

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

Willian Jonis Andrioli

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 16/03/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Willian Jonis Andiroli

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2012

LOMBADA

ANDRIOLI,
W. J.

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycocleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

Espaço de 2,5 cm
reservado para
etiqueta de
localização da
biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrioli, Willian Jonis

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Ribeirão Preto, 2012. 240 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. Fungos. 2. *Beauveria bassiana*. 3. *Mycleptodiscus indicus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Willian Jonis Andrioli

Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à Jaime Andrioli e Lea T. Tedesco Andrioli, meus queridos pais que transmitiram a mim os mais importantes valores da vida, aos meus amados irmãos Gabriela e Ronald e a Deus pelo dom da vida.

Agradecimento especial

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

"Se eu não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro."

Dom Pedro II

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida;

Aos meus queridos pais, Jaime e Lea Andrioli;

Aos meus amados irmãos, Gabriela e Ronald;

À toda minha família, repleta de pessoas de bom coração;

Aos meus amigos André Damásio, Maller, Tony, Fernando, André Miotello, Lucas, Camilo, Marcelo, Fausto, Nilmar, Anderson, Antônio, Roberto, pelas tantas histórias, quinta dos amigos, República Cueca Virada e futebol;

Aos meus colegas de laboratório João Paulo, Bruno Mineiro, Eliane, Daniella, Ricardo, Mauro, Cris, Rejane, Bruno, Thiago, Cristiane, Niltinho, Renata, Juliana, Mariza, Flávia, Carol, Camila, João Luiz, obrigado pela boa convivência e pelo aprendizado ao lado de vocês;

À Profa. Dra. Niede, pela gentileza e disponibilidade em ajudar e ensinar com carinho;

Ao Prof. Dr. Fernando, pelos ensinamentos e oportunidade de compartilhar a cultura que possui;

À Profa. Dra. Mônica T. Pupo, por todo apoio e disponibilidade em auxiliar meu crescimento;

Aos técnicos de Laboratório da Farmacognosia Waltinho, Mário e João Gabriel, pelo companheirismo.

To Dr. Dhammika Nanayakkara and his wife Kumudine, thank you for receiving me in the United States and for all the teaching;

To Tibba, Ranjitt, Mallika and Vladmyr for the acceptance and good relationship;

À Cássia, pelo ótimo convívio durante o estágio nos EUA e pela amizade que construímos;

Aos técnicos de Laboratório Thomaz, Cláudia, Áurea, Cris e Giba pela disponibilidade e apoio;

Ao pessoal do Laboratório de Química Farmacêutica Denise, Warley, Adriana, Fernanda, Marília, Raphael, Larissa, Noemi, Gisele, Eduardo, Rita, Luciano e Pedro;

Aos Professores, Norberto P. Lopes, Nivaldo, Carlos Curti, Andréia Leopoldino,

Ao Professor Dr. Carlo Bertucci, pela aquisição dos dados de difração circular e ao Professor Dr. José Ricardo Sabino (UFG) pelos dados de cristalografia;

Às secretárias Soninha, Nilva, Lilian, Ruth, Rosana, Rossana, Eleni, Ana;

À Dona Evanira do cafezinho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP;

A todos os funcionários e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Agradeço a ampla disponibilidade de infra-estrutura, bem como a credibilidade demonstrada em nosso trabalho através da concessão de suporte financeiro de bolsas e projetos:



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Mestrado: 05/57116-4; Doutorado: 07/58650-0; Projeto Temático: 04/07935-6.



The University of Mississippi

National Center for Natural Products Research

Epígrafe

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos”

(Albert Einstein)

RESUMO

ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Beauveria bassiana* e *Mycoleptodiscus indicus* visando à produção de metabólitos com atividades antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral.** 2012. 230f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Sabe-se que micro-organismos são vistos como promissoras fontes de moléculas bioativas, incluindo-se nesse grupo fungos endofíticos e também entomopatogênicos. Desse modo, foram selecionados o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e o fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus*. Numa primeira etapa foram prospectadas condições de cultivo favoráveis à obtenção de metabólitos secundários com atividade biológica. Este trabalho foi guiado por ensaios biológicos e análises cromatográficas. As frações obtidas nos cultivos de escala ampliada foram submetidas a ensaios biológicos (leishmanicida, antimalárico, antimicrobiano e citotóxico). As frações diclorometânicas e em acetato de etila de ambos os fungos apresentaram resultados promissores em ensaios antitumorais e leishmanicidas. Em seguida, estas frações foram submetidas a processos cromatográficos que permitiram o isolamento de substâncias, cujas estruturas químicas foram elucidadas por meio do uso de técnicas de RMN, espectrometria de massas, UV, IV, rotação óptica (α_D) e difração de raio-X. A partir de cultivos de *B. bassiana* foram obtidos compostos da classe das piridonas: piridovericina, piridovericina-N-O-(4-O-metil- β -D-glucopiranosídeo) e 15-desóxi-piridovericina, sendo os dois últimos inéditos; e das aloxazinas: 7,8-dimetilaloxazina (lumicromo) e 1-metil-11-hidróxilumicromo, sendo este inédito. A partir dos cultivos de *M. indicus* foram obtidas substâncias de duas classes: cromenos e azafilonas. Neste trabalho foram isolados derivados cromenos: eugenitina, 6-metóxieugenina e 9-hidróxieugenina, os quais têm sido isolados de uma ampla variedade de plantas e fungos. As azafilonas são uma classe estruturalmente diversa de metabólitos fúngicos, conhecidos pigmentos com estrutura pirano-quinona que contêm um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quiral quaternário. Foram obtidas duas azafilonas conhecidas: austidiol e austidiol diacetato (produto de acetilação); e três azafilonas inéditas: dímero de austidiol, austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno. As três azafilonas inéditas de *M. indicus* apresentam um padrão não usual de conexão entre dois policetídeos aromáticos, uma ponte metilênica. O isolamento de tais moléculas reforça a hipótese de que a biossíntese ocorra com a participação de uma molécula de formaldeído. As substâncias purificadas foram submetidas aos ensaios biológicos para confirmar o potencial de suas frações geradoras. No ensaio citotóxico as azafilonas austidiol e austidiol diacetato e a piridona piridovericina mostraram-se ativas contra as linhagens tumorais avaliadas, embora em concentrações superiores aos padrões utilizados. Além disso, apresentaram algum grau de seletividade (não tóxicas para linfócitos humanos). Também nos ensaios leishmanicidas, austidiol, austidiol diacetato e piridovericina mostraram-se ativos, embora em níveis inferiores aos leishmanicidas padrões. De modo que, pode-se considerar que as azafilonas e piridonas são bons compostos líderes para a busca de agentes citotóxicos e leishmanicidas, uma vez que estas classes de compostos possuem dinamicidade biológica. Por fim, o isolamento e elucidação de novos metabólitos das classes azafilonas e piridonas contribuem para o enriquecimento destas importantes classes de metabólitos fúngicos, ao mesmo tempo, que evidenciam a importância dos fungos endofíticos e entomopatogênicos na química de produtos naturais.

Palavras-chave: Aloxazinas, azafilonas, *Beauveria bassiana*, cromenos, *Mycoleptodiscus indicus* e piridonas.

ABSTRACT

ANDRIOLI, W. J. **Optimization of culture conditions of *Beauveria bassiana* and *Mycoleptodiscus indicus* aiming the production of metabolites with antimicrobial, antitumor and antiparasitic activity.** 2012. 230f. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012

It is known that microorganisms are considered as promising source of bioactive molecules and endophytic and entomopathogenic fungi are included in this group. Therefore, we selected the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the endophytic fungus *Mycoleptodiscus indicus* to initiate the prospection aiming to determine the favorable growing conditions to obtain secondary metabolites with biological activity. This work was guided by biological assays and chromatographic analysis. The fractions obtained in the cultivation in a large scale were subjected to biological tests (leishmanicidal, antimalarial, antimicrobial and cytotoxic). The dichloromethane and ethyl acetate fractions of both fungi showed promising results in antitumor and leishmanicidal assays. Then, these fractions were subjected to chromatographic processes that allowed the isolation of compounds whose chemical structures were elucidated through the use of NMR techniques, mass spectrometry, UV, IR, α D, and X-ray diffraction. From cultures of *B. bassiana* were obtained compounds from the pyridone class: pyridovericin, pyridovericin-N-O-(4-O-methyl- β -D-glucopyranoside) and pyridovericin-15-deoxy, being the latter two novel compounds; and alloxazine class: 7,8-dimethylalloxazine (lumichrome) and 1-methyl-11-hydroxylumichrome, being this last one unprecedented. From *M. indicus* cultures were obtained compounds from two classes: azaphilone and chromene. In this thesis we report the derivatives eugenitin, 6-methoxyeugenin and 9-hydroxyeugenin, which have been isolated from a wide variety of plants and fungi. Azaphilones are a class of structurally diverse fungal metabolites, known pigments with pyran-quinone structure and contains a highly oxygenated bicyclic core and a chiral quaternary center. Then, we obtained two known azaphilones: austdiol and austdiol diacetate (product of acetylation), and three precedent azaphilones: austdiol dimer, austdiol dihydroisocoumarin and austdiol chromen. The three new azaphilones from *M. indicus* have an unusual pattern of connection between two aromatic polyketides, a methylene bridge. The isolation of these molecules reinforces the hypothesis that the biosynthesis occurs with the participation of one formaldehyde molecule. The purified compounds were submitted to biological assays. In the cytotoxic assay the azaphilones austdiol and austdiol diacetate, and the pyridone pyridovericin displayed activity against tumor cell lines, although at higher concentrations than the standard compounds used. Moreover, there was some degree of selectivity, since the assayed compounds were not toxic to human lymphocytes. Also in leishmanicidal assays, austdiol, austdiol diacetate and pyridovericin displayed activity, although at levels lower than leishmanicidal standards. Thereby, it can be considered that azaphilone and pyridone compounds are good leader compounds to search for cytotoxic and leishmanicidal agents, since these classes of compounds have biological dynamicity. Finally, the isolation and elucidation of new metabolites belonging to azaphilone and pyridone classes contribute to the enrichment of these important fungal metabolites and, likewise, this study demonstrates the importance of endophytic and entomopathogenic fungi in natural products chemistry.

Keywords: Alloxazines, azaphilones, *Beauveria bassiana*, chromenes, *Mycoleptodiscus indicus* and pyridones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais.	2
Figura 2. Metabólitos microbianos utilizados na clínica e seus respectivos micro-organismos produtores.	4
Figura 3. Metabólitos isolados de culturas de <i>Beauveria bassiana</i>	6
Figura 4. Metabólitos isolados de culturas de <i>Beauveria bassiana</i>	7
Figura 5. a) Colônia de crescimento de <i>M. indicus</i> b) Esporodóquio de <i>M. indicus</i>	8
Figura 6. Esquema de fracionamento da fração BbA60DCM.	25
Figura 7. (A) Cromatogramas da Fr6.2.1 e (B) da substância Fr6.2.1 (251 mm).	29
Figura 8. Esquema de fracionamento da fração BbA60EtOAc.	30
Figura 9. Cromatograma em CLAE de 1-metil-11-hidróxilumicromo (A) e 7,8-dimetiloxazina (B) (251 mm).	33
Figura 10. Esquema de fracionamento da fração BbLEtOAc.	34
Figura 11. (A) Cromatograma em CLAE das frações agrupadas; (B) piridovericina-N-O-(4-O-metil- β -D-glucopiranosídeo) (em 251 mm).	36
Figura 12. Esquema de fracionamento da fração MiHex (9835 mg).	38
Figura 13. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiDCM.	39
Figura 14. Esquema de fracionamento da fração MiDCM precipitado.	40
Figura 15. Esquema de fracionamento da fração MiDCM solúvel.	42
Figura 16. Solubilização em MeOH e centrifugação amostra MiEtOAc.	45
Figura 17. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc precipitado.	46
Figura 18. Esquema de fracionamento da fração MiEtOAc MeOH solúvel.	48
Figura 19. Aloxazinas e piridonas isoladas de cultivos de <i>B. bassiana</i>	52
Figura 20. Exemplos de piridonas produzidos planta (ricinina) e por fungos.	53
Figura 21. Exemplos de piridonas com atividades biológicas.	54
Figura 22. Estrutura de piridovericina isolada de <i>B. bassiana</i>	55
Figura 23. Experimentos de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY e HMBC de piridovericina.	56
Figura 24. Piridonas inéditas de <i>B. bassiana</i>	60
Figura 25. Derivados aloxazina isolados de cultivos de <i>B. bassiana</i>	63
Figura 26. Correlações de HMBC 1-metil-11-hidróxilumicromo.	64
Figura 27. Azafilonas e cromenos isolados de cultivos de <i>M. indicus</i>	64
Figura 28. Estrutura dos cromenos isolados a partir de <i>M. indicus</i>	65
Figura 29. Correlações do mapa de contornos HMBC de eugenitina	66
Figura 30. Correlações do mapa de contornos HMBC de 6-metóxieugenina.	67
Figura 31. Correlações do mapa de contornos HMBC de 9-hidróxieugenina.	68

Figura 32. Biogênese de cromenos.....	70
Figura 33. Estrutura das azafilonas: austidiol e austidiol diacetato.....	75
Figura 34. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol.....	76
Figura 35. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diacetato.....	77
Figura 36. Biogênese de austidiol.	80
Figura 37. Estrutura da azafilona dímero de austidiol.....	82
Figura 38. Representação ORTEP da estrutura do cristal de dímero de austidiol.	85
Figura 39. Estrutura da azafilona austidiol diidroisocumarina.....	86
Figura 40. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol diidroisocumarina.	89
Figura 41. Estrutura da azafilona austidiol cromeno.....	90
Figura 42. Correlações do mapa de contornos HMBC de austidiol cromeno.	93
Figura 43. Aspergilonas A e B isoladas de <i>Aspergillus</i> sp.....	94
Figura 44. Estruturas de xilocetal B e F isolados de <i>Xylaria</i> sp.....	95
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H - eugenitina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	125
Figura 46. Espectro de RMN ¹³ C - eugenitina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).	126
Figura 47. Mapa de contornos HMQC – eugenitina (DMSO- <i>d</i> ₆).	127
Figura 48. Mapa de contornos HMBC– eugenitina (DMSO- <i>d</i> ₆).....	128
Figura 49. Espectro de massas eugenitina.....	129
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H – 6-metóxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	130
Figura 51. Espectro de RMN ¹³ C – 6-metóxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).	131
Figura 52. Mapa de contornos HMQC – 6-metóxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆)	132
Figura 53. Mapa de contornos HMBC – 6-metóxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆).	133
Figura 54. Espectro de massas 6-metóxieugenina.....	134
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).	135
Figura 56. Espectro de RMN ¹³ C – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).	136
Figura 57. Mapa de contornos HMQC – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆).....	137
Figura 58. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆).....	138
Figura 59. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆).	139
Figura 60. Mapa de contornos HMBC – 9-hidróxieugenina (DMSO- <i>d</i> ₆).....	140
Figura 61. Espectro de massas 9-hidróxieugenina	141
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H – austidiol (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	142
Figura 63. Espectro de RMN ¹³ C – austidiol (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz).....	143
Figura 64. Mapa de contornos HMQC – austidiol (DMSO- <i>d</i> ₆).	144
Figura 65. Mapa de contornos HMBC – austidiol (DMSO- <i>d</i> ₆).....	145
Figura 66. Espectro de massas austidiol.....	146

Figura 67. Espectro de RMN ^1H – austidiol diacetato (CDCl_3 - 400 MHz).	147
Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diacetato (CDCl_3 - 400 MHz).	148
Figura 69. Mapa de contornos HMQC – austidiol diacetato (CDCl_3).	149
Figura 70. Mapa de contornos HMBC – austidiol diacetato (CDCl_3).	150
Figura 71. Espectro de masas austidiol diacetato.	151
Figura 72. Espectro de RMN ^1H – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).	152
Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz).	153
Figura 74. Espectro de RMN DEPT – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz).	154
Figura 75. Mapa de contornos HMQC – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$).	155
Figura 76. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$).	156
Figura 77. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$).	157
Figura 78. Mapa de contornos HMBC – dímero de austidiol ($\text{DMSO-}d_6$).	158
Figura 79. Espectro de masas dímero de austidiol.	159
Figura 80. Espectro de RMN ^1H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).	160
Figura 81. Espectro de RMN ^1H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).	161
Figura 82. Espectro de RMN ^1H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).	162
Figura 83. Espectro de RMN ^1H – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 400 MHz).	163
Figura 84. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD - 100 MHz).	164
Figura 85. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD , 400 MHz). ..	165
Figura 86. Mapa de contornos COSY – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD , 400 MHz). ..	166
Figura 87. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	167
Figura 88. Mapa de contornos HMQC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	168
Figura 89. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	169
Figura 90. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	170
Figura 91. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	171
Figura 92. Mapa de contornos HMBC – austidiol diidroisocumarina (CD_3OD).	172
Figura 93. Espectro de masas austidiol diidroisocumarina.	173
Figura 94. Espectro de RMN ^1H – austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$ - 400 MHz)	174
Figura 95. Espectro de RMN ^1H – austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$ - 400 MHz).	175
Figura 96. Espectro de RMN ^{13}C – austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$ - 400 MHz)	176
Figura 97. Espectro de RMN DEPT austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$ - 125 MHz).	177
Figura 98. Mapa de contornos HMQC – austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$).	178
Figura 99. Mapa de contornos HMBC – austidiol cromeno ($\text{DMSO-}d_6$).	179
Figura 100. Espectro de masas austidiol cromeno.	180
Figura 101. Espectro de RMN ^1H – piridovericina ($\text{DMSO-}d_6$ - 400 MHz).	181

Figura 102. Espectro de RMN ^{13}C – piridovericina (DMSO- d_6 - 100 MHz).....	182
Figura 103. Mapa de contornos HMQC – piridovericina (DMSO- d_6).....	183
Figura 104. Mapa de contornos HMBC – piridovericina (DMSO- d_6).....	184
Figura 105. Mapa de contornos COSY – piridovericina (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	185
Figura 106. Espectro de massas de piridovericina.	186
Figura 107. Espectro de RMN ^1H – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	187
Figura 108. Espectro de RMN ^1H – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	188
Figura 109. Espectro de RMN ^1H – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	189
Figura 110. Espectro de RMN ^1H – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	190
Figura 111. Espectro de RMN ^1H – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	191
Figura 112. RMN NOESY 1D – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).	192
Figura 113. RMN TOCSY – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 400 MHz).	193
Figura 114. RMN de ^{13}C – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 - 100 MHz).	194
Figura 115. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	195
Figura 116. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	196
Figura 117. Mapa de contornos COSY – piridovericina-Glc (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	197
Figura 118. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	198
Figura 119. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	199
Figura 120. Mapa de contornos HMQC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	200
Figura 121. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	201
Figura 122. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	202
Figura 123. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	203
Figura 124. Mapa de contornos HMBC – piridovericina-Glc (DMSO- d_6).....	204
Figura 125. Espectro de massas de piridovericina-Glc.	205
Figura 126. Espectro de RMN ^1H – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4 - 400 MHz).	206
Figura 127. Espectro de RMN ^1H – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4 - 400 MHz).	207
Figura 128. Espectro de RMN ^1H – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4 - 400 MHz).	208
Figura 129. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).	209
Figura 130. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).	210
Figura 131. Mapa de contornos HMQC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).	211
Figura 132. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).....	212
Figura 133. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).....	213
Figura 134. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d).....	214
Figura 135. Mapa de contornos HMBC – 15-desóxi-piridovericina (CD $_3$ OD- d_4).....	215
Figura 136. Espectro de massas de 15-desóxi-piridovericina	216

Figura 137. Espectro de RMN ^1H – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6 - 400 MHz).	217
Figura 138. Espectro de RMN ^{13}C – 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6 - 100 MHz).....	218
Figura 139. Espectro de RMN DEPT 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6 - 125 MHz).....	219
Figura 140. Mapa de contornos COSY - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	220
Figura 141. Mapa de contornos HMQC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6 - 400 MHz).....	221
Figura 142. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6).....	222
Figura 143. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6).....	223
Figura 144. Mapa de contornos HMBC - 1-metil-11-hidróxilumicromo (DMSO- d_6).....	224
Figura 145. Espectro de massas de 1-metil-11-hidróxilumicromo.	225
Figura 146. Espectro de RMN ^1H – 7,8-dimetilaloxazina (DMSO- d_6 - 400 MHz).	226
Figura 147. Espectro de RMN ^{13}C – 7,8-dimetilaloxazina (DMSO- d_6 - 100 MHz).	227
Figura 148. Mapa de contornos HMQC – 7,8-Dimetilaloxazina (DMSO- d_6).	228
Figura 149. Espectro de massas de 7,8-dimetilaloxazina.....	229

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das frações dos cultivos em escala ampliada.	17
Tabela 2. Cromatografia em coluna (CC) - BbA60DCM5 (182 mg).....	26
Tabela 3. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM5 (182 mg).....	26
Tabela 4. Cromatografia em coluna (CC) - BbADCM6 (182 mg).....	27
Tabela 5. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (562 mg).....	28
Tabela 6. Cromatografia em coluna (CC) – BbAEtOAc5 (462 mg).....	31
Tabela 7. Agrupamento das frações obtidas por CC – BbAEtOAc5 (462 mg).....	31
Tabela 8. Cromatografia em coluna (CC) - BbAEtOAc6 (239 mg).....	32
Tabela 9. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbA60DCM6 (239 mg).....	32
Tabela 10. Cromatografia em coluna (CC)- BbL21EtOAc5 (293 mg).	35
Tabela 11. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc5 (293 mg).....	35
Tabela 12. Cromatografia em coluna (CC) - BbL21EtOAc7 (200 mg).	36
Tabela 13. Agrupamento das frações obtidas por CC - BbL21EtOAc7 (200 mg).....	37
Tabela 14. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM ppt (3870 mg).....	40
Tabela 15. Cromatografia em coluna (CC) - fração MiDCM5 (461 mg).....	43
Tabela 16. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiDCM5 (461 mg).....	43
Tabela 17. Cromatografia em coluna (CC) - MiDCM6 (220 mg).....	44
Tabela 18. Agrupamento das frações obtidas por CC - MiDCM6 (220 mg).	44
Tabela 19. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc ppt (2420 mg).....	46
Tabela 20. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc6-7 (830 mg).	49
Tabela 21. Agrupamento das frações obtidas por CC –MiEtOAc6-7 (461 mg).	49
Tabela 22. Cromatografia em coluna (CC) - MiEtOAc8 (300 mg).....	50
Tabela 23. Agrupamento das frações obtidas por CC – MiEtOAc8 (300 mg).....	50
Tabela 24. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC de piridovericina.....	57
Tabela 25. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC de piridovericina-Glc e 15-desóxi-piridovericina.	61
Tabela 26. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC 7,8-dimetilaloxazina e 1-metil-11-hidróxilumicromo.	63
Tabela 27. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC dos cromenos isolados.....	69
Tabela 28. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC de austidiol e austidiol diacetato.....	79
Tabela 29. Dados espectroscópicos de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC de dímero de austidiol.	83
Tabela 30. Distâncias de ligação (Å) e ângulos (deg) para o austidiol e dímero de austidiol.	84

Tabela 31. Dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de austidiol diidroisocumarina.	88
Tabela 32. Dados espectroscópicos de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de austidiol cromeno.	92
Tabela 33. Ensaio de atividade citotóxica <i>in vitro</i>	95
Tabela 34. Ensaio de atividade citotóxica <i>in vitro</i>	97
Tabela 35. Ensaio cinético de inibição de GAPDH – <i>T. cruzi</i>	99
Tabela 36. Ensaio cinético de inibição de LtAPRT – <i>L. tarentolae</i>	100
Tabela 37. Ensaio leishmanicida para determinação de DL ₅₀ – <i>L. major</i>	100
Tabela 38. Ensaio cinético de inibição de (pLDH) – <i>P. falciparum</i>	101
Tabela 39. Ensaio antileishmania - <i>Leishmania donovani</i>	102
Tabela 40. Ensaio antileishmania secundário CI ₅₀ e CI ₉₀ – <i>L. donovani</i>	103
Tabela 41. Ensaio antileishmania secundário CI ₅₀ e CI ₉₀ - <i>Leishmania donovani</i>	103
Tabela 42. Ensaio de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica.	105
Tabela 43. Ensaio secundário de atividade antimicrobiana – antibacteriana e antifúngica...	107
Tabela 44. Ensaio antimicrobianos com substâncias controle.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APRT	Adenina fosforribosil transferase
ATCC	American Type Culture Collection
BuOH	Butanol
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
CBM	Concentrações bactericidas mínimas
CFM	Concentrações fungicidas mínimas
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI-TOF	Electron Spray Ionization – Time of Flight
EtOAc	Acetato de etila
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Hex	Hexano
IV	Infra-vermelho
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
LDH	Lactato desidrogenase parasítica
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazo-2-il)-2,5 difeniltetrazólio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
<i>s</i>	Singleto
<i>d</i>	Dubleto

<i>dd</i>	Duplo dupleteo
<i>t</i>	Tripleteo
<i>q</i>	Quadrupleteo
<i>J</i>	Constante de acoplamento (Hz)
UV	Ultra-violeta
$[\alpha_D]$	Rotação óptica
δ_C	Deslocamento químico de carbono (ppm)
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio (ppm)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Produtos Naturais	13
1.2 Micro-organismos	15
1.3 <i>Beauveria bassiana</i>	17
1.4 <i>Mycoleptodiscus indicus</i>	19
2. OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
3. EXPERIMENTAL	Erro! Indicador não definido.
3.1 Micro-organismos: identificação e manutenção de estoque	Erro! Indicador não definido.
3.2 Produção dos metabólitos em meio fermentativo líquido	Erro! Indicador não definido.
3.3 Produção de metabólitos em meio fermentativo sólido	Erro! Indicador não definido.
3.4 Obtenção dos extratos e frações	Erro! Indicador não definido.
3.5 Ampliação de escala	Erro! Indicador não definido.
3.6 Análise cromatográfica.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 Extratos e frações – escala ampliada	Erro! Indicador não definido.
3.8 Ensaios Biológicos – NCNPR – University of Mississippi	Erro! Indicador não definido.
3.9 Ensaios Biológicos – Grupos de pesquisa do Brasil	Erro! Indicador não definido.
3.10 Procedimentos gerais de isolamento.....	Erro! Indicador não definido.
3.11 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – <i>Beauveria bassiana</i>	Erro! Indicador não definido.
3.12 Fracionamento das frações obtidas em escala ampliada – <i>Mycoleptodiscus indicus</i>	Erro! Indicador não definido.
3.13 Análise Orgânica.....	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
4.1 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – <i>Beauveria bassiana</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas – <i>Mycoleptodiscus indicus</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3 Ensaios Biológicos de Frações e Substâncias Purificadas.....	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS	22

ANEXO Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

O uso de produtos naturais como agentes terapêuticos na medicina moderna tem declinado bruscamente nas últimas décadas, principalmente do século passado. No entanto, pesquisas por moléculas naturais bioativas (animais, micro-organismos e plantas) ainda desempenham um papel imprescindível na prospecção de novos agentes terapêuticos. Com o emprego de técnicas modernas, instrumentação e automação no isolamento e elucidação estrutural, a humanidade tem em mãos um enorme e diversificado banco de produtos naturais. Em paralelo, a biologia tem contribuído com enorme progresso para a expansão das fronteiras do conhecimento. Uma interface destas duas áreas do conhecimento constitui uma valiosa mola propulsora na pesquisa dos compostos elaborados pela natureza (Dev, 2010).

A importância dos produtos naturais tem sido amplamente discutida em diversas revisões. O valor dos produtos naturais pode ser mensurado usando três critérios: (1) o nível de introdução de novas entidades químicas de ampla diversidade estrutural, incluindo aquelas que servem como protótipo para compostos semissintéticos e sintéticos, (2) o número de doenças tratadas ou prevenidas por estas substâncias, e (3) sua frequência de uso para o tratamento de doenças (Chin *et al.*, 2006)

Uma análise da origem de medicamentos desenvolvida entre 1981 e 2002 mostrou que os produtos naturais ou medicamentos derivados de produtos naturais abrangeram 28% de todas as novas entidades químicas (NEQ) lançadas no mercado. Em adição, 24% destas novas entidades químicas eram compostos sintéticos ou imitações de produtos naturais, baseados no estudo de grupos farmacofóricos relacionados aos produtos naturais. Esta porcentagem combinada (52% de todos os NEQs) sugere que os produtos naturais são importantes fontes para novos fármacos e também são excelentes compostos protótipos, apropriados para processos de modelagem molecular durante o desenvolvimento de medicamentos. A vasta proporção de produtos naturais na descoberta de fármacos tem surgido de diversas estruturas e intrincados esqueletos carbônicos. Metabólitos secundários de fontes naturais são elaborados dentro de sistemas vivos e frequentemente concebidos como sendo mais “fármaco-semelhante” e tendo maior efeito biológico quando comparado a moléculas totalmente sintéticas, o que faz deles bons candidatos para o desenvolvimento de outros fármacos (Chin *et al.*, 2006).

Uma avaliação minuciosa das indicações médicas observando as origens dos compostos utilizados tem demonstrado que os produtos naturais e fármacos relacionados são usados para tratar 87% de todas as categorias de doenças humanas (48/55), incluindo antimicrobianos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitários, agentes imunossupressores, entre outros. Não havia relatos sobre produtos naturais e fármacos relacionados para outras sete categorias (anestésicos, antiangina, anti-histamínicos, ansiolíticos, queladores e antídotos, diuréticos e hipnóticos) de 1981 a 2002. No caso de agentes antimicrobianos, produtos naturais têm dado grande contribuição no direcionamento de tratamentos ou como base para processos de modificação via síntese. Dos 90 fármacos deste tipo que se tornaram comercialmente disponíveis nos Estados Unidos ou foram aprovadas no mundo entre 1981 e 2002, cerca de 80% têm origem a partir de produtos naturais (Chin *et al.*, 2006).

Newman e Cragg (2007) analisaram a origem de fármacos desenvolvidos e aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 e 2006 e concluíram que 63% das pequenas moléculas consideradas como novas entidades químicas apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos, 6% são totalmente originários de produtos naturais, 28% são derivados semissintéticos e 29% são derivados miméticos ou de síntese total, porém foram baseados nos grupos farmacofóricos de produtos naturais (Newman e Cragg, 2007).

Recentemente, Ganesan (2008) reavaliou os dados publicados por Newman e Cragg em 2007, aplicando filtros para analisar de fato as contribuições inovadoras dos produtos naturais na terapêutica após 1970. Desta análise resultaram 24 fármacos (produtos naturais ou derivados semissintéticos), dos quais 54% (n= 13) foram obtidos de actinobactérias de solo, 21% de plantas, 17% de fungos e 8% de bactérias. Estes dados demonstram o grande potencial dos micro-organismos como fonte de obtenção de novos produtos naturais com aplicação farmacêutica (**Figura 1**).

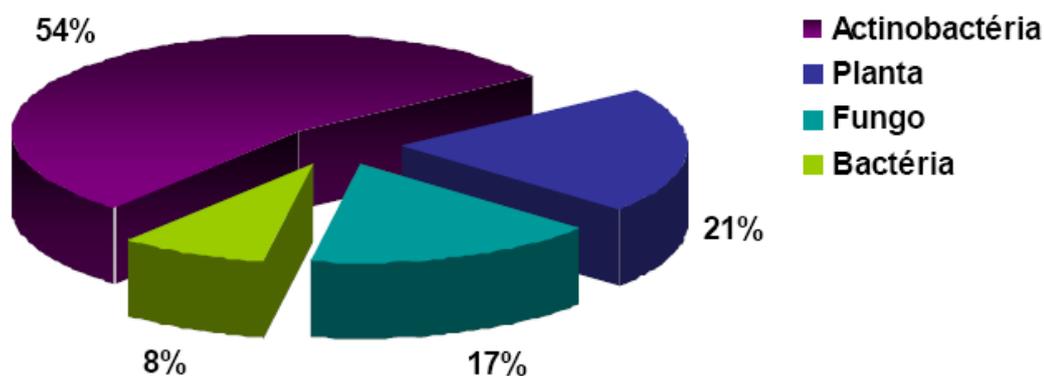


Figura 1. Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais.

A frequência do uso de produtos naturais no tratamento e/ou prevenção de doenças pode ser mensurado pelo número e/ou valor econômico das prescrições, a partir das quais a amplitude de preferência e/ou efetividade dos fármacos pode ser estimada indiretamente. De acordo com um estudo de Grifo e colaboradores (1997), 84 de um representativo grupo de 150 fármacos prescritos nos Estados Unidos caíram dentro da categoria de produtos naturais ou a esses relacionados. Elas foram prescritas predominantemente como: antialérgicos, agentes pulmonares/respiratórios, analgésicos, fármacos cardiovasculares e para doenças infecciosas. As vendas de duas categorias de agentes quimioterápicos derivados de plantas foram responsáveis por aproximadamente um terço do total das vendas mundiais de fármacos anticancer. Algo em torno de U\$ 3 bilhões em 2002; isto é, os taxanos, paclitaxel e docetaxel, bem como os derivados de camptotecina, irinotecan e topotecan (Chin *et al.*, 2006).

1.2 Micro-organismos

Até o desenvolvimento da penicilina no início dos anos 40, muitos dos fármacos derivados de produtos naturais foram obtidos de plantas. O sucesso da penicilina no tratamento de infecções levou a uma expansão na área de descoberta de fármacos a partir de micro-organismos. Micro-organismos terrestres são abundantes fontes de substâncias bioativas com diversidade estrutural, e têm provido ampla contribuição para a descoberta de agentes antimicrobianos incluindo penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina e policetídeos. Aplicação terapêutica de metabólitos de micro-organismos tem expandido para agentes imunossupressores (ciclosporinas e ripamicina), agentes redutores de colesterol

(lovastatina e mevastatina), agentes antihelmínticos (ivermectina), um agente antidiabético (acarbose) e agentes anticancer (pentostatina, peplomomicina e epirrubicina) (Chin *et al.*, 2006).

Micro-organismos produzem alguns dos mais importantes medicamentos já desenvolvidos. Eles são fonte de tratamento para infecções fúngicas e bacterianas (ex., penicilina, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina, vancomicina, anfotericina), câncer (ex., daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina e bleomicina), imunossupressores (ex., ciclosporina, FK-506, ripamicina) e redutores de colesterol (ex., estatinas como lovastatina e mevastatina) (**Figura 2**). Os produtos naturais microbianos são notáveis não somente por seu potencial terapêutico, mas também pelo fato deles frequentemente possuírem propriedades farmacocinéticas desejáveis, as quais são requeridas para o desenvolvimento clínico (Farnet, 2005).

Fermentação microbiana é um método para produção comercial de certos produtos que são gerados em quantidades substanciais (Weiss e Edwards, 1980; Strhol, 1997; Leeper, 2000; Liese *et al.*, 2000; Schreiber, 2000). O mercado mundial de estatinas gira em torno de 15 bilhões de dólares. O total do mercado farmacêutico excede os 400 bilhões de dólares e continua a crescer mais rápido do que a média da economia mundial. Neste âmbito a biotecnologia está diretamente envolvida nos processos de produção de muitos destes fármacos (Gavrilescu e Chisti, 2005).

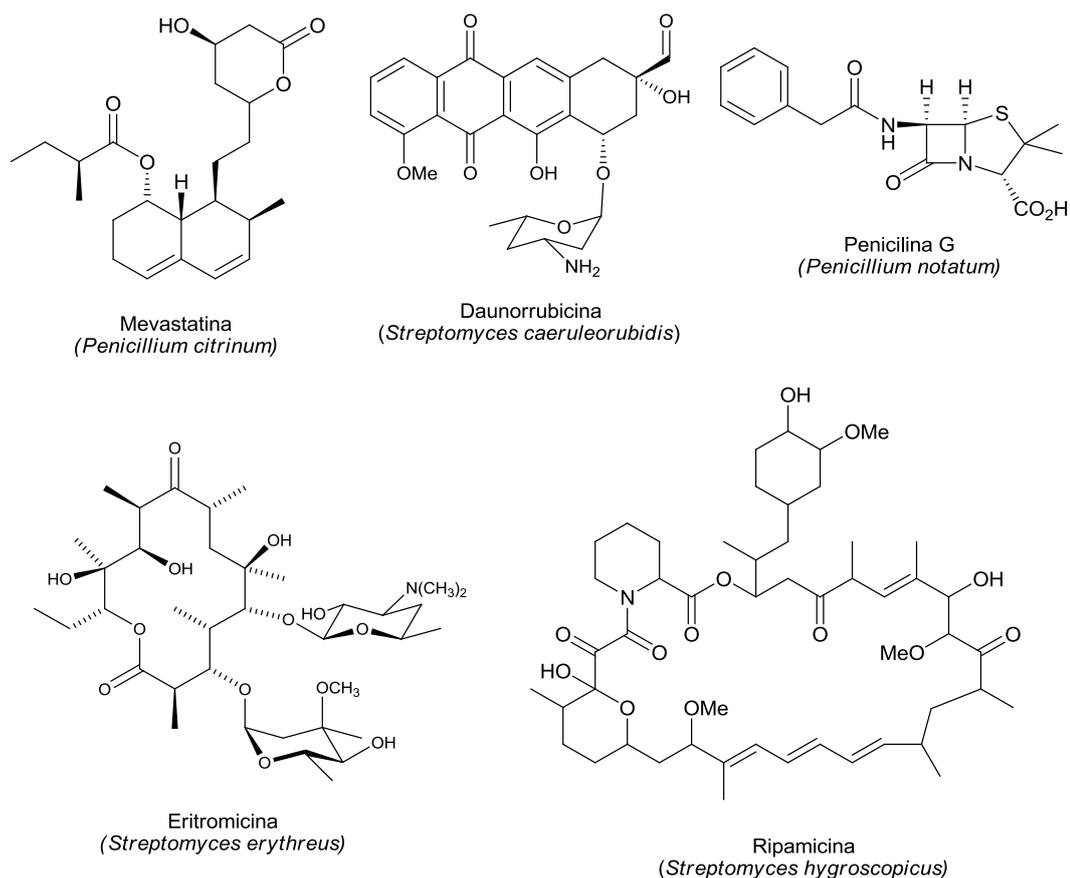


Figura 2. Metabólitos microbianos utilizados na clínica e seus respectivos micro-organismos produtores.

A introdução de antibióticos sulfonamidas nos anos 30 e da penicilina nos anos 40 revolucionou a prática médica pelo decréscimo dramático das taxas de mortalidade associadas a infecções bacterianas. Estas descobertas conduziram as pesquisas para novas classes de fármacos antimicrobianos conhecidos atualmente, sendo que muitos foram derivados de produtos naturais. Dado este sucesso, é surpreendente notar que apenas três novas classes de antimicrobianos, o antibiótico tópico mupirocina em 1985, a oxazolidinona linezolida em 2000 e o lipoptetídeo daptomicina em 2003, tenham entrado no mercado desde 1970. Entre 1986 e 2006 houve um declínio de 56% no número de antibióticos aprovados anualmente pelo Food and Drug Administration (FDA) e ao longo da década compreendida entre 1996 e 2006, apenas 22 novos fármacos antimicrobianos foram lançados. Destes 12 foram derivados de produtos naturais pertencentes a cinco diferentes classes (β -lactama, estreptogramina, macrolídeos, tetraciclina e daptomicinas), enquanto os 10 fármacos sintéticos lançados pertencem a apenas duas classes de antimicrobianos, sendo que nove pertencem a classes das quinolonas (Butler, 2006).

Os micro-organismos endofíticos são relativamente pouco estudados e considerados como fonte alternativa de grande potencial de produtos naturais, contribuindo na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas das mais variadas classes químicas com ação antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (Wiyarutta *et al.*, 2004; Firáková *et al.*, 2007; Gallo *et al.*, 2008; Gallo *et al.*, 2009).

A palavra endofítico é originária do grego (*éndon* + *phytón*), significando “dentro da planta”. O termo abrange principalmente bactérias e fungos que convivem de forma simbiótica com a planta hospedeira (Tan e Zou, 2001; Owen e Hundley, 2004; Schultz e Boyle, 2005; Firáková *et al.*, 2007). A comunidade endofítica, ao contrário dos micro-organismos patogênicos, não causa fitopatogênias aparentes a seus hospedeiros, podendo ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (Bacon e White, 2000; Schultz e Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006). Os endófitos, com exceção dos transmitidos pelas sementes (transmissão vertical) penetram primariamente através da zona radicular, embora micro-organismos do ar possam utilizar aberturas naturais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (transmissão horizontal). Os micro-organismos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular, alojando-se intra e/ou intercelularmente (Bacon e White, 2000; Zinniel *et al.*, 2002; Saikkonen *et al.*, 2004; Marinho *et al.*, 2005).

1.3 *Beauveria bassiana*

Fungos patogênicos a insetos são um grupo de micro-organismos ecologicamente especializados e parecem ser uma interessante fonte de compostos biologicamente ativos como inseticidas (Roberts, 1981) e imunossupressores (Fujita *et al.*, 1994; Iijima *et al.*, 1992), pois todas as ordens de insetos são suscetíveis a infecções por fungos (Takahashi *et al.*, 1998).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é uma conhecida estratégia comercial para o controle biológico de importantes pragas da agricultura e de insetos vetores de doenças animais e humanas (Fan *et al.*, 2011). Além do interesse como agente biológico para o controle de pragas, é conhecido que algumas linhagens de *B. bassiana* podem catalisar reações de hidroxilação, redução e oxidação (Olivo *et al.*, 2003; Osorio-Lozada *et al.*, 2008; Zhan e Gunatilaka, 2008). Além de ser usado como agente microbiano para controle de pragas (insetos) por todo o mundo, *B. bassiana* tem provido praticamente o único controle microbiano contra gafanhotos, os quais são acometidos por poucas doenças bacterianas ou

virais conhecidas (Mason e Erlandson, 1994; Lomer *et al.*, 2001; Quesada-Moraga, 2002, *apud* Quesada-Moraga e Vey, 2004).

Fungos entomopatogênicos secretam ampla gama de metabólitos tóxicos em meios de cultura artificiais e, em poucos casos, *in vivo* (Mazet *et al.*, 1994; Vey, 1998; Vey *et al.*, 2001). Muitas das toxinas de fungos descritas são metabólitos secundários de baixo peso molecular (**Figura 3**), sobretudo peptídeos cíclicos, apresentando propriedades antibióticas ou inseticidas (Strasser *et al.*, 2000; Vey *et al.*, 2001, *apud* Quesada-Moraga e Vey, 2004).

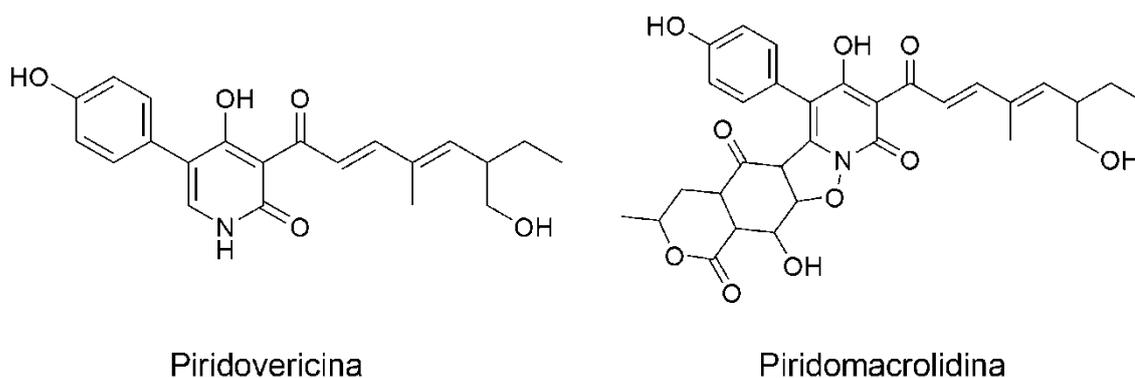


Figura 3. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana*.

Beauvericina e dois ciclodepsipeptídeos análogos, beauvericina A e beauvericina B, contendo ácido 2-hidróxi-3-metilfenilpentanóico como um de seus resíduos constituintes foram isolados como os principais componentes tóxicos para insetos a partir de extratos do fungo *Beauveria bassiana* (**Figura 4**). A toxina ciclodepsipeptídeo (beauvericina) é conhecida por ser produzida por diversos fungos, incluindo *Beauveria bassiana* (hifomiceto), a qual apresenta atividade frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Gupta *et al.*, 1995).

Um inibidor de agregação plaquetária, bassiatina, foi obtido de caldos de cultivo de *Beauveria bassiana*, o qual foi isolado de amostra de solo coletada na província de Yunna, China. A estrutura da bassiatina foi determinada como (3*S*,6*R*)-4-metil-6-(1-metiletil)-3-fenilmetil-1,4-peridroxazina-2,5-diona (**Figura 4**). A substância inibiu a agregação de plaquetas de coelhos ADP-induzida com CI_{50} de 1.9×10^{-4} M (Kagazimono *et al.*, 1995).

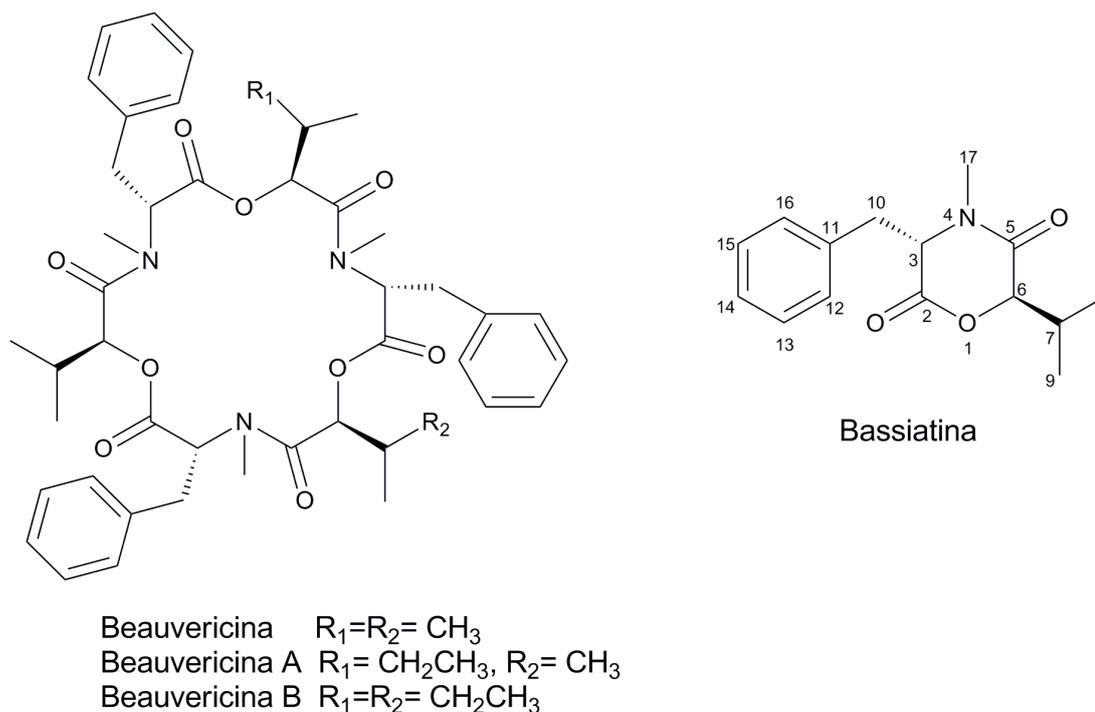


Figura 4. Metabólitos isolados de culturas de *Beauveria bassiana*.

1.4 *Mycoleptodiscus indicus*

Mycoleptodiscus indicus é um fungo tropical ou subtropical de difícil cultivo e identificação, trata-se de um agente etiológico de feohifomicose associado com plantas que em condições ideais causa infecção subcutânea em pacientes imunocomprometidos. *M. indicus* é uma espécie que ocorre em folhas de plantas hospedeiras, principalmente, mas não exclusivamente em monocotiledôneas (Sutton, 1973). O fungo produz esporodóquios e não escleródios em meio de cultura ou em substrato natural, assim como fazem outras espécies de *Mycoleptodiscus*, *M. terrestris* e *M. sphericus* (Ellis, 1976; Ostazeski, 1967; Sutton, 1973). Esporodóquios de *M. indicus* estão associados com amplas lesões em folhas de *Zamia* spp (Cycadófito americana) e em outras plantas monocotiledôneas. *Zamia* é um gênero de cerca de 40 espécies de pequenas plantas classificadas na família *Zamiaceae* da classe *Cycadophyta* das gimnospermas. Estas pequenas plantas são encontradas ao longo da costa da Carolina do Sul, Flórida, México, e ao norte e noroeste da América do Sul. Também está presente na Índia, Sudeste da Ásia e partes da África. *M. indicus* tem sido isolado em culturas a partir de lesões em folhas de *Zamia* ssp. As culturas em extrato malte desenvolveram esporodóquios e conídios após diversas semanas de tratamento com UV, mas a produção de esporodóquios e conídios não foram consistentes (Padhye *et al.*, 1995)

No Canadá foi reportado um caso de artrite séptica causada pelo fungo. A infecção fúngica foi contraída durante as férias na Costa Rica, provavelmente através da inoculação direta na pele lesionada. O fungo foi isolado do fluido sinovial e a identificação confirmada pela sequência de DNA. Houve apenas um caso prévio de artrite séptica de joelho (homem de 72 anos na Carolina do Norte) e uma infecção de pele reportada para este fungo. Os casos envolveram pacientes imunossuprimidos. Ambos os pacientes com artrite séptica precisaram de cirurgia na articulação e lavagem para remoção do fungo. No futuro, é muito provável que o número de pacientes infectados com *M. indicus* aumente devido ao maior contato com este patógeno. Presume-se que estas infecções sejam adquiridas pela implantação traumática do fungo (Dewar e Sigler, 2010).

A identificação de *M. indicus* é difícil, sendo que a característica fenotípica mais importante inclui a presença de apressórios (**Figura 5**), fiálides escuras, células conidiogênicas com proeminências e agregadas dentro da massa esporodóquia, hialina e conídios curvados.

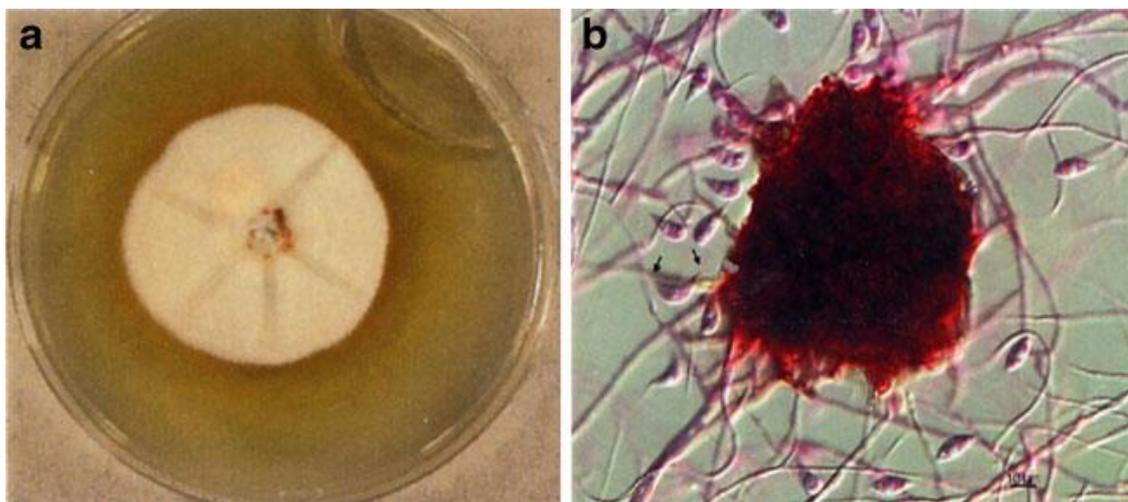


Figura 5. a) Colônia de crescimento de *M. indicus* **b)** Esporodóquio de *M. indicus*.

A cepa de *M. indicus* utilizada nesta tese foi isolada como um fungo endofítico de folhas de *Borreria verticillata*, uma erva anual ou perene, subarbusto ramoso com hastes subangulosas, com 15-60 cm de altura, flores pequenas branco-esverdeadas e dispostas em densas inflorescências capituliformes, folhas simples, lineares ou lanceoladas de quase 1 a 3 cm de comprimento dispostas em verticilos e frutos aquênios oblongos de cor marromesverdeada (Corrêa, 1978; Braga, 2001; Porto *et al.*, 2004). Esta planta ocorre em todo território brasileiro, principalmente na orla marítima, conhecida popularmente como

vassourinha-de-botão nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e, em outras regiões, por outros nomes populares como falsa-poaia, poaia-preta, erva-botão, perpétua-do-mato, cordãozinho-de-frade e erva-de-largato (Lorenzi, 1991; Vieira *et al.*, 1999; Braga, 2001). *B. verticillata* apresenta ação diurética, abortiva e vomitiva e é utilizada no tratamento de diversas enfermidades e infecções como: leucorréias; blenorreias; diarreias; esquistossomose e doenças de pele (Baldé *et al.*, 1991; Burkill, 2000; Lorenzi e Matos, 2002; Sá Peixoto Neto *et al.*, 2002; Gazzaneo *et al.*, 2005).

2. CONCLUSÃO

O estudo de metabólitos secundários do fungo entomopatogênico *B. bassiana* permitiu o isolamento e elucidação de produtos naturais de representativas classes de metabólitos fúngicos: **aloxazinas** e **piridonas**. Foram obtidos os derivados aloxazínicos 7,8-dimetilaloxazina e 1-metil-7-hidroximetilumicromo, sendo este inédito. Além dos derivados aloxazínicos, foram obtidos três metabólitos piridônicos: piridovericina, piridovericina-N-O-(4-O-metil- β -D-glucopiranosídeo) e 15-desóxi-piridovericina, os dois últimos inéditos. Cabe destacar que o metabólito piridovericina-Glc apresenta um padrão incomum de glicosilação para produtos piridônicos, a glicosilação do grupo N-OH.

Por sua vez o estudo de metabólitos secundários do fungo endofítico *M. indicus* permitiu o isolamento e elucidação de produtos naturais de relevantes classes de metabólitos fúngicos: **azafilonas** e **cromenos**. Cabe destacar a obtenção de três azafilonas inéditas: dímero de austidiol, austidiol diidroisocumarina e austidiol cromeno. Estas azafilonas apresentam o mesmo padrão de conexão entre duas cadeias policetídeos aromáticas, uma ponte metilênica. A ocorrência de ponte metilênica entre produtos naturais é bastante incomum e é hipotetizado que a conexão entre as duas cadeias policetídicadas ocorra através de um sistema de biossíntese na natureza que use formaldeído. Foram obtidos também o austidiol e seu derivado acetilado. Além dos produtos inéditos e das azafilonas conhecidas foram isolados os derivados cromênicos: eugenitina, 6-metóxieugenina e 9-hidroxieugenina, os quais possuem ampla distribuição na natureza

Do ponto de vista biológico as azafilonas: austidiol e austidiol diacetato, bem como a piridona piridovericina, mostraram-se ativas nos ensaios citotóxicos (HCT-8, HL-60, MDA-MB435, PC3 e SF-95) e leishmanicidas (*L. donovani* e *L. major*), embora em níveis inferiores aos padrões utilizados. Cabe destacar que nos ensaios citotóxicos as substâncias foram ativas

contra as linhagens tumorais e inativas contra linfócitos humanos, considerando as maiores concentrações avaliadas. Este dado é relevante, pois há um grau de seletividade por células tumorais, o que é bastante desejável.

Por fim, o isolamento e elucidação de novos metabólitos azafilônicos e piridônicos contribuem para o enriquecimento destas importantes classes de metabólitos fúngicos, ao mesmo tempo, evidenciam a importância dos fungos endofíticos e entomopatogênicos na química de produtos naturais.

3. REFERÊNCIAS

Alfatafta, A.A., Gloer, J.B., Scott, J.A., Malloch, D. Apiosporamida: a new antifungal agent from the coprophilous fungus *Apzospora montagnez*. **Journal of Natural Products**. v.57, p.1696–1702. 1994.

Anke, H., Kemmer, T., Hofle, G. Deflectins, new antimicrobial azaphilones from *Aspergillus deflectus*. **Journal of Antibiotics**. v.34, p.923–928. 1981.

Aono, T.; Mizuno, K. European Patent, 283761, 1998.

Agusta, A.; Ohashi, K.; Shibuya, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.54, p.579-582. 2006.

Arai, N., Shiomi, K., Tomoda, H., Tabata, N., Yang, D.J., Masuma, R., Kawakubo, T., Omura, S. Isochromophilones III-VI, inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.696–702. 2005.

Ariyasena, J.; Baek, S.-H.; Perry, N. B.; Weavers, R. T. Ether-linked biflavonoids from *Quintinia acutifolia*. **Journal of Natural Products**. v.67, p.693-696. 2004.

Ando, K., Suzuki, S., Saehi, T., Tamura, T., Arima, K. Antiviral and antitumor antibiotics. XIII. Funiculosin, a new antibiotic. 1. Isolation, biological and chemical properties. **Journal of Antibiotics** v.22, p.189–194. 1969.

Arai, N.; Shiomi, K.; Tomoda, H.; Tabata, N.; Yang, J.; Masuma, R.; Kawakubo, T.; Omura, S. Isochromophilones III ~VI, inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.696-702, 1995.

Atlas, R. M. Handbook of microbiological media. Boca Raton: **CRC Press**, p.280. 1995.

Bacon, C.W.; White Jr., J.F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, v. 1 p. 487, 2000.

Baldé, A.M., Pieters, L.A., Gergely, A., Wray, V., Clayes, M., Vlietinck, A. J. Spermacoceine, a bis-indole alkaloid from *Borreria verticillata*. **Phytochemistry**. v.30, p.997-1000, 1991.

Ball, G. F. M., 2006. Vitamins in Foods: Analyzis, Bioavailability, and Stability. In: Press, C. (Ed.), Boca Raton, FL, pp. 167-168.

Braga, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará - 5^a Ed. - Fund. Guimarães Duque/Fund. Vingt-Un Rosado - Mossoró (RN) - Brasil – 496 p, 2001.

Burkill, H.M. The useful plants of West Tropical Africa. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. v 5, 686 p, 2000.

Buechi, G., White, J.D., Wogan, G.N. The structures of mitorubrin and mitorubrinol. **Journal of American Chemical Society**. v.87, p.3484–3489. 1965.

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

Cannell, R. J. P. (ed.). Scale-up of natural products isolation. In: **Natural Products Isolation**. New Jersey, Humana Press. cap. 14, p.409–424. 1998.

Casinovi, C.G., Grandolini, G., Mercantini, R., Oddo, N., Olivieri, R., Tonolo, A. A new antibiotic produced by a strain of *Aspergillus flaviceps*. **Tetrahedron Letters**. v.9, 3175–3178. 1968.

Cheng, Y., Schneider, B., Riese, U., Schubert, B., Li, Z., Hamburger, M. (+)-*N*-Deoxymilitarinone A, a Neuritogenic Pyridone Alkaloid from the Insect Pathogenic Fungus *Paecilomyces farinosus* **Journal of Natural Products**. v.69, p. 436–438. 2006.

Chin, Y.W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghom, D. A. Drug Discovery From Natural Sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**. v. 8, p. 239-253. 2006.

Colombo, L., Gennari, C., Ricca, G.S., SCOLASTICO, C. Detection of one symmetrical precursor during the biosynthesis of the fungal metabolite austidiol using [1,2- C₂]acetate and

[Me-]methionine. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**. 575 – 576. 1981.

Corrêa, P.M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. v 6, 777 p, 1978.

Dev, S. Impact of natural products on modern drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 191-198. 2010.

Dewar, C. L., Sigler, L. Fungal arthritis of the knee caused by *Mycocleptodiscus indicus*. **Clinical Rheumatology**. v.29, p.1061–1065, 2010.

Dickinson, C., Hanson, J. R, Hitchcock, P.B., Claydon, N. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Chemical Society Perkin Trans. 1**, p.1885–1887. 1989.

Dong, J., Zhou, Y., Li, R., Zhou, W., Li, L., Zhu, Y., Huang, R., Zhang, K. New nematicidal azaphilones from the aquatic fungus *Pseudohalonestria adversaria* YMF1.01019. **FEMS Microbiology Letters**. v.264, p.65–69. 2006.

Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., Chatterjee, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**. v.54, p.119-122. 2005.

Eda, S., Nishioka, K., Ogawa, Y., Hosaka, K. Japanese Patent, 02169586, 1990.

Ellis, M.B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, England.v.1, p.447–448. 1976.

Fan, Y., Zhang, S., Kruer, N., Keyhani, N.O. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.106, 274-279. 2011.

Farnet, C. M., Zazapoulos, E. Improving drug discovery from Microorganisms. In: Zhang L, Demain AL (eds.). **Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine**. Humana Press, Totowa, p. 95-106. 2005.

Farrugia, L.J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**. v.32, p.837-838. 1999.

Firáková, S., Šturdíková, M., Múčková, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**. v. 62, p.251-257. 2007.

Fox, C.H., Huneck, S. The formation of roccellic acid, eugenitol, eugenetin, and rupicolon by the mycobiont *Lecanora rupicola*. **Phytochemistry**. v.8, p.1301-1304. 1969.

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M., Gilman, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, p.362-366. 1998.

Frisch, J *et al.*, *Gaussian 03* (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2003).

Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Samson, R.A., Stolk, A.C. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.57, p.179–218. 1990.

Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y., Okumoto, T. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. **Journal of Antibiotics**. v.47, p.208-215. 1994.

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. Bioprospecting studies of extracts and compounds from endophytic fungi isolated in *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) for cytotoxic activity. **Journal of Basic Microbiology**. v.49, p.142-151, 2009.

Gallo, M.B.C., Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T. Natural Products from Endophytic Fungi. *In*: Ratul Saikai, Rajib L. Bezbaruah and Tarun Ch. Bora (Eds) **Microbial Biotechnology**. New Delhi, India, New India Publishing Agency. v.1, p.139-168, 2008.

Ganesan, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.12, p. 306-31. 2008.

Gavrilescu, M., Chisti, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**. v.23, p.471–499. 2005.

Gazzaneo, L.R.S., Lucena, R.F.P., Albuquerque, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v1, p.1-9. 2005.

Gill M, Steglich W. Pigments of fungi (Macromycetes). **Prog Chem. Org Nat Prod** v.51, p.1–317. 1987.

Gill, M. Pigments of fungi (Macromycetes). **Natural Products Reports**. v.13, p.513–528. 1996.

Gill, M. Pigments of fungi (Macromycetes). **Natural Products Reports**. v.16, p.301–317. 1999.

Grifo, F., Newman, D., Farifiel, A., Bhattacharya, B., Grupenhoff, J. The origins of prescription drugs. In: Grifo, F., Rosenthal, J., eds. **Biodiversity and Human Health**. Washington, DC: Island Press. 131–163. 1997.

Gupta, S., Montillor, C., Wang, Y. Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Natural Products**. v.58, p.733-738. 1995.

Hajjaj, H., Kläbe, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J., Francois, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Applied Environment Microbiology**. v.65, p.311–314. 1999.

Halo, L.M., Heneghan, M.N., Yakasai, A.A., Song, Z., Williams, K., Bailey, A.M., Cox, R.J., Lazarus, C.M., Simpson, T.J. Late stage oxidations during the biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of American Chemical Society**. v.130, p.17988-17996. 2008.

Hayakawa, S., Minato, H., Katagiri, K. The ilicicolins, antibiotics from *Cylindrocladium ilicicola*. **Journal of Antibiotics**. v.24, p.653-654. 1971.

Hutchinson, C.R. Microbial polyketide synthases: more and more prolific. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 96, p.3336–3338. 1999.

Iijima, M., Masuda, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Ishizuka, M., Takeuchi, T., Iitake, Y. Metacytofilin, a novel immunomodulator produced by *Metarhizium* sp. TA2759. **Journal of Antibiotics**. v.45, p.1553-1556. 1992.

Irlapati, N.P., Baldwin, J.E., Adlington, R.M., Pritchard, G.J. An unusual oxidative cyclization: studies towards the biomimetic synthesis of pyridomacrolidin. **Organic Letters**. v.5, p.2351-2354. 2003.

Isaka, M., Palasarn, S., Kocharin, K., Saenboonrueng, J. A Cytotoxic xanthone dimer from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. BCC 8401 **Journal of Natural Products**. v.68, p.945-946, 2005.

Ito, H., Kasajima, N., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T. Dimeric flavonol glycoside and galloylated C-glucosylchromones from *Kunzeaambigua*. **Journal of Natural Products**. v.67, p.411-415, 2004.

Jessen, H.J., Gademann, K.. 4-Hydroxy-2-pyridone alkaloids: structures and synthetic approaches. **Natural Products Reports**. v.27, p.1168-1185. 2010.

Jongrungruangchok S, Kittakoo P, Yongsmith B, Bavovada R, Tanasupawat S, Lartpornmatulee N, Thebtaranonth Y. Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. **Phytochemistry**. v.65, p.2569–2575. 2004.

Kagazimono, T., Nishino, E., Matsumoto, K., Kawashima, A., Kishimoto, M., Sakai, N., He, B., Chenf, Z., Adachi, T., Morimoto, S., Hanada, K. Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.1407-1412, 1995.

Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Yodbuddee, D., Phonkerd, N. New Antimalarial bis-dehydroaporphine alkaloids from *Polyalthia debilis*. **Journal of Natural Products** v.66, p.616-619. 2003.

Kogel, K.H., Franken, P., Hückelhoven, R. Endophytes or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, p.358-363, 2006.

Kurono, M., Nakanishi, K., Shindo, K., Tada, M. Biosyntheses of monascorubrin and monascoflavin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.11, p.359–362. 1963.

Leeper, F. J. Biosynthesis: aromatic polyketides and vitamins. Berlin. 7 Springer; 2000.

Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. Industrial biotransformations. A collection of processes. Weinheim 7 Wiley-VCH; 2000.

Locci, R., Merlini, L., Nasini, G., Locci, J.R. Mitorubrinic acid and related compounds from a strain of *Penicillium funiculosum*. **Gioron Microbiology**. v.15, p.92–102. 1967.

Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., Thomas, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**. v.46, p.667-702. 2001.

Lo Presti, R.S., Destro, R. The fungal metabolite austdiol. **Acta Crystallographica**. v.59, p.199-201. 2003.

Lorenzi, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. 440p, 1991.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 512p, 2002.

Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L., Hinriches, D.J. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.48, p.739-741. 1993a.

Makler, M.T., Hinriches, D.J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.48. p.205-210, 1993b.

Mapari, S., Meyer, A.S., Thrane, U., Frisvad, J.C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**. v.8, p.24. 2009.

Marinho, A.M.R., Rodrigues-Filho, E., Moitinho, M.L.R., Santos, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.16, p.280-283, 2005.

Mason, P.G., Erlandson, M.A. The potential of biological control for management of grasshoppers (Orthoptera, Acrididae) in Canada. **Canadian Entomologist**. v.126, p.1459-1491. 1994.

Maquenne, L., Philippe, L. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**. v.139, p. 840–843. 1904.

Marumo, S., Nukina, M., Kondo, S., Tomiyama, K.. Lunatoic acid A, a morphogenic substance inducing chlamyospore-like cells in some fungi. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.46,p.2399–2401. 1982.

Mazet, I., Hung, S.Y., Boucias, D.G.. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. **Experientia**. v.40, p.385-391. 1994.

McCormick, D. B. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. In: Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. (Eds.), New York. 2003.

McInnes, A. G., Smith, D. G., Wat, C.K., Vining, L.C., Wright, J.L.C. Tenellin and bassianin, metabolites of *Beauveria* species. Structure elucidation with ¹⁵N- and doubly ¹³C-enriched

compounds using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chemical Society. Chemical Communications**. p.281–282. 1974

Mikus, J., Steverding, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* by using the dye Alamar Blue. **Parasitology International**. v.48, p.265-269. 2000.

Moore, M.C., Cox, R.J., Duffin, G.R., O'Hagan, D. Synthesis and evaluation of a putative acyl tetramic acid intermediate in tenellin biosynthesis in *Beauveria bassiana*. a new role for tyrosine. **Tetrahedron**. v.54, p.9195-9206. 1998.

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

Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J., Walker, L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **Journal of Natural Products**. v.67, p.772-777. 2004.

Muroga, Y., Yamada, T., Numata, A., Tanaka, R. Chaetomugilins I–O, new potent cytotoxic metabolites from a marine-fish-derived *Chaetomium* species. Stereochemistry and biological activities. **Tetrahedron**. v.65, p.7580–7586. 2009.

Natsume, M., Takahashi, Y., Marumo, S. Chlamydosporelike cell-inducing substances of fungi: close correlation between chemical reactivity with methylamine and biological activity. **Agricultural Biological Chemistry**. v.52, p.307–331. 1988.

NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Proposed Standard, M38-P. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 18 (13). 1998.

NCCLS Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically M7-A5. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 20(2). 2000.

NCCLS Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Tentative Standard, Second Edition, M24-T2. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 20 (26). 2000.

Newman D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v.70, p.461-477. 2007.

Okamoto, Y., Kobayashi, T., Imokawa, G., Hori, T., Nishizawa, Y. Japanese Patent, 09188608, 1997.

Olivo, H. F., Peeples, T. L., Ríos, M. Y., Velásquez, F., Kim, J. W., Narang, S. Microbial C-hydroxylation and β -4-*O*-methylglucosidation of methyl-benzamide 7-azanorbornane ethers with *Beauveria bassiana*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.21, p.97-105. 2003.

Omura, S., Tomoda, H., Kimura, K., Zhen, D., Kumagai, H., Igarashi, K., Imamura, N. Takahashi, Y., Tanaka, Y., Iwai, Y. Atpenins, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. production, isolation, physico-chemical and biological properties. **Journal of Antibiotics**. v.41, p.1769–1773. 1988.

Osmanova, N., Schultze, W., Ayoub, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**. v.9, p.315–342. 2010.

Ostazeski, S.A. An undescribed fungus associated with a root and crown rot of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). **Mycologia**. v.59, p.970–975. 1967.

Osorio-Lozada, A., Tovar-Miranda, R., Olivo, H.F. Biotransformation of *N*-piperidinylacetophenone with *Beauveria bassiana* ATCC-7159. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.55, p.30-36. 2008.

Owen, N.L., Hundley, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**. v.87, p.79-99. 2004.

Padhye, A. A., Davis, M.S., Reddick, A., Bell, M.F., Gearhart, E.D., Von Moll, L. *Mycocleptodiscus indicus*: a new etiologic agent of *Phaeohyphomycosis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, p.2796–2797. 1995.

Pairet, L., Wrigley, S.K., Chetland, I., Reynolds, E.E., Hayes, M.A., Holloway, J., Ainsworth, A.M., Katzer, W., Cheng, X.M., Hupe, D.J., Charlton, P., Doherty, A.M. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.913-923. 1995.

Park, J.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Kim, H.T., Cho, K.Y., Kim, J.C. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. **FEMS Microbial Letters**. v.252, p.309–313. 2005.

Pelaez, F., Gonzalez, V., Platas, G., Sanchez-Ballesteros, J., Rubio, V. Molecular phylogenetic studies within the *Xylariaceae* based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**. v.31, p.111–134. 2008.

Phonkerd, N., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Soyong, K., Prabpai, S., Kongsearee, P. Bis-spiro-azaphilones and azaphilones from the fungi *Chaetomium cochliodes*VTh01 and *C. cochliodes* CTh05. **Tetrahedron**. v.64, p.9636–9645. 2008.

Porto, K.C., Cabral, J.P., Tabareli, M. Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba: História Natural, Ecologia e Conservação. 1ª ed. Brasília, 324p, 2004.

Qian-Cutrone, J., Huang, S., Chang, L.P., Pirnik, D.M., Klohr, S.E., Dalterio, R.A., Hugill, R., Lowe, S., Alam, M., Kadow, K.F. Harzophilone and fleophilone, two new HIV REV/RRE binding inhibitors produced by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Antibiotics**. v.49, p.990–997. 1996.

Quang, D.N., Hashimoto, T., Fournier, J., Stadler, M., Radulovic, N., Asakawa, Y. Sassafrins A-D, new antimicrobial azaphilones from the fungus *Creosphaeria sassafras*. **Tetrahedron** 61:1743–1748. 2005.

Quang, D.N., Hashimoto, T., Asakawa, Y. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. **Chemical Record**. v.6, p.79–99. 2006a.

Quang, D.N., Harinantenaina, L., Nishizawa, T., Hashimoto, T., Kohchi, C., Soma, G.I., Asakawa, Y. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cells by azaphilones from xylariaceous fungi. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v.29, p.34–37. 2006b.

Quesada-Moraga, E. Los hongos entomopatógenos en el control de plagas de insectos. **Phytoma**. v.144, p. 41-47. 2002.

Quesada-Moraga, E.; Vey, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**. v.108, p.441–452. 2004.

Rao, M. R.; Faulkner, D. J. Clavosolides A and B, dimeric macrolides from the philippine sponge *Myriastra clavosa*. **Journal of Natural Products**. v.65, p.386-388. 2002.

Roberts, D. W. Toxins of entomopathogenic fungi. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic Press, New York. 1981.

Sá Peixoto-Neto, P.A., Silva, M.V., Campos, N.V.C., Porfírio, Z., Caetano, L.C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**. v.73, p.529-531. 2002.

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**. v.9, p.275-280. 2004.

Sakuda, S., Otsubo, Y., Yamada, Y. Structure of patulodin, a new azaphilone epoxide, produced by *Penicillium urticae*. **Journal of Antibiotics**. v.48, p.85–86. 1995.

Santos, L. C., Piacente, S., Pizza, C., Albert, K., Dachtler, M., Vilegas, W. Planifolin, a new naphthopyranone dimer and flavonoids from *Paepalanthus planifolius* **Journal of Natural Products**. v.64, p.122-124. 2001.

Schreiber, S. L. Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids. Berlin 7 Springer; 2000.

Schulz, B., Boyle, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. v.109, p.661-686. 2005.

Shao, C. L.; Wang, C. Y.; Wei, M. Y.; Gu, Y. C.; She, Z. G.; Qian, P. Y.; Lin, Y. C. Aspergilones A and B, two benzylazaphilones with an unprecedented carbon skeleton from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v.21, p.690-693. 2011.

Sheldrick, G.M. A short history of *SHELX*. **Acta Crystallographica**. v.64, p.112-122. 2008.

Shibasaki, M., Tanaka, K., Nagai, K., Watanabe, M., Fujita, S., Suzuki, K., Okada, G., Yamamoto, T. YM-92447 (spinosulfate A), a neuraminidase inhibitor produced by an unidentified pycnidial fungus. **Journal of Antibiotics** v.57, p.812-815. 2004.

Stadler, M., Akne, H., Dekermendjian, K., Reiss, R., Sterner, O., Witt, R. Novel bioactive azaphilones from fruit bodies and mycelial cultures of the Ascomycete *Bulgaria inquinans* (FR). **Natural Products Letters**. v.7, p.7–14. 1995.

Stadler, M., Laessle, T., Vasilyeva, L. The genus *Pyrenomyxa* and its affinities to other cleistocarpous Hypoxyloideae as inferred from morphological and chemical traits. **Mycologia**. v.97, p.1129–1139. 2005.

Stadler, M., Fournier, J. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). **Revista Iberoamericana de Micología**. v.23, p.160–170. 2006

Strasser, H., Vey, A., Butt, T. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species. **Biocontrol Science and Technology**. v.10, p.717-735. 2000.

Strhol, W. R. *Biotechnology of antibiotics*. New York 7 Dekker; 1997.

Sturdikova, M., Slugen, D., Lesova, K., Rosenberg, M. Mikrobiálna produkcia farbnych azaphilonovych metabolitov. **Chem Listy**. v.94, p.105–110. 2010.

Sutton, B. C. *Pucciniopsis, Mycoleptodiscus and Amerodiscosiella*. **Transactions of the British Mycological Society**. v.60, p.525–536. 1973.

Takahashi, M., Koyama, K., Natori, S. Four new azaphilones from *Chaetomium globosum* var. flavo-viridae. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.38, p.625–628. 1990.

Takahashi, S., Kakinuma, N., Uchida, K., Hashimoto, R., Yanagisawa, T., Nakagawa, A. Pyridovericin and pyridoacrolidin: novel metabolites from entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*. **Journal of Antibiotics**. v.51, p.596-598. 1998.

Tan, R.X., Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**. v.18, p.448-459. 2001.

TePaske, M.R., Gloer, J. B., Wicklow, D.T., Dowd, P. F. Leporin A: an antiinsectant N-alkoxy-pyridone from the sclerotia of *Aspergillus leporis*. **Tetrahedron Letters**. v.32, p.5687–5690. 1991.

Tsuchinari, M., Shimanuki, M., Hiramatsu, K., Murayama, F., Koseki, F., Shiono, T. Fusapyridons A and B, novel pyridone alkaloids from an endophytic fungus, *Fusarium* sp. YG-45. **Zeitschrift fur. Naturforsch B Chemical Sciences**. v.62, p.1203–1207. 2007.

Tsui, W.; Brown, G. D. Chromones and chromanones from *Baeckea frutescens*. **Phytochemistry**. v.43, p.871-876. 1996.

Tuberoso, C. I., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F., Floris, I. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, p.364-369. 2011

Turner, W.B. *Fungal metabolites*. Academic press, London. 1971.

Turner, W.B., Aldridge, D.C. *Fungal metabolites II*. Academic press, London. 1983.

Tuson, J. An alkaloid contained in the seeds of the *Ricinus communis*, or castor-oil plant **Journal of Chemical Society**. v.17, p.195–197. 1864.

Tuttle, J.V.; Krenitsky, T. A. Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**. v.255, p.909-915.1990.

Tzrel, L.; Hullan, L.; Szarvas, T.; Csiba, A.; Szende, B.; Novak, E. K.; Spazan, O, **Kosmat**. v. 47, p.153-161. 1998.

Velisek, J., Davidek, J., Cejpek, K. Biosynthesis of food constituents: natural pigments. Part 2: a review. **Czech Journal Food Science**. v.26, p.73–98. 2008.

Vey, A. Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and sustainable agriculture. **OILB. WPRS. Bulletin**. v.21, p.71–76. 1998.

Vey, A., Hoagland, R., Butt, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In *Fungi as Biocontrol Agents Progress: problems and potential* (T. M. Butt, C. W. Jackson & N. Magan, eds): 311–346. CABI Publishing, Wallingford. 2001.

Vieira, I.J.C., Mathias, L., Braz-Filho, R., Schripsema, J. Iridoids from *Borreria verticillata*. **Organic Letters**. v.1, p.1169-1171. 1999.

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 Applied Chemistry**. v.73, p.617-622. 2001.

Vleggaar, R., Steyn, P.S., Nagel, D.W. Constitution and absolute configuration of austdiol, the main toxic metabolite from *Aspergillus ustus*. **Journal of Chemical Society**. v.1, p.45–49. 1974.

Wat, C. K., McInnes, A. G., Smith, D. G., Wright, J. L. C., Vining, L. C. The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin. **Canadian Journal of Chemistry**. v.55, p.4090 - 4098. 1977.

Wei, W.G., Yao, Z.J. Synthesis studies toward chloroazaphilone and vinylogous c-pyridones: two common natural product core structures. **Journal of Organic Chemistry**. v.70, p.4585–4590. 2005.

Weiss, U., Edwards, J. M. Biosynthesis of aromatic compounds. New York 7 Wiley; 1980.

Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.20, p.65-272. 2004.

Wolf, H., Zahner, H. **Archives in Microbiology**. v.83, p.147–154. 1972.

Wu, X.Y., Liu, X.H., Lin, Y.C., Luo, J.H., She, Z.G., Li, H.J., Chan, W.L., Antus, S., Kurtan, T., Elsasser, B., Krohn, K. Xyloketal F: A Strong L-Calcium Channel Blocker from the Mangrove Fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea Coast. **European Journal of Organic Chemistry**. v.19, p.4061-4064. 2005

Yamada, T., Muroga, Y., Tanaka, R. New Azaphilones, *seco*-Chaetomugilins A and D, produced by a marinefish- derived *Chaetomium globosum*. **Marine Drugs**. v.7, p.249–257. 2009.

Yao, G. M., Ding, Y., Zuo, J. P., Wang, H. B., Wang, Y. B., Ding, B. Y., Chiu, P., Qin, G. W. Dihydrochalcones from the Leaves of *Pieris japonica*. **Journal of Natural Products**. v.68, p.392-396. 2005.

Zhang, Q., Rivikin, A., Curran, D.P. Quasiracemic synthesis: concepts and implementation with a fluorous tagging strategy to make both enantiomers of pyridovericin and mappicine. **Journal of American Chemical Society**. v.124, p.5774-5781. 2002.

Zhang, J., Gunatilaka, A. A. Microbial metabolism of 1-aminoanthracene by *Beauveria bassiana*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.16, p.5085-5089. 2008.

Zhu, J., Grigoriadis, N.P., Lee, J.P., Porco, J. Synthesis of the azaphilones using copper-mediated enantioselective oxidative dearomatization. **Journal of American Chemical Society**. v.127, p.342–343. 2005.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, B. N., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p.2198-2208. 2002.