a virulência fúngica e a defesa do hospedeiro. Qualquer fator de estresse do hospedeiro ou mudança em condições fisiológicas

de um dos envolvidos na interação pode perturbar este balanço e levar ao desenvolvimento de doença.

Estes microrganismos têm uma estreita relação co-evolucionária com o seu hospedeiro (KRIEL; SWART; CROUS, 2000; WILSON, 1993) e podem, por exemplo, proteger a planta hospedeira contra herbívoros (CLAY, 1988b; CLARK; MILLER; WHITNEY, 1989; CARROLL, 1995; SCHULZ et al., 1995) e outros patógenos fúngicos (CARROLL, 1988), aumentando a defesa da planta (SCHULZ et al., 1995).

Alguns endofíticos podem ser usados como agentes no controle biológico de pragas e doenças (WHIET; COLE, 1985) promovendo aumento de resistência a estresse ambiental (GAO et al., 2005). Podem produzir substâncias bioativas como fitohormônios (YUE et al., 2000) que aumentam o crescimento (VILA-AIUB; GUNDEL; GHERSA, 2005) e competitividade do hospedeiro na natureza (KRIEL; SWART; CROUS, 2000; TAN; ZOU, 2001; RUDGERS; KOSLOW; CLAY, 2004; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004), induzindo, por exemplo, o aumento na produção de sementes do seu hospedeiro (CLAY, 1988b). Poderiam ser utilizados como micoherbicidas no controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1987) e promover a invasão da planta em comunidades diversas (RUDGERS; MATTINGLY; KOSLOW, 2005).

Fungos fitopatogênicos podem se tornar endofíticos em determinado período de sua vida (WILSON, 1995), através de alterações mutagênicas para crescerem como endofíticos não patogênicos (FREEMAN; RODRIGUES, 1993). De fato, tem sido sugerido que a origem evolucionária de muitos endofíticos pode recair em patógenos assintomáticos ou latentes (SAIKKONEN et al., 1998). O contrário também pode ocorrer. Fungos endofíticos que interajam mutualisticamente com seu hospedeiro podem se tornar patogênicos em algum momento de estresse do hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005; KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006).

Os fungos endofíticos mais estudados, até o momento, são os associados a espécies de gramíneas, devido ao fato da importância que estes fungos desempenham na agricultura (SAIKKONEN et al., 1998). Estes produzem uma ampla quantidade de metabólitos secundários (SCHULZ; BOYLE, 2005). Pertencem à família Clavicipitaceae e são Ascomycetos da tribo Balansiae e se resumem a apenas cinco gêneros (*Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Epichloë* e *Myriogenospora*) totalizando aproximadamente 30 espécies (CLAY, 1988b). Saikkonen et al. (1998) encontraram um pouco mais de 200 referências na literatura descrevendo aspectos ecológicos ou evolucionários de associações de endofíticos com seu hospedeiro ou herbívoros, com aproximadamente 75% descrevendo interações de fungos endofíticos de gramas, principalmente de duas espécies agronomicamente importantes, *Festuca arundinaceae* e *Lolium perenne*, demonstrando a grande porcentagem de estudos biológicos acerca dos fungos endofíticos associados a espécies de gramíneas em relação a endofíticos associados a outras espécies de plantas.

Como resultado direto da função que os metabólitos secundários bioativos exercem na natureza, eles podem apresentar aplicações na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002). Devido a estreita relação entre os microrganismos endofíticos e as plantas hospedeiras, há um grande potencial de isolamento de novas estruturas químicas e substâncias bioativas destes microrganismos. De fato, na última década a literatura registra um aumento no número de trabalhos envolvendo o estudo químico de fungos endofíticos. Em programas de triagem em bioensaios, a proporção de microrganismos endofíticos de plantas e algas que produzem substâncias biologicamente ativas foi significativamente superior aos microrganismos de solo (SCHULZ et al., 2002). Adicionalmente, cerca de 51% das substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos até 2002 eram previamente desconhecidas (STROBEL, 2002).

Os microrganismos endofíticos constituem uma fonte potencial de produtos naturais pouco explorada, quando comparada as plantas e organismos marinhos. A maioria das

pesquisas com endofíticos tem sido realizadas em países do hemisfério norte e Nova Zelândia. Os resultados de regiões tropicais são menos numerosos, mas têm mostrado que as plantas tropicais apresentam grande diversidade de microrganismos endofíticos, muitos deles ainda não classificados e que podem pertencer a novos gêneros e espécies (AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002). Uma grande diversidade de metabólitos pode ser encontrada com o estudo dos fungos obtidos em uma única espécie vegetal, pois se estima que cerca de $1,3 \times 10^6$ endofíticos habitem as 270.000 plantas vasculares conhecidas (BRADY; CLARDY, 2000).

Strobel e Daisy (2003) afirmam que a seleção das plantas hospedeiras para o isolamento de fungos endofíticos, que sejam interessantes do ponto de vista químico e biológico, deveria ser feita baseada em alguns critérios: i) a planta deve apresentar um histórico etnobotânico, ii) deve se adaptar facilmente ao meio ambiente, podendo apresentar atividade alelopática, iii) deve crescer em regiões de alta biodiversidade e/ou iv) deve endêmica. A planta *Tithonia diversifolia* cumpre a maioria destes requisitos.

1.3 A família Asteraceae e a espécie *Tithonia diversifolia*

Asteraceae (ou Compositae) é uma das maiores famílias entre as angiospermas e está bem representada no Brasil. É composta por 1.535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, agrupadas em 3 subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994). É predominante em regiões de cerrado, área de elevada biodiversidade vegetal (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996).

Inúmeras espécies possuem importância econômica e biológica, sendo empregadas na terapêutica (fitoterápicos), na medicina popular e na alimentação, muitas delas mundialmente consagradas. Como exemplos de espécies economicamente importantes para o homem,

podem ser citadas a arnica (*Arnica montana*), a alface (*Lactuca sativa*), a chicórea (*Cichorium intybus*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), a alcachofra (*Cynara scolymus*), a calêndula (*Calendula officinale*), o crisântemo (*Chrysanthemum* spp), a carqueja (*Baccharis trimera*), o guaco (*Mikania glomerata*), a marcela (*Achyrocline satureoides*) e o falso boldo (*Vernonia condensata*), dentre muitas outras.

Há também um grande número de substâncias, biologicamente ativas, isoladas de espécies de Asteraceae, incluindo diferentes classes de terpenóides, flavonóides, cumarinas e poliacetilenos, todas micromoléculas características dessa família (BOHLMANN; ZDERO, 1990; HEYWOOD; HARBORNE; TURNER, 1977; PICMAN, 1986; RODRIGUEZ et al., 1976). As substâncias mais investigadas da família Asteraceae, sob diversos aspectos, são as lactonas sesquiterpênicas (LST). Além de apresentarem diversas atividades biológicas (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976), são importantes marcadores taxonômicos (SEAMAN, 1982), visto que alguns tipos de esqueletos carbocíclicos, padrões de oxidação e de substituição são peculiares de determinados grupos de espécies (SPRING; BUSCHMANN, 1996; SEAMAN, 1982). Essa classe de substâncias é predominante em toda família, ocorrendo esporadicamente em outras angiospermas.

A tribo Heliantheae é a segunda maior da família Asteraceae, englobando 35 subtribos e cerca de 250 gêneros, segundo Robinson (1981), ou 10 tribos com aproximadamente 200 gêneros, segundo Bremer (1994), com mais de 2.500 espécies. Dentre as espécies economicamente importantes que pertencem a esta tribo, pode-se citar o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), que possui atividade hipoglicemiante, o girassol (*Helianthus annuus*), que produz terpenóides com atividades biológicas e é empregado na produção de óleo comestível, o picão (*Bidens pilosa* e *Bidens* spp), com emprego na medicina popular contra hepatite, o margaridão (*Tithonia diversifolia*), planta invasora introduzida no Brasil cujas substâncias

possuem atividade antiinflamatória e alelopática, além da equinácea (*Echinacea angustifolia*), cujo fitoterápico dela obtido é um dos mais vendidos imunostimulantes no mundo.

Tithonia diversifolia Hemsl A. Gray é um arbusto alto (3-5 m) (figura 3) de textura semi-herbácea, ereto, vigoroso, ramificado, com ramagem vigorosa mais quebradiça. Folhas inteiras ou lobadas e pubescentes. Possui inflorescências terminais e axilares, com flores amarelas vistosas, reunidas em capítulos solitários grandes, semelhante aos girassóis, formados nos meses de outono-inverno sendo pouco tolerante a baixa temperatura (LORENZI; SOUZA, 2001). A planta é nativa do México e América Central (PEREZ et al., 1984, SCHUSTER et al., 1992). Também cresce em partes da África, Austrália, Ásia, América do Norte (GU et al., 2002) e Índia Ocidental (GOFFIN et al., 2002). Tem sido introduzida em várias partes do mundo (PEREZ et al., 1984), sendo usada para propósitos ornamentais (OWOYELE et al., 2004) tornando-se uma planta dominante em algumas regiões onde está presente (PEREZ et al., 1984). Isto sugere que a planta seja altamente competitiva e possa apresentar atividade alelopática sobre outras espécies vegetais (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 1998).

Figura 3. *Tithonia diversifolia* (margaridão)

Investigações fitoquímicas resultaram no isolamento de cadinanos, flavonóides, cromenos, sesquiterpenos eudesmanos e germacranos (GU et al., 2002). Extratos de *T. diversifolia* têm sido usados tradicionalmente no tratamento da diarreia, febre, hepatites, feridas (GU et al., 2002; GOFFIN et al., 2002; MADUREIRA et al., 2002;) e malária (GU et al., 2002; GOFFIN et al., 2002; MADUREIRA et al., 2002; ELUFIOYE; GABEDAHUNSI, 2004). Atividades amebicida (TONA et al., 1998, 2000), inseticida (ADERIRE; AKINNEYE, 2004), espasmolítica (TONA et al., 2000), antidiabética (MIURA et al., 2002, 2005), antibacteriana (OBAFEMI et al., 2006), antifúngica, antiviral e antiinflamatória, também têm sido descritas para extratos da planta (GOFFIN et al., 2002; COS et al., 2002). Substâncias isoladas da planta confirmam as atividades biológicas demonstradas pelo extrato, apresentando atividades antibacteriana (OBAFEMI et al., 2006; BOUBERT et al, 2006a), antiinflamatória (HERRERA et al., 2007), antifúngica (BOUBERT et al, 2006a, 2006b), fitotóxica (BOUBERT et al, 2006a, 2006b), citotóxica (KURODA et al., 2007) e potencial quimiopreventivo ao câncer de cólon e de mama (GU et al., 2002). A LST tagitinina C (IV), principal componente do extrato em éter das partes aéreas, apresentou atividade promissora contra *Plasmodium falciparum* (GOFFIN et al., 2002). A figura 4 apresenta os principais esqueletos carbônicos de LSTs isoladas de *T. diversifolia*: furanoeliangolido (XI), heliangolido (XII), guaianolido (XIII) e germacrolido (tagitinina C. XIV)

Figura 4. Principais esqueletos de lactonas sesquiterpênicas encontrados em *T. diversifolia*

Juntamente com os fungos isolados da planta *T. diversifolia* descritos neste trabalho, foram isolados 12 fungos da planta *Viguiera robusta* (Asteraceae) (MOMESSO, 2004) e 34 da planta *V. arenaria* (GUIMARÃES et al., 2008). Todos estes fungos pertencem à coleção de cepas do laboratório de Química Farmacêutica sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo e estão depositados no Laboratório de Enzimologia Industrial sob a responsabilidade da Profa. Dra. Suraia Said.

1.4 Biotransformações utilizando fungos

Os fungos, além de produzirem uma ampla diversidade de estruturas químicas, também são bastante utilizados em processos de biotransformação.

Biotransformações tem sido utilizadas pelo homem desde meados do século XIX. A primeira aplicação de uma biotransformação foi feita em 1858 por Pasteur, usando o fungo *Penicillium glaucum*, obtendo-se L-tartarato de amônio de DL-tartarato de amônio (HANSON, 1995). Entretanto, somente no século XX, estudos acerca das biotransformações passaram a receber maior atenção, principalmente após o desenvolvimento de hidroxilações microbianas em esteróides bioativos ou em produtos intermediários utilizados na síntese de corticosteróides. A α hidroxilação em um único passo, da progesterona usando *Rhizopus arrhizus* foi descrita em 1952 (PETERSON et al., 1952). Esta reação foi muito importante para a síntese de hormônios adrenocorticoides (corticosterona, cortisona e hidrocortisona) e abriu caminho para a preparação de uma série de derivados bioativos (prednisona, prednisolona e triancinolona) (VEZINA, 1987). Uma hidroxila na posição 11 β nos esteróides é essencial para sua atividade biológica. A introdução desta hidroxila via biotransformação

foi descrita primeiramente em 1953 usando *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia lunata* (figura 5). Cortisolona foi 11 β -hidroxilada produzindo hidrocortisona com 60-70% de rendimento usando *C. lunata* (VEZINA, 1987).

Figura 5. Biotransformação da cortisolona pelos fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia lunata*.

Atualmente, biotransformações tem se tornado uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de novas tecnologias e para a síntese de compostos com alto valor agregado. Fungos são capazes de catalisar um amplo espectro de reações químicas. Eles também exibem alta tolerância a uma diversa variedade de substâncias químicas (FABER, 1997). Apresentam alta taxa de crescimento e de metabolismo levando a uma eficiente biotransformação do substrato adicionado. Podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes da molécula. Podem realizar reações em regiões que dificilmente se obteriam por síntese química, isto é, funcionalização de posições não ativadas em moléculas orgânicas, tal como hidroxilações em cadeias alifáticas (FABER, 1997).

O uso de fungos ou enzimas isoladas é mais barato quando comparado a catalise metálica e normalmente reduz o número de passos da reação. Em geral, as reações de biotransformação são realizadas a pH variando entre 5-8, a temperatura ambiente e pressão atmosférica, uma vantagem sobre processos químicos que requerem significantes aumentos de energia. Estas condições minimizam problemas comuns em alguns tipos de reações como

decomposição, isomerização, racemização ou rearranjo, comuns nas metodologias tradicionais (FABER, 1997).

As biotransformações são ecologicamente seguras, pois as realizadas em água. As células são completamente biodegradáveis, as enzimas são normalmente secretadas para o meio extracelular e não apresentam toxicidez (VEZINA, 1987).

Os procedimentos utilizados em biotransformação podem ser cuidadosamente planejados. Alguns aspectos relevantes requerem atenção: i) seleção do composto alvo e possíveis reações (oxidação, redução, etc), ii) avaliação da atividade catalítica de enzimas isoladas, iii) determinação das condições de reação ideais (temperatura, tempo, pH, solvente, concentração do substrato), iv) a escolha do método analítico apropriado (CG, CE, HPLC, RMN, etc), v) elucidação da configuração absoluta dos produtos, vi) aumento da escala (industrial ou preparativa) e vii) escolha do microrganismo a ser usado.

Fungos endofíticos são uma fonte praticamente inexplorada nos estudos de biotransformação, visto que existem pouquíssimos relatos na literatura sobre este tipo de estudo. Pode-se destacar:

1 - Benzoxazinonas, uma classe de fitoanticipinas que ocorrem nas famílias Gramineae, Acanthaceae, Ranunculaceae e Scrophulariaceae, apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida. O fungo *Fusarium moniliforme*, um dos mais comuns associados à *Zea mays* L. mostrou ser capaz de metabolizar o substrato 6-metoxi-benzoxazolinona (MBOA) e 2-benzoxazolinona (BOA) em *N*-(2-hidroxi-4-methoxifenil) e *N*-(2-hidroxifenil) ácido malônico, respectivamente. A biotransformação de BOA e 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (HBOA) por quatro endofíticos isolados de *Aphelandra tetragona* também foi reportado por Zikmundová et al. (2002a). Eles identificaram vários novos produtos oriundos de acetilação, acilação, oxidação, hidrólise e nitração. *Fusarium sambucinum* detoxificou BOA e HBOA em *N*-(2-hidroxifenil) ácido malônico. *Plectosporium*

tabacinum, *Gliocladium cibotii*, e *Chaetosphaeria* sp. transformaram HBOA em 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxifenil)acetamida, *N*-(2-hidroxifenil)acetamida, *N*-(2-hidroxi-5-nitrofenil)acetamida, *N*-(2-hidroxi-3-nitrofenil)acetamida, 2-amino-3*H*-fenoxazin-3-ona, 2-acetilamino-3*H*-fenoxazin-3-ona e 2-(*N*-hidroxi)acetilamino-3*H*-fenoxazin-3-ona. BOA não foi metabolizado por nenhum dos 3 fungos. Em adição, a biotransformação de BOA e seus maiores produtos de degradação 2-hidroxi-*N*-(2-hidroxifenil)acetamida e *N*-(2-hidroxifenil)acetamida foi feita por *Chaetosphaeria* sp., um fungo endofítico isolado de *Aphelandra tetragona* (ZIKMUNDOVA et al., 2002b). Foram identificados três novos metabólitos, 2-amino-7-hidroxi-3*H*-fenoxazin-3-ona, 2-acetilamino-7-hidroxi-3*H*-fenoxazin-3-ona e 7-hidroxi-2-(2-hidroxiacetil)-amino-3*H*-fenoxazin-3-ona.

Estudos de biotransformação de fármacos também são importantes, pois podem gerar metabólitos ativos ou intermediários de síntese com interesse industrial. Como exemplo, muitos derivados fenotiazínicos, tal como tioridazina, sob S-oxidação, geram derivados sulfoxidados. Tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-2-sulfona são metabólitos considerados farmacologicamente ativos enquanto tioridazina-5-sulfóxido contribui para os efeitos cardiotóxicos do fármaco (HALE; POKLIS, 1986). Particularmente, tioridazina-2-sulfóxido foi introduzida no mercado farmacêutico sob o nome de Serentil® e é duas vezes mais potente que o agente antipsicótico tioridazina, em humanos (AGUILAR, 1975). Considerando que os metabólitos da tioridazina são terapeuticamente ativos, com efeitos secundários que podem ser atribuídos a estereoisômeros específicos, o estudo de seu metabolismo por fungos endofíticos pode ser útil para obter metabólitos em sua forma enantiomericamente pura e depois estudar seus efeitos clínicos e tóxicos.

2 - Biotransformação estereoseletiva da tioridazina foi estudada por Borges et al., (2007; 2008) utilizando 12 fungos endofíticos isolados de *Tithonia diversifolia*, *Viguiera robusta* e *V. arenaria*. Em geral, o enxofre da cadeia lateral (posição 2) ou o enxofre do anel

fenotiazínico foi oxidado produzindo os principais metabólitos do metabolismo humano da tioridazina, tioridazina-2-sulfóxido e tioridazina-5-sulfóxido. A quantidade dos metabólitos biosintetizados variou entre os 12 fungos endofíticos avaliados. Entretanto, mono-2-sulfoxidação ocorreu com mais frequência.

Finalmente, biotransformações com interesse na área de biotecnologia e novos métodos para a geração de metabólitos são necessários para a indústria farmacêutica podendo usar este conhecimento para produzir novos fármacos em suas formas estereo/enantioseletiva. Em adição, os pesquisadores acadêmicos e industriais acreditam que os processos de biotransformação são uma área muito promissora, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de compostos químicos e fármacos, isto é, química verde.

5. Conclusões

É muito importante um eficiente processo de esterilização da superfície do tecido ao qual se busca os microrganismos endofíticos, evitando-se assim o isolamento de microrganismos epifíticos (MAHESHWARI, 2006). Neste trabalho observou-se que a submersão das folhas de *T. diversifolia* em hipoclorito de sódio durante cinco minutos foi muito drástica, eliminando os microrganismos endofíticos. Ainda, é necessário levar em conta alguns fatores para se evitar a perda de microrganismos que possam vir a ser interessantes do ponto de vista químico, foco principal deste trabalho, como trabalhar sempre em ambientes totalmente assépticos, evitando contaminações indesejadas, padronizar um procedimento de extração para se evitar a perda de microrganismos por esterilização das paredes internas dos tecidos vegetais, como possivelmente ocorreu neste trabalho e, por fim, mas não menos importante, procurar sempre se informar com dados da literatura, estando sempre atualizado sobre novos procedimentos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que, para um mesmo fungo, os metabólitos produzidos variaram em função das condições de cultivo, que influenciaram diferentemente cada um dos cinco microrganismos endofíticos associados a *T. diversifolia*. Este dado demonstra a ampla capacidade biossintética que estes microrganismos possuem. Genes que estão silenciados para a produção de um determinado metabólito podem se manifestar apenas pela simples variação da temperatura, fonte de carbono do meio ou aeração. Este fato torna-se muito importante para o trabalho químico, pois deve-se tentar encontrar a melhor condição de cultivo que possibilite o microrganismo expressar seu potencial enzimático e produzir substâncias de interesse em quantidades satisfatórias.

Dentre os fungos isolados de *T. diversifolia*, *Phoma sorghina* se mostrou o mais promissor ao que se foi proposto, produzindo extratos ativos nos ensaios realizados e três novos derivados antraquinônicos, além de outras substâncias conhecidas. Entretanto, não se pode dizer que este fungo produza maior quantidade ou metabólitos mais ativos frente a um determinado experimento. Isto apenas ocorreu nas condições estudadas, podendo este perfil mudar drasticamente com a mudança das condições de cultivo.

Com a incessante busca por novos metabólitos que sejam estruturalmente novos ou bioativos, o fungo *Chaetomium globosum*, isolado de *Viguiera robusta*, mostrou-se bastante promissor, produzindo oito novas estruturas de derivados azafilônicos, que podem vir a apresentar atividade biológica frente a algum ensaio.

Os fungos endofíticos também biotransformaram os substratos naftoquinônicos e 1-tetralona, através de reações de oxidação, redução e metilação. Assim, este trabalho abre perspectivas para a utilização destes microrganismos em experimentos de biocatálise e biotransformação de outros substratos, a fim de se obter derivados com propriedades biológicas melhoradas, como maior atividade farmacológica, menor toxicidade, propriedades farmacocinéticas melhoradas, etc. Ainda, estes microrganismos podem ser usados na tentativa de se determinar possíveis metabólitos de um candidato a fármaco a serem produzidos *in vivo*, etapa fundamental em processos de desenvolvimento de novos fármacos.

De forma geral, o trabalho desenvolvido contribuiu para evidenciar a importância dos microrganismos endofíticos em projetos de bioprospecção e como fontes de novas estruturas químicas e, ainda, em experimentos de biotransformação.

6. Referências bibliográficas

ADEDIRE, C. O.; AKINNEYE, J. O. (2004) Biological activity of tree marigold, *Tithonia diversifolia*, on cowpea seed bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Annals of Applied Biology*, **144**: 185-189.

AGRIOS, G. N. Plant Patology. 3 ed. New York: Academic Press, 1988. p. 40.

AGUILAR, S. J. (1975) An open study of mesoridazine (Serentil) in chronic schizophrenics. *Diseases of the nervous system*, **36**: 484-489.

ALDRED, D.; MAGAN, N.; LANE, B. S. (1999) Influence of water activity and nutrients on growth and production of squalastatin S1 by a *Phoma* sp. *Journal of Applied Microbiology*, **87**: 842-848.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4 ed. John Wiley & Sons, 1996. p. 449-450.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. (1992) Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia*, **119**: 17-23

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, **88**: 541-549.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*, **3**: 267-274.

AZEVEDO, J. L. (1999) Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica*, **22**: 225-229.

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

BACON, C. W. In: Isolation of biotechnological organisms from nature. New York: McGraw-Hill, 1990. pp. 259-282.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, **4**: 14-19.

BICK, I. R. C.; RHEE, C. (1966) Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. *Biochemical Journal*, **98**: 112-116.

BOCK, B.; PEDERSEN, C. (1983) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry*, **41**: 27-65.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. (1990) Systematics and evolution within the Compositae seen with the eyes of a chemist. *Plant Systematics and Evolution*, **171**: 1-14.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. (2007) Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**:669–674

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. (2008) Stereoselective analysis of thioridazine-2-sulfoxide and thioridazine-5-sulfoxide: An investigation of *rac*-thioridazine biotransformation by some endophytic fungi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**: 945–952.

BOUBERT, M. Y.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; DONGO, E.; SCHULZ, B.; HU, Q. (2006a) Tithoniaquinone A and tithoniamide B: a new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **61b**: 78-82.

BOUBERT, M. Y.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; DONGO, E.; SCHULZ, B.; HU, Q. (2006b) Tithoniamarin and tithoniamide: a structurally unique isocoumarin dimmer and a new ceramide from *Tithonia diversifolia*. *Natural Product Research*, **20**: 842-849.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. (2000) CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*, **63**: 1447-1448.

BRAZ-Fº, R. (1994) Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. *Química Nova*, **17**: 405.

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

BUTLER, M. S. (2004) The role of Natural Product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, **67**: 2141-2153.

CARROLL, G. (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, **69**: 2-9.

CARROLL, G. (1995) Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*, **73**: S1316-S1324.

CERKAUSKAS, R. F. (1987) Latent colonization by *Colletotrichum* spp. – Implications for mycoherbicides. *Phytopathology*, **77**: 1703-1703.

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

CLARK, C. L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. (1989) Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. *Mycological Research*, **93**: 508-512.

CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. – In: PIROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. (eds), *Coevolution of fungi with plants and animals*. Academic Press, San Diego, 1988a.

CLAY, K. (1988b) Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, **69**: 10-16.

CLAY, K.; SCHARDL, C. (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, **160**: S99-S127.

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

COLLINS, P.; FERRIER, R. *Monosaccharides – their chemistry and their roles in natural products*. 2 ed. 1996.

CORDELL, G. A. (2000) Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**: 463-480.

COS, P.; HERMANS, N.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; SINDAMBIWE, J. B.; VANDEN BERGHE, D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. (2002) Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**: 155-163

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. (1997) Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, **60**: 52-60.

CZARNICK, A. W. (1996) Guest Editorial. *Accounts of Chemical Research*, **29**: 112-113

DAI, J.; KROHN, K.; ELSASSER, B.; FLORKE, U.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T. (2007) Metabolic products of the endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp. from *Larix decidua*. *European Journal of Organic Chemistry*, 4845-4854.

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

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

ELUFIOYE, T. O.; AGBEDAHUNSI, J. M. (2004) Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 167-171.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. (2006) Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, **69**: 1121-1124.

FABER, K. Biotransformation in organic chemistry: a text book. Springer-Verlag, 1997. pp. 402.

FAETH, S.; HAMONN, K. (1997) Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology*, **78**: 820-827.

FAETH, S. H. (2002) Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos*, **98**: 25-36.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. (2002) Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology*, **42**: 360-368.

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

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. (1993) Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualism. *Science*, **260**: 75-78

FURTADO, N. A. J. C. Otimização das condições de cultivo de *Aspergillus fumigatus*, utilização de processos de eliciação para produção de antibióticos e isolamento das substâncias ativas. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 1999, 137 pp.

GADEN, E. L. (2000) Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemistry and Microbiology Technology Engineering*, **1**: 413.

GALLO, M. B. C.; GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural Products from endophytic fungi. In: Ratul Saikai; Rajib L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org). Microbial Biotechnology. New Delhi: New India Publishing Agency, 2007, 139-168.

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

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. (2008) Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb.

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

GARCIA-SILVA, M. *Penicillium corylophilum* Dierckx: atividades antimicrobiana a antichagásica de extratos brutos e metabólitos secundários isolados. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 2002, 132 pp.

GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZALEZ-COLOMA, A. (2007) Fungal endophytes and their role in plant protection. *Current Organic Chemistry*, **11**: 707-720.

GOFFIN, E.; ZIEMONS, E.; DE MOL, P.; MADUREIRA, M. C.; MARTINS, A. P.; CUNHA, A. P.; PHILIPPE, G.; TITS, M.; ANGENOT, L.; FREDERICH, M. (2002) In vitro

antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. *Planta Medica*, **68**: 543-545

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

GRAUPNER, P. R.; CARR, A.; CLANCY, J.; CILBERT, J.; BAILEY, K. L.; DERBY, J. A.; GERWICK, B. C. (2003) The macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *Journal of Natural Products*, **66**: 1558-1561.

GU, J. Q.; GILLS, J. J.; PARK, E. J.; GREENWOOD, E. M.; HAWTHORNE, M. E.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P. I.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. (2002) Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *Journal of Natural Products*, **65**: 532-536.

GUIMARAES, D. O.; BORGES, W. S. KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. (2008) Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **52**, 134-144.

GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 523-531.

GUNASERAKAN, M.; WEBER, D. J. (1981) Influence of physicochemical factors on growth and pigment synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Mycologia*, **73**: 844-852.

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

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. (2008) Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**: 136-142.

GUO, B. H.; WANG, Y. C.; ZHOU, X. W.; HU, K.; TAN, F.; MIAO, Z. Q.; TANG, K. X. (2006) An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *marei*. *African Journal of Biotechnology*, **5**: 875-877.

HALE, P. W. Jr.; POKLIS, A. (1986) Cardiotoxicity of thioridazine and two stereoisomeric forms of thioridazine 5-sulfoxide in the isolated perfused rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **86**: 44-55.

HANSON, J. R. An introduction to biotransformations in organic chemistry. In: J. Man (ed.), Biochemical & Medicinal Chemistry Series, W. H. Freeman, 1995. p. 1-89.

HARVEY, A. (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, **5**: 294-300.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. (1999) Statistical investigation into the structural of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie Internacional Edition in English*, **38**: 643-647.

HERRERA, J.; TRONCONE, G.; SANCHEZ, M. R.; MIGUEL, V.; LOPEZ, S. E. (2007) The effect of furanoheliangolides from *Tithonia diversifolia* on superoxide anion generation in human neutrophils. *Fitoterapia*, **78**: 465-469.

HEYWOOD, V. A.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. (eds.) The biology and chemistry of the Compositae. London: Acad. Press, vol. 1 e 2, 1977.

HOLLER, U. Isolation, biological activity and secondary metabolite investigation of marine-derived fungi and selected host sponges.. Dissertação de mestrado, Technical University of Braunschweig, Braunschweig, Alemanha, 1999, 151 pp.

HU, Z.-Y.; LI, Y.-Y.; HUANG, Y.-J.; SU, W.-J.; SHEN, Y.-M. (2008) Three new sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*, **91**: 46-52.

HUANG, H.; SHE, Z.; LIN, Y.; VRIJMOED, L. L. P.; LIN, W. (2007) Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a Mangrove leaf (*Kandelia candel*). *Journal of Natural Products*, **70**: 1696-1699.

ILAVSKY, J.; PLAINS, P; HERZOG, H. (1962) 11-hydroxylations of steroids by *Phoma* microorganisms. United States Paten Office, number 3,054,725. Patented Sep. 18.

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

KITA, K.; SHIOMI, K.; OMURA, S. (2007) Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology*, **25**: 223-229.

KOCK, I.; KROHN, K.; EGOLD, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. (2007) New massarilactones, massarigenin E, and coniothyrenol, isolated from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp. from *Carpobrotus edulis*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2186-2190.

KOGEL, K.-H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. (2006) Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 358-363.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; NASOMIAI, P.; LOUANQSYSOUPHANH, S.; SOYTONG, K.; ISOBE, M.; KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SUKSAMRARN, A. (2006) Antifungal azaphilones from the fungus *Chaetomium cupreum* CC3003. *Journal of Natural Products*, **69**: 891-895.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. (2003) Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotricum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. *Journal of Natural Products*, **66**: 709-711.

KRIEL, W. M.; SWART, W. J.; CROUS, P. W. (2000) Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae. *Advances in Botanical Research*, **33**: 1-34.

KURODA, M.; YOKOSUKA, A.; KOBAYASHI, R.; JITSUNO, M.; KANDO, H.; NOSAKA, K.; ISHII, H.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. (2007) Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **55**: 1240-1244.

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

LIN, Z.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. (2008) Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, **69**: 1273-1278.

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

LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X.; TIAN, X.; TAN, R. X. (2002) Leptosphaerone, a metabolite with a novel skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Helvetica Chimica Acta*, **85**: 2664-2667.

LIU, Z.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. (2003a) A cyclic carbonated and related polyketides from a marine-derived fungus of the genus *Phoma*. *Phytochemistry*, **64**: 571-574.

LIU, J. Y.; LIU, C. H.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. (2003b) Leptosphaeric Acid, a metabolite with a Novel Carbon Skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV 403, an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. *Helvetica Chimica Acta*, **86**: 657-660.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. (2001) Plantas Ornamentais no Brasil (arbustivas, herbáceas e trepadeiras)..3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 508 p.

LOSGEN, S.; MAGULL, J.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; ZEECK, A. (2008) Isofusidienols: novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. *European Journal of Organic Chemistry*, 698-703.

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

MADUREIRA, M. C.; MARTINS, A. P.; GOMES, M.; PAIVA, J.; CUNHA, A. P.; ROSARIO, V. (2002) Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology*, **81**: 23-29.

MAHESHWARI, R. (2006) What is an endophytic fungus? *Current Science*, **90**: 1309.

MAHINDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRAWAT, H.; PISUTJAROENPONG, S.; ENGPRASERT, S.; CHUMSRI, P.; TENGCHASRI, T.; SIRISINHA, S.; PICH, P. (1998) Biodiversity and natural product drug discovery. *Pure & Applied Chemistry*, **70**: 2065-2072.

MIURA, T.; FURUTA, K.; YASUDA, A.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; ISHIHARA, E.; ISHIDA, T.; TANIGAWA, K. *American Journal of the Chinese Medicine*, **30**: 81-86.

MIURA, T.; NOSAKA, K.; ISHII, H.; ISHIDA, T. (2005) Antidiabetic effect of Nitobegiku, the herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **28**: 2152.

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

MULLER, C. B.; KRAUSS, J. (2005) Symbiosis between grasses and assexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**: 450-456.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, **16**: 1-5.

NATORI, S. Advances in natural products chemistry. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981. p. 1.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, **17**: 215-234.

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

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

OBAFEMI, C. A.; SULAIMON, T. O.; AKINPELU, D. A.; OLUGBADE, T. A. (2006) Antimicrobial activity of extracts and a germacranolide-type sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. *African Journal of Biotechnology*, **5**: 1254-1258.

OSTERHAGE, C.; SCHWIBBE, M.; KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D. (2000) Differences between marine and terrestrial *Phoma* species as determined by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, **11**: 288-294.

OSTERHAGE, C. Isolation, structure determination and biological activity assessment of secondary metabolites from marine-derived fungi. Dissertação de mestrado, Technical University of Braunschweig, Braunschweig, Alemanha, 2001, 186 pp.

OWOYELE, V. B.; WURAOLA, C. O.; SOLADOYE, A. O.; OLALEYE, S. B. (2004) Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**: 317-321.

PARISI, A.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C.; LIO, G. M. D. S. (1993) Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry*, **32**: 865-867.

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

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H.; REINEKE, L. M.; WEINTRAUB, A.; MEISTER, P. D.; LEIGH, H. M. (1952) Microbial transformation of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. *Journal of American Chemical Society*, **74**: 5933-5936.

PEARCE, C. (1997) Biologically active fungal metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, **44**: 1-68.

PEREZ, A. L.; COLIN, M. C. D.; GUERRERO, C.; DE LA CRUZ, M.; DE VIVAR, A. R. (1984) Sesquiterpene lactones from *Tithonia rotundifolia*. *Phytochemistry*, **23**: 823-827.

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

PICMAN, A. K. (1986) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, **14**: 255-281.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROF, J. (2007) A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryophthora mamane* PSU-M76. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **55**: 1404-1405.

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

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. (2006) The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, **122**: 494-510.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist*, **151**: 705-716.

REHMAN, S.; SHAWL, A. S.; KOUR, A.; ANDRABI, R.; SUDAN, P.; SULTAN, P.; VERMA, V.; QAZI, G. N. (2008) An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**: 203-209.

RICHARDSON, D. H. S. (1999) War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycological Research*, **103**: 641-650.

ROBINSON, H. (1981) A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian Contributions to Botanic*, **51**: 1-102.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. (1976) Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, **15**: 1573-1580.

ROUHI, A. M. (1997) Seeking drugs in natural products. *Chemical & Engineering News*, **75**: 14-29.

ROUHI, A. M. (2003) Rediscovering natural products. *Chemical & Engineering News*, **81**: 77-78, 82-83, 86, 88-91.

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

RUDGERS, J. A.; MATTINGLY, W. B.; KOSLOW, J. M. (2005) Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia*, **144**: 463-471.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. (2008) Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*, **69**: 783-787.

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

SAKURAI, M.; NISHIO, M.; YAMAMOTO, K.; OKUDA, T.; KAWANO, K.; OHNUKI, T. (2003) TMC-264, a novel inhibitor of STAT6 activation produced by *Phoma* sp. TC 1674. *Journal of Antibiotics*, **56**: 513-519.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FILHO, E. (2003) Structures of meroterpenes produced by *Penicillium* sp, an endophytic fungus found associated with *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**: 722-727.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. (2004) Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 315-340.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. (1995) Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. *Mycological Research*, **99**: 1007-1015.

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

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

SCHUSTER, A.; STOKES, S.; PAPASTERGIOU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. (1992) Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. *Phytochemistry*, **31**: 3139-3141.

SEAMAN, F. C. (1982) Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*, **48**: 123-551.

SELOSSE, M. A.; BAUDOUIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, **327**: 639-648.

SEMMELHACK, M. F.; HO, S.; COHEN, D.; STEIGERWALD, M.; LEE, M. C.; LEE, G.; GILBERT, A. M.; WULFF, W. D.; BALL, R. G. (1994) Metal-catalyzed cyclopropene rearrangements for benzannulation: evaluation of an anthraquinone synthesis pathway and reevaluation of the parallel approach via carbene-chromium complexes. *Journal of American Chemical Society*, **116**: 7108-7122.

SETO, Y.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, H.; KOGAMI, Y.; YADA, H.; YOSHIHARA, T.; NABETA, K. (2007) Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus *Epichloe typhina*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**: 1470-1475.

SHU, Y. Z. (1998) Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, **61**: 1053-1071.

SIEBER, T. N. (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, **21**: 75-89.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**: 1107-1112.

SPRING, O.; BUSCHMANN, H. A chemotaxonomic survey of sesquiterpene lactones in the Helianthinae (Compositae). In: HIND, D.J.N. e BEENTJE, H.J. (eds.). *Compositae: systematic proceedings of the international Compositae conference*. Kew: Royal Botanic gardens, vol. 1, pp. 307-316, 1996.

STEYN, P. S.; RABIE, C. J. (1976) Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. *Phytochemistry*, **15**: 1977-1979.

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

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

STROBEL, G.; DAISY, B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 491-502.

STROHL, W. R. (2000) The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, **5**: 39-41.

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

TANAKA, M.; OHRA, J.; TSUJINO, Y.; FUJIMORE, T.; AGO, H.; TSUGE, H. (1995) Dendryol A, B, C and D, four new compounds produced by a weed pathogenic fungus *Dendryphiella* sp. *Zeitschrift für Naturforschung*, **50c**: 751-756.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; CIMANGA, K.; VLIETINCK, A. J. (1998) Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **61**: 57-65.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; MESIA, K.; PENGE, O.; LUSAKIBANZA, M.; CIMANGA, K.; De BRUYNE, T.; APERS, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. (2000) Antiamoebic and spasmolytic activity of extract of some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa Congo. *Phytomedicine*, **7**: 31-38.

TONGMA, S., KOBAYASHI, K., USUI, K. (1998) Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. *Weed Science*, **46**: 432-437.

TUTTLE, J.V.; KRENISTSKY, T.A. (1990) Purine Phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, **255**: 909-915.

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

VERPOORTE, R. (1998) Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, **3**: 232-238.

VERDINE, G. L. (1996) The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, **384**: 11-13 (supplement).

VEZINA, C. Biotransformation. In: Basic Biotechnology. Bu'lock, J. and Kristiansen, B. (eds). Academic Press, 1987. pp. 463-482

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

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

VILA-AIUB, M. M.; GUNDEL, P. E.; GHERSA, C. M. (2005) Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Austral Ecology*, **30**: 49-57.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. (2000) Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus from *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, **193**: 249-253.

WANG, J.W.; ZHANG,Z.; TAN, R. X. (2001) Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. *Biotechnology Letters*, **23**: 857-860.

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

WENNSTROM, A. (1994) Endophyte – the misuse or an old term. *Oikos*, **71**: 535-536.

WIJERATNE, E. M.; PARANAGAMA, P. A.; MARRON, M. T.; GUNATILAKA, M. K.; ARNOLD, A. E.; GUNATILAKA, A. A. L. (2008) Sesquiterpene quinones and related metabolites from *Phyllosticta spinarum*, a fangal strain endophytic in *Platycladus orientalis* of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products*, **71**: 218-222.

WILSON, D. (1993) Fungal endophytes – out of sight but should not be out of mind. *Oikos*, **68**: 379-384.

WILSON, D. (1995) Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, **73**: 274-276.

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

YUE, Q.; MILLER, C. J.; WHITE, J. F. Jr.; RICHARDSON, M. D. (2000) Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichoë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 4687-4692.

ZAITS, C.; HEINS-VACCARI, E. M.; FREITAS, R. S.; ARRIAGADA, G. L. H.; RUIZ, L.; TOTOLI, S. A. S.; MARQUES, A. C.; REZZE, G. G.; MÜLLER, H.; VALENTE, N. S.; LACAZ, C. S. (1997) Subcutaneous pheohyphomycosis caused by *Phoma cava*. Report of a

case and review of the literature. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **39**: 000-000.

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

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

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; HESSE, M.; WERNER, C. (2002b) Hydroxylated 2-Amino-3*H*-phenoxazin-3-one Derivatives as Products of 2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) Biotransformation by *Chaetosphaeria* sp., an endophytic fungus from *Aphelandra tetragona*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **57c**: 660-665.

ZOBERI, M. H. Tropical microfungi. 1 ed. London: The MacMillan Press, 1972. p. 1.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y. & TAN, R. X. (2000) Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, **63**: 1529-1530.