UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito de moduladores epigenéticos na biossíntese de
produtos naturais em fungos**

Marília Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito de moduladores epigenéticos na biossíntese de produtos naturais em fungos

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(a): Marília Oliveira de Almeida

Orientador(a): Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 02/07/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

RESUMO

ALMEIDA, M. O. **Avaliação do efeito de moduladores epigenéticos na biossíntese de produtos naturais em fungos**. 2014. 211f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A manipulação seletiva de alvos epigenéticos usando pequenas moléculas inibidoras das enzimas histona-desacetilases (HDACs) e DNA metiltransferases (DNMTs) é uma estratégia para estimular a expressão das vias biossintéticas e a produção de novos metabólitos secundários em fungos. Neste trabalho, inibidores de histona-desacetilases (butirato de sódio, ácido hidroxâmico suberoilânilda e ácido valproico) e inibidores de DNA metiltransferases (5-azacitidina, hidralazina, procaína e procainamida) foram suplementados em culturas líquidas e sólidas dos fungos endofíticos *Fusarium oxysporum* SS46, *Hyphodermella corrugata* FLe8.2 e *Chaetomium globosum* VR10, das linhagens comerciais *Fusarium oxysporum* ATCC MYA 4623 e *Chaetomium globosum* ATCC 56726 e do fitopatógeno *Botrytis cinerea* B0510. O fungo endofítico *H. corrugata* FLe8.2, em meio PDB, produziu o composto 2-(2-metoxifenil)-4H-piran-4-ona, e sua cultura em meio Czapek suplementada com hidralazina levou ao isolamento de 3-metil-1,2,4-triazolo[3,4-a]-ftalazina. O tratamento de *F. oxysporum* SS46 e *F. oxysporum* ATCC MYA 4623 com hidralazina em meio Czapek levou ao isolamento de um novo composto, 2H-[1,2,4]triazino[3,4-a]-ftalazina. Nestas culturas houve biotransformação da hidralazina pelos fungos, provavelmente como mecanismo de desintoxicação. Ainda, a hidralazina teve um efeito inibidor sobre a biossíntese do ciclohexadepsipeptídeo beauvericina em *F. oxysporum* SS46. Nas culturas de *C. globosum* VR10 em meio Czapek os inibidores de HDACs e de DNMTs suprimiram a biossíntese de chaetoglobosinas. A adição de ácido valproico na cultura de *C. globosum* VR10 em meio PDB eliciou a produção da chaetoviridina B. A adição de 5-azacitidina nas culturas de *C. globosum* VR10 em meio sólido PDA não modificou a produção da chaetoglosina A. A produção de chaetoviridina B por *C. globosum* ATCC 56726 em meio PDA foi inibida na menor concentração de 5-azacitidina, 50 μ M, e retomada na concentração de 150 μ M. O tratamento de *B. cinerea* B0510 com ácido hidroxâmico suberoilânilda SAHA levou à biossíntese de um novo composto, ácido 5-benzil-2,3-di-hidroxi-3-isopropil-4-oxotetrahidrofuran-2-carboxílico, o qual também foi isolado da linhagem geneticamente modificada *B. cinerea* Bc Δ STC2. No geral, considerando as linhagens fúngicas estudadas, os resultados mostram que a adição de moduladores químicos que atuam em mecanismos epigenéticos promove mudanças no perfil de metabólitos secundários.

Palavras-chave: produtos naturais microbianos, biossíntese, moduladores epigenéticos, fungos endofíticos, fungo fitopatogênico.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais microbianos

A produção de metabólitos secundários por fungos filamentosos é um processo que ocorre em condições ambientais específicas ou durante etapas específicas de seu ciclo de vida. Os metabólitos secundários em geral são moléculas de baixa massa molecular, que se diferenciam dos metabólitos primários por não serem essenciais para o crescimento dos organismos que os produzem. Estes metabólitos são usados como defesa, sinais químicos para comunicação, adaptação a um habitat ou para inibição do crescimento de outros organismos que podem competir pelo território, alimentação, entre outros (STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011; BRAKHAGE; 2013).

A produção de metabólitos secundários está frequentemente relacionada com condições estressantes no meio ambiente como escassez de nutrientes, temperatura, ausência de luz, ou mudanças no pH do meio. Estes compostos são também denominados como produtos naturais, e podem apresentar uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas (STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011; BRAKHAGE; 2013).

Os micro-organismos são uma importante fonte de moléculas únicas, modificadas e aprimoradas pela evolução. Em 2008, Ganesan reavaliou os dados publicados sobre os novos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration*, FDA (NEWMAN & CRAGG, 2007), e confirmou a contribuição extremamente relevante dos micro-organismos para a descoberta de novas entidades químicas. Foram aplicados filtros para analisar as contribuições originais de produtos naturais na terapêutica, e concluiu-se que, entre 1970 e 2006, foram aprovadas 24 substâncias inovadoras de origem natural, sendo que 19 foram isoladas de micro-organismos e cinco de plantas (GANESAN, 2008). Mesmo com a revisão mais atual de Newman & Cragg (2012), os dados obtidos por Ganesan (2008) não são alterados significativamente, mostrando a importância dos produtos naturais microbianos no desenvolvimento de fármacos. Alguns fármacos derivados de produtos naturais microbianos são apresentados na Figura 1.

I
Validamicina (antidiabético)
(*Streptomyces hygroscopicus*)
Acarbose (1990)
Voglibose (1994)

II
Midecamicina (antibiótico)
(*Streptomyces mycarofaciens*)
Miocamicina (1985)

III
Cefamicina C (antibiótico)
Streptomyces clavuligerus
Moxalactam (1982)
Cefotetan (1984)
Cefoperazona (1985)

IV
Ácido pseudomônico (antibiótico)
Pseudomonas fluorescens
Mupirocina (1995)

V
Ciclosporina A (imunossupressor)
Tolypocladium inflatum
Ciclosporina (1983)

VI
Daptomicina (antibiótico)
Streptomyces roseosporum
Daptomicina (2003)

Figura 1. Fármacos derivados de produtos naturais de micro-organismos (São apresentados nome do produto natural, sua atividade, espécie produtora e ano de introdução dos fármacos na terapêutica).

VII

Tienamicina (antibiótico)
Streptomyces cattleya
 Imipenem (1985)
 Meropenem (1994)
 Panipenem (1994)
 Biapenem (2002)
 Ertapenem (2002)
 Doripenem (2005)

VIII

FK506 (imunossupressor)
Streptomyces tsukubaensis
 Tacrolimus (1993)

IX

Rapamicina (imunossupressor)
Streptomyces hygroscopicus
 Sirolimus (1999)

Figura 1. (Continuação da figura anterior) Fármacos derivados de produtos naturais de micro-organismos (São apresentados nome do produto natural, sua atividade, espécie produtora e ano de introdução dos fármacos na terapêutica).

A importância dos produtos naturais na descoberta e no desenvolvimento de fármacos é bem documentada, e esta pesquisa está cada vez mais inserida na área da biologia química, que utiliza pequenas moléculas para o estudo de processos biológicos (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

Os métodos tradicionais para a busca de substâncias bioativas a partir dos micro-organismos envolvem basicamente cultivo de coleções de micro-organismos e procedimentos de extração, isolamento e identificação de moléculas, que na maioria das vezes são monitoradas por ensaios de atividade biológica. Infelizmente esta abordagem tem sido limitada quanto à descoberta de novas moléculas. Entretanto, com o avanço da genética de micro-organismos há novas expectativas em relação à descoberta de compostos bioativos inéditos (SCHERLACH, HERTWECK, 2009).

Entre as principais classes de metabólitos secundários de fungos estão os policetídeos sintases (PKS), peptídeos sintetases não ribossomais (NRPs), híbridos policetídeo-peptídeo (PKS-NRPs), e os terpenos. A descoberta que a biossíntese de metabólitos secundários em fungos é realizada por um grupo de genes agrupados no genoma (*clusters*) é atual. Estes clusters costumam ter vários genes envolvidos na biossíntese, e são responsáveis pela expressão das enzimas envolvidas neste processo. Assim, entre outras enzimas envolvidas no metabolismo secundário, estes clusters de genes expressam enzimas multimodulares e de multidomínio extremamente grandes pertencentes às policetídeos sintases (PKS) e peptídeos sintetases não ribossomais (NRPs) (BRAKHAGE; 2013).

Paralelamente ao progresso da identificação de genes necessários para a produção dos metabólitos secundários, tem sido de grande interesse conhecer o agrupamento em cluster e como está regulada a expressão destes genes. Clusters de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários fúngicos são regulados por uma complexa rede envolvendo múltiplas proteínas que respondem aos vários estímulos ambientais. Estes estímulos incluem fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, luz, pH, entre outros, e também estímulos de outros micro-organismos. Contudo, muito destes estímulos são relevantes para alguns clusters de genes e podem variar entre as espécies de fungos (BRAKHAGE; 2013).

Os programas recentes de sequenciamento genômico têm revelado que estes micro-organismos possuem um grande potencial biossintético e que o número de genes que codificam para enzimas biossintéticas em muitas bactérias e fungos supera claramente o conhecido. Uma razão para isto pode ser que apenas um subconjunto de genes é expresso sob condições normais de laboratório, e, portanto, apenas uma minoria de estruturas químicas em potencial é produzida. Estes genes são denominados como genes crípticos, cuja presença não foi detectada em condições normais de crescimento. Estes genes crípticos tem chamado a atenção de muitos pesquisadores, principalmente porque a maioria deles contem genes que codificam para policetídeos sintases (PKSs) e peptídeos sintetases não ribossomais (NRPs), que são altamente estudados e procurados por estarem envolvidos na biossíntese de agentes com potencial terapêutico (SCHERLACH; HERTWECK, 2009).

No entanto, nem todas as vias biossintéticas estão necessariamente silenciadas. Os metabólitos podem ser produzidos em baixas quantidades devido às condições de cultivo utilizadas, que não estimulam a biossíntese destes compostos, ou seja, os sinais químicos ou ambientais necessários para a produção destes metabólitos podem estar ausentes (SCHERLACH; HERTWECK, 2009).

A supressão rigorosa da transcrição de metabólitos secundários é hipotetizada como uma forma de proteção dos fungos do potencial tóxico dos produtos naturais, e a biossíntese somente é eliciada quando for realizado um estímulo ambiental apropriado. Estudos recentes mostram que a transcrição de muitas vias biossintéticas é controlada por mecanismos epigenéticos (FISCH et al., 2009).

1.2 Modulação epigenética de biossíntese de produtos naturais

Waddington descreveu o processo epigenético em 1940 como “ramo da biologia que estuda as interações casuais entre os genes e seus produtos que conduzem os fenótipos a existir”. No entanto os mecanismos moleculares específicos envolvidos na modificação epigenética da atividade do genoma não foram completamente elucidados até mais recentemente. Atualmente, o estudo da epigenética centra-se em “fatores moleculares e processos em torno do DNA que regulam a atividade do genoma independente da sequência do DNA e que são mitoticamente estáveis”. Estudos recentes revelaram que a metilação do DNA e a modificação de histonas são os mecanismos epigenéticos predominantes (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2011; SUZUKI; MIYATA, 2006).

Alterações epigenéticas podem ter uma vasta gama consequências fenotípicas que conduzem a condições de doença como câncer, problemas reprodutivos e obesidade (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2011).

A regulação baseada na modificação da cromatina é também um importante mecanismo de controle utilizado por fungos para modular a transcrição de genes envolvidos na produção de metabólitos secundários (CICHEWICZ, 2010).

A cromatina é o complexo formado por DNA nuclear e proteínas em que o material genético dos eucariontes está empacotado. A principal subunidade da cromatina é o nucleossomo. Ele consiste em cerca de 165 bp de DNA envolvidos em duas voltas superhelicais em torno de um octâmero formado por oito unidades de diferentes proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) com duas cópias. Este arranjo físico de DNA em nucleossomos resulta numa compactação de aproximadamente de 10 vezes da cromatina, que é adicionalmente aumentada pelas interações com os nucleossomos vizinhos para formar uma fibra de 30 nm da cromatina (STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011).

Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão de genes. Quando a cromatina está na forma condensada, os genes são inativos e quando a

cromatina está descondensada os genes são expressos. Estes estados dinâmicos da cromatina são controlados por padrões de fatores epigenéticos (STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011; GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado que a transcrição de genes fúngicos é muitas vezes controlada por regulação epigenética como modificações covalentes de histonas e metilação de DNA (CICHEWICZ, 2010; STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011).

Cada uma das histonas que compõem o octâmero nucleossomal possui uma cadeia de aminoácidos terminais, denominada cauda N-terminal, que se estendem do nucleossomo. Os resíduos de aminoácidos das cadeias N-terminais são sujeitos a diversas modificações pós-traducionais, que incluem carbonilação, fosforilação, ubiquitinação, glicosilação, sumoilação, ADP-ribosilação e principalmente acetilação e metilação, dentre as quais a acetilação é a mais estudada e melhor compreendida (CICHEWICZ, 2010; STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011).

A acetilação é a modificação em histonas mais estudada em fungos, este processo provoca um desenrolamento da cromatina que torna possível a transcrição dos genes. A acetilação de histonas é realizada por enzimas histona-acetiltransferases (HATs). A cauda N-terminal das histonas contém grandes quantidades de aminoácidos básicos, como lisinas e argininas, resultando em uma carga positiva e possibilitando sua ligação com DNA, carregado negativamente. Após a acetilação, as cargas positivas do grupo NH_3^+ dos aminoácidos básicos são neutralizadas, eliminando assim sua interação com o grupo fosfato do DNA, resultando em uma estrutura da cromatina menos condensada, o que facilita o acesso dos fatores regulatórios ao DNA. O processo contrário, a desacetilação da cromatina, resulta na cromatina mais condensada e o silenciamento gênico. A desacetilação de histonas é realizada por enzimas histona-desacetilases (HDACs) (CICHEWICZ, 2010; STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011). O mecanismo de acetilação-desacetilação das histonas encontra-se descrito na Figura 2.

Figura 2. Mecanismo de acetilação-desacetilação de histonas

Outra modificação epigenética observada em fungos é a metilação do DNA. Este processo é catalisado por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que utilizam S-adenosilmetionina (SAM) como doador de grupo metílico para adição do grupo metílico ao carbono da posição 5' de citosina, resultando na formação de um composto chamando 5-metilcitosina. Este processo está correlacionado com silenciamento gênico (CICHEWICZ, 2010; SUZUKI; MIYATA, 2006; CHERBLANC et al., 2013). O mecanismo deste processo inicia com o grupamento tiol do resíduo de cisteína que ataca a posição 6 da citosina e gera um intermediário DNA-proteína, que possui propriedade nucleofílica na posição 5. O intermediário aceita o grupamento metila de SAM, em seguida o hidrogênio da posição 5 é abstraído por um resíduo básico e eliminado por β eliminação na posição 6 e formando 5-metilcitosina (Figura 3) (SUZUKI; MIYATA, 2006).

Figura 3. Mecanismo da metilação do DNA catalisado por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs)

Modificações covalentes em histonas e metilações no DNA podem operar em conjunto para provocar mudanças no estado da cromatina e promover a expressão ou o silenciamento gênico em fungos e em outros organismos. Muitas enzimas alvo modificadoras do epigenoma têm sido identificadas. No metabolismo fúngico, as enzimas mais estudadas são as DNA metiltransferases (DNMTs) e as histona-desacetilases (HDACs). Algumas pequenas moléculas bioativas (naturais ou sintéticas) têm sido identificadas como inibidores seletivos ou semi-seletivos das enzimas alvo modificadoras DNA metiltransferases (DNMTs) e as histona-desacetilases (HDACs) (CICHEWICZ, 2010).

Alguns compostos são capazes de reverter a metilação do DNA através da inibição das DNA metiltransferases (DNMTs) (Figura 4). O análogo nucleosídico 5-azacitidina (**X**) é um modulador epigenético clinicamente aprovado pelo FDA como agente antitumoral para o tratamento da síndrome mielodisplásica (REN et al., 2011). Apesar de ter sido descoberto de uma série de análogos nucleosídeos sintéticos, mais tarde 5-azacitidina foi descoberto como um produto natural (CHERBLANC et al., 2013). O inibidor 5-azacitidina é incorporado no DNA, o que resulta na ligação das enzimas DNMTs com o DNA modificado causando a inibição irreversível das enzimas DNMTs. Apesar da eficácia na reversão da metilação de DNA, um dos grandes problemas de compostos como 5-azacitidina é a citotoxicidade provavelmente associado com a incorporação no DNA (CICHEWICZ, 2010; GANESAN et al., 2009; SUZUKI; MIYATA, 2006; CHERBLANC et al., 2013; REN et al., 2011).

O fármaco anestésico procaína (**XII**) e seu derivado procainamida (**XIII**), fármaco do grupo dos anti-arrítmicos, e o anti-hipertensivo hidralazina (**XI**) são compostos não nucleosídeos que inibem a atividade das DNMTs (Figura 4). O mecanismo de ação da hidralazina e procainamida envolve a interação do átomo de nitrogênio com os resíduos de lisina e arginina das DNMTs inibindo a atividade catalítica das enzimas (GANESAN et al., 2009; REN et al., 2011).

Tem sido desenvolvido um grande número de inibidores das enzimas histona-desacetilases (HDACs) (Figura 4). O ácido hidroxâmico suberoilanida SAHA (**XIV**) (Vorinostat) foi clinicamente aprovado pelo FDA para o tratamento do linfoma cutâneo de células T. SAHA bloqueia a atividade enzimática de HDACs Classe I (HDAC 1, 2 e 3) e Classe II (HDAC6) em concentrações de nanomolar, interagindo no sítio ativo das enzimas. Em concentrações que não são tóxicas para células

normais, SAHA altera dramaticamente os padrões de acetilação e provoca interrupção e morte do crescimento de células cancerígenas tanto *in vitro* como em modelos animais. A inibição das HDACs por SAHA resulta na acumulação de histonas acetiladas, o que leva a ativação da expressão de genes (RICHON, 2006; RICHON; GARCIA-VARGAS; HARDWICK, 2009). O ácido valproico (**XVI**), fármaco anticonvulsivante, e o butirato de sódio (**XV**), apesar de serem mais fracos que os inibidores hidroxâmicos, são considerados também uma importante classe de inibidores de HDACs (CICHEWICZ, 2010; GANESAN et al., 2009; PONTIKI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2012; SUZUKI; MIYATA, 2006).

Figura 4. Compostos inibidores das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e histona-desacetilases (HDACs)

Na tentativa de acessar rotas de produtos naturais silenciadas e aumentar a produção de metabólitos secundários microbianos, Willians e colaboradores (2008)

suplementaram culturas de fungos com moduladores epigenéticos. Nos experimentos iniciais, doze fungos foram tratados com diversos inibidores de HDACs e de DNA-metiltransferases em série de diluição (0.1 μ M a 10 mM). A análise dos perfis metabólicos por HPLC, EM, RMN de ^1H e CCDA revelou que onze destes fungos responderam ao tratamento com a produção de novos produtos naturais. Além disso, o cultivo de linhagens selecionadas em vários tipos de meios de cultura confirmou que muitos dos novos metabólitos foram exclusivamente obtidos quando os fungos foram tratados com moduladores epigenéticos. Destas linhagens, duas culturas foram estudadas com mais detalhes. A adição de 5-azacitidina (**X**) à cultura de *Cladosporium cladosporioides* estimulou a produção de várias oxilipinas (**XVII-XIX**), enquanto o tratamento com ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) (**XIV**) resultou em duas outras novas perilenequinonas, cladocromas, juntamente com quatro outras cladodromas conhecidas (**XX-XXVI**). O segundo fungo testado foi a linhagem do gênero *Diatrype* tratado com 5-azacitidina (**X**), resultando na produção de dois novos policetídeos glicosilados (**XXVII-XXVIII**) (Figura 5) (WILLIAMS et al., 2008).

Foi realizado um trabalho posterior pelo mesmo grupo com o tratamento de *Aspergillus niger* (ATCC1015) com o ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) (**XIV**), inibidor de histona-desacetilases (HDACs). Este trabalho resultou produção de um novo metabólito, a nigerona A (**XXIX**), biossintetizado exclusivamente quando a cultura foi tratada com o SAHA (Figura 5) (HENRIKSON et al., 2009).

A manipulação epigenética do fungo *Penicillium citreonigrum* gerou mudanças no aspecto de seus gutatos. O cultivo do fungo em meio sólido com o modulador epigenético 5-azacitidina (**X**) gerou o desenvolvimento de gutatos vermelhos escuros, enquanto o cultivo do fungo sem adição do modulador epigenético gerou a formação de gutatos sem coloração. A adição do modulador epigenético induziu a produção de seis azafilonas (**XXX-XXXV**), dois pencolídeos (**XXXVI-XXXVII**) e dois novos meroterpenos (**XXXVIII-XXXIX**) (Figura 5), ausentes no extrato controle (WANG et al., 2010). Portanto, a estratégia de modulação epigenética usando compostos químicos tem se mostrado eficiente para a diversificação do perfil metabólito em fungos.

Figura 5. Produtos naturais produzidos por fungos tratados com moduladores epigenéticos

1.3 Fungos endofíticos da coleção do laboratório de Química de Micro-organismos

O laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo), da FCFRP-USP mantém uma coleção de micro-organismos endofíticos isolados de espécies de Asteraceae (GUIMARÃES et al., 2008; GALLO et al., 2009).

A linhagem *Chaetomium globosum* VR10 foi isolada das folhas de *Viguiera robusta*, e produziu os híbridos de policetídeo com peptídeo, chaetoglobosinas B (XL), D (XLI) e E (XLII) (Figura 6), em meio líquido Czapek e sólido de arroz. Chaetoglobosina B apresentou significativa atividade citotóxica em células leucêmicas JURKAT e de melanoma (B16F10) (MOMESSO et al., 2008). Quando cultivado em meio PDB (batata e dextrose) o fungo produziu outros policetídeos denominados chaetoviridinas (XLIII-LV), alguns conhecidos e outros inéditos (Figura 6) (BORGES, et al., 2011). A produção de metabólitos secundários bioativos por este fungo foi significativamente influenciada pelos diferentes meios de cultivo líquidos.

Figura 6. Metabólitos isolados do fungo endofítico *Chaetomium globosum* VR10

comerciais e endofíticas podem fornecer dados interessantes e comparativos acerca do metabolismo secundário.

1.4 Características, metabolismo e genoma de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) é um fungo imperfeito, filamentoso e necrotrófico da ordem Moniliales e família Moniliaceae. É um patógeno de uvas, tabaco, tomates, morangos entre um total de mais de 235 espécies de plantas identificadas. *B. cinerea* é um saprófita que ataca primeiramente as partes danificadas da planta antes de se espalhar no tecido saudável. O sintoma mais comum da infecção deste patógeno envolve as lesões necróticas nas folhas (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007).

Este fungo é responsável pela doença conhecida como “podridão cinzenta”, cujo nome se deve por produzir um mofo cinzento sobre os cultivos que infecta, provocando grandes perdas em vegetais, frutas e outras culturas sob uma variedade de condições de crescimento. O mofo cinzento causa grandes perdas econômicas em vinhedos em climas temperados, onde causa a secagem e putrefação de uvas, assim como alterações bioquímicas que reduzem a qualidade do vinho. Contudo, em certas condições climáticas, a mesma espécie causa a chamada “podridão nobre”, que é utilizada para elaboração de vinhos de alta qualidade como vinhos do tipo Sauternes (França) (JACOMETTI; WRATTEN; WALTER, 2010).

B. cinerea sobrevive ao inverno em folhas secas, cascas e gemas da espécie frutal. Forma estruturas de resistência chamadas de esclerócios, restos de micélio e esporos nos ramos e resíduos infectados da temporada anterior. Na primavera, sob condições de umidade e temperatura favoráveis (15-20 °C e 95% de umidade relativa) dá-se a formação de conídeos a partir destes esclerócios e micélios que voltam a repetir o ciclo de infecção (JACOMETTI; WRATTEN; WALTER, 2010).

Durante as últimas décadas foram realizados estudos sobre o metabolismo secundário de *B. cinerea*, com a finalidade de conhecer o papel dos metabólitos secretados no meio nos processos de infecção. Estes estudos evidenciaram que alguns dos compostos produzidos por *B. cinerea* são fitotoxinas não específicas que matam as células das plantas hospedeiras. Durante o processo de infecção da planta, o fungo secreta substâncias pertencentes a duas famílias de toxinas: (1) sesquiterpenos com esqueletos botrianos e (2) policetídeos com esqueleto de

boticininas (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007; TANI et al., 2005; TANI et al., 2006; MORAGA et al., 2011).

Os metabólitos com esqueletos botrianos são sesquiterpenos, cujo esqueleto básico é um biciclo, que não seguem a regra do isopreno. Dentre os compostos isolados desta família os mais representativos são o botridial (**LVIII**) e o di-hidrobotridial (**LXII**). Botrianos e derivados (**LVIII-LXXII**) são responsáveis pela fitopatogenicidade do fungo *B. cinerea* e encontram-se na Figura 8. A principal toxina produzida por este fungo é o botridial. Botridial (**LVIII**) é produzido durante a infecção da planta e induz a clorose e colapso das células da planta. Botridial (**LVIII**) e di-hidrobotridial (**LXII**) foram os primeiros metabólitos isolados de *B. cinerea* apresentando propriedade fitotóxica. Estes sesquiterpenoides têm uma ampla gama de atividade biológica e desempenham um papel importante na patogenicidade do fungo (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007). Os botrianos mais recentes, boledulinas A-C (**LXX-LXXII**), foram isolados de um basidiomiceto *Boletus edulis* (FENG et al., 2011).

O segundo grupo de compostos isolados por *B. cinerea* é formado pelo ácido boticínico (**LXXIII**) e boticininas (**LXXIV-LXXIX**), que constituem compostos com estruturas de lactonas policetílicas. Ácido boticínico e derivados também induzem clorose e necrose nas plantas, e também demonstraram atividades antifúngicas (TANI et al., 2005; TANI et al., 2006). Estes compostos policetílicos isolados de *B. cinerea* encontram-se na Figura 9. Recentemente foram isoladas a botrilactona e outras boticininas de uma linhagem mutante de *B. cinerea* Bc cat 2 (MORAGA et al., 2011). A botrilactona (**LXXX**) é uma lactona poli-hidroxilada descrita na literatura como um composto de potente atividade antibiótica, e recentemente teve sua configuração absoluta revisada e estabelecida (MORAGA et al., 2011).

Figura 8. Sesquiterpenos com esqueletos botrianos isolados de *B. cinerea*

Figura 9. Policetídeos isolados de *B. cinerea*

O controle de *B. cinerea* é difícil devido a sua ampla gama de hospedeiros e a sua capacidade de desenvolver resistência aos fungicidas, alta variabilidade genética e capacidade de sobreviver como saprófito ou por períodos prolongados como esclerócios em resíduos de culturas (COLLADO; MACÍAS; HANSON, 2007).

As estratégias de controle deste fungo baseadas em fungicidas clássicos produzem graves efeitos colaterais principalmente relacionados com a contaminação ambiental e desenvolvimento de multirresistências. Há um grande interesse na produção de fungicidas que não impeçam o papel benéfico que os micro-organismos desenvolvem com as plantas e que também não persistem na cadeia alimentar (COLLADO; MACÍAS; HANSON, 2007; JACOMETTI; WRATTEN; WALTER, 2010).

Para abordar estas questões é necessário uma melhor compreensão da biologia do fungo, a função dos genes e os aspectos relacionados ao metabolismo secundário e interação planta-patógeno. Assim, estudos vêm sendo publicados sobre os genes e as enzimas envolvidos no metabolismo secundário de *B. cinerea* (SIEWERS et al., 2005; PINEDO et al., 2008; AMSELEM et al., 2011; DALMAIS et al., 2011).

Recentemente foi realizado o sequenciamento dos genomas das linhagens de *B. cinerea* B0510 e T4 e de *S. sclerotinia* pelo Broad Institute, instituto de pesquisa entre Harvard-MIT (*B. cinerea* Database; http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea/Home.html) e The Genoscope, centro francês de sequenciamento (<http://www.genoscope.cns.fr>), respectivamente. Como resultado destes estudos, foi possível conhecer a sequência completa de genes, fatores de transcrição e regulação, assim como genes envolvidos no metabolismo secundário que codificam enzimas chaves participantes na biossíntese das toxinas. Verificou-se que *B. cinerea* possui um arsenal de enzimas envolvidas na biossíntese das toxinas excretadas, junto a outras funções ainda desconhecidas. Analisando o sequenciamento genômico de *B. cinerea* do ponto de vista dos metabólitos secundários, este fungo apresenta 45 enzimas chaves, algumas específicas deste patógeno: vinte e dois poliketídeos sintases (PKS), oito peptídeos sintetases não ribossomais (NRPS), cinco enzimas híbridas (PKS-NRPS), seis sesquiterpenos ciclases (STC), três diterpenos ciclases (DTC) e uma dimetilalil triptofano sintase (DMATS).

Estes dados demonstram que o fungo patogênico *B. cinerea* tem um grande potencial para o estudo de metabólitos crípticos e suas correspondentes vias biossintéticas.

O sequenciamento dos genomas das linhagens de B0510 e T4 de *B. cinerea* pelo Broad Institute e The Genoscope, respectivamente, proporcionou a caracterização do cluster de genes envolvido na biossíntese do botridial (SIEWERS et al., 2005; PINEDO et al., 2008). Este cluster de genes é constituído por genes que codificam para uma sesquiterpeno ciclase (*BcBOT2*), uma acetiltransferase (*BcBOT5*) e três monooxigenases P450 (*BcBOT1*, *BcBOT2* e *BcBOT3*) (Figura 10). Este cluster de genes não foi identificado em nenhum outro genoma fúngico.

Figura 10. Cluster envolvido na produção de botridial e derivados (PINEDO et al., 2008)

Estes estudos permitiram identificar o primeiro gene *BcBOT1* envolvido na biossíntese do botridial. O gene *BcBOT1* (*Botrytis cinerea BOTrydial biosynthesis gene*) codifica para uma monooxigenase 450 que atua em um dos últimos passos da biossíntese do botridial. Foram estudados três mutantes diferentes de *B. cinerea*, nos quais o gene *BcBOT1* foi silenciado. Nenhum dos mutantes produziu botridial, contudo foi observado o acúmulo do intermediário 4 β -acetoxiprobotriano-9 β ,10 β -diol, indicando que *BcBOT1* está envolvido na hidroxilação do carbono C-15 do esqueleto botriano, que segue com a hidroxilação do carbono C-10 levando à formação do 4 β -acetoxi-9 β ,10 β ,15 α -tri-hidroxiprobotridial, seguida de oxidação de C-10 e de C-15, produzindo botridial (Figura 11) (SIEWERS et al., 2005).

Figura 11. Rota biossintética do botridial

O segundo gene identificado envolvido na biossíntese de botridial foi o *BcBOT2*. Este gene codifica para uma sesquiterpeno ciclase (STC) encarregada de ciclizar o farnesil pirofosfato (FPP) a presilfiperfolan-8β-ol, o precursor dos botrianos. Os dados obtidos neste estudo estabeleceram que a proteína codificada por *BcBOT2* é necessária para o primeiro passo da biossíntese do botridial. A inativação do gene *BcBOT2* em *B. cinerea* B0510 resultou em um possível redirecionamento do metabolismo originando uma superprodução significativa de ácido boticínico (LXXIII) e boticinina A (LXXIV), metabólitos com esqueleto policetídeo (Figura 9). A superprodução de ácido boticínico e boticinina observada na cepa B0510, quando o gene *BcBOT2* foi silenciado, sugere que o fungo é capaz de compensar a ausência da toxina botridial com ácido boticínico. Isto demonstra que ambas as famílias de toxinas estão relacionadas com a fitotoxicidade e o mecanismo de infecção do fitopatógeno (PINEDO et al., 2008).

Recentemente foram identificados dois genes de *BcPKS6* e *BcPKS9* que codificam para policetídeos sintases (PKS). Estes genes foram renomeados como *BcBOA6* e *BcBO9* e estão envolvidos na biossíntese das boticininas, lactonas

policetílicas isoladas de *B. cinerea*. Neste trabalho, o estudo de linhagens mutantes de *B. cinerea* B0510, nas quais foram silenciados os genes BcPKs6 ($\Delta bcboa6$) e BcPKs9 ($\Delta bcboa9$), indicou a ausência de produção de boticininas em ambos os casos e uma superprodução de botrilactona na linhagem $\Delta bcboa9$. Estes dados mostraram que ambos os genes são necessários para biossíntese de boticinina e que pode existir uma correlação biossintética entre ambas as famílias de policetídeos (botrilactonas e boticininas) (DALMAIS et al., 2011; MORAGA et al., 2011).

Todas estas informações tornam *B. cinerea* um fungo interessante para estudos de modulação epigenética que podem induzir a expressão de genes crípticos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que, de maneira geral, os moduladores epigenéticos podem modificar a biossíntese de produtos naturais nos fungos estudados, algumas vezes inibindo a produção de compostos e outras vezes estimulando a produção de compostos. Não é possível afirmar que os mecanismos de inibição e eliciação são realmente em função dos processos epigenéticos, envolvendo desacetilação de histonas e metilação de citosinas, já que inibidores das mesmas vias – metilação de citosinas e desacetilação de histonas – não tiveram necessariamente os mesmos efeitos.

É interessante observar que os moduladores que tiveram maior efeito na eliciação da biossíntese foram dois inibidores de HDACs. O ácido valproico estimulou a biossíntese de chaetoviridina B no fungo endofítico *C. globosum* VR10, enquanto o ácido hidroxâmico suberoilanolida induziu a produção do novo metabólito, ácido botricinereico, em *B. cinerea* B0510.

Todos inibidores de DNMTs tiveram efeito inibitório na biossíntese de produtos naturais, nas condições testadas. Entre eles, a hidralazina, além de ter efeito inibitório na biossíntese, parece ter induzido um processo de desintoxicação nos fungos *H. corrugata* FLe8.2, *F. oxysporum* SS46 e *F. oxysporum* ATTC MYA 4623, uma vez que produtos de biotransformação deste modulador foram isolados e identificados.

Não foi possível comparar o efeito dos moduladores nas linhagens endofíticas e comerciais de *F. oxysporum* e *C. globosum*, uma vez que em ambos os casos as linhagens comerciais e endofíticas não produziram os mesmos perfis químicos nas culturas controle. Porém, as duas linhagens de *F. oxysporum* biotransformaram a hidralazina ao mesmo produto de desintoxicação.

É difícil planejar racionalmente os experimentos de eliciação biossintética em fungos, visando o estudo do metabolismo secundário em função dos mecanismos epigenéticos, já que os moduladores podem apresentar diferentes efeitos, em diferentes fungos. Além disso, as alterações nas condições de cultivo já podem influenciar o metabolismo secundário. Ainda assim, pode-se afirmar o uso de moduladores epigenéticos é uma das estratégias para a ativação de vias biossintéticas em fungos, que pode conduzir à obtenção de novos produtos naturais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAH, H. M. F.; SOLIMAN, R. Synthesis and spectra of some triazolo and triazinophthalazines of possible hypotensive activity. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 24, p. 667, 1987.

AMSELEM, J.; CUOMO, C. A.; VAN KAN, J. A.; VIAUD, M.; BENITO, E. P.; COULOUX, A.; COUTINHO, P. M.; DE VRIES, R. P.; DYER, P. S.; FILLINGER, S.; FOURNIER, E.; GOUT, L.; HAHN, M.; KOHN, L.; LAPALU, N.; PLUMMER, K. M.; PRADIER, J. M.; QUÉVILLON, E.; SHARON, A.; SIMON, A.; TEN HAVE, A.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; WINCKER, P.; ANDREW, M.; ANTHOUARD, V.; BEEVER, R. E.; BEFFA, R.; BENOIT, I.; BOUZID, O.; BRAULT, B.; CHEN, Z.; CHOQUER, M.; COLLÉMAR, J.; COTTON, P.; DANCHIN, E. G.; DA SILVA, C.; GAUTIER, A.; GIRAUD, C.; GIRAUD, T.; GONZALEZ, C.; GROSSETETE, S.; GÜLDENER, U.; HENRISSAT, B.; HOWLETT, B. J.; KODIRA, C.; KRETSCHMER, M.; LAPPARTIENT, A.; LEROCH, M.; LEVIS, C.; MAUCELI, E.; NEUVÉGLISE, C.; OESER, B.; PEARSON, M.; POULAIN, J.; POUSSEREAU, N.; QUESNEVILLE, H.; RASCLE, C.; SCHUMACHER, J.; SÉGURENS, B.; SEXTON, A.; SILVA, E.; SIRVEN, C.; SOANES, D.; M.; TALBOT, N.J.; TEMPLETON, M.; YANDAVA, C.; YARDEN, O.; ZENG, Q.; ROLLINS, J. A.; LEBRUN, M. H.; DICKMAN, M. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLOS Genetics**, v. 7, p. 1-27, 2011.

ARAÚJO, L.W.; LIMA, S.O.A.; AZEVEDO, L. J.; MARCON. J.; SOBRAL, K.J.; LAVACA, T.P. **Manual Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**, Piracicaba, ESALQ, p. 86, 2002.

BORGES, W. S.; MANCILLA, G.; GUIMARÃES, D. O. ; DURAN-PATRON, R.; COLIADO, I. G.; PUPO, M. T. Azaphilones from the endophyte *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1182-1187, 2011.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 21-32, 2013.

BUENO, C.; VILLEGAS, M. L.; BERTOLOTTI, S. G.; PREVITALI, C. M.; NEUMANN, M. G.; ENCINAS, M. V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. Photophysics and photochemical reaction. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, p. 385-390, 2002.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathol Appl**, v. 20, p. 1-6, 1963.

CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W. M.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, v.30, p. 595-754, 2013.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v.27, p. 11-22, 2010.

COLLADO, I. G.; SÁNCHEZ, A. J. M; HANSON, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 674-686, 2007.

CONTI, R. Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, tese de doutorado, 2012.

DALMAIS, B.; SCHUMACHER, J.; MORAGA, J.; LE PÊCHEUR, P.; TUDZYNSKI, B.; COLLADO, I. G.; VIAUD, M. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 564-579, 2011.

FENG, T.; LI, Z.; DONG, Z.; SU, J.; LI, Y.; LIU, J. Non-isoprenoid botryane sesquiterpenoids from basidiomycete *Boletus edulis* and their cytotoxic activity. **Natural Product Bioprospect**, v. 1, p. 29-32, 2011.

FISCH, K. M.; GILLASPY, A. F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JACKSON, L.; NAJAR, F. Z.; WÄGELE, H.; CICHEWICZ, R. H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p. 1199-1213, 2009.

GALLO, M. B. C., CHAGAS, F. O., ALMEIDA, M. O., MACEDO, C. C., CAVALCANTI, B. C., BARROS, F. W. A., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFFO, L. V., PESSOA, C. O., BASTOS, J. K., PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, p.142-151, 2009.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion Chemical Biology**, v.12, p. 306-317, 2008.

GANESAN, A.; NOLAN, L.; CRABB, S. J.; PACKHAM, G. Epigenetic Therapy: histone acetylation, DNA methylation and anti-cancer drug discovery. **Current Cancer Drug Targets**, v.9, p. 963-981, 2009.

GAO, J. YANG, S.; QIN, J. Azaphilones: chemistry and biology. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 4755-4811, 2013.

GE, H. M.; ZHANG, Q.; XU, S. H.; GUO, Z. K.; SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; TAN, R. X. Chaetoglocins A-D, four new metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Planta Medica**, v. 77, p. 277-280, 2011.

GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M. K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 354, p. 3-8, 2011.

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

HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JOYNER, P. M.; CICHEWICZ, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 435-438, 2009.

JACOMETTI, M. A.; WRATTEN, S. D.; WALTER, M. Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 16, p. 154–172, 2010.

KINGSLAND, S. R.; BARROW, R. Identification of chaetoviridin E from a cultures microfungus, *Chaetomium* sp. and structural reassignment of chaetoviridins B and D. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, p. 269-274, 2009.

MOMESSO, L. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; Auro Nomizo; GOLDMAN, G. H.; PUPO, M. T. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 31, p. 1680-1685, 2008.

MORAGA, J.; PINEDO, C.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Botrylactone: new interest in an old molecule - review of its absolute configuration and related compounds. **Tetrahedron**, v. 67, p. 417-420, 2011.

MORAGA, J.; PINEDO, C.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Corrigendum to 'Botrylactone: new interest in an old molecule - review of its absolute configuration and related compounds' [Tetrahedron 67 (2011) 417e420]. **Tetrahedron**, v. 67, 8583, 2011.

NASCIMENTO, A. M.; CONTI, R.; TURATTI, I. C. C.; CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J. S.; CRUZ, A. K.; PUPO, M. T. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p. 1276-1281, 2012.

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.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

OLMO, E.; BARBOZA, B.; YBARRA, M. I.; LO´PEZ-PE´REZ, J. L.; SEVILLA, R. C. M. A.; BOSELLI, C.; SAN FELICIANO, A. Vasorelaxant activity of phthalazinones and related compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 2786-2790, 2006.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 2720, 2002.

PINEDO, C.; WANG, C.; PRADIER, J.; DALMAIS, B.; CHOQUER, M.; LE PÊCHEUR, P.; MORGANT, G.; COLLADO, I. G.; CANE, D. E.; VIAUD, M. The sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. **ACS Chemical Biology**, v. 3, p. 791-801, 2008.

PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Histone Deacetylase Inhibitors (HDACIs). Structure - Activity Relationships: History and New QSAR Perspectives. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, p. 1-165, 2012.

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

REECE, P. A. Hydralazine and related compounds: chemistry, metabolism, and mode of Action. **Medicinal Research Reviews**, v. 1, p. 73-96, 1981.

REN, J.; SINGH, B. N.; HUANG, Q.; LI, Z.; GAO, Y.; MISHRA, P.; HWA, YI L.; LI, J.; DOWDY, S. C.; JIANG S. DNA hypermethylation as a chemotherapy target. **Cellular Signalling**, v. 23, p.1082–1093, 2011.

RICHON, V. M. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. S2 – S6, 2006.

RICHON, V. M.; GARCIA-VARGAS, J.; HARDWICK, J. S. Development of vorinostat: Current applications and future perspectives for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 280, p. 201-210, 2009.

RUKACHAISIRIKUL, V.; KANNAI, S.; KLAIKLAY, S. PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. Rare 2-phenylpyran-4-ones from the seagrass-derived fungi Polyporales PSU-ES44 and PSU-ES83. **Tetrahedron**, v. 69, p. 6981-6986, 2013.

RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U.; CHOYEKLIN, R.; HATTORI, T.; JONES, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 139-161, 2008.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.

SIEWERS, V.; VIAUD, M.; JIMENEZ-TEJA, D.; COLLADO, I. G.; GRONOVER, C. S.; PRADIER, J.-M.; TUDZYNSKI, P. Functional Analysis of the Cytochrome P450 Monooxygenase Gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p. 602-612, 2005.

SUZUKI, T.; MIYATA, N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 935-958, 2006.

STRAUSS, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. **Fungal Genetics and Biology**, v.48, p. 62-69, 2011.

STREETER, A. J.; TIMBRELL, J. A. Studies on in vivo metabolism of hydralazine in rats. **Drug Metabolism And Disposition**, v. 11, p. 184-189, 1983.

TAKAHASHI, M.; KOYAMA, K.; NATORI, S. Four new azaphilones from *Chaetomium globosum* Var. *flavor-viridade*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 625-628, 1990.

TALSETH, T.; HAEGELE, K. D.; MACNAY, J. L. Studies in the rabbit on 3-metiltriazolophthalazine, an acetylated metabolite of hydralazine. Evidence for an alternative route of formation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 8, p. 73-76, 1979.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; NAKAJIMA, H. Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1768–1772, 2005.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; CUTLER, H. G.; NAKAJIMA, H. Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 722–725, 2006.

TODA, J.; SAITOH, T.; OYAMA, T.; HORIGUCHI, Y.; SANO, T. Thermal addition reaction of aroylketene with ethyl vinyl ether: aromatic substituent effect on aroylketene reactivity. **Heterocycles**, v. 43, p. 2457-2463, 1996.

WANG, H., XU, Z.; GAO, L.; HAO, B. A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p.195, 2009.

WANG, X.; SENA FILHO, J. G.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R.; CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an Atlantic-Forest-Soil-Derived *Penicillium citreonigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 942–948, 2010.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.6, p. 1857-2020, 2008.

XU, X.; WANG, Z.; CHENG, J.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. Trichodermin (12,13-epoxytrichethec-9-en-4b-yl 4-fluorobenzoate). **Acta Crystallographica**, v.E66, p. o2097, 2010.