

Fernanda Fraga Campos

**Isolamento e identificação de substâncias
bioativas produzidas por fungos endofíticos
associados a *Piptadenia adiantoides*
(Fabaceae)**

Belo Horizonte, MG
UFMG/Microbiologia
2009

Fernanda Fraga Campos

**Isolamento e identificação de substâncias
bioativas produzidos por fungos endofíticos
associados a *Piptadenia adiantoides*
(Fabaceae)**

Orientador: Dr. Carlos Leomar Zani
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração, Microbiologia.

Belo Horizonte, MG

2009

Dedico esta tese a minha querida sobrinha e
afilhada Luísa.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Leomar Zani, pela orientação, confiança, paciência, conhecimentos transmitidos, convivência agradável, amizade e disponibilidade dos recursos do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa, por ter me recebido em seu laboratório quando eu era ainda aluna da graduação, obrigada pelo incentivo e disponibilidade dos recursos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia da UFMG;

Ao Professor Dr. Luiz Henrique Rosa pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos;

À Dra. Tânia Alves pela importante ajuda no desenvolvimento deste trabalho e contribuição com seus conhecimentos;

Aos companheiros do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da UFMG pelo convívio, amizade e paciência;

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Dani, Paty, Ezequias, Luciana e Márcia, pela amizade, paciência e importante ajuda na confecção deste trabalho;

Aos amigos do Departamento de Microbiologia Andréa, Leo, Dra. Regina Nardi, Dra. Vera Lúcia, Dra. Maria Rosa pela amizade e convivência agradável nos curtos encontros nos corredores do ICB;

Aos colaboradores deste trabalho, Ana Rabello, Betânia Cota, Patrícia Cisalpino, Rachel Caligorne, Susana Johann e Tânia Alves a colaboração com vocês foi imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho;

À minha família, meus pais Edson (*in memoriam*) e Sueli, meus irmãos, Daniela, Marco Túlio e Thiago pelo apoio e compreensão;

À minha querida sobrinha e afilhada, Luísa Campos Portela, seu nascimento trouxe mais vida para toda nossa família, obrigado por você existir em nossas vidas. TE AMO!

Ao Glauco e família por terem me apoiado durante todo o período do doutorado;

Às amigas Bets e Susana do LQPN que sempre estavam disponíveis para me ajudar durante todo o período do doutorado. Sem vocês a vida de doutoranda teria sido muito mais difícil. Obrigada!

Agradeço especialmente à amiga Bets, pois além de amiga foi minha professora;

Às amigas, Mariana, Priscila, Fabiana, Syomara, Cristina, Poliana e Vivian, pela amizade que fizemos durante este período do doutorado. Agradeço especialmente a amiga Mariana que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho;

A Alessandra, uma pessoa incrível que conheci durante meu doutorado é que me ajudou muito nesta caminhada;

Ao revisor desta tese, Professor Ary Correa Júnior, pelas sugestões;

Aos componentes da banca de qualificação, Dra. Jovita Gazzinelli e a Dra. Patrícia Cisalpino, a contribuição de vocês foi inestimável;

A secretaria do curso de pós-graduação, ICB, UFMG;

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta Tese, obrigada!

COLABORADORES

¹ Dra. Betania Barros Cota

¹ Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

¹ Dra. Susana Johann

² Dra. Ana Lúcia Teles Rabello

² Dra. Rachel Basques Caligiorne

³ Dra. Patrícia Silva Cisalpino

¹ Laboratório de Química de Produtos Naturais – Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ.

² Laboratório de Pesquisas Clínicas – Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ.

³ Laboratório de Microbiologia – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

SUPORTE FINANCEIRO

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iv
Colaboradores.....	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	15
2. Revisão bibliográfica.....	19
2.1 Introdução as Doenças.....	20
2.1.1 Leishmaniose.....	21
2.1.2 Doença de Chagas.....	24
2.1.3 Paracoccidioidomicose.....	26
2.1.4 Câncer.....	29
2.1.5 Infecções Causadas por Microrganismos Patogênicos.....	30
2.2 Fungos Endofíticos – Fontes para a Descoberta de Novas Drogas.....	33
2.2.1 Produtos Naturais – Origem Microbiana ou Vegetal?.....	34
2.2.3 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos.....	36
2.3 <i>Piptadenia adiantoides</i>	41
2.3.1 O Gênero <i>Bipolaris</i> , Shoemaker, 1959 e seu teleomorfo <i>Cochliobolus</i>	43
2.3.2 O Gênero <i>Fusarium</i> Link, 1809.....	45
2.4 Estudo de Fungos Endofíticos – Uma Investigação Promissora.....	47
3. Objetivos.....	49
3.1 Geral.....	50

3.2 Específicos.....	50
4. Metodologia, Resultados e Discussão.....	52
5. Artigo <i>Cochliobolus</i>	54
6. Artigo <i>Fusarium</i>	82
7. Artigo <i>Bipolaris</i>	107
8. Discussão integrada.....	128
9. Conclusões.....	135
10. Perspectivas.....	138
11. Referências bibliográficas.....	140
12. Anexos.....	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania amazonensis</i> (Saúde, 2009).....	22
Figura 2. PCM no lábio inferior (Ramos-e-Silva, 2000).....	28
Figura 3. Paclitaxol, substância anticancer produzida pelo fungo <i>Taxonomyces andreanae</i> (Strobel & Daisy, 2003).....	35
Figura 4. Criptocandina, Substância antifúngica isolada de <i>Cryptosporiopsis quercinia</i> (Strobel et al., 1999).....	37
Figura 5. Citochalasin, substâncias anticancer produzidas pelo endofítico <i>Rinocladiella</i> sp. (Wagenaar et al., 2000).....	39
Figura 6. Pestacina (7) e isopestacina (8), substâncias com atividade antioxidante e antimicrobiana (Strobel & Daisy, 2003).....	40
Figura 7. <i>Piptadenia adiantoides</i> em época de floração (Rosa, 2006).....	42
Figura 8. Hierarquia taxonômica de <i>Piptadenia adiantoides</i>	42
Figura 9. 6-epi-3anhydrophiobolina B, isolada de <i>Cochliobolus</i> sp.....	44
Figura 10. Subglutininol A, substância com atividade imunossupressora isolado de <i>F. subglutinans</i> (Strobel & Daisy, 2003).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Fusarium</i> causadoras de doenças em plantas economicamente importantes.....	45
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM/MFC	Concentração Fungicida Mínima/Minimal Fungicidal Concentration
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM/MIC	Concentração Inibitória Mínima/Minimal Inhibitory Concentration
CI50/IC50	Concentração inibitória de 50% Inhibitory concentration of the 50 %
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Diode Array Detection
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
$\Delta OD/\Delta t$	Razão entre a variação da densidade óptica em um intervalo de tempo
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2- ácido etanesulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSCCC	High-Speed Counter-Current Chromatography
HSCoCC	High-Speed Co-Current Chromatography
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Infravermelho
MCF-7	Linhagem de células humanas obtidas de câncer de mama
MEA	Malte Extract Agar

μM	Micromolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazoli-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
m/z	Relação massa/carga
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCI	National Cancer Institute
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo “Roswell Park Memorial Institute”
RP	Reverse Phase
TK-10	Linhagem de células humanas obtidas de câncer renal
TLC	Thin Layer Chromatography
TryR	Enzima tripanotiona redutase
T(S)2	Tripanotiona oxidada
UACC	Linhagem de células humanas obtidas de melanoma
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

RESUMO

As doenças negligenciadas, o câncer e as doenças infecciosas constituem um importante problema de saúde para todo o mundo. Neste contexto, os fungos endofíticos da planta *Piptadenia adiantoides* foram selecionados para o isolamento de substâncias bioativas contra Leishmaniose, doença de Chagas, câncer, paracoccidioidomicose e doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias. As linhagens de fungos endofíticos isolados desta planta foram ativas contra formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de *Trypanosoma cruzi*, sendo capazes de inibir a proliferação de três linhagens de células tumorais humanas (UACC-62, MCF-7 e TK-10). Os quatro fungos selecionados, foram identificados até o nível de gênero por meio de suas características macro e micro morfológicas e também pelo sequenciamento da região inter gênica (ITS) do rDNA. Os isolados UFMGCB-540, 551, 554 e 555 foram identificados como *Bipolaris* sp., *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., e *Cochliobolus* sp. A partir do extrato do fungo *Cochliobolus* sp. foi obtido as substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A que foram ativas contra formas amastigotas “like” de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O extrato do fungo endofítico *Fusarium* sp. foi fracionado por cromatografia em corrente de alta velocidade e dois tricotecenos foram obtidos a partir da purificação das frações em cromatografia líquida de alta eficiência. Os tricotecenos 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol e a T2 toxina foram ativos contra onze isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e uma linhagem de *Candida albicans*. No entanto, os dois compostos foram 100 vezes menos ativo contra esta levedura. Os dois fungos identificados como *Bipolaris* sp. apresentaram atividade biológica contra *L. (L.) amazonensis*, inibiram a enzima tripanotiona redutase e foram ativos contra quatro isolados de *P. brasiliensis*. Além disso, quando avaliados em cromatografia líquida de alta eficiência, as duas linhagens de *Bipolaris* sp. apresentaram diferentes perfis químicos. Este trabalho corrobora o potencial dos fungos endofíticos como fonte promissora de substâncias bioativas que, no caso dos fungos *Cochliobolus* sp. e *Fusarium* sp., forneceram substâncias potencialmente úteis para o desenvolvimento de novas drogas para doenças negligenciadas. Além disso, os fungos *Bipolaris* sp. apresentaram grande potencial para isolamento de novas substâncias bioativas contra as doenças negligenciadas e o câncer.

ABSTRACT

Neglected diseases, cancer and infectious diseases constitute an important health problem in the whole world. In this context, the endophytic fungi of the plant *Piptadenia adiantoides* were selected for the isolation of bioactive compounds against Leishmaniasis, Chagas diseases, cancer, paracoccidioidomycosis and infectious diseases caused by fungi and bacteria. The strains of endophytic fungi isolated from this plant were active against amastigote-like forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, being able to inhibit the proliferation of three human tumoral cells lines (UACC-62, MCF-7 and TK-10). The four selected fungi were identified until the genus level according to their macro and micromorphologic characteristics and based on the sequence of the ITS region of rDNA. The isolates UFMGCB-540, 551, 554, and 555 were identified as *Bipolaris* sp., *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., and *Cochliobolus* sp., respectively. The compounds cochlioquinone A and isocochlioquinone A were obtained from the extract of the fungus *Cochliobolus* sp. and were actives against amastigote-like forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. The extract of *Fusarium* sp. was fractioned by high-speed co-current chromatography and two trichothecenes were obtained from the purification of its fractions in high-performance liquid chromatography. Trichothecenes 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol and T2 toxin were active against eleven isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* and against *Candida albicans*, being 100 times less active against this yeast. Both *Bipolaris* sp. presented biological activity against *L. (L.) amazonensis*, and were able to inhibit the enzyme tripanothione reductase and active against four isolates of *P. brasiliensis*. Moreover, when evaluated in high-performance liquid chromatography, both *Bipolaris* sp. presented different chemical profiles. This work corroborates for the potential of endophytic fungi as a promising source of bioactive compounds. The fungi *Cochliobolus* sp. and *Fusarium* sp. can produce potentially useful substances for the development of new drugs for the treatment of neglected diseases. In addition to this, *Bipolaris* sp. can be a great source of new bioactive compounds against neglected diseases and cancer.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) afetam um bilhão de pessoas em áreas tropicais e subtropicais do planeta (WHO, 2006). As DTNs tendem a ficar marginalizadas pelos serviços de saúde e pelo governo, pois afligem principalmente populações carentes e com pouca ou nenhuma voz política. Embora seja a causa de sofrimento, incapacitações e de deformidades que acompanham o indivíduo pelo resto da vida, estas doenças geralmente não são as maiores causas de mortalidade. Desta forma, sob condições de recurso limitado, a prioridade é dada a doenças de alta mortalidade como, por exemplo, a AIDS e tuberculose (WHO, 2006).

Protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae, subordem Trypanosomatina, são agentes causais de uma variedade de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como, por exemplo, a doença de chagas e as leishmanioses. Atualmente essas doenças representam importante problema médico e econômico para milhões de pessoas (WHO, 2006, WHO, 2008). As leishmanioses são consideradas doenças endêmicas em mais de 80 países, afetando aproximadamente 400.000 pessoas por ano e por isso causando sérios problemas de saúde pública nos países afetados (Rath *et al.*, 2003). O Glucantime e o Pentostan, medicamentos desenvolvidos há 40 anos para o tratamento das leishmanioses, são administrados via parenteral e são consideravelmente tóxicos (Rath *et al.*, 2003). Apresentando os mesmos agravantes, a Doença de Chagas afeta principalmente os países das Américas do Sul e Central. Os quimioterápicos nifurtimox e o benzonidazol são os mais utilizados atualmente e apresentam uma série de efeitos colaterais. Além disso, são pouco eficientes para o tratamento de pacientes na fase crônica da doença, estágio em que se encontra a maioria dos chagásicos do Brasil (Otero *et al.*, 2006).

Outra doença que pode ser considerada como DTNs é a Paracoccidioidomicose (PCM). A PCM é uma doença endêmica que afeta milhões de pessoas na América Latina, e que também é negligenciada pelos serviços de saúde e pelo governo. Embora existam antifúngicos efetivos para o tratamento da PCM, a doença deixa deformidades no indivíduo afetado e, para piorar a situação, todos os antifúngicos disponíveis no mercado são de uso prolongado que dependendo do caso pode chegar a dois anos de

tratamento. Contudo, se não for tratada, a PCM pode levar a morte do indivíduo (Felipe *et al.*, 2005, San-Blas & Nino-Vega, 2008). Diante do exposto, verifica-se uma necessidade para a descoberta de novas drogas que sejam mais efetivas, menos tóxicas e de fácil administração, para o tratamento das DTNs.

Por outro lado, as doenças globais como, por exemplo, o câncer e as doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas) são uma das maiores causas de mortalidade no mundo. Apesar do uso de quimioterápicos, como por exemplo, os alquilantes polifuncionais, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos, dentre outros (INCA, 2008), o câncer acomete nas suas mais variadas formas, um número cada vez maior de pessoas, e constitui uma das principais causas de morte em todo mundo (Sporn & Liby, 2005). Assim, além de uma grande necessidade, a descoberta de quimioterápicos para o tratamento efetivo do câncer é um imenso desafio.

Nos últimos anos, a dificuldade e o alto custo em identificar novas estruturas com novos mecanismos de ação em microrganismos, tornaram-se um desafio para a pesquisa farmacêutica provocando um declínio no lançamento de novas drogas no mercado (Demain, 1999). O fato, é que este declínio veio acompanhado de vários problemas para a população que necessita dos antimicrobianos, como por exemplo, o desenvolvimento de resistência dos microrganismos às drogas já existentes, o aparecimento de novas doenças (AIDS, *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes, entre outras) e a toxicidade de algumas drogas. Diante deste problema, a triagem com plantas e microrganismos para o descobrimento de novas classes de antibióticos são de extrema necessidade.

Nas últimas décadas, diversas classes de produtos naturais foram isoladas e suas estruturas identificadas. A descoberta destas estruturas juntamente com a elucidação dos mecanismos biológicos, bioquímicos e a ação terapêutica, tem sido uma abordagem importante usada pelos químicos orgânicos e medicinais no desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais são fontes inestimáveis para o desenvolvimento de novas drogas, sendo isolados principalmente de microrganismos e plantas (Clardy & Walsh, 2004, Newman & Cragg, 2004). Além destes, outros organismos como as algas, esponjas, insetos e anfíbios, também têm sido investigados (Clardy & Walsh, 2004).

Os microrganismos são responsáveis por uma variedade enorme dos produtos naturais conhecidos. Existem 50.000 metabólitos secundários de microrganismos, sendo que, 12.000 são antibióticos conhecidos. Destes 55% foram produzidos por actinomicetos e 22% por fungos filamentosos (Demain, 1999). Os fungos são considerados fontes promissoras de novas drogas para uso terapêutico e de fato, diversos medicamentos utilizados nos centros de saúde são derivados de metabólitos de fungos (Strobel & Daisy, 2003, Ferrara, 2006). Nas últimas duas décadas, um grupo de microrganismos que se destacou para a produção de metabólitos bioativos foi o dos endofíticos, especialmente os fungos. Estes organismos representam uma importante fonte genética para a biotecnologia, tendo estimulado o interesse da comunidade científica devido à produção de metabólitos secundários com aplicações, principalmente, na indústria alimentícia e farmacêutica (Strobel & Daisy, 2003). Os fungos endofíticos são fontes de novos antibióticos, imunossuppressores e substâncias anticancer (Ferrara, 2006).

Com o objetivo de isolar substâncias bioativas contra as DTNs, o câncer e as doenças infecciosas (causadas por bactérias e fungos), decidiu-se trabalhar com os fungos endofíticos da planta *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae). Esta decisão fundamentou-se em resultados preliminares obtidos por pesquisadores do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CPqRR/FIOCRUZ, que demonstraram que além do extrato do caule desta espécie ser altamente tóxico para células tumorais da linhagem UACC-62 (melanoma), várias linhagens de fungos endofíticos isolados desta planta eram ativos contra formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e de *Trypanosoma cruzi*, sendo algumas capazes de inibir a proliferação de três linhagens de células tumorais humanas (UACC-62, MCF-7 e TK-10) (Luiz H. Rosa, 2007, dados não publicados). Desta forma, quatro isolados de fungos endofíticos de *P. adiantoides* foram selecionados para o isolamento das substâncias bioativas.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução

De acordo com a última proposta realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) as doenças foram classificadas em globais (que ocorrem em todo mundo), negligenciadas (mais prevalentes em países em desenvolvimento) e extremamente negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). As doenças negligenciadas são por definição doenças que não dispõe de tratamentos eficazes ou adequados e que apesar dos avanços na ciência, desenvolvimento de novas drogas e diagnóstico rápido e preciso afetam milhares de pessoas principalmente em países em desenvolvimento (Morel *et al.*, 2005). Vários termos são utilizados para referenciar estas doenças, entretanto, neste trabalho, será dada prioridade para o termo Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).

As DTNs listadas pela OMS são: Tuberculose, Leishmaniose, Doença de Chagas, Malária, Esquistosomose, Dengue, Doença do Sono, Tripanossomíase Africana dentre outras (WHO, 2008b, Morel *et al.*, 2005). Neste trabalho foram priorizadas a Leishmaniose, Doença de Chagas e Paracoccidiodomicose (PCM). A PCM foi incluída como doença negligenciada, pois sua prevalência está aumentando e ainda não existe drogas realmente eficazes para seu tratamento.

As doenças globais por outro lado, ao contrário das DTNs são um grupo de doenças que podem ou não dispor de tratamentos eficazes e não estão restritas a um grupo de países, elas podem ocorrer no mundo todo (Morel *et al.*, 2005). Apesar de ser um grupo enorme de doenças, neste trabalho serão abordados somente o câncer e as infecções causadas por microrganismos patogênicos.

2.1.1 Leishmaniose

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as leishmanioses são doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade, prevalentes em países

tropicais e subtropicais em quatro continentes. As leishmanioses são responsáveis por doze milhões de casos em todo o mundo, com aproximadamente dois milhões de novos casos anuais. Expõe ao risco, mais de trezentos e cinquenta milhões de pessoas (adultos e crianças) em diferentes pontos do mundo, estima-se que, cerca de 60.000 mortes por ano sejam devido às leishmanioses (Roberts *et al.*, 2000, Handman, 2001, Desjeux *et al.*, 2004, Desjeux, 2004, WHO, 2003, WHO, 2006, WHO, 2002).

Diversos trabalhos de pesquisadores vinculados a OMS reconhecem que as leishmanioses têm maior impacto em 88 países, dos quais 66 são do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo. Nestes países as leishmanioses estão em intensa atividade dificultando a produtividade e o progresso sócio-econômico (Desjeux, 2001, Desjeux *et al.*, 2004). Muitos deles são países em desenvolvimento (países pobres), que de antemão sofrem com sérios problemas econômicos, sociais e de saúde pública, como por exemplo, Afeganistão, África, Iran, Arábia Saudita, Síria, Índia, Bangladesh, Sudão, Brasil, Bolívia e Peru. Nestes países, essas enfermidades vêm ganhando, anualmente, grandes proporções devido a fatores de risco tanto ambientais quanto a fatores cultural-comportamentais (Desjeux, 2001, Desjeux *et al.*, 2004, Murray *et al.*, 2005, WHO, 2002, WHO, 2006).

Os primeiros estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses caracterizaram-nas como doenças exclusivamente rurais, compreendendo lesões que afetam a pele e os órgãos (ou vísceras) (Figura 1). Estas doenças, que eram restritas a áreas rurais, com o passar do tempo, também se tornaram comuns em áreas suburbanas e urbanas (Gontijo & Melo, 2004). Essa nova distribuição aconteceu como resultado de problemas que envolvem aspectos ambientais, sociais e econômicos, possivelmente associados aos processos de fluxos populacionais em massa das áreas rurais para os centros urbanos, gerando um potente fator de risco para a disseminação da doença: a urbanização descontrolada (WHO, 1999, WHO, 2002, Desjeux *et al.*, 2004, Desjeux, 2004, Gontijo & Melo, 2004, WHO, 2006, WHO, 2008a).

Esses parasitos foram sistematicamente alocados no grupo dos protozoários e são taxonomicamente classificados na Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.



Figura 1. Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania amazonensis* (Saúde, 2009).

As leishmanioses são basicamente resultantes da transmissão das formas infectantes – promastigotas metacíclicas – para hospedeiros mamíferos, quando o inseto vetor fêmea infectado vai exercer seu hematofagismo. Os hospedeiros invertebrados das espécies de *Leishmania* são dípteros flebotomíneos (subfamília Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus* (distribuído no Velho Mundo) e do gênero *Lutzomyia* (distribuído no Novo Mundo). Duas espécies bastante estudadas e que podem ser encontradas no Brasil transmitindo os parasitos são: *Lutzomyia longipalpis* e *L. whitmani*, as quais possuem a denominação popular de “mosquito palha” (Azevedo *et al.*, 1996, Mutebi *et al.*, 1999, Uribe, 1999).

O gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan[®] (Bayer) ou Pentostam[®] (Glaxo Wellcome), foi introduzido na terapia médica em 1936 (Berman, 1988). Na década de 40, surgiu na França um medicamento alternativo, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime[®] (Rhône-Poulenc-Rohrer) ou antimoniato de meglumina (Rath *et al.*, 2003). No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina (Rath *et al.*, 2003). O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasito (Rath *et al.*, 2003). Os efeitos colaterais frequentemente associados ao uso destas drogas são mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (Serenio & Lemesre, 1997). Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a Pentamidina, Anfotericina B, Paromomicina, Miltefosina, Imidazoquinolina e Sitamaquina (Rath *et al.*, 2003).

A pentamidina é comercializada sob o nome de Lomidina[®]. A substância é particularmente útil em casos que não respondem aos antimoniais ou para pacientes com leishmaniose visceral que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (Berman, 1988).

A Anfotericina B é um antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, que pode ser incorporada em lipossomas carregadores sendo absorvida pelo sistema reticuloendotelial onde o parasito da *Leishmania* reside, e é assim pouco absorvido pelos rins, o maior órgão alvo para a toxicidade da anfotericina (Yardley & Croft, 2000, Bern *et al.*, 2006). Estudos confirmaram que o AmBisome[™] é consideravelmente menos tóxico que a Anfotericina B convencional. O AmBisome[™] provou ser eficaz tanto no tratamento da leishmaniose cutânea como mucocutânea, sendo utilizado nos casos onde existe falha com a terapia de antimoniais (Yardley & Croft, 2000).

Outro medicamento que se tem mostrado efetivo contra a leishmaniose visceral é a Paromomicina (também chamada aminosidina), antibiótico aminoglicosídeo que é ativo contra espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo* (Martinez & Marr, 1992). Estudos clínicos para testar a eficácia da paromomicina injetável contra a leishmaniose visceral, têm sido realizados na Índia, onde o tratamento antimonial padrão não é muito efetivo e as taxas de mortalidade são altas (Martinez & Marr, 1992).

Atualmente, todos os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são injetáveis. A Miltefosina, uma droga anti-câncer, é ativa contra *Leishmania spp*, *in vitro* e *in vivo*, e pode vir a ser o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral (Fischer *et al.*, 2001). Resultados de estudos de fase II, na Índia, indicam que quando a Miltefosina é oralmente administrada é bem tolerada.

Os efeitos adversos causados pela utilização destes medicamentos comprometem o tratamento do paciente. A maioria é de administração via parenteral, além disso, são tóxicos e o tratamento é de longa duração (Ouellette, 2004). Para agravar a situação, linhagens do parasito resistentes a drogas disponíveis no mercado são constantemente encontrados. Outro fator importante são as interferências do sistema imune do paciente

e a variação intrínseca de sensibilidade às drogas, o que compromete a eficácia do tratamento (Ouellette *et al.*, 2004). Contudo, apesar das opções no mercado, sem dúvida alguma, ainda faz-se necessário estudos para a descoberta de novas drogas para o tratamento das leishmanioses.

2.1.2 Doença de Chagas

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta em 1909, pelo cientista brasileiro Carlos Chagas. Segundo estimativas da OMS (WHO, 2008b), a doença de Chagas afeta 18 países das Américas Central e do Sul, desde o norte do México até o sul da Argentina. São mais de 17 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, com quase 3,5 milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200 mil novos casos. Segundo Otero e colaboradores (2006), 25% a 30% dos casos diagnosticados progridem para complicações cardíacas e gastrintestinais irreversíveis, sendo estas a causa de um número considerável de mortes pela doença.

De acordo com a OMS (WHO, 2008b) vários fatores contribuem para a alta taxa de mortalidade da doença, como por exemplo, a região, idade, condições de saúde do paciente, tratamento precoce ou tardio, tipo de medicamento, dentre outros. Dessa forma, a taxa de mortalidade pela Doença de Chagas pode variar entre 8% a 12%. Um índice de 21 mil mortes anuais causadas pela Doença de Chagas foi constatado no ano de 2002.

O agente etiológico da Doença de Chagas é o protozoário flagelado *T. cruzi*, pertencente a ordem Kinetoplastidae e família Tripanosomatidae. O *T. cruzi* é transmitido de um hospedeiro a outro por insetos hematófagos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Dias *et al.*, 2008), sendo o principal transmissor o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro ou chupão.

Desde o início da década de 70 somente dois medicamentos antichagásicos tem sido amplamente utilizados: o Nifurtimox e o Benzonidazol, comercializados com os nomes de Lampit[®] e Rochagan[®], respectivamente (Otero *et al.*, 2006). Entretanto, estes

dois fármacos, além de serem pouco específicos, são também muito tóxicos. Outra limitação é que o tratamento é longo e por isso causa muitos efeitos colaterais.

Os efeitos colaterais associados ao uso do Nifurtimox incluem anorexia, perda de peso, vômitos, excitabilidade ou sono excessivo, problemas digestivos, cólicas intestinais e diarreia. Em relação ao Benzonidazol, os efeitos são febres, dores musculares e nas articulações, hipersensibilidade e dermatite (Coura & de Castro, 2002). O resultado obtido com esses medicamentos varia de acordo com a fase da doença, o período, a dose prescrita, a idade e a origem dos pacientes. De acordo com Coura & de Castro (2002) esses medicamentos podem curar até 80% dos pacientes mais jovens com a doença na fase aguda. Segundo o referido autor a cura para a doença na fase crônica é de apenas 8% dos casos. No Brasil, somente o Benzonidazol é comercializado. Os efeitos adversos causados pelo uso destes medicamentos limitam o tratamento da doença, além disso, diferenças de suscetibilidade dos parasitos às drogas é outro fator agravante.

Tripanotiona redutase – um alvo terapêutico para tripanosomatídeos

A enzima tripanotiona redutase (TR) é uma flavoenzima que está presente em parasitos protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastidae e família Tripanosomatidae. Nestes parasitos o sistema de oxi-redução envolve a participação da tripanotiona/tripanonotona redutase, enquanto que na maioria dos organismos vivos quem faz este papel é a glutathione/glutathione redutase (Fairlamb & Cerami, 1992). A função da TR é catalisar a redução do seu substrato tripanotiona dentro do citoplasma celular, uma vez que o acúmulo de dissulfetos (TS_2) afeta o equilíbrio tiólico-redox e conseqüentemente, a atividade metabólica do parasito. A principal forma encontrada nos parasitos é a forma ditiol ($T[SH]_2$).

Tanto a TR quanto a GR possuem um alto grau de homologia estrutural, e ambas catalisam a reação de redução NADPH-dependente por mecanismos análogos (Bond *et al.*, 1999). Apesar das similaridades, as duas enzimas apresentam especificidade completa apenas para seus respectivos substratos (Garrard *et al.*, 2000). Esta distinção metabólica entre o parasito e o hospedeiro e o fato da dependência da TR para o crescimento e virulência do parasito, torna esta enzima um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias (Fairlamb, 2003).

2.1.3 Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz, em 1908, em São Paulo, Brasil. Também é conhecida por Doença de Lutz-Splendore-Almeida ou Blastomicose Sul Americana (Rivitti & Aoki, 1999). A PCM é endêmica na América Latina, onde dez milhões de pessoas são infectadas e destes 2% desenvolvem a doença (de Almeida *et al.*, 2005). Entretanto, em áreas de grande endemicidade, como o Brasil, a incidência anual é de três casos para 100,000 habitantes, com faixa de letalidade de 2 a 23% (Felipe *et al.*, 2005). A maioria dos países da América Latina relata a ocorrência do fungo, com maior incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (Marques, 1998).

A distribuição geográfica do fungo está diretamente relacionada com o clima. A maioria dos fungos ocorre em áreas tropicais e sub-tropicais, com solo ácido, temperaturas variando entre 17° a 24°C, em altitudes entre o nível do mar de 1500 m e com índice pluviométrico entre 500 a 2.500 mm/ano (Rivitti & Aoki, 1999, Marques, 1998).

O número de pacientes clinicamente diagnosticados com PCM representa uma pequena proporção dos indivíduos infectados (de Almeida *et al.*, 2005). A primeira infecção usualmente ocorre nas primeiras duas décadas da vida (Rivitti & Aoki, 1999), mas também pode desenvolver muitos anos depois, dependendo de múltiplos fatores da resposta imune do hospedeiro, tais como, o uso de imunossupressores, idade e existência de outras doenças. Mulheres em idade fértil são menos afetadas pela PCM por causa da presença de receptores de β -estradiol no citoplasma do micélio e da levedura do *Paracoccidioides brasiliensis*.

O fungo *P. brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae (Bagagli, 2006). O fungo *P. brasiliensis* é considerado um fungo termodimórfico. A forma micelial é encontrada a temperatura ambiente 25°C, produz colônias lentamente entre 3 a 4 semanas e quando observado sob o microscópio, apresenta hifas finas e septadas com presença de clamidósporos (Marques, 1998). A forma micelial é a forma infectante do fungo. A forma leveduriforme está presente em exudato de tecidos dos hospedeiros e cresce somente a 37°C. Esta forma apresenta estruturas ovóides que reproduzem por gemulação. Essa transição morfológica é

determinada pela temperatura ambiente e está diretamente correlacionada com a invasão no hospedeiro (Felipe et al., 2005, Body, 1996).

Dados epidemiológicos sugerem que o homem provavelmente é infectado via inalação dos conídios do ar (Tavares *et al.*, 2007). A doença pode apresentar varias formas. A infecção por *P. brasiliensis* que não causa doença é conhecida apenas como paracoccidioidomicose infecção (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A paracoccidioidomicose doença causada por *P. brasiliensis* pode surgir em seqüência à infecção primária ou por reativação depois do período de latência, que pode durar muitos anos. Usualmente o fungo penetra pelo trato respiratório e chega aos pulmões por inalação. A PCM pulmonar ocorre em 80% a 90% dos casos (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Entretanto, a PCM ocorre também por inoculação via pele ou ingestão, sendo estas formas mais raras (Rivitti & Aoki, 1999). As duas formas principais da doença são: aguda ou sub-aguda (forma juvenil) e a crônica (forma adulta). Na forma juvenil o comprometimento cutâneo ocorre em 54% dos casos. A taxa de letalidade nesta forma é de 11%, isto reflete a severidade da doença (Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008, Marques, 1998). A forma adulta é responsável por mais de 90% dos casos relatados, a maioria em homens adultos, com progressão lenta podendo levar anos para se desenvolver completamente. A forma adulta de PCM afeta primariamente o pulmão, mas pode ocorrer infecção da cavidade oral (Figura 2) por meio das secreções advindas do pulmão. Os locais mais afetados são: lábio inferior, a membrana mucosa da boca, a língua, o palato e região sublingual (Marques, 2003). Frequentemente, as lesões nestes locais são desprovidas de infecções secundárias.



Figura 2. PCM no lábio inferior (Ramos-e-Silva, 2000).

A cura espontânea da PCM não é um fato comum, exceto em alguns casos de infecção primária nos pulmões (San-Blas *et al.*, 2002). Apesar da existência de tratamentos para a PCM, o diagnóstico não é realizado com facilidade devido a natureza polimórfica das lesões, isto leva a progressão da doença e consequentemente, deixa seqüelas irreversíveis (Restrepo, 1994). Apesar de vários medicamentos disponíveis para o tratamento da PCM, não existe um consenso de qual a melhor droga a ser usada, sendo que a escolha depende da experiência obtida por cada centro de saúde (Ramos-E-Silva & Saraiva, 2008).

As drogas clássicas usadas para o tratamento da PCM são as sulfonamidas, Anfotericina B e derivados de Azólicos, como o Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol. O Voriconazol é um novo triazólico antifúngico de segunda geração de administração via oral e intravenosa. É uma boa opção para o tratamento de PCM neurológica, devido a sua penetração no sistema nervoso central, entretanto seu alto custo é uma das limitações para seu uso (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

O tratamento da PCM é longo e geralmente as drogas utilizadas causam enormes efeitos colaterais. A utilização da Anfotericina B como escolha de tratamento exige internação, pois só pode ser administrada via endovenosa, além disso, é muito tóxica. Por outro lado, tratamentos com Azólicos são menos tóxicos e podem ser administrados via oral, mas na maioria dos casos, a seqüela fibrótica persiste podendo causar recidivas. Apesar dos medicamentos disponíveis na indústria farmacêutica, percebe-se o quanto a PCM é negligenciada. Estudos para descoberta de novos medicamentos para o tratamento da PCM são quase inexistentes, especialmente pesquisas na área de produtos naturais. Diante deste contexto, a descoberta de novas fontes para o tratamento da PCM é uma necessidade para todos os países onde esta doença é endêmica.

2.1.4 Câncer

O Câncer não se constitui de uma só doença, mas sim de um conjunto de mais de 200 doenças diferentes, com multiplicidade de causas, história natural diversa e uma gama imensa de abordagens terapêuticas (WHO, 2007, INCA, 2008). O câncer tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores. Por outro lado, um tumor maligno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original (WHO, 2007, INCA, 2008).

No Brasil as estimativas para o ano de 2008, validas para 2009 apontam que ocorreram 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes a exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008).

Estima-se que os agentes infecciosos sejam responsáveis por 18% dos casos diagnosticados de câncer no mundo. Os agentes infecciosos mais comuns associados aos cânceres são: papiloma vírus humano (HPV), o *Helicobacter pylori* e os vírus das hepatites B e C (WHO, 2007). Segundo a OMS o HPV está associado a 100% de casos de câncer de colo do útero no mundo e 5,2% de cânceres diversos, em ambos os sexos. No Brasil, o vírus é responsável por 8,1% de neoplasias malignas em mulheres. O HPV está associado a cânceres na área genital, além da boca e faringe (WHO, 2007).

A bactéria *H. pylori*, está associada ao desenvolvimento do carcinoma e do linfoma gástrico. Nos países em desenvolvimento, é responsável por 78% do total de cânceres do estômago e, no Brasil, por 65%. O número de casos novos de câncer de estômago estimados para o Brasil, no ano de 2008, é de 14.080 para homens e 7.720 nas mulheres (INCA, 2008).

Os vírus da hepatite B e C são responsáveis pelos cânceres no fígado. Nos países em desenvolvimento, o HBV e o HCV são responsáveis por 58% e 33,4%,

respectivamente. Nos casos de infecções associadas HBV e HCV, o número estimado aumenta ainda mais (INCA, 2008, WHO, 2007).

O tabagismo é a principal causa de câncer. Além do câncer de pulmão, o uso do tabaco é também fator de risco para câncer de laringe, pâncreas, fígado, bexiga, rim, e leucemia mielóide. O tabaco associado ao consumo de bebida alcoólica pode gerar o câncer da cavidade oral e esôfago (WHO, 2007). Vários fatores podem contribuir para o aparecimento do câncer. Diversos estudos mostram que tabagismo, alimentação, consumo de bebidas alcoólicas, excesso de peso, exposição ao sol, exposição a substâncias cancerígenas, dentre outros, são fatores de risco para o desenvolvimento do câncer (WHO, 2007).

A detecção precoce é um dos métodos mais eficazes para combater qualquer tipo de câncer. Após a confirmação diagnóstica, é necessário determinar a extensão do câncer no organismo, que auxiliará na escolha do tratamento, na identificação do prognóstico, no tempo de terapia e na padronização do protocolo de tratamento. As principais modalidades de tratamento são cirurgias e a radioterapia/quimioterapia. Cirurgia e radioterapia são apropriadas para tratamento da doença localizada e regional, e pode curar nos estádios precoces do câncer. Em estágios avançados a cirurgia e a radioterapia não são muito eficazes. A quimioterapia pode curar alguns tipos de câncer e ter atuação em doenças disseminadas (INCA, 2008). Os principais agentes quimioterápicos empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos, dentre outros (INCA, 2008). A busca por drogas mais seletivas e menos tóxicas para o tratamento do câncer é constante. Muitos trabalhos de triagem para selecionar substâncias citotóxicas são realizados por diversos pesquisadores, entretanto, essa luta é um desafio para a pesquisa científica. A toxicidade apresentada por estes quimioterápicos é preocupante, especialmente considerando pacientes imunocomprometidos.

2.1.5 Infecções Causadas por Microrganismos Patogênicos

Apesar do sucesso da descoberta dos antibióticos no passado, nas duas últimas décadas houve um aumento significativo das infecções causadas por microrganismos.

Segundo Butler (2005) as doenças infecciosas estão em segundo lugar como causa de morte em todo mundo. Infecções bacterianas causam 17 milhões de mortes globais, sendo as crianças e os idosos os mais atingidos.

O aumento no número de infecções fúngicas e bacterianas se devem a vários fatores como, por exemplo, a resistência dos microrganismos às drogas, o aparecimento de novas doenças como a AIDS, doença aguda do sistema respiratório e doenças autoimunes, além disso, pacientes imunocomprometidos, tais como, pacientes com câncer, transplantados, idosos e crianças são alvos para infecções nosocomiais. Para agravar a situação, tratamentos prolongados com drogas antifúngicas e/ou antibacterianas, hemodiálise e procedimentos invasivos (uso de cateteres) são fatores intrínsecos para o surgimento de resistência dos microrganismos (Butler, 2005).

Dentro deste contexto, é possível citar alguns microrganismos causadores de infecções nosocomiais, sendo alguns destes discutidos adiante. Neste trabalho serão abordadas duas bactérias de importância clínica, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, duas leveduras oportunistas de maior importância médica *Candida albicans* e *C. krusei* e finalmente um patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans* e um fitopatógeno *Cladosporium sphaerospermum*.

Staphylococcus aureus – os estafilococos ocorrem em grupos que se assemelham a cachos de uva. São anaeróbicos facultativos e crescem bem sob alta pressão osmótica e pouca umidade (Tortora, 2005). São responsáveis por doenças com baixa morbidade e mortalidade, como por exemplo, foliculite e intoxicação alimentar, mas também por doenças severas e fatais como a endocardite e a síndrome do choque tóxico (Kuehnert *et al.*, 2006). O aumento da resistência deste microrganismo às drogas e o aparecimento de estafilococos meticilina-resistente, tem se tornado um grave problema nos centros de saúde. Apesar de não ser causa de doenças negligenciadas, doenças causadas por *S. aureus* são graves e afetam a população mundial.

Escherichia coli – são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, muitas vezes chamados de entéricos. O nome se refere o fato da bactéria ser encontrada no trato intestinal de humanos e outros animais (Tortora, 2005). Todas as linhagens patogênicas possuem fímbrias especializadas que permitem a ligação da bactéria às células do epitélio intestinal. São produtoras de toxinas que causam distúrbios

gastrointestinais, denominado coletivamente de gastroenterite por *E. coli*. Essa bactéria é o principal coliforme fecal encontrado em águas contaminadas, sendo responsável por 75% dos casos de pielonefrite (Santiago *et al.*, 2005).

***Candida* spp.** – as leveduras do gênero *Candida* são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. As candidoses são as infecções produzidas por leveduras do gênero *Candida*. A maioria destas infecções é causada pela levedura *C. albicans*, no entanto, outras leveduras como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* podem causar infecções (Weinberger *et al.*, 2005). Essas leveduras fazem parte da microbiota normal, entretanto, em indivíduos imunologicamente comprometidos, elas tornam-se patógenos oportunistas. Especialmente as leveduras *C. krusei* e *C. glabrata* são leveduras oportunistas que estão cada vez mais resistentes aos antifúngicos disponíveis no mercado (Bard *et al.*, 2005).

Cryptococcus neoformans – a principal característica dessas leveduras é a produção de uma cápsula polissacarídica (Tortora, 2005). As espécies causadoras de doenças em humanos são *Cryptococcus neoformans* e o *Cr. gattii*. Estas leveduras são responsáveis pela doença denominada criptococose. Estes microrganismos possuem vários fatores de virulência, como por exemplo, a produção da cápsula, crescimento a 37°C, produção de melanina, dentre outros (Janbon, 2004). A doença se expressa como uma meningite crônica e se não tratada, pode causar morte. Para o tratamento da doença é utilizada a combinação da Anfotericina B com Flucitosina, entretanto taxa de mortalidade é alta, aproximadamente 30%.

Cladosporium sphaerospermum – os fungos deste gênero são considerados fitopatógenos. O *C. sphaerospermum* é considerado um contaminante do ar, sendo encontrado no mundo todo. Geralmente é isolado de locais fechados e abertos, habitações, ocasionalmente de humanos e frequentemente de plantas (Park *et al.*, 2004). São contaminantes de plantas especialmente folhas e galhos em decomposição (Barbosa *et al.*, 2001). Entretanto este fungo é muito sensível a maioria dos antifúngicos e consequentemente sua utilização para identificação substâncias ativas contra outros fungos é uma estratégia adequada.

2.2 Fungos Endofíticos – Fontes para a Descoberta de Novas Drogas

Os fungos são microrganismos eucarióticos, aclorofilados, produtores de esporos, com nutrição por absorção, capazes de se reproduzirem tanto sexuada quanto assexuadamente, cujas células estão envolvidas por parede celular, rica em quitina e também com galactose e manana, sua membrana celular é rica em ergosterol (Alexopoulos, 1996, Kirk, 2001). Alguns fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, e outros multicelulares, como os fungos filamentosos. Nestes últimos, a hifa constitui o micélio do fungo, que cresce alongando-se por crescimento apical. Praticamente qualquer parte do fungo é capaz de crescer, e um fragmento do organismo é capaz de produzir um novo ponto de crescimento e gerar um novo indivíduo. Estruturas reprodutivas são diferentes das estruturas somáticas e, por exibirem uma variedade de formas, são extremamente úteis para a classificação taxonômica dos fungos (Alexopoulos, 1996).

A nutrição dos fungos ocorre pela liberação de exoenzimas sobre algum tipo de substrato. Os fungos necessitam basicamente de carbono e nitrogênio para sua nutrição. Outras fontes como, fósforo, cálcio, potássio, magnésio e elementos traços também são utilizadas por estes microrganismos (Kirk, 2001). São aeróbios em sua maioria, apesar de alguns estarem envolvidos em processos fermentativos, sendo em alguns casos, capazes de sobreviverem em condições de anaerobiose (Alexopoulos, 1996).

A partir da descoberta dos endofíticos em 1904, vários pesquisadores têm definido estes organismos de diversas maneiras (Tan & Zou, 2001). Segundo Petrini (1991), os fungos endofíticos colonizam os tecidos saudáveis de partes aéreas das plantas em algum período do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Já Bacon (2000) define os fungos endofíticos como microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar algum dano imediato ao seu hospedeiro. Os endofíticos diferem dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatógenos, que lhes causam doenças (Souza, 2004). As interações endófito/planta ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a

diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Gunatilaka, 2006, Kogel *et al.*, 2006).

De acordo com as estimativas feitas por Hawksworth (2001), existe cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas 5% estão descritos. Por outro lado, estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, cada uma hospede no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos, podendo-se talvez chegar a um milhão de espécies de fungos, considerando-se apenas os endofíticos (Strobel & Daisy, 2003). Consequentemente são grandes as chances de se encontrar novos microrganismos endofíticos dentre os milhares de plantas nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se numa fonte rica, de diversidade genética e, possivelmente, de novos produtos naturais (Strobel & Daisy, 2003).

Neste contexto, as florestas tropicais são consideradas ecossistemas com grande diversidade biológica quando comparadas às florestas temperadas (Bills, 2002). Diversidade biológica implica em diversidade química, pois no contexto da corrida evolucionária, sobrevive o organismo capaz de estar em constante inovação química (Bills, 2002). Florestas tropicais são excelentes exemplos desse tipo de ambiente. A competição é constante, os recursos são limitados e a pressão seletiva está em seu ápice. Isto faz com que seja alta a probabilidade das florestas tropicais serem fontes de novas estruturas moleculares e combinações biologicamente ativas (Bills, 2002). De fato, os mesmos autores mostram que endofíticos de ambientes tropicais, fornecem um maior número de produtos naturais quando comparados com endofíticos de regiões temperadas, além disso, notaram que é significativamente alto o número de endofíticos tropicais produzindo um grande número de metabólitos secundários ativos, se comparado com os fungos de florestas temperadas. Esta observação sugere a importância do ambiente em que a planta hospedeira está inserida sobre o metabolismo dos endofíticos.

2.2.1 – Produtos naturais – origem microbiana ou vegetal?

Existe uma troca de metabólitos secundários entre plantas e fungos onde algumas plantas que produzem produtos naturais fornecem metabólitos para os fungos endofíticos e vice-versa. O paclitaxol (1) (Figura 3) é um diterpenóide que apresenta

atividade citotóxica e é utilizado na clínica como agente anticâncer. O paclitaxol foi originalmente encontrado em espécies vegetais do gênero *Taxus* (Stierle *et al.*, 1993). Para a surpresa dos pesquisadores, em 1993, outro paclitaxol produzido pelo fungo *Taxonomyces andreanae*, foi isolado e caracterizado de *Taxus brevifolia*. Tan & Zou, (2001) acreditam que alguns endofíticos produzem certas substâncias químicas de origem vegetal e, que esses produtos seriam originalmente característicos da planta hospedeira. Segundo estes autores, os produtos poderiam estar relacionados a uma recombinação genética do endofítico com a planta hospedeira que ocorre durante a evolução dos mesmos. Está é uma idéia que estava originalmente proposta como um mecanismo para explicar por que o fungo endofítico *T. andreanae* produz o paclitaxol (Stierle *et al.*, 1993).

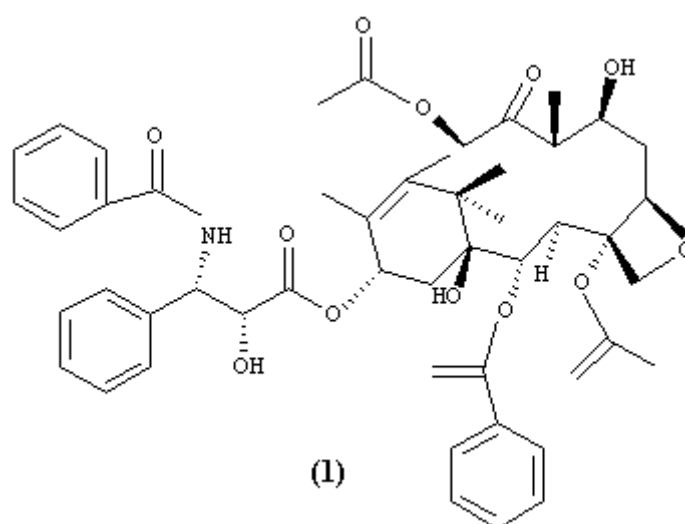


Figura 3. Paclitaxol, substância anticancer produzida pelo fungo *Taxonomyces andreanae* (Strobel & Daisy, 2003).

Deste modo, caso o endofítico tenha habilidade de produzir, assim como sua planta hospedeira, o mesmo metabólito bioativo, isto só não reduziria a necessidade de coletar plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, mas também preservaria a biodiversidade. Além disso, é reconhecido que uma fonte microbiana de um produto valorizado pode ser mais fácil e econômico para produzir, reduzindo eficazmente seu custo no mercado (Stierle *et al.*, 1993). Dessa forma, mais informações sobre a biologia de uma determinada espécie de planta e seu microrganismo seriam essencialmente úteis para dirigir a procura por produtos bioativos. De acordo com a

literatura, o papel dos endofíticos na natureza não está claro, mas sua relação de hospedeiro com várias espécies de plantas é bem conhecida (Strobel & Daisy, 2003).

Vários isolados de endofíticos pertencentes à mesma espécie são obtidos da mesma planta e apenas um dos isolados têm a capacidade de produzir uma substância biologicamente ativa *in vitro* (Li *et al.*, 1996). Além disso, existe uma grande incerteza em relação ao que os endofíticos produzem *in vitro* e o que podem produzir na natureza. A produção de certas substâncias bioativas pelo endofítico pode facilitar a dominação de seu nicho biológico dentro da planta e/ou também oferecer proteção para a planta contra microrganismos patogênicos prejudiciais e invasores. Entretanto, esta afirmação só pode ser considerada verdadeira se o produto bioativo do endofítico for produzido somente por este e não pelo hospedeiro (Li *et al.*, 1996).

Aparentemente, essas informações facilitariam o estudo da função do endofítico e o seu papel na planta, mas poucas informações existem referentes à bioquímica e fisiologia das interações do endofítico com a planta hospedeira. Fatores que alteram a biologia do hospedeiro como, por exemplo, a estação do ano, idade, ambiente e local podem influenciar na fisiologia do endofítico, bem como nas espécies de endofíticos presentes (Strobel & Daisy, 2003). Estas interações químicas são provavelmente mediadas para algum propósito no ciclo biológico. Uma definição do papel destes organismos na natureza fornecerá as melhores informações para um alvo particular com grande potencial para a bioprospecção (Strobel & Daisy, 2003).

2.2.3 Produtos Naturais de Fungos Endofíticos

Antibióticos produzidos por microrganismos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, ativos em baixas concentrações contra outros microrganismos (Demain, 1999). Os fungos endofíticos, freqüentemente, são fontes desses antibióticos. Produtos naturais de fungos endofíticos inibem ou matam uma variedade de agentes causadores de doenças nocivas, incluindo fitopatógenos, bem como, bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam a população humana, os animais e as plantas (Demain, 1999).

Como exemplo, em um estudo *in vitro* realizado com o fungo *Cryptosporiopsis quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*, o extrato do fungo

apresentou atividade antifúngica contra alguns patógenos humanos, tais como, *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. A partir do estudo químico deste fungo, a substância criptocandina (2) foi isolada (Figura 4) (Strobel *et al.*, 1999). Esse composto tem um número peculiar de aminoácidos hidroxilados e também um novo aminoácido: 3-hidroxi 4-hidroximetil prolina (Strobel *et al.*, 1999).

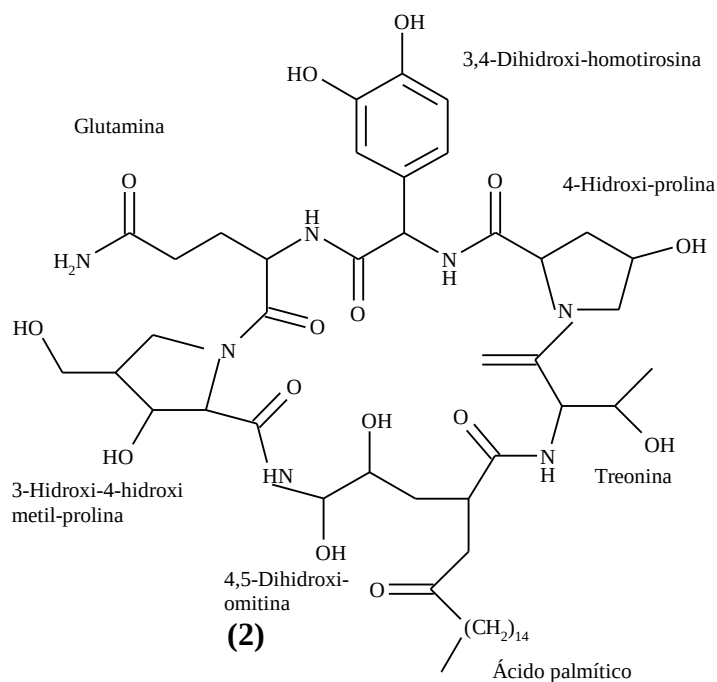


Figura 4. Criptocandina, substância antifúngica isolada de *Cryptosporiopsis quercina* (Strobel *et al.*, 1999).

Sette *e colaboradores*, (2006), isolaram 39 fungos de *Coffea arabica* e *C. robusta*. Os autores mostraram que os gêneros *Aspergillus*, *Bionectria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Oxysporum*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Talaromyces* e *Trichoderma* inibiram pelo menos uma das sete bactérias testadas: *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e mais quatro sorotipos diferentes de *E. coli* (Sette *et al.*, 2006).

A produção de metabólitos voláteis por fungos endofíticos confere a estes microrganismos uma nova aplicação. Em estudos realizados com os fungos endofíticos do caule da planta *Cinnamomum zeylanicum*, o fungo *Muscodor albus* apresentou atividade fungicida e bactericida contra uma variedade de microrganismos por meio da produção de uma mistura de metabólitos voláteis (Strobel *et al.*, 2001). Os metabólitos

voláteis foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A classe de metabólitos que apresentou maior inibição dos microrganismos alvo foram os ésteres, sendo o acetato de isoamila o mais ativo (Strobel et al., 2001). Com o mesmo objetivo anterior, Worapong *e colaboradores*, (2002), verificaram que o endofítico *Gliocladium* sp., produziu compostos voláteis com atividade antimicrobiana. Esta atividade biológica verificada foi inédita para este fungo. Embora sejam estudos semelhantes, os metabólitos encontrados são totalmente diferentes daqueles encontrados em *M. albus*, além disso, a bioatividade de *Gliocladium* sp., não está bem definida quanto à do *M. albus* (Worapong et al., 2002).

Outra aplicação dos produtos naturais dos fungos endofíticos é a inibição de agentes virais. Dois novos inibidores de uma protease de citomegalovírus foram isolados a partir do cultivo em meio sólido do fungo *Cytonaema* sp. As estruturas do ácido citônico A e B foram elucidadas por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear - RMN (Guo et al., 2000). O potencial para a descoberta de endofíticos com atividade antiviral ainda é incipiente. De fato alguns metabólitos encontrados são promissores, mas a principal limitação para a descoberta de moléculas antivirais está provavelmente relacionada à ausência de um sistema efetivo de triagem antiviral (Guo et al., 2000).

Em um estudo realizado com o objetivo de encontrar novos produtos naturais contra células tumorais, o fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. foi isolado da planta *Tripterygium wilfordii*, pertencente a família Celastraceae (Wagenaar et al., 2000). O extrato desse fungo exibiu potente atividade contra as três linhagens de células tumorais humanas: A2780s (câncer de ovário), SW-620 (câncer de cólon) e HCT-116 (câncer de cólon). A partir do extrato desse fungo endofítico, foram isoladas quatro substâncias, três novas citochalasinias (3), (4) e (5) e a citochalasinia E (6) (Figura 5), previamente relatada (Dagne et al., 1994). Ao serem testadas contra as três linhagens de células tumorais, a citochalasinia E (6) foi a que apresentou a maior atividade citotóxica (15-100 vezes) em relação aos compostos (3), (4) e (5) (Wagenaar et al., 2000).

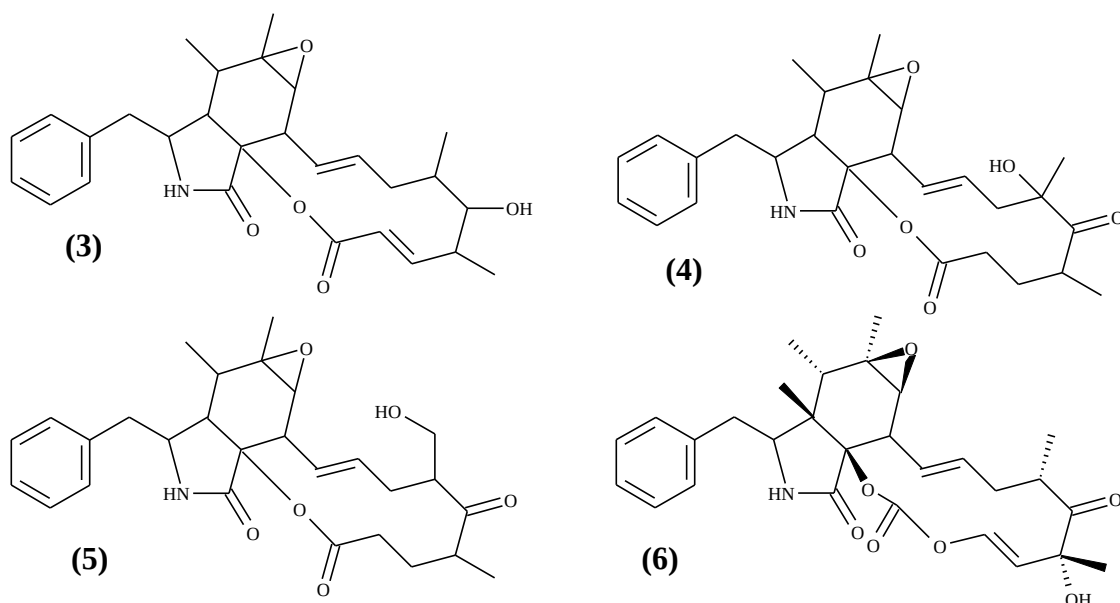


Figura 5. Citochalasinas, substâncias anticancer produzidas pelo endofítico *Rinocladiella* sp. (Wagenaar et al., 2000).

Um total de 81 plantas medicinais coletadas nas florestas de quatro regiões geográficas da Tailândia foram estudado para o isolamento de fungos endofíticos com atividade biológica. De 582 isolados obtidos, 360 foram testados contra duas linhagens de células tumorais humanas: KB (câncer de boca) e BC-1 (câncer de mama). Dos 360 isolados, 60 (17%) e 48 (13%) apresentaram inibição das células KB e BC-1 (Wiyakrutta *et al.*, 2004). Em relação a IC_{50} , os extratos dos fungos foram classificados dentro de três grupos: alta inibição (IC_{50} 0,18-5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), média inibição (IC_{50} 5,1-10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e baixa inibição (IC_{50} 10,1-20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De uma maneira geral, as células KB foram mais suscetíveis aos extratos dos fungos, quando comparada com as células BC-1 (Wiyakrutta *et al.*, 2004).

Harper *e colaboradores*, (2003) isolaram duas substâncias bioativas, a pestacina (7) e a isopestacina (8), obtidos de extratos de *Pestalotiopsis microspora*, um endofítico isolado da planta *Terminalia morobensis*, que cresce na margem do Rio de Sepik na Papua-Nova Guiné. Ambas exibiram atividade antimicrobiana e antioxidante. Havia suspeitas de que a isopestacina (Figura 6) fosse um antioxidante baseada na sua semelhança estrutural com um flavonoide. Experimentos por "electrospray" confirmaram a atividade antioxidante da isopestacina que mostrou ser capaz de retirar radicais livres e superóxidos da solução. A pestacina (Figura 6) foi descrita

posteriormente a isopestacina, sendo considerada como um dos componentes da mistura racêmica (constituído por partes iguais dos dois enantiômeros de uma substância quiral) (Harper et al., 2003). Ambas exibiram atividade antioxidante e antimicrobiana, porém a pestacina apresentou atividade antioxidante superior ao trolox, um derivado de vitamina E (Harper et al., 2003).

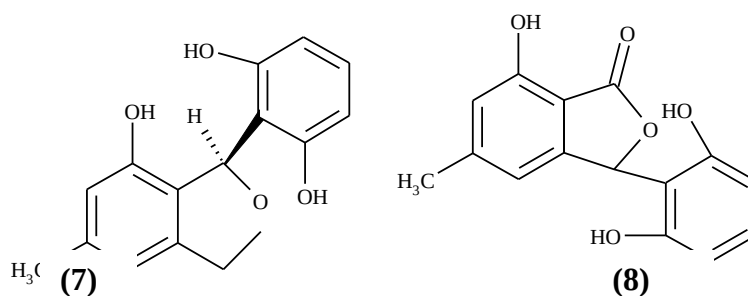


Figura 6. Pestacina (7) e isopestacina (8), substâncias com atividade antioxidante e antimicrobiana (Strobel & Daisy, 2003).

Vários endofíticos são capazes de produzir substâncias que matam insetos. *Muscodor vitigenus* foi recentemente descrito como fungo endofítico da planta *Paullinia paullinioides*, uma liana de florestas tropicais da Amazônia Peruviana. Por meio do CG/MS observou-se que as propriedades do composto eram idênticas ao naftaleno. Outros *Muscodor* spp. produzem substâncias antimicrobianas voláteis mas, *M. vitigenus* é o único que produz o naftaleno quase que exclusivamente (Daisy et al., 2002).

O extrato do fungo endofítico *M. vitigenus*, isolado da planta *P. paullinioides* forneceu um novo diterpeno, o ácido nodulispórico que apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de moscas (Daisy et al., 2002). O primeiro metabólito nodulispórico isolado foi do fungo endofítico *Nodulisporium* sp., da planta *Bontia daphnoides*. A partir dessa descoberta, iniciou-se uma busca intensiva para encontrar o fungo *Nodulisporium* sp. ou outros fungos que produziam análogos do ácido nodulispórico (Demain, 2000).

Nos últimos anos a triagem com fungos tem revelado que eles são fontes potenciais de agentes imunossupressores como, por exemplo, a ciclosporina A, FK506 e rapamicina. Porém estes agentes imunossupressores apresentam efeitos indesejáveis como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Neste contexto, os endofíticos têm sido alvos para a descoberta de novos imunossupressores. A planta medicinal *Tripterygium*

wilfordii, pertencente à família Celastraceae, está sendo extensivamente utilizada para tratamento de doença autoimune, assim como no tratamento de outras doenças como artrite, lúpus sistêmico eritematoso, dermatomicose, glomerulonefrites e doença inflamatória intestinal (Tong *et al.*, 1999). Um total de 343 isolados de fungos foi obtido da planta *T. wilfordii*, representando 60 morfotipos diferentes. Somente 15 isolados apresentaram atividade anti-proliferativa (Kumar *et al.*, 2004). Extrato da fase orgânica de *Pestalotiopsis leucothes*, *Mucor* sp., *Verticillium* sp., e *P. disseminata* inibiram a proliferação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) com doses entre 0,12 e 500 µg mL. Entretanto, os extratos dos fungos *Acremonium* sp. e *P. suffocata*, morfotipos 4 e 5, apresentaram os maiores valores de citotoxicidade na concentração de 125 µg mL (Kumar *et al.*, 2004).

2.3 *Piptadenia adiantoides*

A planta *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr, pertence à família Fabaceae e à ordem Fabales (Cerrado, 2006) (Figura 7 e Figura 8). A família Fabaceae possui 650 gêneros e mais de 18.000 espécies. Uma característica típica dessa família é apresentar fruto do tipo legume, também conhecido como vagem. No interior do Brasil, as folhas e cascas da árvore do gênero *Piptadenia* são utilizadas para matar formigas. Têm grande importância econômica, sua madeira é dura e pesada, sendo utilizada para marcenaria, vigas, tacos, rodas de engenhos, lenha e carvão. Da goma dessa árvore podem-se obter remédios para bronquites, infecções do pulmão e vias respiratórias, servindo ainda para depurar o sangue. Quase todas as espécies da família apresentam simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, que fixam o nitrogênio da atmosfera (N₂) e convertem em nitrato (NO₃⁻) que é utilizado pela planta hospedeira, uma característica ecológica de extrema importância (Anoca, 2006).



Figura 7. *Piptadenia adiantoides* em época de floração (Rosa, 2006).

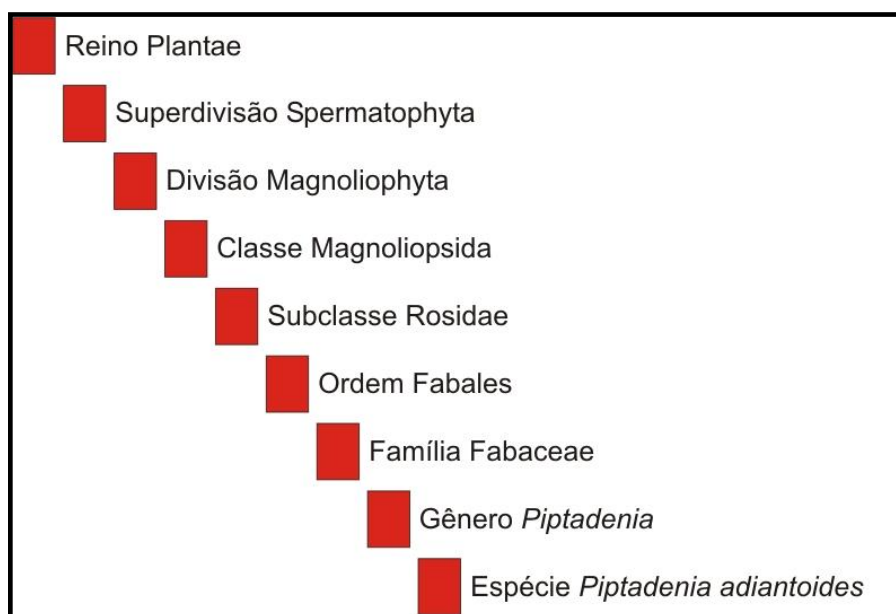


Figura 8. Hierarquia taxonômica de *Piptadenia adiantoides*

Exemplares de *P. adiantoides* podem ser lianas ou arbustos escandentes, com ramos terminais cilíndricos e ferrugíneo (Filho, 1996). O fruto é seco, deiscente do tipo legume. Reproduzem-se por meio de autocoria, com os frutos ou diásporos caindo na base da planta-mãe (Cerrado, 2006). São comuns em toda a América do Sul, principalmente nos estados da Bahia, Espírito Santo, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo. Preferem solos profundos e não muito úmidos ou inundados (IBGE, 2006).

Neste trabalho vários fungos endofíticos foram isolados do caule e da folha desta planta. Algumas informações referentes aos gêneros dos fungos isolados do caule que apresentaram atividade biológica são descritas a seguir.

2.3.1 O gênero *Bipolaris* Schoemaker, 1959 e seu teleomorfo *Cochliobolus*.

Os fungos do gênero *Bipolaris* Schoemaker, apresentam conidióforos marrons, na maioria das vezes simples, produzem conídio por meio do poro apical, possuem crescimento simpodial e formam conídios sobre sucessivas novas pontas; conídios marrons, várias células, retas ou curvas, germinam por um tubo germinativo; são parasitas principalmente em ervas rasteiras; o estágio perfeito desse fungo é conhecido como *Cochliobolus* (Barnett, 1972).

Originalmente, os gêneros *Drechslera*, *Exserohilum* e *Bipolaris* foram classificados como *Helminthosporium*, que tradicionalmente é considerado um contaminante ambiental. Contudo isolados dentro desse grupo, foram separados devido às características de desenvolvimento dos conidióforos e pela morfologia do seu conídio. Os isolados que apresentavam conidióforos que cessavam o crescimento antes da formação conidial, foram classificados no gênero *Helminthosporium*, enquanto aqueles conidióforos que continuam crescendo lentamente até a formação de um novo ponto de crescimento (crescimento simpodial) originaram um novo gênero, *Drechslera* (Dixon & Polakwyss, 1991). Devido ao crescimento simpodial (crescimento em zigzag), o gênero *Drechslera* foi separado em dois outros gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum*, baseado na morfologia do conídio, tais como, forma, tamanho, posição, natureza da divisão do septo, posição e tamanho do hilo (McGinnis *et al.*, 1986).

Bipolaris é um dos vários gêneros de fungos dematiáceos (fungos negros) que causam feohifomicose em animais e em humanos. As espécies desse gênero têm um papel clínico muito importante nas feohifomicoses e em doenças broncopulmonares. Os membros desse gênero têm sido associados a agentes etiológicos de sinusites, infecções oculares, peritonites, meningoencefalites e doenças disseminadas (McGinnis *et al.*, 1992). Doenças causadas por *Bipolaris* sp. podem ser não invasivas e invasivas superficialmente (envolvem áreas cutâneas, subcutâneas e a córnea). Entretanto, *Bipolaris* é comumente considerado como um fungo patogênico oportunista, pois mais da metade dos isolados são de pacientes saudáveis (Brandt & Warnock, 2003). A prevalência desse microrganismo e a sua influência nas doenças em humanos ainda é menosprezada por clínicos, mas estes lentamente estão aprendendo a reconhecer a importância e o papel desses organismos.

Diversas substâncias com propriedades terapêuticas já foram isoladas do extrato do fungo *Bipolaris* e também do seu teleomorfo *Cochliobolus*. Shen e colaboradores, (1999) relatam o isolamento e identificação estrutural da substância 6-epi-3-anhydrophiobolina B (9) (Figura 9) e seis ophiobolinas conhecidas, que foram isoladas do extrato orgânico do fungo *C. heterostrophus*.

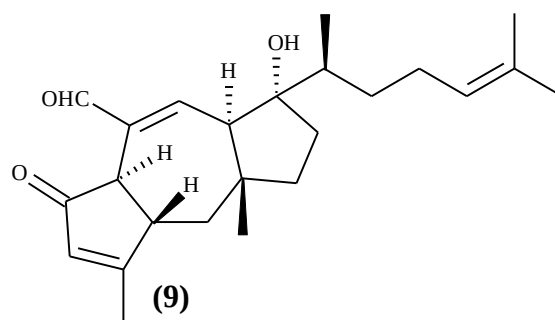


Figura 9. 6-epi-3-anhydrophiobolina B, isolada de *Cochliobolus* sp. (Shen et al., 1999).

Outras espécies de *Bipolaris* como, por exemplo, *B. zeicola* e *B. cynodontis* são responsáveis também pela produção da cochlioquinona A e do cochlioquinol, respectivamente (Lim *et al.*, 1996, Jung *et al.*, 2003). Embora, o conhecimento a respeito dos fungos do gênero *Bipolaris* e seu teleomorfo *Cochliobolus*, ainda sejam restritos, em relação a produção de metabolitos bioativos, esses microrganismos vêm sendo cada vez mais estudados e observados, tanto para a descoberta de novas drogas,

quanto para a análise como possíveis causadores de doenças em humanos (Shen et al., 1999, Brandt & Warnock, 2003).

2.3.2 O gênero *Fusarium* Link, 1809

As espécies de fungos do gênero *Fusarium* Link, quando cultivados em meios de cultura convencionais, possuem micélio extenso e colônia cotonosa, muitas vezes apresentam coloração rosa, púrpura ou amarela no micélio ou no meio de cultura; os conidióforos são variáveis, delgados e simples ou curtos e espessos; ramificação irregular, única ou agrupada dentro do esporodóquio; conídio hialino; macroconídio com várias células ligeiramente curvadas ou inclinadas e pontiagudas no final, tipicamente em forma de canoa; microconídio possui uma célula, ovóide ou oblonga, únicas ou em cadeias; alguns conídios intermediários, duas ou três células oblongas ou ligeiramente curvadas; são parasitas em plantas superiores ou saprófitos em plantas em decomposição (Barnett, 1972).

Os fungos do gênero *Fusarium* têm uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrências restritas a determinados ambientes. Ocorrem, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas, embora algumas espécies tenham uma íntima associação com os hospedeiros (Burgess & Summerell, 1992).

Os critérios morfológicos são o primeiro passo para a identificação de *Fusarium*, mas podem ser complementados com a utilização de métodos mais específicos, como, por exemplo, os baseados nas características genéticas (Burgess & Summerell, 1992). As descrições para a classificação de *Fusarium* têm base no uso de meios de cultura específicos e condições de cultura (crescimento micelial, pigmentação, estruturas e esporulação). A forma dos macroconídios, forma e modo de produção dos microconídios, e formação de clamidósporos (ausentes ou presentes) são critérios essenciais. Para auxiliar na identificação é necessário utilizar meios de cultura especiais, pois, a morfologia das culturas e as taxas de crescimento também são usadas para a identificação (Burgess & Summerell, 1992).

No Brasil as espécies de *Fusarium* identificadas entre 1993 e 1996 são principalmente de importância fitopatológica. Várias espécies de *Fusarium* podem

causar diversas doenças em plantas (Tabela 1). A natureza das doenças fornece importantes indícios das espécies de que podem estar infectando o vegetal. Entretanto, se o sintoma é novo ou não usual no hospedeiro, essa informação não tem valor algum (Summerell *et al.*, 2003).

Tabela 1. Espécies de *Fusarium* causadoras de doenças em plantas economicamente importantes

Planta	Local afetado	Espécie de <i>Fusarium</i>
Banana	murchamento da folha	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
Milho	espiga de milho apodrecida	<i>F. graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i>
Tomate	murchamento da folha	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Soja	talo apodrecido	<i>F. andiyazi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i>
Manga	malformação do vegetal	<i>F. manginifera</i>

Fonte: (Summerell *et al.*, 2003).

Embora a maioria dos fungos do gênero *Fusarium* seja constituída de patógenos de plantas, muitos trabalhos relatam isolamento de *Fusarium* como endofítico e as substâncias bioativas produzidas por espécies do gênero. O fungo endofítico *F. subglutinans* isolado da planta *Tripterygium wilfordii*, produz um diterpeno, denominado subglutanol A (10) (Figura 10) apresentando atividade imunossupressora com valores de IC₅₀ de 0.1 µM. A ciclosporina que é um famoso imunossupressor, também de origem de metabólitos de fungos, é 10⁴ vezes mais ativa quando comparada com o subglutanol A, porém o subglutanol A não é tóxico. Este estudo sugere que esta substância seja mais bem estudada para a caracterização da atividade biológica em questão (Lee *et al.*, 1995).

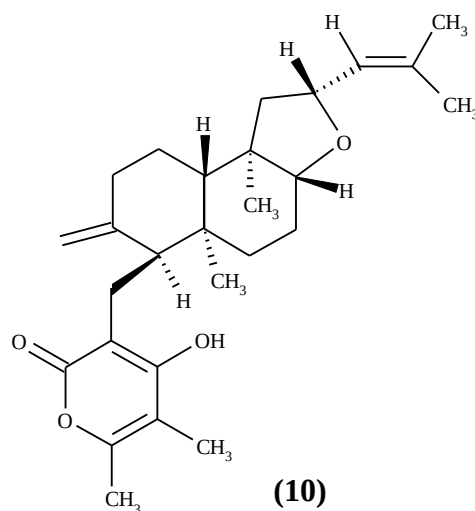


Figura 10. Subglutinol A, substância com atividade imunossupressora isolado de *F. subglutinans* (Strobel & Daisy, 2003).

O fungo *F. oxysporum*, responsável pelo murchamento das folhas de banana, foi investigado para a produção de metabólitos bioativos onde foram isoladas as substâncias beauvericina e bikaverina. Ambas apresentaram citotoxicidade contra as células tumorais humanas NCI-H460 (câncer de pulmão) e MIA Pa Ca-2 (câncer de pâncreas), respectivamente (Zhan *et al.*, 2007). Apesar de se apresentarem mais como fitopatógenos, os fungos do gênero *Fusarium* são altamente promissores para a descoberta de substâncias bioativas (Zhan *et al.*, 2007) e também para a busca de novas estruturas químicas (Zhan *et al.*, 2007).

2.4 Estudo de Fungos Endofíticos – Uma Investigação Promissora

Diante da diversidade biológica existente, os fungos endofíticos são microrganismos ainda pouco investigados. Eles representam uma fonte abundante de novos metabólitos bioativos e de diversidade química com grande potencial para exploração em diversas áreas como agricultura, medicina e indústria (Strobel & Daisy, 2003). Certamente a descoberta de novas substâncias é vantajosa, sendo uma área estimulante e promissora (Strobel & Daisy, 2003).

Indubitavelmente, um dos maiores problemas para a compreensão da biologia dos endofíticos e a descoberta dos produtos naturais será a extinção das florestas tropicais, que possuem o maior recurso para aquisição de novos microrganismos e seus

bioprodutos. O total de massa terrestre do mundo que atualmente mantém as florestas tropicais é equivalente à área dos Estados Unidos. Segundo (Strobel & Daisy, 2003), poucos trabalhos descrevem informações sobre a perda do potencial da diversidade microbiana quando uma espécie de planta desaparece. Quando este fato ocorre, quantifica-se somente que uma espécie de planta sumiu, mas geralmente se esquece que naquela planta habitava diversos endofíticos que podem ter desenvolvido relações simbióticas específicas com aquela planta hospedeira. Dessa forma, é de extrema importância estudos com fungos endofíticos para o conhecimento da diversidade química dos mesmos (Strobel & Daisy, 2003).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Isolar e identificar as substâncias bioativas presentes nos extratos orgânicos de fungos endofíticos associados à planta *Piptadenia adiantoides*.

3.2 – Objetivos específicos

- Cultivar e produzir extratos da fase orgânica dos fungos, UFMGCB-540, UFMGCB-551, UFMGCB-554 e UFMGCB-555;

- Avaliar a atividade biológica dos extratos orgânicos dos fungos em ensaios biológicos utilizando:

A – três linhagens de células tumorais humanas UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e TK-10 (renal);

B – a enzima tripanotona redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi*;

C – formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;

D – microrganismos de interesse clínico e fitopatógeno: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Cryptococcus neoformans*;

E – onze isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*.

- Realizar a identificação morfológica e molecular dos fungos endofíticos ativos;

- Obter o perfil cromatográfico dos fungos endofíticos ativos em CLAE;

- Cultivar, em larga escala, os fungos UFMGCB-555 e UFMGCB-551 para o isolamento das substâncias bioativas;

- Realizar o fracionamento químico biomonitorado, utilizando o bioensaio adequado para a atividade biológica em questão;
- Elucidar as estruturas químicas das moléculas bioativas;
- Calcular a CI_{50} , a CIM e a CFM das substâncias bioativas isoladas.

_____ *Metodologia, Resultados e Discussão*

4. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

A parte experimental bem como os resultados e discussão referente aos objetivos da tese estão apresentados em forma de artigos. No capítulo 5 está apresentado o Artigo *Cochliobolus*, intitulado: “Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)”, publicado na PLOS Neglected Tropical Diseases em dezembro de 2008. No capítulo 6 está apresentado o artigo intitulado: “Antifungal activity of the 8-n-pentanoylneosolaniol and T-2 Toxin isolated from *Fusarium* sp. UFMG551 against the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis*”, que será submetido em breve para publicação. No capítulo 7 está apresentado, finalmente, o artigo intitulado: “Biological activities of two isolates of *Bipolaris* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)”, que será submetido futuramente para publicação. Uma discussão integrada destes três artigos se encontra no capítulo 8. No capítulo 11, o anexo I refere-se a um trabalho que foi iniciado com as leveduras isoladas de ambientes tropicais, pois inicialmente o objetivo do trabalho de doutorado era trabalhar com isolamento de substâncias bioativas de extratos de leveduras; no anexo II estão os documentos do depósito de patente realizado em abril de 2008, referentes ao trabalho intitulado: “Metabólitos leishmanicidas e inibidores da enzima tripanotiona redutase isolados do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. de *Piptadenia adiantoides*”; no anexo III estão os perfis cromatográficos que foram realizados com os quatro fungos; e finalmente no anexo IV as publicações do doutorado.

Artigo Cochliobolus

**Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp.,
an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**

Fernanda Fraga Campos^{1,2}, Luiz Henrique Rosa³, Betania Barros Cota¹, Rachel Basques Caligiorne⁴, Ana Lúcia Teles Rabello⁴, Tânia Maria Almeida Alves¹, Carlos Augusto Rosa², and Carlos Leomar Zani^{1*}

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG, 30190-002, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

³Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

⁴Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

**Corresponding author: Tel.: +55-31-33497791, Fax: +55-31-32953115, E-mail: zani@cpqrr.fiocruz.br*

Abstract

Protozoan parasites belonging to genera *Leishmania* and *Trypanosoma* are the etiological agents of severe neglected tropical diseases (NTDs) that cause enormous social and economic impact in many countries of tropical and sub-tropical areas of the world. In our screening program for new drug leads from natural sources, we found that the crude extract of the endophytic fungus *Cochliobolus* sp. (UFMGCB-555) could kill 90% of the amastigote-like forms of *Leishmania amazonensis* and inhibit Ellman's reagent reduction in a trypanothione reductase (TryR) assay, when tested at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. UFMGCB-555 was isolated from the plant *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) and identified based on the sequence of the internally transcribed spacer (ITS) regions of its ribosomal DNA. The chromatographic fractionation of the extract was guided by the TryR assay and resulted in the isolation of cochlioquinone A and isocochlioquinone A. Both compounds were active in the assay with *L. amazonensis*, disclosing EC_{50} values (effective concentrations required to kill 50% of the parasite) of 1.7 μM (95% CI= 1.6 to 1.9 μM) and 4.1 μM (95% CI= 3.6 to 4.7 μM), respectively. These compounds were not active against three human cancer cell lines (MCF-7, TK-10 and UACC-62), indicating some degree of selectivity towards the parasites. These results suggest that cochlioquinones are attractive lead compounds that deserve further investigation aiming at developing new drugs to treat leishmaniasis. The findings also reinforce the role of endophytic fungi as an important source of compounds with potential to enter the pipeline for drug development against NTDs.

Introduction

Protozoan parasites belonging to the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* (order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae) occurs in the tropical and sub-tropical areas of the world, where they cause severe diseases with huge medical, social, and economic impact to millions of people [1]. All diseases caused by these parasites are among the Neglected Tropical Diseases (NTDs) listed by the World Health Organization [1]. Different species of *Leishmania* affects over 12 million people and puts over 350 million people at risk in 88 countries; *Trypanosoma cruzi* infects approximately 8 million and puts 100 million at risk in Central and South America, and *T. brucei* infects 60 million people in 36 sub-Saharan African countries [2]. The drugs

currently available to treat the different forms of leishmaniasis and trypanosomiasis were introduced many decades ago and have significant drawbacks, especially in terms of efficacy, length of treatment, route of administration, toxicity, and cost [2]. To complicate the situation, there is no new drug being developed by the major pharmaceutical industries for these diseases [3].

It is well known that plant-associated microorganisms produce a variety of metabolites with novel structures and interesting biological activities [4,5,6,7]. Indeed, some medicinal properties and biological activities initially attributed to plant species were found later to be due to the secondary metabolites produced by their endophytic microorganisms [8]. With the aim to discover new drug leads for some NTDs, we have been bioprospecting the Brazilian flora and mycota using bioassays which includes the protozoan parasite *Leishmania amazonensis* and the enzyme trypanothione reductase (TryR). This flavoenzyme is part of a complex enzymatic system present in protozoans of the order Kinetoplastida that help them to survive under oxidative stress [9]. More important, TryR was shown to be essential for the growth and survival of these parasites, and was validated as a drug target for the discovery and design of new leishmanicidal and trypanocidal drugs [9,10,11,12]. In our bioprospecting program, we have prepared hundreds of extracts of endophytic fungi isolated from plants growing in different Brazilian biomes (unpublished results). The isolate UFMGCB-555, obtained from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae), showed strong activity in the assay with TryR and *L. amazonensis* and was chosen for investigation aiming at its bioactive components. In this report we describe the molecular taxonomic identification of UFMGCB-555 and the isolation and identification of two leishmanicidal compounds from its extract.

Methods

Cultivation of the endophytic fungus UFMGCB-555

The endophytic fungus was isolated from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) and deposited at Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais under the code UFMGCB-555. The fungus was grown in potato dextrose agar (PDA) medium for 5 days at $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Five millimeter diameter

plugs of this culture were then inoculated at the center of 160 Petri dishes (90 mm diameter), each containing 20 mL of malt extract agar (MEA) medium (1% glucose, 1% malt extract, 0.1% peptone, and 1.5% agar). The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 days. After this period, a small aliquot of the biomass was used for extraction of DNA and the remaining material extracted with ethyl acetate for the isolation of the fungal secondary metabolites. Five plates which were not inoculated with the fungus were subjected to the same protocol to serve as control of the culture medium.

Molecular identification of the fungus UFMGCB-555

The DNA was extracted according to the protocol described by de Hoog [13]. The ribosomal DNA internal transcribed spacer domains (rDNA-ITS) were amplified using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGG-TGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), as previously described [14]. Five sequences were generated using MEGABACE (Amersham Biosciences, USA) which were used to feed PHRED-PHRAP software [15] in order to find the consensus sequence. The sequence thus obtained was compared with those deposited in the GenBank using the software BLASTn [16] to identify the fungus to the genus level. The sequence was deposited in the GenBank (accession number EU684269).

Phylogenetic relationships were calculated using the version 4.0 of the software MEGA [17]. The phylogenetic tree shown in Figure 1 was constructed using the neighbor joining algorithm with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs. The Kimura 2-parameter model [18] was used to estimate the evolutionary distances.

Extraction of secondary metabolites from the fungal cultures

The fungus culture material from 160 Petri dishes (approximately 3 liters) was transferred to a six-liter Erlenmeyer containing 3.5 L of ethyl acetate and left in contact for 48 h at room temperature. After decantation, the organic phase was filtered and the solvent evaporated under vacuum in a rotary-evaporator at 45°C . Residual solvent was eliminated in a vacuum centrifuge at 40°C , and the crude extract thus obtained was stored at -40°C until use. A similar extraction procedure was carried out using the five plates containing medium only to generate a control extract of the medium.

Chromatographic fractionation of the extract

The initial fractionation step involved high-speed counter-current chromatography (HSCCC), using a Pharma-Tech chromatograph model CCC-1000 equipped with three multilayer coils totaling a volume of 850 mL. With the rotor stopped, the coils were filled with the lower aqueous phase of the biphasic mixture of hexane-ethyl acetate-methanol-water (1.2:0.8:1:1). The coils were then rotated at 1000 r.p.m. and the upper phase was pumped at a flow-rate of 5 mL min⁻¹ in tail-to-head direction until hydrodynamic equilibrium was reached, that is, until only the mobile phase was flowing out of the column. Part of the extract (800 mg) was then dissolved in 10 mL of equal parts of the upper and lower phases of the biphasic solvent mixture and this mixture injected into the column. A total of 158 fractions of 15 mL each was collected. They were pooled into 40 groups (Figure 2) based on their similarity, as assessed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck). Group 10 was fractionated on reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) using a semi preparative column (250 x 20 mm) filled with RP-18 (octadecyl) silica gel with 5µm average particle size. The separation was run using a gradient of methanol-water from 70 to 100% in 50 min, at a flow rate of 10 mL min⁻¹. The column effluent was monitored with a UV detector set at a wavelength of 220 nm. Two pure compounds, **1** (14 mg) and **2** (2.4 mg) were isolated.

Spectral data of the isolated compounds

Proton (¹H) and carbon (¹³C) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (HMQC), and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) experiments were run on a Bruker DRX 400 spectrometer using the pulse programs provided by the manufacturer. The substances were dissolved in perdeuterated solvents containing 0.1% tetramethylsilane as the internal chemical shift standard. The data obtained from these spectra are summarized in the Tables 2 - 4. Mass spectra (MS) were acquired on a Thermo Finnigan LCQ-Advantage spectrometer equipped with an electrospray ion (ESI) source. Solutions of the compounds at 200 µg mL⁻¹ in MeOH-H₂O (1:1) were infused at 25 µL min⁻¹ and the positive and negative mass spectra acquired in the *m/z* range between 50 and 1000 Daltons. The cone voltages were

optimized for positive and negative ion analysis in the range between 25 and 50 V. The capillary voltages were set at 4.5 kV in positive ion mode and -3.1 kV in negative ion mode. In the MS/MS experiments, the parent ion isolation width was 3.8 Daltons and the normalized collision energy was set at 30% for both compounds **1**. Fifty scans from 150 to 600 Daltons were collected to generate the averaged spectra shown in Figure 4.

Assays with recombinant trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi (TryR).

The TryR microtitre plate assay procedure based on in situ Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione (Figure 6A), described by Hamilton et al. [19], was used during the screening and the bioassay-guided fractionation protocols. The assay was performed in 96-well plates (Costar 9017, Corning, USA) using Hepes buffer (40 mM, pH 7.5) with 1 mM EDTA. Each assay well (250 μ L) contained enzyme (1 mU), trypanothione (1 μ M) and NADPH (200 μ M). The extracts, fractions and pure compounds were added to the above mixture and incubated at 30°C during 30 min. After this period, Ellman's reagent [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) –DTNB] was added (70 μ M) and the absorbance (Abs) measured at the wavelength of 412 nm in the kinetic mode during the time (t) of 10 minutes at every 10 seconds. The slope of the curve $\Delta \text{Abs} / \Delta t$ is proportional to DTNB reduction which, in absence of competing reactions, is proportional to the enzyme activity. The inhibition of the coupled system was calculated as the ratio between slope $\Delta \text{Abs} / \Delta t$ of the experimental wells and that of the controls without drug, that is, percent inhibition = $[1 - \text{slope}_{\text{exp}} / \text{slope}_{\text{contr}}] \times 100$.

The classical assay based on the measurement of NADPH consumption was performed in 1 mL cuvettes (1 cm light path length) at 27 °C using a Beckman DU spectrophotometer. Each cuvette contained 500 μ L Hepes buffer (40 mM, pH 7.5), 1 mM EDTA, 4 mU enzyme, 200 μ M NADPH, 50 μ M cochlioquinone A, and 100 μ M trypanothione. The enzyme, NADPH and the compound were pre-incubated for 5 minutes at 27°C. The absorbance measurement at the wavelength of λ 340 nm was started in the kinetic mode (1 reading per second) for about 30 seconds. The sample compartment cover was opened during 3 to 4 seconds, just enough for the quick addition of the substrate. After closing, the absorbance measurement was continued for another 30 seconds. The initial reaction velocity (v_0) was calculated by the instrument software using the first 5-20 data points after the substrate addition. These points should fit a straight line with R^2 (squared correlation coefficient) greater than 0.99. To estimate

the effect of the compound on enzyme activity the v_0 values obtained in the experiments with and without cochlioquinone A were compared. Each experiment was repeated three times.

Assay with human cancer cell lines

The effect of the extract and isolated compounds on the survival and growth of the human cancer cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), and TK-10 (renal), was determined using a colorimetric method developed at the National Cancer Institute-USA [20,21]. Briefly, the cells were inoculated in 96-well plates and incubated at 37°C for 24 h in 5% CO₂ atmosphere. The solutions of the test samples were added to the culture wells to attain the desired concentrations, and the plates incubated for further 48 h. Trichloroacetic acid was added to each well to precipitate the proteins, which were stained with sulforhodamine B. After washing out the unbound dye, the stained protein was dissolved with 10 mM Tris, and the absorbance measured at the wavelength of 515 nm. Results were calculated using the absorbance measured in the test-wells (T) in comparison with that of the control wells corresponding to the initial cell inoculum (T_i) and cells grown for 48 h without drug (T_f), using the formula: $[(T-T_i)/(T_f-T_i)] \times 100$. This formula allows the quantification of both growth inhibition (values between 0 and 100) and cell death (values smaller than 0). Each sample was tested in duplicate in two independent experiments.

Assay with amastigote-like forms of Leishmania (Leishmania) amazonensis

Promastigotes of *L. amazonensis* (strain IFLA/BR/196/PH-8) were obtained from lesions of experimentally infected hamsters. The parasites were incubated for 9 days at 26°C in Schneider's medium buffered at pH 7.2. The promastigotes were then stimulated to differentiate into amastigote-like forms by rising the incubation temperature to 32°C and lowering the pH of the medium to 6.0. After 7 days under these conditions 90% of the parasites were in the amastigote-like forms. The parasite concentration was adjusted to 1×10^8 cells mL⁻¹, and 90 µL added to each well of 96-well plates, followed by 10 µL of the solutions containing the samples and control drug (0.2 µg mL⁻¹ Amphotericin B - Fungisone[®] Bristol-Myers Squibb B, Brazil). The plates were incubated at 32°C for 72 h and the number of parasites estimated using the MTT

(methyl thiazolyl tetrazolium)-based colorimetric assay [22]. The results were calculated from the measured absorbancies using the formula $[1 - (\text{Abs}_{\text{exp}}/\text{Abs}_{\text{contr}})] \times 100$, which express the percentage of parasite death in relation to the controls without drug. All samples were tested in duplicate and the experiments repeated at least once. Experiments to determine the dose response curves and the EC_{50} (effective concentration to kill 50% of the parasites) were run as above, using 1:2 serial dilutions of the test compounds to reach the appropriate concentrations (Figure 3). The experiments were run in duplicate and repeated at least once.

Assays with microorganisms

The antimicrobial activity of the samples was evaluated using the following microorganisms: *Candida albicans* ATCC18804, *C. krusei* ATCC2159, *Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Escherichia coli* ATCC25922 and *Cryptococcus neoformans* ATCC32608. The yeasts were grown on agar Sabouraud (Difco) at 28°C for 24 h, and their inocula were adjusted in saline solution to Mac Farland optical density scale 1 [23] before seeding into plates containing agar Sabouraud. The bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI, Difco) in 6-mL tubes, and their concentration adjusted to 10^3 to 10^4 cells mL^{-1} before inoculation into plates containing agar BHI. In each plate, five clean filter-paper disks with 6 mm diameter were placed equidistant from each other on the surface of the medium. Solutions of the samples at 10 mg mL^{-1} were prepared in 1% aqueous dimethyl sulfoxide (1% aq. DMSO). Five microliters of these solutions, corresponding to 50 μg of the sample, were applied to the paper disks, and the plates incubated at 37°C for a period of 24 to 48 h. Aqueous solutions of amphotericin B and chloramphenicol at 10 mg mL^{-1} were used as positive controls for yeasts and bacteria, respectively. Solvent control consisted of 1% aq. DMSO. The sample was considered active if it caused a growth inhibition halo around the disk to which it was applied.

Statistical analysis

The software GraphPad Prism version 4.03 was used to calculate the IC_{50} values using the non-linear curve fitting of two or more independent experimental datasets to

a four-parameter logistic dose-response model. No constraints were applied to the curve fitting calculations.

Results

Molecular identification of UFMGCB-555: A small aliquot (1 g) of the fungus culture was used to isolate the fungal DNA for sequencing of the ITS domains. These sequences were used for the taxonomic identification of the fungus and for the elucidation of its phylogenetic relationships (Figure 1). The fungus UFMGCB-555 was then identified to the genus level as *Cochliobolus* sp. and showed a close phylogenetic relationship with *C. melinidis* (Genbank access number AF452445), from which its consensus sequence differs by only 2.7% (12 nucleotides, 70% bootstrap value).

Extraction of secondary metabolites: The culture material (3 liters) yielded 2 g of the crude extract, representing a yield of approximately 0.6 g L⁻¹ of culture broth. This extract showed activity in different bioassays (Table 1) when tested at 20 µg mL⁻¹, but was completely inactive against *C. albicans*, *C. krusei*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. neoformans* when tested at 50 µg per disk (data not shown). The extract of the control (sterile) culture medium was not active in these assays.

Bioassay-guided fractionation of the extract: approximately 800 mg of the crude extract was subjected to counter-current chromatography in an HSCCC to afford 158 fractions, which were pooled into 40 groups (Figure 2). After testing all groups in the TryR assay, only Group 10 and Groups 24 – 40 showed some activity. Groups 24 – 40 were not studied further because they presented low masses and were constituted of complex and instable mixtures of highly polar compounds. Fraction 10 (100 mg) was further fractionated using reversed-phase HPLC to yield compounds **1** (14 mg; 1.4% w/w of the crude extract) and **2** (2.4 mg; 0.24% w/w of the crude extract).

Both compounds strongly inhibited the growth of amastigote-like forms of *L. (L.) amazonensis*, with EC₅₀ values (effective concentration to kill 50% of the parasites) of 1.7 µM (95% confidence interval = 1.5 to 1.9 µM) and 4.1 µM (95% confidence interval = 3.6 to 4.7 µM), respectively (Figure 3). However, only **1** was active in the DTNB-coupled TryR assay. Furthermore, while the crude extract was toxic to three human cancer cell lines used in this work (MCF-7, TK-10, and UACC-62), neither Group 10 nor compounds **1** and **2** showed activity against these lineages (Table 1). The

compounds were also inactive against the five pathogenic microorganisms investigated (data not shown).

Structure elucidation of the bioactive compounds: The electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) of both compounds (Figure 4) exhibited quasi-molecular sodiated ion peaks $[M+Na]^+$ with m/z 555 Daltons in positive ion mode, and $[M-H]^-$ with m/z 531 Daltons in negative ion mode, indicating they both have molecular weight of 532 g mol⁻¹ (Figure 4). The peak integration areas in the ¹H NMR spectra (Table 2 and Table 3) indicated the presence of 44 hydrogen atoms, while the ¹³C NMR spectra (Table 4) showed 30 signals for each compound. Edited DEPT sub-spectra showed signals due eight methyl groups, one belonging to an acetyl group, and five methylene carbon atoms for both compounds. Signals due to eight methyne carbon atoms, four of them oxygenated, were observed for compound **1**, while seven signals of methyne carbon atoms, three of them oxygenated, were detected for in the spectra of compound **2**. Altogether, these data is compatible with the molecular formula C₃₀H₄₄O₈, with an index of hydrogen deficiency of 18, corresponding to 9 insaturations. The analysis of the ¹H and ¹³C spectra allow to infer that both compounds have five double bonds in their structures, with the remaining insaturations attributed to the presence of four rings. A quinonoid ring in **1** was suggested by the presence of the signals at 181.64 and 188.86 ppm, attributed to carbonyl groups, together with four signals between 134.32 and 151.40 ppm in the ¹³C NMR spectrum. A phenol moiety in **2** was indicated by the presence of six signals between 107.0 and 181.5 ppm in the ¹³C NMR spectrum. A signal at 198.5 ppm suggested the presence of a ketone carbonyl in **2**. The connections between carbon and hydrogen atoms in the structures were established based on the analysis of the two-dimensional NMR experiments (COSY, HMQC and HMBC - Table 2 and Table 3). The spectral data of **1** and **2** are in agreement with those published in the literature for cochlioquinone A and isocochlioquinone, respectively (Figure 5).

Discussion

Several endophytic fungi were isolated from the *P. adiantoides*, a plant species selected due to the activity of its extract in a panel of assays used to screen the Brazilian flora for bioactive natural products (unpublished results). Among the fungi isolated from this plant, the isolate UFMGCB-555 showed strong activity in the assays with TryR and *L. amazonensis*. Using molecular taxonomy techniques, we were able to

identify this fungus as *Cochliobolus* sp. (Pleosporaceae, Ascomycota). This genus comprises approximately 50 species occurring all over the world [24], many of which can parasitize plants and cause considerable agricultural losses [25]. Some species of *Bipolaris*, the anamorphic state of *Cochliobolus*, are also the etiologic agent of several human diseases, such as sinusitis, ocular infections, peritonitis, and meningoencephalitis [26,27]. However, in the present work we looked for the ability of *Cochliobolus* UFMGCB-555 to produce secondary metabolites with biological or pharmaceutical potential, especially for neglected tropical diseases.

To guide the fractionation process aiming at the isolation of the active compounds of this extract, we decided to use the TryR assay developed by Hamilton et al. [19]. Besides being more economic due to low consumption of the expensive substrate trypanothione, this assay is simpler, safer and faster to perform than the assay with *L. amazonensis*. Thus, the bioassay with the parasite was used only at the end of the isolation procedure, with the pure compounds. Using this strategy we arrived at a fraction containing two major substances, one active (**1**) and the other inactive (**2**) in the TryR assay (Table 1). Both compounds were, however, active against *L. amazonensis*, showing EC₅₀ values of 1.7 μ M and 4.1 μ M, respectively (Figure 3).

After detailed analysis of the ESI-MS and NMR spectra, and comparison of our data with those published in the literature [28], compounds **1** and **2** were identified as cochlioquinone A and isocochlioquinone, respectively (Figure 5). However, slightly different interpretation of some NMR signals, as compared with those described by Miyagawa [28], are noteworthy: a) the hydrogen at C-5 in both compounds (Table 2 and Table 3 – position 5) couples with the three hydrogen atoms bound to C-27 and with the hydrogen at C-4, thus appearing as a double quartet, with coupling constants $J = 7.0$ and 5.1 Hz, and not as quintet, as described by Miyagawa; b) the two hydrogen atoms at C-2 in compound **1** (Table 2 – position 2) show distinct signals centered at 1.45δ and 1.08δ and not one centered at 1.35δ ; c) the same is true for compound **2** (Table 3 – position 2), where the corresponding signals are observed at 1.45δ and 1.08δ and not only at 1.25δ , and finally; d) the two hydrogen atoms at C-20 in compound **2** (Table 3 – position 20) resonate at 1.46δ and 1.74δ and not only at 1.60δ as described by those authors.

Cochlioquinones and related compounds are known to occur in fungi from different genera, including *Cochliobolus* and *Bipolaris* [29,30,31], *Helminthosporium*

[32], *Drechslera* [33], and *Stachybotrys* [30]. However, this is the first report on the leishmanicidal activity of compounds belonging to this class of natural products.

It is known that quinonoid compounds with free positions in the quinone ring are susceptible to nucleophilic attack by thiol groups to form stable Michael addition products [35]. In this regard, after **1** was unequivocally identified as cochlioquinone A, its activity in the Ellman's-reagent-mediated TryR assay was questioned due to the presence of a quinonoid ring in its structure. Thus, rather than directly inhibiting the enzyme in the assay, cochlioquinone A could be capturing the reduced substrate (Figure 6B) resulting in the interruption of the chemical reduction of Ellman's reagent [36]. To confirm this possibility, we performed the assay using the classical protocol based on the measurement of NADPH consumption [36] while using an excess trypanothione (100 μM) in comparison to cochlioquinone A (50 μM). Indeed, under these conditions no inhibition of the enzyme activity could be observed (data not shown).

In view of the above results, we can conclude that cochlioquinone A and isocochlioquinone A are exerting their leishmanicidal effect by hitting targets other than TryR within the parasite. A literature search disclosed the following information: a) cochlioquinone A is a competitive inhibitor of the ivermectin binding site in *Caenorhabditis elegans*, with an inhibition constant of 30 μM [34]; b) ivermectin is also active *in vivo* against different species of *Leishmania* [37,38]; c) the mode of action of ivermectin in nematodes is related to its high affinity to glutamate-gated chloride channels, causing an increase in the permeability of the cell membrane to chloride ions [39]; d) the TDR database of potential drug targets for NDTs (<http://tdrtargets.org>) reveals four genes of *L. major* expressing putative chloride ions transporters (LmjF01.0180, LmjF04.1000, LmjF32.3370, and LmjF33.1060); e) at least three of these genes have orthologs in *C. elegans* (C07H4.2, R07B7.1), while LmjF01.0180 has an ortholog also in *T. cruzi* (Tc00.1047053504797.140). Based on these pieces of information it is plausible to speculate that chloride ions transporters may also serve as a target for cochlioquinone A and related compounds in *Leishmania* and *Trypanosoma*. This hypothesis needs further experimental evidences to be confirmed or refuted.

Concerning isocochlioquinone A, the literature [40] show that it can inhibit the growth of the malaria-causing protozoan parasite *Plasmodium falciparum* with IC_{50} values of 1.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the K1 strain (resistant to chloroquine and pyrimethamine), and 3.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the NF 54 strain (susceptible to standard antimalarials). These values are close to the EC_{50} shown against *L. amazonensis* in the present work.

Besides the significant activity against *L. amazonensis*, our data indicate that **1** and **2** present some degree of selectivity, as they were inactive in the assays with three human cancer cell lines (Table 1) and five pathogenic microorganisms (data not shown) used in this investigation. The low toxicity of **1** and **2** to mammalian cell lines reported in this work is in agreement with recently reported data showing that isocochlioquinone A has only a small effect on HeLa and KB cells [29,41]. Another study [33] showed that when cochlioquinone A was tested *in vitro* against different kinases it showed selective activity against diacylglycerol kinase, both *in vitro* and in whole cell assay employing BW5147 T cell lymphoma lineage. Related compounds, such as cochlioquinone A1, exhibited selective toxicity towards bovine aortic endothelial cell when compared with normal and cancer cell lines [29] leading the authors to suggest that it may serve for developing new therapeutic agents for angiogenesis-related diseases.

The activity in the low micro molecular range towards *L. amazonensis* and the selectivity of **1** and **2** are reported here for the first time and justify further investigations on compounds of this class to assess their *in vitro* and *in vivo* effect on parasites of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*. Finally, by disclosing the leishmanicidal activity of two secondary metabolites from an endophytic fungus, the present work reinforces the role of these organisms as an important source of drug lead candidates for the development of new chemotherapeutic agents for NTDs.

Supporting Information

NMR spectra of the isolated compounds.

Acknowledgments

The recombinant trypanothione reductase used in this work was a kind gift from Prof. Alan Fairlamb (University of Dundee, Scotland). We thank to RPPN Santuário do Caraça for their support during plant collection. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Oswaldo Cruz Foundation (PDTIS-FIOCRUZ). We are grateful to the reviewers of the original manuscript for their constructive comments and suggestions.

References

1. WHO (2008) World Health Organization. Control of Neglected Tropical Diseases (NTD): Neglected tropical diseases frequently asked questions. http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index.html. Accessed: 15 October 2008.
2. DNDi (2008) Drugs for Neglected Diseases Initiative. Neglected Diseases.
3. Torreele E (2006) No drugs in an age of plenty: urging governments to redress the balance. *Interdisciplinary Science Reviews* 31: 3-8.
4. Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448-459.
5. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.
6. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257-268.
7. Gunatilaka AAL (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* 69: 509-526.
8. Kettering M, Sterner O, Anke T (2004) Antibiotics in the chemical communication of fungi. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 59: 816-823.
9. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A (1985) Trypanothione - a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione-reductase in trypanosomatids. *Science* 227: 1485-1487.
10. Fairlamb AH, Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology* 46: 695-729.
11. Henderson GB, Fairlamb AH (1987) Trypanothione metabolism - a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitology Today* 3: 312-315.
12. Frearson JA, Wyatt PG, Gilbert IH, Fairlamb AH (2007) Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends in Parasitology* 23: 589-595.
13. de Hoog GS, Vicente V, Caligorie RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, et al. (2003) Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 4767-4778.

14. White TJ, Bruns TD, Lee SB (1989) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis NA GJ, Sninsky J, et al., editor. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press. pp. 315-322.
15. Green P (2008): <http://www.phrap.org>. Accessed: 15 October 2008
16. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
17. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
18. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
19. Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH (2003) Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal* 369: 529-537.
20. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, et al. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 757-766.
21. Shoemaker RH (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* 6: 813-823.
22. Teixeira MCA, Santos RD, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L, dos-Santos WLC (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research* 88: 963-968.
23. Yarrow D (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: *The yeast: a taxonomic study*. Fell, J W (Ed.) Amsterdam: Elsevier. pp. 77-105.
24. Fungorum" I (2008) Available: <http://indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed: 15 October 2008.
25. Aggarwal R, Tewari AK, Srivastava KD, Singh DV (2004) Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* 157: 369-377.

26. Jacobson M, Galetta SL, Atlas SW, Curtis MT, Wulc AW (1992) *Bipolaris*-induced orbital cellulitis. *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology* 12: 250-256.
27. Maskin SL, Fetchick RJ, Leone CR, Sharkey PK, Rinaldi MG (1989) *Bipolaris hawaiiensis*-caused pheohyphomycotic orbitopathy - a devastating fungal sinusitis in an apparently immunocompetent host. *Ophthalmology* 96: 175-179.
28. Miyagawa H, Nagai S, Tsurushima T, Sato M, Ueno T, et al. (1994) Phytotoxins produced by the plant-pathogenic fungus *Bipolaris bicolor* el-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 58: 1143-1145.
29. Jung HJ, Lee HB, Lim CH, Kim CJ, Kwon HJ (2003) Cochlioquinone A1, a new anti-angiogenic agent from *Bipolaris zeicola*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 4743-4747.
30. Yoganathan K, Yang LK, Rossant C, Huang YC, Ng S, et al. (2004) Cochlioquinones and epi-cochlioquinones: Antagonists of the human chemokine receptor CCR5 from *Bipolaris brizae* and *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Antibiotics* 57: 59-63.
31. Lim CH, Miyagawa H, Tsurushima T, Ueno T, Sato M (1996) Cochlioquinol: A new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60: 724-725.
32. Ashley JN, Raistrick H (1938) Studies in the biochemistry of micro-organisms LVI. Luteoleersin and alboleersin; Metabolic products of *Helminthosporium leersii* Atkinson. A possible oxidation-reduction system. *Biochemical Journal* 32: 449-454.
33. Machida T, Higashi K, Ogawara H (1995) Cochlioquinone-a, an inhibitor of diacylglycerol kinase. *Journal of Antibiotics* 48: 1076-1080.
34. Schaeffer JM, Frazier EG, Bergstrom AR, Williamson JM, Liesch JM, et al. (1990) Cochlioquinone-a, a nematocidal agent which competes for specific [h-3] ivermectin binding-sites. *Journal of Antibiotics* 43: 1179-1182.
35. Wang XH, Thomas B, Sachdeva R, Arterburn L, Frye L, et al. (2006) Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3604-3609.
36. Martyn DC, Jones DC, Fairlamb AH, Clardy J (2007) High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 1280-1283.

37. Rasheid K, Morsy T (1998) Efficacy of ivermectin on the infectivity of *Leishmania major* promastigotes. J Egypt Soc Parasitol 28: 207-212.
38. Rifaat LK, Mohammad MA, Jawdat SZ (1989) Ivermectin, levamisole and thymic extract for chemotherapy and immunostimulation of visceral leishmaniasis in hamsters and mice. Japanese Journal of Medical Science & Biology 42: 51-61.
39. Cheeseman CL, Delany NS, Woods DJ, Wolstenholme AJ (2001) High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. Molecular and Biochemical Parasitology 114: 161-168.
40. Osterhage C, Konig GM, Holler U, Wright AD (2002) Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. Journal of Natural Products 65: 306-313.
41. Phuwapraisirisan P, Sawang K, Siripong P, Tip-Pyang S (2007) Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. Tetrahedron Letters 48: 5193-5195.
42. Canonica L, Beretta MG, Colombo L, Gennari C, Ranzi BM, et al. (1980) Biosynthesis of cochlioquinones. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1: 2686-2690.

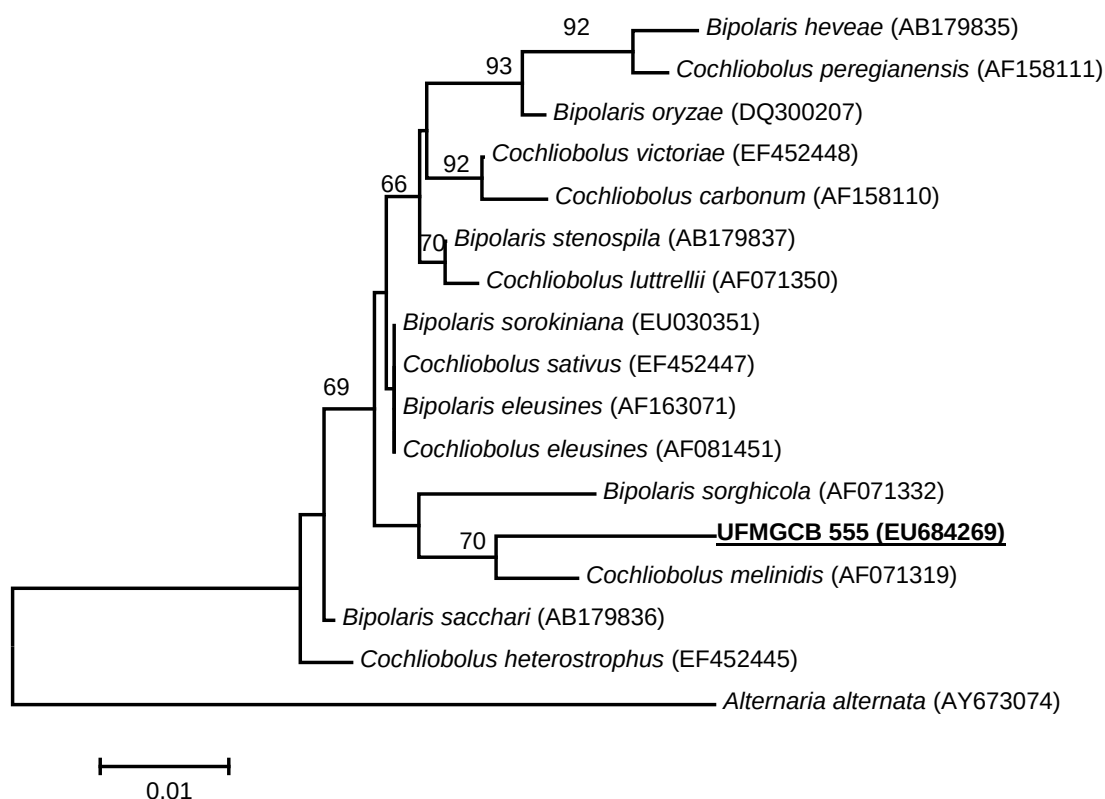


Figure 1. Phylogenetic tree depicting the relationships between UFMGCB-555 and related species. The tree was constructed by neighbor-joining analysis (Kimura-2 parameter) of their ITS domain sequences. Bootstrap percentage from 1000 replicates is shown. The GenBank accession numbers are indicated for each reference sequence. The ITS sequence of *Alternaria* (AY673074) was used as an outgroup.

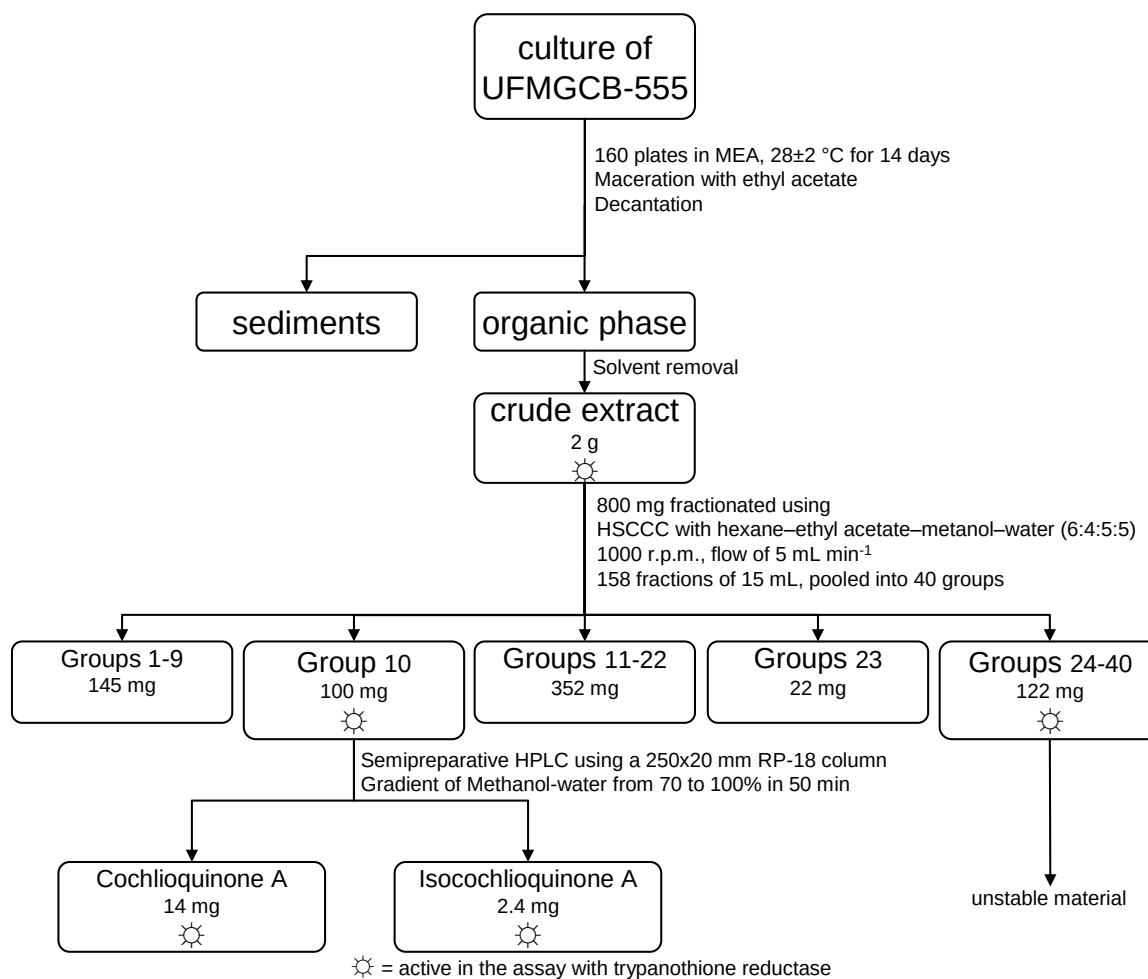


Figure 2. Flowchart illustrating the isolation of cochlioquinone A and isocochlioquinone A. The fractionation was guided by the bioassay with the enzyme trypanothione reductase, in which the crude extracts, fractions, and isolated compounds were tested at $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

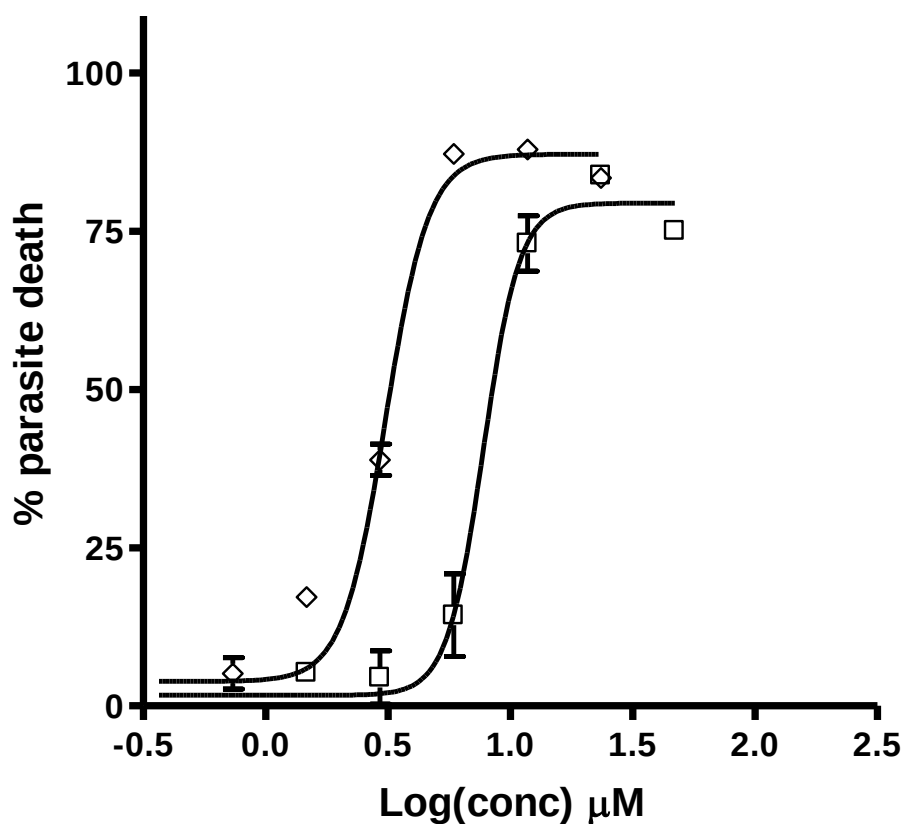


Figure 3. Dose response curves for **1** (diamonds) and **2** (squares) in the assay with amastigote-like forms of *L. amazonensis*. The EC_{50} (effective concentration to kill 50% of the parasites) values were found to be $1.7 \mu\text{M}$ (95% confidence interval = 1.5 to $1.9 \mu\text{M}$) and $4.1 \mu\text{M}$ (95% confidence interval = 3.6 to $4.7 \mu\text{M}$), respectively. The data in the plots are derived from at least two independent experiments.

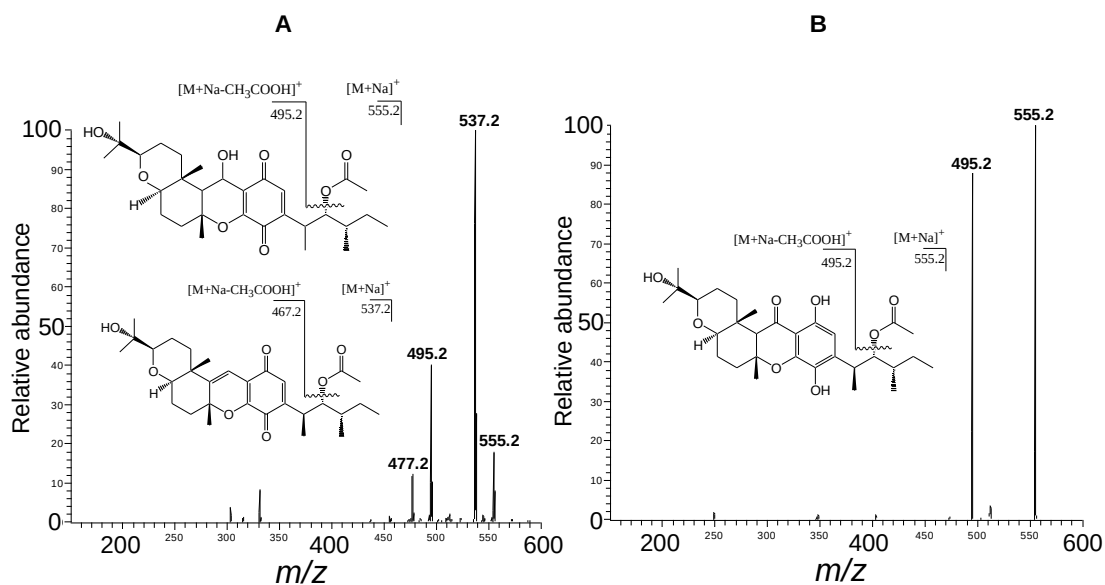


Figure 4. ESI-MS-MS in the positive ion mode showing the main fragments generated by cochlioquinone A (panel **A**) and isocochlioquinone A (panel **B**). Both compounds show sodiated quasi-molecular ion peak $[M+Na]^+$ at 555 daltons and the loss of acetic acid (60 daltons) from the side chain. In addition, the hydroxyl group in the pyrane ring of cochlioquinone A is responsible for the observed loss of water (18 daltons).

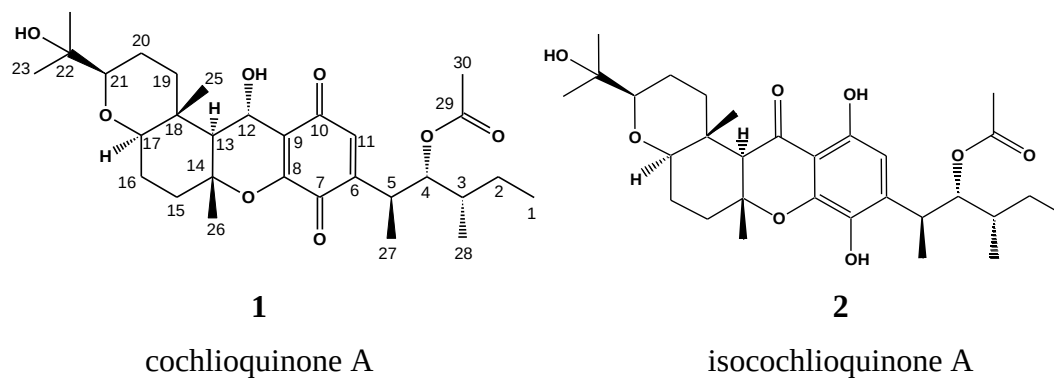


Figure 5. Chemical structures of compounds isolated from *Cochliobolus* sp. UFMGCB-555. The numbering in these structures follows that used in [42].

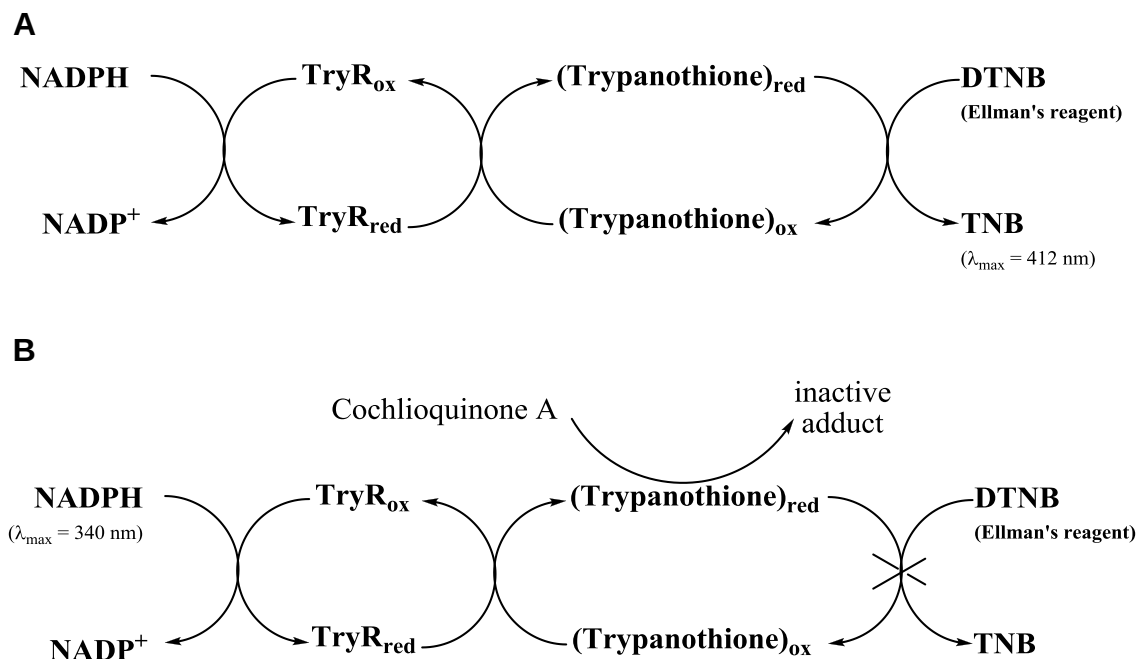


Figure 6. **A)** Schematic view of the chemical and enzymatic reactions involved in the TryR assay resulting in the reduction of the Elmmann's reagent (DTNB) to the yellow-colored 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB); **B)** Same as above, showing the interference of cochlioquinone A resulting in a false positive readout due to its reaction with the reduced form of trypanothione, interrupting the chemical reduction of DTNB.

Table 1. Biological activities of crude extract, fraction, and compounds isolated from *Cochliobolus* sp. (UFMGCB-555) tested at a single dose of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Samples	AMA ^a	TryR ^b	Cancer cell lines ^c		
			UACC-62	MCF-7	TK-10
Crude extract	87 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	62 $\pm$ 22	67 $\pm$ 8	80 $\pm$ 16
Grupo 10	nt ^d	99 $\pm$ 5	-	-	-
1	60 $\pm$ 5	99 $\pm$ 4	-	-	-
2	70 $\pm$ 2	-	-	-	-

^a Percentage of death of amastigote-like forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Control drug: amphotericin B at 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$;

^b Percentage inhibition of the enzyme trypanothione reductase. Clomipramine at 6 μM was used as 50% inhibition control;

^c Cytocidal activity (percentage of death of human cancer cells relative to the initial inoculum). Control drugs: etoposide at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and colchicine at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$;

^d not tested.

The values represent the mean $\pm$ S.D. of at least 2 independent experiments.

The minus symbol (-) means inactive.

Table 2. ^1H -NMR and HSQC spectral data of **1** and comparison with literature data for cochlioquinone A.

Position	cochlioquinone A ^a		1	
	Chemical shifts	Multiplicity and coupling constants	Chemical shifts	Multiplicity and coupling constants
1	0.88	(3H, <i>t</i> , $J = 7.0$)	0.85	(3H, <i>t</i> , $J = 6.8$)
2	1.35	(2H, *)	1.45	(1H, *)
			1.08	(1H, *)
3	1.60	(1H, *)	1.49	(1H, *)
4	5.01	(1H, <i>dd</i> , $J = 7.5, 5.0$)	4.92	(1H, <i>dd</i> , $J = 7.7, 5.1$)
5	3.22	(1H, *)	3.37	(1H, <i>dq</i> , $J = 7.0, 5.1$)
11	6.63	(1H, <i>s</i>)	6.63	(1H, <i>s</i>)
12	4.93	(1H, <i>dd</i> , $J = 10.0, 1.3$)	4.94	(1H, <i>d</i> , $J = 10.6$)
13	1.72	(1H, <i>d</i> , $J = 10.0$)	1.72	(1H, <i>d</i> , $J = 10.6$)
15	1.91	(1H, <i>dt</i> , $J = 13.3, 3.8$)	1.91	(1H, <i>dt</i> , $J = 13.2, 3.9$)
	2.09	(1H, <i>dt</i> , $J = 13.3, 3.3$)	2.08	(1H, <i>dt</i> , $J = 13.2, 3.5$)
16	1.56	(1H, *)	1.54	(1H, *)
	1.79	(1H, *)	1.79	(1H, *)
17	3.17	(1H, <i>dd</i> , $J = 12.5, 3.8$)	3.17	(1H, <i>dd</i> , $J = 11.9, 3.5$)
19	1.40	(1H, *)	1.40	(1H, *)
	2.47	(1H, <i>m</i>)	2.47	(1H, <i>m</i>)
20	1.43	(1H, *)	1.43	(1H, *)
	1.65	(1H, *)	1.64	(1H, *)
21	3.25	(1H, <i>dd</i> , $J = 12.5, 2.5$)	3.25	(1H, <i>dd</i> , $J = 11.9, 2.8$)
23	1.17	(3H, <i>s</i>)	1.16	(3H, <i>s</i>)
24	1.18	(3H, <i>s</i>)	1.18	(3H, <i>s</i>)
25	1.01	(3H, <i>s</i>)	1.01	(3H, <i>s</i>)
26	1.32	(3H, <i>s</i>)	1.32	(3H, <i>s</i>)
27	1.14	(3H, <i>d</i> , $J = 6.8$)	1.12	(3H, <i>d</i> , $J = 7.0$)
28	0.87	(3H, <i>d</i> , $J = 7.0$)	0.84	(3H, <i>d</i> , $J = 7.5$)
30	1.98	(3H, <i>s</i>)	2.05	(3H, <i>s</i>)

Spectra were recorded at 400MHz in CDCl_3 .

^a data from reference [28].

J = coupling in Hz.

* overlapping multiplet signal.

Table 3. ^1H -NMR and HSQC spectral data of **2** and comparison with literature data for isocochlioquinone A.

Position	Isocochlioquinone A ^a		2	
	Chemical shifts	Multiplicities and coupling constants	Chemical shifts	Multiplicities and coupling constants
1	0.89	(3H, <i>t</i> , $J = 7.0$)	0.83	(3H, <i>t</i> , $J = 7.4$)
2	1.25	(2H, *)	1.45	(1H, *)
			1.08	(1H, *)
3	1.63	(1H, *)	1.56	(1H, *)
4	5.18	(1H, <i>dd</i> , $J = 7.5, 5.0$)	5.04	(1H, <i>dd</i> , $J = 7.6, 5.3$)
5	3.46	(1H, <i>qnt</i> , $J = 7.0$)	3.37	(1H, <i>dq</i> , $J = 7.0, 5.3$)
11	6.40	(1H, <i>s</i>)	6.52	(1H, <i>s</i>)
13	2.77	(1H, <i>s</i>)	2.78	(1H, <i>s</i>)
15	2.06	(1H, *)	2.08	(2H, *)
	2.09	(1H, <i>dt</i> , $J = 13.3, 3.3$)		
16	1.60	(1H, *)	1.66	(1H, *)
				(1H, <i>ddd</i> , $J = 13.4, 7.33, 3.8$)
	1.80	(1H, *)	1.81	(1H, <i>dd</i> , $J = 11.9, 3.8$)
		(1H, <i>dd</i> , $J = 12.0, 3.8$)		
17	3.16	(1H, <i>dd</i> , $J = 12.5, 2.5$)	3.15	(1H, <i>dd</i> , $J = 12.0, 2.9$)
19	1.30	(3H, <i>s</i>)	1.29	(3H, <i>s</i>)
	2.75	(3H, <i>s</i>)	2.75	(3H, <i>s</i>)
20	1.60	(3H, <i>s</i>)	1.46	(3H, <i>s</i>)
			1.74	(3H, <i>s</i>)
21	3.27	(3H, <i>s</i>)	3.26	(3H, <i>s</i>)
23	1.19	(3H, <i>s</i>)	1.19	(3H, <i>s</i>)
24	1.19	(3H, <i>s</i>)	1.19	(3H, <i>s</i>)
25	1.13	(3H, <i>s</i>)	1.01	(3H, <i>s</i>)
26	1.46	(3H, <i>s</i>)	1.48	(3H, <i>s</i>)
27	1.20	(3H, <i>d</i> , $J = 7.0$)	1.19	(3H, <i>d</i> , $J = 7.0$)
28	0.88	(3H, <i>d</i> , $J = 6.8$)	0.86	(3H, <i>d</i> , $J = 6.6$)
30	1.93	(3H, <i>s</i>)	2.05	(3H, <i>s</i>)

Spectra were recorded at 400MHz in CDCl_3 .

^a data from reference [28].

J = coupling constants in Hz.

* overlapping multiplet signal.

Table 4. ^{13}C -NMR and DEPT spectral data of compounds **1** and **2** and comparison with literature data for Cochlioquinone A and Isocochlioquinone.

Position	Chemical shifts		Mult ^b	Chemical shifts		Mult ^b
	1	Cochlioquinone A ^a		2	Isocochlioquinone A ^a	
1	11.1	11.4	CH3	11.1	11.4	CH3
2	25.2	26.4	CH2	24.2	26.5	CH2
3	36.4	36.2	CH	36.4	36.2	CH
4	79.9	78.2	CH	80.6	79.0	CH
5	32.7	34.6	CH	34.4	35.5	CH
6	148.1	148.3	qC	139.7	140.2	qC
7	181.6	181.5	qC	135.0	135.3	qC
8	151.4	151.5	qC	143.8	144.0	qC
9	119.1	119.0	qC	107.0	107.0	qC
10	188.9	188.5	qC	153.2	153.2	qC
11	134.3	133.6	CH	108.2	108.2	CH
12	63.1	63.0	CH	198.3	198.5	C
13	51.7	51.8	CH	60.4	60.5	CH
14	83.2	83.0	qC	83.5	83.3	qC
15	37.5	37.5	CH2	37.6	37.6	CH2
16	24.0	25.2	CH2	25.0	25.0	CH2
17	83.8	83.8	CH	83.6	83.6	CH
18	36.7	36.7	qC	35.5	35.6	qC
19	38.6	38.5	CH2	37.4	37.3	CH2
20	21.5	21.5	CH2	21.3	21.3	CH2
21	85.1	85.1	CH	85.4	85.5	CH
22	71.9	71.7	qC	71.9	72.0	qC
23	23.8	24.0	CH3	23.8	23.8	CH3
24	26.1	25.9	CH3	26.0	26.0	CH3
25	12.6	12.6	CH3	12.3	12.5	CH3
26	21.1	21.0	CH3	22.0	22.0	CH3
27	18.2	17.2	CH3	18.0	17.5	CH3
28	15.4	13.2	CH3	15.3	13.5	CH3
29	170.6	170.3	qC	170.8	170.5	qC
30	20.9	20.7	CH3	21.0	20.8	CH3

Spectra were recorded at 100MHz in CDCl_3 .

^a data from reference [28].

^b the multiplicities were deduced from DEPT experiments; qC means quaternary carbon.

Artigo Fusarium

Antifungal activity of the 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol and T2 Toxin isolated from *Fusarium* sp. UFMG551 against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Fernanda Fraga Campos^{1, 2}, Susana Johann¹, Betania Barros Cota¹, Tânia Maria Almeida Alves¹, Luiz Henrique Rosa³, Rachel Basques Caligiorne⁴, Carlos Augusto Rosa², Patrícia Silva Cisalpino², and Carlos Leomar Zani^{1*}

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG, 30190-002, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

³Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

⁴Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

*Corresponding author: Tel.: +55-31-33497791, Fax: +55-31-32953115, E-mail: zani@cpqrr.fiocruz.br

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, antifungal compounds, 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol and T2 toxin, *Fusarium* sp.

Abstract

Endemic mycoses caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is a serious public health concern in several countries in Latin America, especially in Brazil, Venezuela, Colombia and Argentina. Most of the drugs used to control infections caused by *P. brasiliensis* are toxic and ineffective, with frequent infections relapses. In our search for new drug lead compounds for paracoccidioidomycosis we found that the crude extract of the endophytic fungus UFMGCB-551, obtained from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) was able to inhibit several clinical strains of *P. brasiliensis* and was also active in the bioautographic assay against the phytopathogenic fungus *Cladosporium sphaerospermum*. The endophytic fungus was identified as *Fusarium* sp. based on its macro and micro-morphology, and on its sequence of the internally transcribed spacer regions (ITS) of rDNA. The chromatographic fractionation of the fungal extract was guided by the bioautographic assay to afford two known trichothecenes mycotoxins: 8-*n*-pentanoyllneosolaniol (**1**) and T2-toxin (**2**). The minimal inhibitory concentrations (MIC) of these compounds were determined using 11 strains of the *P. brasiliensis*, and the values found to vary from 160-640 nM for **1** and 75-640 nM for **2**. The compounds were found to be much less active against *Candida albicans*, showing MIC values higher than 22 µM.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), also called Lutz-Splendore-Almeida disease or South American blastomycosis, is a chronic and infectious disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Marques, 1998). This fungus alternates between the mycelial and yeast forms in infected tissues or cultures when changing from room temperature to 37 °C. The disease is characterized by a polymorphism of lesions and can affect different tissues, in particular, skin, lymphnodes, lungs, oral, nasal and gastrointestinal mucous membranes, suprarenal glands, and the central nervous system (de Almeida, *et al.*, 2005, Ramos-E-Silva & Saraiva, 2008).

PCM is endemic in Latin America, where 2% of the estimated 10 million infected people will develop the disease (McEwen, 1995). However, in some countries the annual incidence can reach 3 cases *per* 100.000 inhabitants and cause the death of up to 23% of the infected people (Felipe, *et al.*, 2005). Most Latin American countries

report the occurrence of this fungus, with the largest number of cases being reported in Brazil, Venezuela, Colombia, Ecuador, and Argentina (Marques, 1998).

Spontaneous cure is not frequently seen in PCM, except in some cases of primary lung infections (Shikanai-Yasuda, *et al.*, 2006). Treatment includes the use of antifungal drugs, nutritional support, treatment of the eventual sequelae and co-morbidities, and the prevention of opportunistic disease (Shikanai-Yasuda, *et al.*, 2006). The classic drugs used for PCM are sulfonamides, amphotericin B, and imidazole derivates, such as ketoconazole, itraconazole, and fluconazole. Voriconazole, a second generation antifungal triazole, is available in oral and intravenous formulations, and constitutes an important therapeutic alternative; however, its high cost is a significant limitation (Shikanai-Yasuda, *et al.*, 2006). Despite the existence of effective treatments for PCM, the polymorphic nature of the disease pose difficulties to its diagnosis, resulting in progressive disease, capable of leaving incapacitating sequelae (Restrepo, 1994). Furthermore, many patients abandon the treatment before a total cure, causing recurrences and paving the way to the emergence of drug resistance.

Aiming at discovering new drug leads for treatment or prevention of *P. brasiliensis*, we screened crude extracts obtained from dozens of endophytic fungus in an assay with *P. brasiliensis* (unpublished data). As a result, the extract of the isolate UFMGCB-551, an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae), showed strong activity in the screening assay. In this work we describe the identification of the fungus UFMGCB-551 on the basis of its morphologic characteristics and also on the its sequence of the internally transcribed spacer region (ITS) of rDNA. We also describe the isolation and identification of two compounds with potent antifungal activity on *C. sphaerospermum* and *P. brasiliensis*.

Material and Methods

Morphologic and molecular identification of the fungus UFMGCB-551

The endophytic fungus was isolated from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) and deposited at Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, with the code UFMGCB-551. Its morphological identification was performed following described procedures (Riddell, 1950). Briefly, the fungus was cultivated on different culture medium (corn meal, oat meal, Sabouraud, Czapek and

potato dextrose agars) for 7 and 14 days at $28 \pm 2^\circ\text{C}$. The sporulated mycelium was then transferred to glass slides, fixed and with polyvinyl lactophenol alcohol (PVL) for visualization of the fungal microstructures (Grandi, 2002). The preparations were photographed using a digital camera Olympus DP12 coupled to a photo microscope Olympus BX-41.

The DNA was extracted according to De Hoog, *et al*, (2003). The ribosomal DNA internal transcribed spacer domains (rDNA-ITS) were amplified using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), as described by White, *et al*, (1989). Five sequences were generated using MEGABACE (Amersham Biosciences, USA) which were used to feed PHRED-PHRAP software (Green, 2008) in order to find the consensus sequence. The sequence was then compared with those deposited in the GenBank using BLASTn software (Altschul, *et al.*, 1997) to identify the isolate to the genus level. The consensus sequence was then deposited in the GenBank (FJ517394).

Fungal culture and extract preparation

To prepare the inoculum, the fungus was grown in potato dextrose agar (PDA) medium for 5 days at $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Five millimeter diameter plugs of this culture were then placed at the center of 150 Petri dishes (90 mm diameter), each containing 20 mL of malt extract agar (MEA) medium (1% glucose, 1% malt extract, 0.1% peptone, and 1.5% agar). The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 days and, after this period, a small aliquot of the biomass was used for extraction of DNA and the remaining material used for extraction of the fungal secondary metabolites. Five plates were not inoculated with the fungus and subjected to the same protocol to serve as control of the culture medium. To prepare the extracts, the broths from the Petri dishes were transferred to a six-liter Erlenmeyer containing 3.5 L of ethyl acetate. After maceration for 48 h at room temperature, the organic phase was decanted and the solvent removed under vacuum in a rotary-evaporator at 45°C . Residual solvent was eliminated in a vacuum centrifuge (Termosavant) at 40°C . A similar extraction procedure was carried out using the five sterile plates with MEA medium, and the extract thus obtained was used as a culture medium control in the bioassays.

Bioassay-guided chromatographic fractionation of the extract

High-speed co-current chromatography (HSCoCC) (Berthod & Hassoun, 2006) was performed in a Pharma-Tech chromatograph model CCC-1000 equipped with three multilayer coils totaling a volume of 360 mL. With the rotor stopped, the coils were filled with the lower aqueous phase of a mixture of dichloromethane-methanol-water (5:6:4). The coils were then rotated at 1045 r.p.m. and the upper phase was pumped in tail-to-head direction, at a flow-rate of 4.5 mL min⁻¹. After equilibration of the phases inside the column, 1.2 g of the extract dissolved in 10 mL of the biphasic solvent mixture was injected into the column. The lower phase was pumped at a flow-rate of 3.0 mL min⁻¹ and the upper phase at 1.5 mL min⁻¹. A total of 134 fractions of 9 mL each were collected and pooled into 25 groups on the basis of their similarity, as assessed by Thin Layer Chromatography (TLC) analysis (see Figure 2). All groups were subjected to the bioautographic assay with *C. sphaerospermum* to identify those with antifungal activity (see Figure 2). Group 18 (95 mg) was subjected to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a RP-18 column (Shim-pak, 250x20 mm i.d., 5µm particle size) using a isocratic system of acetonitrile-water 40% in 50 min. The mobile phase was pumped at a flow rate of 10 mL min⁻¹ and the column effluent monitored with a UV detector set to 210 nm. This procedure yielded 4 mg of compound **1** and 15 mg of compound **2**.

Structure elucidation of compounds **1** and **2**

Proton and carbon Nuclear Magnetic Resonance (¹H and ¹³C NMR) spectra, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC), and Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) experiments were run on a Bruker DRX 400 spectrometer using the pulse programs provided by the manufacturer. The substances were dissolved in perdeuterated solvents containing 0.1% tetramethylsilane as the internal chemical shift standard. Mass spectra were acquired on a Thermo Finnigan LCQ-Advantage spectrometer equipped with an electrospray ion source. Solutions of the compounds at 200 µg mL⁻¹ in MeOH-H₂O (1:1) were infused at 2.5 µL min⁻¹ and the positive mass spectra acquired in the range between *m/z* 150 and 1000 Daltons. The run conditions were: source voltage = 4.56kV, source current = 0.24 µA, sheath gas flow rate = 19.63, capillary voltage = 10.17V, and capillary temperature = 200°C. The MS² and MS³ spectra were obtained using collision

induction dissociation (CID) adjusted for 28% and 30%, respectively, with He as the collision activation partner.

***Cladosporium sphaerospermum* assays**

The bioautographic assay with *C. sphaerospermum* CCT 1740 was performed using the procedure developed by (Homans & Fuchs, 1970). Briefly, 10 µL of the sample solutions, corresponding to 50 µg/spot of the crude extract and groups, were applied to pre-coated silica-gel TLC plates. The plates were then developed with dichloromethane-methanol (95:5), and dried for complete removal of solvents. The plates were then sprayed with a 10^6 CFU mL⁻¹ spore suspension of *C. sphaerospermum* in glucose and salt solution and incubated for 72 h in darkness in a moistened chamber at 25 °C. Clear inhibition zone appeared against a dark background indicating the presence of antifungal compounds. The results were expressed as (-) no visible inhibition halo, (+) halo up to 8 mm in diameter, (++) halo between 9-12 mm and (+++) inhibition halos larger than 12 mm.

Culture and maintenance of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Candida albicans*

Eleven clinical *P. brasiliensis* strains, Pb-01 (ATCC- MYA-826), Pb-18 (from the fungal collection of the Faculty of Medicine of the Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil), Pb-B339 (ATCC 32069), Pb-470 (clinical isolate from acute PCM, São Paulo, Brazil), Pb-608 and Pb-1017 (clinic isolates from chronic PCM, São Paulo, Brazil– MHH Forjaz / TIE Svidzinski), Pb-1925 (Epm 60), Pb-1578, Pb-9673, Pb-ED01, Pb-MG5 (clinic isolates from acute PCM, Paraná, Brazil, TIE Svidzinski) and one strain of *Candida albicans* (ATCC 18804) were used in the biological assays.

P. brasiliensis strains were maintained by weekly passage on solid YPD (yeast extract, peptone and dextrose) medium at 37°C and were used after 7-10 days of fungus growth. Yeast cells in the exponential phase were collected aseptically with a platinum loop and transferred to a tube containing 5 mL of sterile saline. If large aggregates existed, they were allowed to settle for several minutes, and the supernatants were collected. The suspensions were then diluted in synthetic RPMI medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine buffered to pH 7.0 with 0.165 mM morpholine propanesulfonic acid (MOPS, Sigma), and prepared according to the CLSI document M 27-A₂ (NCCLS, 2002) to obtain a final inoculum dilution suitable for the strains (Nakai

& Siebert, 2003). After homogenization by vortexing, transmittance was measured at 520 nm and adjusted to 69 to 70% (Hahn & Hamdan, 2000).

C. albicans was cultivated in Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Oxoid, Basingstoke, UK) at 4°C and maintenance transfers were performed at three month intervals. Synthetic medium RPMI with L-glutamine buffered to pH 7.0 with 0.165 mM MOPS was prepared according to the CLSI document M27-A2 (NCCLS, 2002) and used for Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determination. Inoculum's suspension in RPMI medium was prepared from fresh fungal cultures grown at 35°C. The spectrophotometric method (Pfaller, *et al.*, 1988) was used to obtain a final inoculum of $1.5 \pm 1.0 \times 10^3$ cfu mL⁻¹ to be used in antifungal susceptibility assay.

Determination of the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC)

Susceptibility was determined by the microbroth dilution method. Broth microdilution testing was performed in accordance with the guidelines in the CLSI M27-A₂ document (NCCLS, 2002, Nakai & Siebert, 2003). RPMI medium without samples or solvents was used as controls for both growth and sterility. Dimethylsulfoxide (DMSO) at the same volumes used in the assay was used as control for solvent toxicity. Amphotericin B (Sigma, St Louis, USA) (25 to 0.03 µg mL⁻¹) in DMSO and Bactrim (Sulfametoxazol + trimetoprim, Roche, Rio de Janeiro, Brazil) (600 to 1.17 µg mL⁻¹) in water were included as positive antifungal control drugs. Two fold serial dilutions were prepared as outlined in CLSI document M 27-A₂ (NCCLS, 2002). Crude extract, fractions and pure compounds were dissolved in DMSO and diluted with RPMI, maintaining a constant volume of 1 mL per tube. The extracts and compounds were initially tested at eight concentrations ranging from 1,000 to 7.8 µg mL⁻¹. The extracts and compounds that were active at the lowest concentrations were then tested in the range between 5.0 and 0.003 µg mL⁻¹. Volumes of 100 µL of each dilution were distributed in sterile flat-bottom 96-well microplates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). After inoculation of fungal strains, the plates were incubated for 10 days at 37°C. The tests were performed in triplicate in at last two independent experiments. The MIC of the samples were determined visually by comparison with the drug-free growth control well, and defined as the lowest sample concentration for which the well was optically clear. MICs are expressed in µg mL⁻¹ (for crude extract and fractions) and µM (for compounds).

Determination of the Minimal Fungicidal Concentrations (MFC)

The MFCs of each extract, fraction, and pure compounds were determined as follows: from the microtiter plate used to determine the MIC values, the test wells that showed complete fungal growth inhibition (clear wells), the test wells with growth similar to that of the no-drug control well, and growth control wells, were selected for the assay to determine the MFC. Thus 10 μ L of these wells were transferred to plates containing YPD medium and incubated at 37°C for 7 days. The MFC was determined as the lowest drug concentration at which fewer than three colonies was able to grow (Espinel-Ingroff, *et al.*, 2001, Portillo, *et al.*, 2005).

Statistical analysis

All the samples were tested in triplicate and two independent experiments were performed. Values represent the mean $\pm$ standard deviation (SD) of these experiments.

Results

Previous, unpublished observations of our group, disclosed that the crude extract of the endophytic fungus UFMGCB-551, obtained from *P. adiantoides*, was active in the bioautographic assay against the phytopathogenic fungus *C. sphaerospermum* and, more important, able to inhibit clinically relevant strains of *P. brasiliensis*.

UFMGCB-551 was cultivated on five different culture media and the morphological aspects of the colonies were annotated and used for taxonomic identification (Table 1). The colonies presented different pigmentation depending on the culture medium: yellowish in oat and PDA (potato dextrose agar), orange in corn meal and Sabouraud, and light pink in Czapek medium. Regarding the size of the colonies, the largest diameter (80 mm) was observed in PDA after 7 days of incubation. All colonies reached the largest size (86 mm) after 14 days of incubation. Although all colonies grew dense and velvety, no spores could be observed in any medium after 14 days of incubation. Samples of all colonies were mounted in lactophenol and its micro morphological aspects analyzed in an optical microscope. In colonies growing in oat after seven days and in Czapek after 14 days it was possible to observe curved and peaky macroconidias, appearing as boat-like structures (Figure 1). Altogether, the macro and micro morphological characteristics of UFMGCB-551 suggests that it belong

to the genus *Fusarium*. In order to add further evidences to this identification, data from molecular analyses were also used. Thus, the ITS sequences of UFMGCB-551 were generated and compared to ITS sequences of fungal species deposited in GenBank. A Blast search of the database indicates that the sequence obtained for UFMGCB-551 has at least 95% identity with species of the genus *Fusarium*.

The fungus was grown in 150 plates containing MEA medium and, after extraction with ethyl acetate, yielded 1.6 g of a crude extract (Figure 2). This extract was active against the filamentous fungus *C. sphaerospermum* (Figure 3), when tested at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and presented MICs that varied from 0.39-1.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against eleven *P. brasiliensis*. For yeast *C. albicans*, the MIC was of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 2).

An aliquot (1.2 g) of the extract was fractionated in a high-speed counter current chromatograph to generate 25 groups of fractions. Their masses and antifungal activity in the bioautographic assay with *C. sphaerospermum* are summarized in Figure 3, showing that only Groups 13, 17 and 18 were active. Group 18 was selected for further investigation because of its high activity and mass. When evaluated against 11 clinical isolates of *P. brasiliensis*, Group 18 showed MIC and MFC values (75 ng mL^{-1}) which are similar to that of Amphotericin B for at least two isolates: Pb-1 and Pb-1578. The control extract, obtained from the culture medium, was not active in these assays. Furthermore, group 18 showed MIC and MFC values of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. albicans*, which is a value about 100 times higher than that observed for *P. brasiliensis*, suggesting some selective toxicity towards the later.

Group 18 (100 mg) was fractionated using reversed-phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC) using a RP-18 column to afford two pure compounds **1** (4 mg) and **2** (15 mg) as white amorphous powders. The electrospray mass spectra (ESI-MS) in positive ion mode were similar for both compounds and showed a *quasi*-molecular sodiated ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ with m/z 489.2, corresponding to a molecular weight of 466.5 g mol^{-1} . The MS/MS spectra displayed peaks at m/z 387.0; 327.1; 267.0 and 245.1. Comparing these data to those published by Nielsen and Smedsgaard (2003) we could concluded that both compounds were analogous to T-2 toxin. The MS^3 of m/z 387.0 $[\text{M} + \text{Na} - \text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2]$ displayed that this ion was the parent ion of m/z 327.1 $[\text{M} + \text{Na} - \text{CH}_3\text{COOH}]$. The MS^4 of this last displayed a loss of 22Da,

meaning a loss of Na^+ and gain of H^+ (m/z 267.0) and a loss of 82 Da [$\text{M}+\text{H}-2\text{CH}_3\text{COOH}$].

The ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spectral data suggested that compounds **1** and **2** were closely related. The ^1H NMR spectrum of both compounds showed characteristic signals of spiroepoxy protons in **1** [δ 3.70 d J = 5.2 Hz, H-2; δ 4.40 d J = 5.6, H-11] and in **2** [δ 3.70 d J = 4.8 Hz, H-2; δ 4.36 d J = 5.6, H-11]. The epoxy protons (δ 3.06 d J = 4.0 Hz and δ 2.80 d J = 4.0 Hz, H-13; **1**; δ 3.06 d J = 3.6 Hz and δ 2.80 d J = 3.6 Hz, H-13, **2**), olefinic proton (δ 5.81 d J = 5.2 Hz, H-10, **1**; δ 5.81 d J = 5.6 Hz, H-10, **2**), allylic methyl group (δ 1.76 s, H-16, **1** and **2**), signal of proton of carbon with hydroxyl group (δ 4.16 m, H-3, **1** and **2**). According Savard et al. (1987) acetylation of the hydroxyl group at C-4 causes H-4 to resonate between 5.0 and 5.4 ppm (δ 5.30 d J = 2.5 Hz, H-4, **1**; δ 5.32 d J = 2.4 Hz, H-4, **2**). Small values of $J_{3,4}$ (2.8-3.4 Hz) indicate a *trans* relationship ($3\alpha,4\beta$) between the C-3 and C-4 substituents for all naturally occurring trichothecenes and for C-15 acetylated compounds, the H-15 appear between 3.9 and 4.4 ppm (δ 4.30 d J = 12.7 Hz and δ 4.06 d J = 12.7, H-15; **1**; δ 4.30 d J = 12.4 Hz and δ 4.06 d J = 12.4 Hz, H-15, **2**). The ^{13}C NMR spectra showed signals of 24 carbons and their multiplicities were obtained by DEPT. These spectra exhibited three carbonyl signals (δ 173.2, C-1', δ 172.7, Ac-4, δ 170.1, Ac-15, **1**; δ 172.7, C-1' and Ac-15 or 4, δ 170.1, Ac-15 or 4, **2**), two signals of methinic carbons of spiroepoxy ring (δ 78.7, C-2, δ 67.4, C-11, **1**; δ 78.8, C-2, δ 67.4, C-11, **2**), one methinic signal of hydroxylated carbon (δ 64.8, C-15, **1**; δ 64.6, C-15, **2**) and allylic carbon signals (δ 136.4, C-9, δ 123.7, C-10, **1**; δ 136.3, C-9, δ 123.7, C-10, **2**) for both compounds confirming ^1H NMR analysis. Differences between **1** and **2** are found in the aliphatic region of the NMR spectra assigned to the ester sidechain at C-8 (δ 173.2, C-1', δ 36.4/2.25 td J = 7.5 and 3.0 Hz, C-2'/H-2', δ 27.7/2.41 dd J = 5.8 and 2.5 Hz and 1.92 m, C-3'/H-3', δ 18.5/1.66 m, C-4'/H-4' and δ 13.7/0.96 t J = 7.3 Hz, C-5'/H-5', **1**; δ 172.7, C-1', δ 43.6/2.15 m, C-2'/H-2', δ 25.8/2.09 m, C-3'/H-3', δ 22.5 or δ 22.4/0.97 d J = 6.1 Hz, C-4'/H-4' or C-5'/H-5', δ 22.5 or δ 22.4/0.96 d J = 6.1 Hz, C-4'/H-4' or C-5'/H-5', **2**) what indicated *n*-pentanoyl ester group for **1** and an isobutyryl ester group for **2**. From these results and by comparison with literature data (Savard & Greenhalgh, 1987; Bekele et al., 1991), **1** and **2** were concluded to be 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol and T-2 toxin (Figure 4), respectively.

8-*n*-Pentanoyl-neosolaniol showed MIC and MFC values of 240 nM and 960 nM, respectively. The most sensitive *P. brasiliensis* strain to **1** was Pb-1578 with a MIC value of 160 nM. T-2 toxin was more active against Pb-470 and Pb-1578, showing MIC and MFC of 75 nM (Table 3).

Discussion

After finding that the UFMGCB-551 extract was toxic to *P. brasiliensis*, we decided to cultivate this isolate in larger scale aiming at its taxonomic classification and production of a culture extract in sufficient amount to allow the bioassay-guided fractionation and identification of its fungicidal components.

Fungus taxonomy is traditionally based on comparative morphology and on development of sexual reproduction structures (Sette, *et al.*, 2006). UFMGCB-551 was cultivated in five different culture medium and showed distinct macro and micromorphological characteristics, including asexual structures that are exclusive of the genus *Fusarium*. Thus the variation in the pigmentation of the colonies (Jackson, *et al.*, 1995, Guarro, *et al.*, 1999) was one of the criteria used to include the isolate UFMGCB-551 in the genus *Fusarium*. Other important morphological characters used to classify the isolate as a *Fusarium* species included the shape of the macroconidia, the presence microconidia, and whether the microconidia grow in chains (Jackson, *et al.*, 1995, Guarro, *et al.*, 1999). Some these characters were used to identify UFMGCB-551 as *Fusarium* sp.

As the classical taxonomic tools did not allow the identification of the fungus to the species level, we turned to the molecular taxonomy expecting the specific identification of UFMGCB-551. However, although genetic methods present high sensitivity and specificity for identifying microorganisms (Guarro, *et al.*, 1999, Sette, *et al.*, 2006), a definitive taxonomic assignment to the species level was not possible with UFMGCB-551. Perhaps will be necessary to use other different regions ITS to know the fungus species. Another important factor of if observing are that the amplification of the region ITS1 and ITS4 yielded a fragment of approximately 400 pb. This low number of base pairs and the regions ITS chosen, can have influenced to identify the isolated UFMGCB-551 to specie level.

Species belonging to the genus *Fusarium* (Hypocreaceae, Ascomycota) are mainly described as phytopathogens, but some species can live in plant tissues (Souza, 2004, Sette, *et al.*, 2006) or grow as saprobes on plant debris and in soil (Glenn, 2007). The teleomorphs states of this fungus are *Gibberella* and *Nectria* (Fungorum", 2008). *Fusarium* species can eventually occur as agents of various kinds of hyalohyphomycosis after traumatic inoculation (Glenn, 2007).

Several works reporting the biological activities of endophytic *Fusarium* species can be found in the literature. For example, crude extracts of *F. oxysporum* was isolated from coffee plants and presented MICs between 800 and 900 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in a panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Sette, *et al.*, 2006). (Xu, *et al.*, 2007) isolated four *Fusarium* endophytes from *Dioscorea zingiberensis*, a medicinal plant distributed mainly in China. From these four *Fusarium* endophytes only one was active against *Escherichia coli* (MIC of 31 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Xanthomonas vesicatoria* (MIC of 62 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Bacillus subtilis* (MIC of 62 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and *Staphylococcus haemolyticus* (MIC of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Concerning their secondary metabolites, *Fusarium* species are highly promising in the discovery of novel and bioactive compounds (Altomare, *et al.*, 2000, Ivanova, *et al.*, 2006, Glenn, 2007, Zhan, *et al.*, 2007). Indeed, several species from this genus are implicated in the production of trichothecene mycotoxins (Glenn, 2007) Bennett & Klick, 2003), and *F. sporotrichioides* is the major producer of trichothecenes such as T2-toxin, neosolaniol, and 8-*n*-pentanoylneosolaniol (Bekele, *et al.*, 1991, Bennett & Klich, 2003, Glenn, 2007).

After the taxonomic identification of the isolate as *Fusarium* sp. we directed our efforts towards the isolation and identification of the active compounds present in the extract of its culture. Thus, approximately 1.6 g of extract was produced from the culture broth. The extract was active against the filamentous fungus *C. sphaerospermum* (Figure 3) and strong activity against eleven clinical isolates of *P. brasiliensis* (Table 2). As the bioautographic assay with *C. sphaerospermum* is much safer, faster, simpler and more economic to run in a routine way, we decided to use this assay to guide the chromatographic fractionation steps, leaving the assay with *P. brasiliensis* to be used at key points in the fractionation process. We thus succeeded with the isolation of two highly active compounds (Figure 4), which were identified as 8-*n*-pentanoylneosolaniol

(1) and as T2-toxin (2) on the basis of the detailed analysis of their ESI-MS and NMR spectra, and by comparison of their spectral data with those published in the literature (Savard, *et al.*, 1987, Bekele, *et al.*, 1991).

The trichothecene mycotoxin 8-*n*-pentanoylneosolaniol, along with other related mycotoxins, was previously isolated from the fungus *F. sporotrichioides* infecting Ethiopian wheat (Bekele, *et al.*, 1991). The cytotoxic effects of these toxins were evaluated on baby hamsters kidney cells (BHK-21) and showed that both 8-*n*-pentanoylneosolaniol and T2-toxin were highly cytotoxic, with LC₁₀₀ values of 14 ng mL⁻¹ (Bekele, *et al.*, 1991). In our work, 8-*n*-pentanoylneosolaniol inhibited eleven strains of *P. brasiliensis* (Table 3) with MICs in range to 75 (for the strain Pb-1) to 640 nM (strains Pb-1578 and Pb-1925).

T2-toxin was isolated for the first time from the fungus *F. tricinatum* (now classified as a *F. sporotrichioides* (Bamburg, *et al.*, 1968). This toxin was reported to contaminate maize, wheat, and oat (Islam, *et al.*, 1998, Berek, *et al.*, 2001) and to exhibit nephrotoxic, immunosuppressive, teratogenic, and carcinogenic activity in animals and humans (Berek, *et al.*, 2001). It is also active at 5 µg mL⁻¹ against *Penicilium digitatum*, *Mucor ramannianus*, and *Saccharomyces bayanus*, and inactive against *Bordetella brochiseptica*, *S. aureus*, and *Mycobacterium smegmatis* (Vesonder, *et al.*, 1981). In spite of the toxicity of the mycotoxins, many works suggest their potential as chemotherapeutic agents. For example, mycotoxins from ergot, which are responsible for fatal poisoning of humans and animals (Demain, 1999), are now used to treat angina pectoris, hypertonia, migraine headache, cerebral circulatory disorder, uterine contraction, hypertension, serotonin-related disturbances, to reduce bleeding after childbirth, and to prevent implantation in early pregnancy (Bentley, *et al.*, 1997).

Few works could be found reporting the biological activity of natural products against *P. brasiliensis*. The natural product (*R*)-goniothalamine and its synthetic enantiomer were evaluated against a panel of microorganisms that included three strains of *P. brasiliensis* (Pb01, Pb18, and Pb339). The MIC values for the (*R*)-goniothalamine and its synthetic enantiomer were in the range between 7 and 22 µg mL⁻¹ on *P. brasiliensis* (Martins, *et al.*, 2008). In our work, the natural products isolate were 100 fold more active against the *P. brasiliensis* studied by Martins, *et al.*, (2008).

Conclusion

Two mycotoxins 8-*n*-pentanoylneosolaniol and T2-toxin were isolated from an antifungal extract obtained from the endophytic fungus UFMGCB-551 which was identified by morphological and molecular techniques as *Fusarium* sp. Both compounds were tested for the first time against eleven strains *P. brasiliensis* and found to be highly toxic to most of them. They were, however, about 100 times less active against *C. albicans*, suggesting they may not be a generally toxic agent. Thus, in spite of the known toxicity of these compounds to humans, it may be worth to further investigate the potential of these compounds as lead for the development of new drugs for treating paracoccidioidomycosis or as biochemical tools to help in this search.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Oswaldo Cruz Foundation (PDTIS-FIOCRUZ). FCC thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship during her Ph.D. studies.

References

- Altomare C, Perrone G, Zonno MC, Evidente A, Pengue R, Fanti F & Polonelli L (2000) Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. *Journal of Natural Products* **63**: 1131-1135.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Bamberg JR, Riggs NV & Strong FM (1968) Structures of toxins from 2 strains of *Fusarium tricinctum*. *Tetrahedron* **24**: 3329-&.
- Bekele E, Rottinghaus AA, Rottinghaus GE, Casper HH, Fort DM, Barnes CL & Tempesta MS (1991) Two new trichothecenes from *Fusarium-sporotrichioides*. *Journal of Natural Products* **54**: 1303-1308.
- Bennett JW & Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **16**: 497-+.
- Bentley AJ, Zorgani AA, Blackwell CC, Weir DM & Busuttil A (1997) Bacterial toxins and sudden unexpected death in a young child. *Forensic Science International* **88**: 141-146.

- Berek L, Petri IB, Mesterhazy A, Teren J & Molnar J (2001) Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in Vitro* **15**: 25-30.
- Berthod A & Hassoun M (2006) Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography - IV. The cocurrent CCC method. *Journal of Chromatography A* **1116**: 143-148.
- de Almeida SM, Rebelatto CLK, Queiroz-Telles F & Werneck LC (2005) Major histocompatibility complex and central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. *Journal of Infection* **51**: 140-143.
- de Hoog GS, Vicente V, Caligiorne RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, van den Ende A & Haase G (2003) Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4767-4778.
- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 455-463.
- Espinel-Ingroff A, Boyle K & Sheehan DJ (2001) In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia* **150**: 101-115.
- Felipe MSS, Torres FAG, Maranhao AQ, *et al.* (2005) Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **45**: 369-381.
- "Index Fungorum" (2008) Available: <http://indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 31 May 2008.
- Glenn AE (2007) Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* **137**: 213-240.
- Grandi, RAP & Gusmão, LFP (2002) Hypomycetes decompositores do folheto de *Tibouchina pulchra* Cogn. *Revista Brasileira de Botânica*. 79-87.
- Green P (2008): <http://www.phrap.org>. Accessed: 15 October 2008
- Guarro J, Gene J & Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 454-+.
- Hahn RC & Hamdan JS (2000) Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1997-2000.
- Homans AL & Fuchs A (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **51**: 327-&.

- Islam Z, Nagase M, Ota A, Ueda S, Yoshizawa T & Sakato N (1998) Structure-function relationship of T-2 toxin and its metabolites in inducing thymic apoptosis in vivo in mice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**: 1492-1497.
- Ivanova L, Skjerve E, Eriksen GS & Uhlig S (2006) Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from *Fusarium avenaceum*. *Toxicon* **47**: 868-876.
- Jackson RM, Walker C, Luff S & McEvoy C (1995) Inoculation and field testing of sitka spruce and douglas-fir with ectomycorrhizal fungi in the united-kingdom. *Mycorrhiza* **5**: 165-173.
- Marques S (1998) Paracoccidioidomycose: atualização Epidemiológica Clínica e Terapêutica. **78**: 135-146.
- Martins CVB, de Resende MA, Magalhaes TFF, *et al.* (2008) Antifungal activity of goniothalamine enantiomers. *Letters in Drug Design & Discovery* **5**: 74-78.
- McEwen J, Garcia, AM, Ortiz, BL, Botero, S, Restrepo, A. (1995) In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*.
- Nakai SA & Siebert KJ (2003) Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* **86**: 249-255.
- NCCLS (2002) Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma Aprovada. NCCLS document M27-A2.
- Pfaller MA, Gerarden T, Yu M & Wenzel RP (1988) Influence of invitro susceptibility testing conditions on the anti-candidal activity of ly121019. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **11**: 1-9.
- Portillo A, Vila R, Freixa B, Ferro E, Parella T, Casanova J & Canigueral S (2005) Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 49-52.
- Ramos-e-Silva M & Saraiva LD (2008) Paracoccidioidomycosis. *Dermatologic Clinics* **26**: 257-+.
- Restrepo A (1994) Treatment of tropical mycoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* **31**: 91-102.
- Riddell RW (1950) Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* **42**: 265-270.
- Savard ME, Blackwell BA & Greenhalgh R (1987) An H-1 nuclear-magnetic-resonance study of derivatives of 3-hydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-enes. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **65**: 2254-2262.

- Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F & Duarte MCT (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**: 1185-1195.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles FD, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML & Grp Consultores Consenso P (2006) Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **39**: 297-310.
- Souza A, Souza, A.D. L, Astolfi Filho, S, Belém Pinheiro, ML, Sarquis, MIM, Pereira, J.O. (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas de amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benth. **31**: 185-195.
- Vesonder RF, Ellis JJ & Rohwedder WK (1981) Elaboration of vomitoxin and zearalenone by fusarium-isolates and the biological-activity of *Fusarium*-produced toxins. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 1132-1134.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB (1989) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis NA GJ, Sninsky J, et al., editor. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press. pp. 315-322.
- Xu JG, Zhao XM, Han XW & Du YG (2007) Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **87**: 220-228.
- Zhan JX, Burns AM, Liu MPX, Faeth SH & Gunatilaka AAL (2007) Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products* **70**: 227-232.

Table 1. Macro morphological characteristics of the fungus *Fusarium* sp. growing on different culture media.

Culture medium	Colony diameter (mm)		Colour	Aspect
	7 days	14 days		
Corn meal	44	86	orange	velvety
Oat	40	86	yelowish	velvety
Sabouraud	45	86	orange	velvety
Czapek	39	86	pink light	velvety
PDA	80	86	yelowish	velvety

Table 2. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) against eleven strains of the *Paracoccidioides brasiliensis* and one *Candida albicans*.

Microorganisms tested	Crude Extract		Group 18	
	MIC	MFC	MIC	MFC
Pb-1	nt	nt	0.075	0.075
Pb-18	0.39	0.39	0.075	0.075
Pb-339	0.54	0.54	0.075	0.075
Pb-470	nt	nt	0.075	0.075
Pb-608	0.28	0.28	0.075	0.075
Pb-1017	1.10	1.10	0.075	0.075
Pb-1578	0.28	0.28	0.075	0.075
Pb-1925	nt	nt	0.075	0.075
Pb-9673	1.10	1.10	0.075	0.075
Pb-ED01	1.10	1.10	0.075	0.075
Pb-MG5	nt	nt	0.075	0.075
<i>Candida</i> <i>albicans</i> ATCC 18804	125	125	> 10	> 10

nt-not tested. The control drug Amphotericin B was tested against Pb-1 and Pb-1578 and showed MIC of 75 nM. The samples were tested in range between 1,000-7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 5-0.003 μg .

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) of **1** (8-n-pentanoynleosolaniol) and **2** (T2-toxin) against eleven strains *Paracoccidioides brasiliensis*. The compounds were tested in the range between 11,000 and 6 nM.

<i>P. brasiliensis</i> <i>strain</i>	8- <i>n</i> -pentanoynleosolaniol		T2 toxin	
	MIC	MFC	MIC	MFC
Pb-1	490	490	160	240
Pb-18	640	640	160	160
Pb-B339	490	490	320	320
Pb-470	320	320	75	75
Pb-608	240	960	240	410
Pb-1017	490	490	240	240
Pb-1578	160	160	75	75
Pb-1925	490	490	160	160
Pb-9673	320	320	490	490
Pb-ED01	640	640	640	640
Pb-MG5	640	640	640	640

The control drug Amphotericin B was tested against Pb-1 and Pb-1578 and showed MIC of 75 nM.

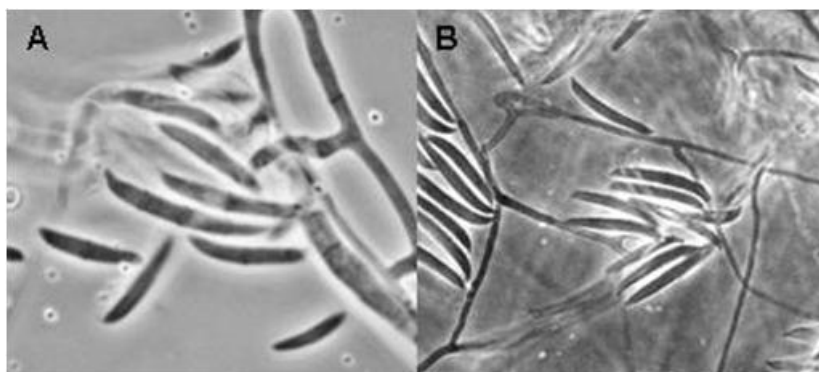


Figure1. Micrograph of macroconids produced by *Fusarium* sp. UFMG551.

A – in oat medium after seven days culture at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$;

B – in Czapek medium after 14 days culture at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

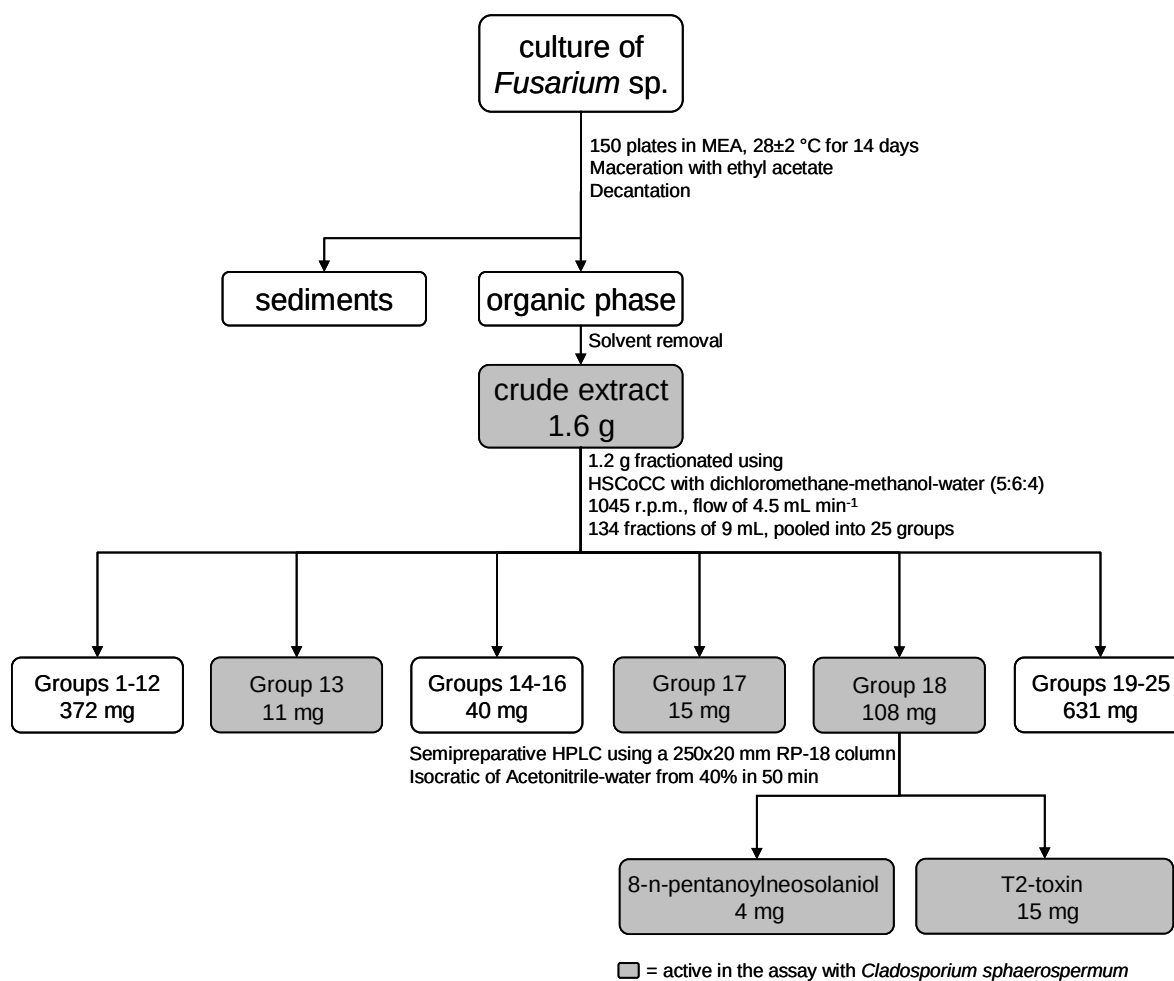


Figure 2. Fractionation scheme for the isolation of 8-*n*-pentanoylneosolaniol and T2-toxin from the endophytic fungus *Fusarium* sp. The fractionation was guided by the bioautographic assay with the fungus *Cladosporium sphaerospermum*. The samples were tested at 50 µg/spot.

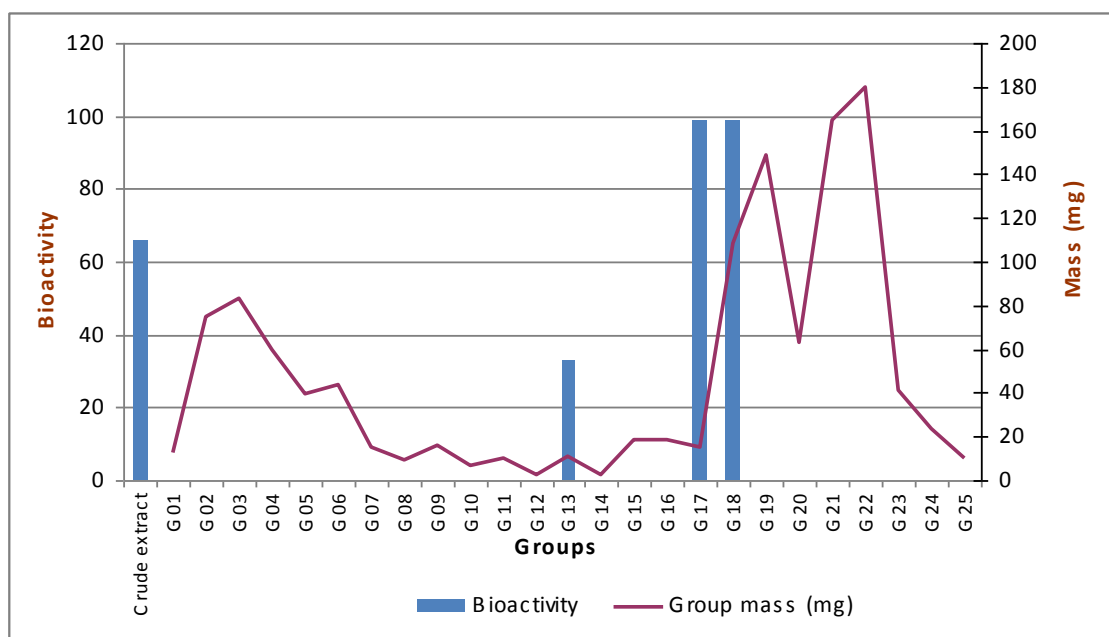


Figure 3. Yields (line) and biological activity (bars) in the bioautographic assay with *Cladosporium sphaerospermum* of the crude extract of *Fusarium* sp. UFMG551 and groups of fractions obtained by counter-current chromatography of the crude extract. All samples were tested at 50 µg/spot, and the heights of the bars are proportional to the inhibition halo. 99% of bioactivity = inhibition zones > 12 mm; 66% of bioactivity = inhibition zones 9 – 12 mm; 33% of bioactivity = inhibition zones 5 – 8 mm; Inactive = no inhibition zone.

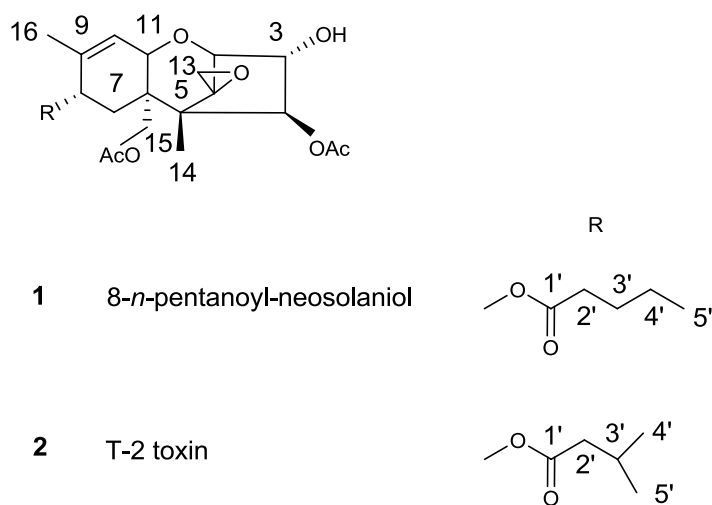


Figure 4. Compounds isolated from *Fusarium* sp. UFMG551; **1** – 8-*n*-pentanoyl-neosolaniol and **2** – T2 toxin.

**Biological activities and fingerprint from two endophytic strains of *Bipolaris* sp. ,
an endophytic fungi isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**

Fernanda Fraga Campos^{1, 2}, Luiz Henrique Rosa³, Susana Johann¹, Rachel Basques Caligiorne⁴, Ana Lúcia Teles Rabello⁴, Carlos Augusto Rosa², Patrícia Silva Cisalpino², and Carlos Leomar Zani^{1*}

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, MG, 30190-002, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

³Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

⁴Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

*Corresponding author: Tel.: +55-31-33497791, Fax: +55-31-32953115, E-mail: zani@cpqrr.fiocruz.br

Key words: Leishmania, tumoral cell lines, Tripanothione reductase, *Paracoccidioides brasiliensis*, and crude extracts.

Abstract

Endophytic filamentous fungi represent an important resource for biotechnology and discovery for novel bioactive natural products. Recently several bioactive substances have been isolated from these microorganisms. In this work, the endophytic fungi UFMGCB-540 and UFMGCB-554 were isolated from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae). These two filamentous fungi were identified in accordance with morphological and molecular (ITS) rDNA characteristics, and both UFMGCB-540 and 554 were identified as *Bipolaris* sp., and were available in a panel of bioassays in our bioprospection program. UFMGCB-540 and 554 showed EC₅₀ values of 22 and 18 µg mL⁻¹, respectively for amastigote-like form of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The same extracts showed IC₅₀ values between 0.9 and 3.5 µg mL⁻¹ against three tumoral cell lines (melanoma UACC-62, breast cancer MCF-7, and kidney cancer TK-10). The extract UFMGCB-554 reduced trypanothione reductase (TryR) enzyme with IC₅₀ values of 7.8 µg mL⁻¹. UFMGCB-540 and 554 were also tested against four strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with the MICs ranging from 15-1.8 µg mL⁻¹ to 7.8- 1.8 µg mL⁻¹. The crude extracts did not inhibited *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. krusei*, and *Cryptococcus neoformans* at 50 µg mL⁻¹ in disk diffusion assays. These results showed that endophytic fungi from *P. adiantoides* are an important source of for the isolation of natural products that can be used, in the future, for the treatment of several diseases.

Introduction

Natural compounds produced by microorganisms represent a rich source of biological active metabolites that may be applied as agrochemicals, antibiotics, antiparasitics, immunosuppressant, and anticancer agents (Gunatilaka, 2006). Plant-associated microorganisms are known to produce a variety of metabolites with novel structures and interesting biological activities and some medicinal properties attributed to the plant can be related to their associated microorganisms (Schulz *et al.*, 2002, Kettering *et al.*, 2004, Tan & Zou, 2001, Strobel *et al.*, 2004, Gunatilaka, 2006).

Bipolaris genus was established by Shoemaker, 1959 and are one of the several dematiaceous fungi (darkly pigmented) that are responsible for causing phaeohyphomycosis in animals as well as in humans (Saubolle, 1996). These fungi are

considered an opportunistic human pathogen in immunosuppressed patients (Toul, 2006). *Bipolaris* species are also important plant pathogens and are associated with symptoms of dark spots on leaves, and root rot of seedlings. These fungi contain dark pigmentation due to the presence of melanin in their cell walls, which is considered an important factor of virulence (Weikert-Oliveira, 2002). Despite of being more known by its pathogenicity in plants, animals, and humans, these fungi produce metabolites with important biological activities. *Bipolaris* and its teleomorph *Cochliobolus* produce compounds with cytotoxic and antimicrobial activities, as well as inhibitors of enzymes (Machida *et al.*, 1995, Jung *et al.*, 2003, Phuwapraisirisan *et al.*, 2007).

In this work we described the morphological and molecular identification of two fungi isolated from *P. adiantoides*. In order to discover new properties from *Bipolaris* species we tested the crude extracts using bioassays with amastigote-like forms, three tumoral cells, the enzyme trypanothione reductase, four strains of the dimorphic fungus *P. brasiliensis*, and five pathogenic microorganisms.

Material and Methods

Plant material

Stems from *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) were collected at the “Santuário do Caraça” natural preserve, located in the municipality of Catas Altas, state of Minas Gerais, Brazil. Immediately after collection, the leaves were stored in plastic bags and kept at 10 °C for a maximum storage period of 24 h. A voucher exsiccate was deposited in the BHCB herbarium of the Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) for further reference.

Isolation of the endophytic fungi

A published protocol (Collado *et al.*, 1996) was used for the isolation of the fungi from the plant. Briefly, the surfaces of the stems were sterilized using ethanol and sodium hypochlorite, and washed with distilled water. The sterile fragments were plated on Petri plates containing potato dextrose agar (PDA), chloramphenicol at 100 µg mL⁻¹. After incubation for up to 60 days at 28 °C, individual colonies were transferred to PDA, and the cultures stored at 4 °C. For long-term preservation, mycelial pieces were

stored in distilled water at room temperature (Castella, 1967), and in 30% aqueous glycerol at -80°C . The isolate used in this work was deposited at Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais under the codes UFMGCB-540 and UFMCB-554.

Fungus cultivation

The fungus was grown in potato dextrose agar (PDA) medium for 5 days at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Five millimeter diameter plugs of this culture were then inoculated at the center of Petri dishes (90 mm diameter), containing 20 mL of malt extract agar (MEA) medium (1% glucose, 1% malt extract, 0.1% peptone, and 1.5% agar). The plate was incubated at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 14 days. After this period, a small aliquot of the biomass was used for extraction of DNA and the remaining material extracted with ethyl acetate for the extraction of the fungal secondary metabolites. Plates which were not inoculated with the fungus were subjected to the same protocol to serve as control of the culture medium.

Extraction of the fungal metabolites

The culture material of one Petri dish was transferred to conic tubes and then extracted with 30 mL of ethyl acetate. After maceration for 48 h at room temperature, the organic phase was decanted and the solvent removed under vacuum in a rotary-evaporator at 45°C . Residual solvent was eliminated in a vacuum centrifuge (Termosavant) at 40°C . The dried extract was dissolved in dimethyl sulfoxide in order to prepare a 20 mg mL^{-1} stock solution, which was stored at -40°C . A similar extraction procedure was carried out using sterile MEA medium, and the extract thus obtained was used as a control in the bioassays.

Morphological characterization

The morphological identification was performed following described procedures (Riddell, 1950). Briefly, the fungus was cultivated on different culture medium (corn meal, oat, Sabouraud, Czapek, and PDA) for 7 and 14 days at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The sporulated mycelium was then transferred to glass slides, fixed with polyvinyl lactophenol alcohol

(PVL) for visualization of the fungal microstructures (Grandi, 2002). The preparations were photographed using a digital camera Olympus DP12 coupled to a photo microscope Olympus BX-41.

Molecular characterization

The DNA was extracted according to the protocol described by De Hoog, (2003). The ribosomal DNA internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) was amplified using the universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGG-TGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), as described by (White *et al.*, 1989). The sequences were generated using MEGABACE (Amersham Biosciences, USA). These sequences were used to feed PHRED-PHAP software (Green, 2008) in order to find the consensus one which was then compared with those deposited in the GenBank using BLASTn software (Altschul *et al.*, 1997).

Biological assays

Assay with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – promastigotes of *L. amazonensis* (strain IFLA/BR/196/PH-8) were obtained from lesions of experimentally infected hamsters. The parasites were incubated for 9 days at 26°C in Schneider's medium buffered at pH 7.2. The promastigotes were then stimulated to differentiate into amastigote-like forms by rising the incubation temperature to 32°C and lowering the pH of the medium to 6.0. After 7 days under these conditions 90% of the parasites were in the amastigote-like forms. The parasite concentration was adjusted to 1×10^8 cells mL⁻¹, and 90 µL added to each well of 96-well plates, followed by 10 µL of the solutions containing the samples and control drug (0.2 µg mL⁻¹ Amphotericin B - Fungisone® Bristol-Myers Squibb B, Brazil). The plates were incubated at 32°C for 72 h and the number of parasites estimated using the MTT (methyl thiazolyl tetrazolium)-based colorimetric assay (Teixeira *et al.*, 2002). The results were calculated from the measured absorbancies using the formula $[1 - (\text{Abs}_{\text{exp}}/\text{Abs}_{\text{contr}})] \times 100$, which express the percentage of parasite death in relation to the controls without drug. All samples were tested in duplicate and the experiments repeated at least once. Experiments to determine the dose response curves and the EC₅₀ (effective concentration to kill 50% of the parasites) were run as above, using 1:2 serial dilutions of the test compounds to

reach the appropriate concentrations. The experiments were run in duplicate and repeated at least once.

Assay with human cancer cell lines - the effect of the extracts on the survival and growth of the human cancer cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), and TK-10 (renal), was determined using a colorimetric method developed at the National Cancer Institute-USA (Monks *et al.*, 1991, Shoemaker, 2006). Briefly, the cells were inoculated in 96-well plates and incubated at 37°C for 24 h in 5% CO₂ atmosphere. The solutions of the test samples were added to the culture wells to attain the desired concentrations, and the plates incubated for further 48 h. Trichloroacetic acid was added to each well to precipitate the proteins, which were stained with sulforhodamine B. After washing out the unbound dye, the stained protein was dissolved with 10 mM Tris, and the absorbance measured at the wavelength of 515 nm. Results were calculated using the absorbance measured in the test-wells (T) in comparison with that of the control wells corresponding to the initial cell inoculum (T_i) and cells grown for 48 h without drug (T_f), using the formula: $[(T - T_i) / (T_f - T_i)] \times 100$. This formula allows the quantification of both growth inhibition (values between 0 and 100) and cell death (values smaller than 0). Each sample was tested in duplicate in two independent experiments.

Assay with recombinant trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* (TryR) - the assay was performed according to (Hamilton *et al.*, 2003) in 96-well plates (Costar 9017, Corning, USA) using Hepes buffer (40 mM pH 7.5) with 1 mM EDTA. Each assay well (250 µl) contained enzyme (6 mU), trypanothione (0.25 nmol) and NADPH (50 nmol). The extracts, fractions and pure compounds were added to the above mixture and incubated at 30°C during 30 min. After this period, 17.5 nmol of DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), Ellman's reagent] was added and the absorbance (Abs) measured at 412 nm in the kinetic mode during 5 min at every 10 s. The slope of the $\delta\text{Abs}/\delta t$ plot is proportional to DTNB reduction and the enzyme activity (Hamilton *et al.*, 2003). The enzyme inhibition was calculated as the ratio between ($\delta\text{Abs}/\delta t$) of the experimental wells and that of the controls without drug, that is, percent inhibition = $(1 - (\delta\text{Abs})_{\text{exp}}/(\delta\text{Abs})_{\text{contr}}) \times 100$.

***Paracoccidiodes brasiliensis* assays** - four clinical *P. brasiliensis* strains, Pb-01 (ATCC- MYA-826), Pb-18 (from the fungal collection of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil), PbB339 (ATCC 32069), and Pb-608 (clinic isolated from chronic paracoccidioidomycosis, São Paulo, Brazil– MHH Forjaz / TIE Svidzinski) were used in the biological assays.

P. brasiliensis strains were maintained by weekly passage on solid YPD (yeast, peptone and dextrose) medium at 37°C and were used after 7-10 days of fungus growth. Yeast cells in the exponential phase were collected aseptically with a platinum loop and transferred to a tube containing 5 mL of sterile saline. If large aggregates existed, they were allowed to settle for several minutes, and the supernatants were collected. The suspensions were then diluted in synthetic RPMI medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine buffered to pH 7.0 with 0.165 mM morpholine propanesulfonic acid (MOPS, Sigma), and prepared according to the CLSI document M 27-A₂ (NCCLS, 2002) to obtain a final inoculum dilution suitable for the strains (Nakai & Siebert, 2003). After homogenization by vortexing, transmittance was measured at 520 nm and adjusted to 69 to 70% (Hahn & Hamdan, 2000).

The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) was determined by the microbroth dilution method. Broth microdilution testing was performed in accordance with the guidelines in the CLSI M27-A₂ document (NCCLS, 2002) and (Nakai & Siebert, 2003). RPMI medium without samples or solvents was used as controls for both growth and sterility. Dimethylsulfoxide (DMSO) at the same volumes used in the assay was used as control for solvent toxicity. Amphotericin B (Sigma, St Louis, USA) (25 to 0.03 µg mL⁻¹) in DMSO and Bactrim (Sulfametoxazol + trimetoprim, Roche, Rio de Janeiro, Brazil) (600 to 1.17 µg mL⁻¹) in water were included as positive antifungal control drugs. Twofold serial dilutions were prepared as outlined in CLSI document M 27-A₂ (NCCLS, 2002). Crude extract, fractions and pure compounds were dissolved in DMSO and diluted with RPMI, maintaining a constant volume of 1 mL per tube. The extracts and compounds were initially tested at eight concentrations ranging from 1.000 to 7.8 µg mL⁻¹. The extracts and compounds that were active at the lowest concentrations were then tested in the range between 5.0 and 0.003 µg mL⁻¹. Volumes of 100 µL of each dilution were distributed in sterile flat-bottom 96-well microplates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). After inoculation of fungal strains, the plates were incubated for 10 days at 37°C. The tests were performed in triplicate in at least two independent experiments. The MIC of the samples were determined visually by

comparison with the drug-free growth control well, and defined as the lowest sample concentration for which the well was optically clear. MICs are expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (for crude extract and fractions) and μM (for compounds).

The Minimal Fungicidal Concentrations (MFC) of each extract were determined as follows: From the microtiter plate used to determine the MIC values, the test wells that showed complete fungal growth inhibition (clear wells), the test wells with growth similar to that of the no-drug control well, and growth control wells, were selected for the assay to determine the MFC. Thus 10 μL of these wells were transferred to plates containing YPD medium and incubated at 37°C for 7 days. The MFC was determined as the lowest drug concentration at which fewer than three colonies was able to grow (Portillo *et al.*, 2005, Espinel-Ingroff *et al.*, 2001).

Assays with other microorganisms - the antimicrobial activity of the samples were evaluated using the following microorganisms: *Candida albicans* ATCC18804, *C. krusei* ATCC2159, *Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Escherichia coli* ATCC25922 and *Cryptococcus neoformans* ATCC32608. The yeasts were grown on agar Sabouraud (Difco) at 28°C for 24 h, and their inocula were adjusted in saline solution to Mac Farland optical density scale 1 (Yarrow, 1998) before seeding into plates containing agar Sabouraud. The bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI, Difco) in 6-mL tubes, and their concentration adjusted to 10^3 to 10^4 cells mL^{-1} before inoculation into plates containing agar BHI. In each plate, five clean filter-paper disks with 6 mm diameter were placed equidistant from each other on the surface of the medium. Solutions of the samples at 10 mg mL^{-1} were prepared in 1% aqueous dimethyl sulfoxide (1% aq. DMSO). Five microliters of these solutions, corresponding to 50 μg of the sample, were applied to the paper disks, and the plates incubated at 37°C for a period of 24-48 h. Aqueous solutions of amphotericin B and chloramphenicol at 10 mg mL^{-1} were used as positive controls for yeasts and bacteria, respectively. Solvent control consisted of 1% aq. DMSO. The sample was considered active if it caused a growth inhibition halo around the disk to which it was applied.

Fingerprint on HPLC and TLC

The extracts of the two fungi were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). For TLC, 10 μL (of a

solution to 1 mg mL⁻¹) of each extract in ethyl acetate were applied on silica gel plates (Merck 60 F254). The plates were eluted with DCM:MeOH (95/5; v/v) and were illuminated with light UV (254 and 366 NM) for the visualization of fluorescent substances. Then the same plates were sprinkled with vaniline/H₂SO₄ and heated to 100 °C for the substances revelation. The relative position of the stains regarding “front” of eluent (retention factor, R_f) as well as the colors generated by the discloser, were used to the fingerprint definition. For HPLC analysis, it was used an analytic column (New-pack RP-18, 3,9 x 150 mm) eluted to 1 mL min with gradients ACN-H₂O (10-100% in 50 min and 100% up to 10 min), monitoring the effluent with a light ultra-violet fitting detector in the dual way for 220 and 254 nm. This generic system was fitted for the best extracts components separation when necessary.

Statistical analysis

All the experiments were performed in triplicate and in two independent experiments. Values represent the mean ± standard deviation (SD) of these experiments.

Results and discussion

The two fungi studied in this work were morphologically characterized and presented differences that are shown in Table 1. The PDA medium was the best for both fungi, with 86 mm of diameter in 14 days of incubation. The worst growth was observed on oat medium. After a 14-day-growth, the diameter of the fungus UFMGCB-540 on this medium was only 35 mm. According to Saubolle, (1996) the culture medium is an important instrument for the identification of fungi, being PDA, oat and cornmeal agar able to evidence conidiation. However, according to these authors, V-8 juice may be most efficacious for stimulating abundant conidiation in *Bipolaris*. Strain UFMGCB-540 presented gray colonies and UFMGCB-554 black colonies. Both presented velvety aspect. Species of the *Bipolaris* genus grow rapidly, producing darkly pigmented colonies (dark-brow to black). According to Toul (2006) colonies of *Bipolaris* grow in two days and presented black colour and velvety aspect in Sabouraud medium. The pigmentation is due deposition in the cell walls of dihydroxynaphthalene melanin, which is an important virulence factor (Morejon *et al.*, 2006, Dixon & Polakwyss, 1991, Saubolle M.A., 1996). Spores were not found on these medium in

both, seven and 14 days. Considering the fungus UFMGCB-540, after mounted in lactophenol and viewed by light microscopy, it was only possible to observe septed hyphae. The fungus UFMGCB-554 presented septed hyphae, multicellular clamydospores and monopolar germination. Bipolar germination should be a convenient conidial feature used as part of the identification of *Bipolaris* (Alcorn, 1983). Dela Paz, 2006) evaluated germination of three isolates of *Bipolaris* and verified that these fungi can present monopolar, intercalary and bipolar germination, being these criteria for identification of *Bipolaris* genus. The same authors analyzed the germination of three isolates of *Bipolaris* in seven different medium and observed, besides another variations, an increase in the percentage of bipolar germination in the medium agar water and agar rabbit food. In the present work it was observed monopolar germination on cornmeal medium. This characteristic is typical of *Bipolaris* genus. The genus *Bipolaris* (Pleosporaceae) contains about 45 species which are mostly subtropical and tropical plant parasites (Index Fungorum, 2008). However, several species, notably *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* are well documented as human pathogens. Clinical manifestations include mycotic keratitis, subcutaneous phaeohyphomycosis, sinusitis, peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD), and cerebral and disseminated infections. Phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris* species has been reported in both normal and immunosuppressed patients (Toul, 2006). Some species can be found as endophytic fungi of several plant species (Sette *et al.*, 2006, Souza, 2004).

Most of the endophytic fungi do not produce spores when cultured on artificial media and, in these cases, molecular methods are required for identification of these isolates (Sette *et al.*, 2006). UFMGCB-540 and 554 were analyzed by molecular techniques using ITS1 and ITS4 primers for the amplification of the ITS region of the rDNA, and both showed 94% of identity with the genera *Bipolaris* sp. The results obtained with the morphological and molecular characterization for both fungi allowed identification them as *Bipolaris* sp., could represent a new species of this genus.

UFMGCB-540 and 554 cultures were extracted with ethyl acetate to afford 6.2 and 14.9 mg of a crude extract, representing a yield of approximately 0.31 and 0.75 mg mL⁻¹, respectively. In order to investigate the crude extracts of these fungi in a panel of bioassays, the cultures of UFMGBC-540 and 554 were evaluated and presented interesting biological activities. The two cultures were active in the assays against *L. amazonensis*, presenting EC₅₀ values of 22 and 18 µg mL⁻¹, respectively. The

bioactivity of *Bipolaris* species against *L. (L.) amazonensis* is related here for the first time. The EC₅₀ values were very low and deserve more attention for future studies for the isolation of their compounds.

The same extracts also presented low IC₅₀ values for three cancer cell lines, being the best value with cell UACC-62 melanoma with IC₅₀ of 0.9 µg mL⁻¹ (Table 2). Wiyakrutta (2004) evaluated 360 endophytes from Thai medicinal plants and verified that 60 (16%) were active against human oral epidermoid carcinoma cells EC₅₀ 0.42-20 µg mL⁻¹ and 48 (13%) were active against breast cancer cells EC₅₀ 0.18-20 µg mL⁻¹. These values are similar to the IC₅₀ shown against breast cancer MCF-7 in the our work.

There are few reports considering the biological activities of fungal extracts against *P. brasiliensis*. Natural products, as ajoene and goniothalamine from plants, were active against *P. brasiliensis* (Martins *et al.*, 2008). We did not find any report in literature of natural products derived from endophytic fungi with bioactivity against *P. brasiliensis*. In this work, two isolates of *Bipolaris* sp. were active against four strains of the dimorphic fungus *P. brasiliensis*, being Pb-B339 more sensible to the fungal extract (Table 2). The MIC values were low and more studies are necessary to isolate the compound active.

The biological activity against the enzyme trypanothione reductase of the fungus UFMGCB-540 was similar to UFMGCB-554, but the first one inhibited the enzyme with IC₅₀ values of the 7.8 µg mL⁻¹ while the second one was not able to inhibit this enzyme. This enzyme is involved in the maintenance of an intracellular homeostasis in trypanosomatids (*Leishmania* and *Trypanosoma*) and essential for the survival of these parasites (Hamilton *et al.*, 2003). The enzyme trypanothione reductase was validated as a chemotherapeutic target for anti-trypanosomal drug discovery (Bond *et al.*, 1999).

UFMGCB-540 and UFMGCB-554 did not inhibit the microorganisms *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. krusei* and *Cr. neoformans* in disk diffusion assay, when tested at 50 µg mL⁻¹. Maybe the method used to evaluate the antimicrobial activity was not adequate, being necessary to perform MIC assays. Moreover, the concentration of the extract used in the disk diffusion method could be low, as for the inhibition of these microorganisms is required a higher concentration. As reported by Sette, (2006), *Bipolaris* species were active against *Salmonella choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa* with MIC in range between 0.5-1.0 mg mL⁻¹. The range of inhibition was higher than the present work.

For determine of fingerprint, in a first step, an appropriate HPLC separation with good resolution and reproducibility had to be established. Several mobile phases, e.g., mixtures of water and acetonitrile or methanol, addition of buffer ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ buffer), and different solvent gradients, were tested in a reversed-phase (RP-18) column. It was found that RP-18 HPLC with a ACN- H_2O gradient yielded the overall best results, and allowed all fungal culture extracts to be finger-printed. In most cases, chromatograms indicated reasonable metabolite separation with good reproducibility (Figure 2). Eluted metabolites were detected using DAD. The extracts of *Bipolaris* presented different profile in HPLC and TLC, showing the chemical diversity in extract of these fungi.

In conclusion, the results presented in this work showed the potential of endophytic fungi from *P. adiantoides* for the search of novel metabolites. The two strains of the endophytic fungi *Bipolaris* sp. showed biological activities against *L. (L.) amazonensis*, trypanothione reductase and *P. brasiliensis*, and it is the first time that these types of biological activities is described for species of this genus. Both extracts of *Bipolaris* presented different profiles when evaluated by TLC and also by HPLC, showing the existing chemical diversity between isolated of the same genus obtained from the same plant. This report demonstrates that *Bipolaris* sp. UFMGCB-540 and 554 may be a promising lead for the development of new drug.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Oswaldo Cruz Foundation (PDTIS-FIOCRUZ). FCC thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the fellowship during her Ph.D. studies and Mariana Vieira for assistance with this work.

References

- Alcorn, J. L., (1983) Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon* **17**: 1-86.

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman, (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Bond, C. S., Y. H. Zhang, M. Berriman, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb & W. N. Hunter, (1999) Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure with Folding & Design* **7**: 81-89.
- Castella, A., (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **70**: 181-&.
- Collado, J., G. Platas & F. Pelaez, (1996) Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. *Nova Hedwigia* **63**: 347-360.
- de Hoog, G. S., V. Vicente, R. B. Caligiorne, S. Kantarcioglu, K. Tintelnot, A. van den Ende & G. Haase, (2003) Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 4767-4778.
- Dela Paz, M. A. G., P. H. Goodwin, A. K. Raymundo, E. Y. Ardales & C. M. V. Cruz, (2006) Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology* **55**: 756-765.
- Dixon, D. M. & A. Polakwyss, (1991) The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses* **34**: 1-18.
- Espinel-Ingroff, A., K. Boyle & D. J. Sheehan, (2001) In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia* **150**: 101-115.
- Grandi, R. A. P., & Gusmão, L.F.P., (2002) Hyphomycetes decompositores do folheto de *Tibouchina pulchra* Cogn. In: Revista Brasileira de Botânica. 79-87.
- Green P (2008): <http://www.phrap.org>. Accessed: 15 October 2008

- Gunatilaka, A. A. L., (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* **69**: 509-526.
- Hahn, R. C. & J. S. Hamdan, (2000) Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1997-2000.
- Hamilton, C. J., A. Saravanamuthu, I. M. Eggleston & A. H. Fairlamb, (2003) Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal* **369**: 529-537.
- Index Fungorum, (2008) Available: <http://indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 31 May 2008.
- Jung, H. J., H. B. Lee, C. H. Lim, C. J. Kim & H. J. Kwon, (2003) Cochlioquinone A1, a new anti-angiogenic agent from *Bipolaris zeicola*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**: 4743-4747.
- Kettering, M., O. Sterner & T. Anke, (2004) Antibiotics in the chemical communication of fungi. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **59**: 816-823.
- Machida, T., K. Higashi & H. Ogawara, (1995) Cochlioquinone-a, an inhibitor of diacylglycerol kinase. *Journal of Antibiotics* **48**: 1076-1080.
- Martins, C. V. B., M. A. de Resende, T. F. F. Magalhaes, B. H. S. Lima, G. A. Watanabe, A. Ruiz, J. E. de Carvalho, R. A. Pilli & A. de Fatima, (2008) Antifungal activity of goniothalamine enantiomers. *Letters in Drug Design & Discovery* **5**: 74-78.
- Monks, A., D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigrowloff, M. Graygoodrich, H. Campbell, J. Mayo & M. Boyd, (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**: 757-766.

- Morejon, K. R., M. H. D. Moraes & E. E. Bach, (2006) Identification of *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 247-250.
- Nakai, S. A. & K. J. Siebert, (2003) Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* **86**: 249-255.
- NCCLS, (2002) Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma Aprovada. In.: NCCLS document M27-A2, pp.
- Phuwapraisirisan, P., K. Sawang, P. Siripong & S. Tip-Pyang, (2007) Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. *Tetrahedron Letters* **48**: 5193-5195.
- Portillo, A., R. Vila, B. Freixa, E. Ferro, T. Parella, J. Casanova & S. Canigual, (2005) Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 49-52.
- Riddell, R. W., (1950) Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* **42**: 265-270.
- Saubolle M.A., S. J., (1996) The Dematiaceous Fungal Genus *Bipolaris* and Its Role in Human Disease. In: Clinical Microbiology Newsletter.1-6.
- Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A. K. Rommert & K. Krohn, (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**: 996-1004.
- Sette, L. D., M. R. Z. Passarini, C. Delarmelina, F. Salati & M. C. T. Duarte, (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**: 1185-1195.
- Shoemaker, R. H., (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* **6**: 813-823.

- Souza, A., Souza, A.D. L, Astolfi Filho, S, Belém Pinheiro, ML, Sarquis, MIM, Pereira, J.O., (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas de amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benth. In: Acta Amazônica.185-195.
- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo & J. Harper, (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**: 257-268.
- Tan, R. X. & W. X. Zou, (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**: 448-459.
- Teixeira, M. C. A., R. D. Santos, R. B. Sampaio, L. Pontes-de-Carvalho & W. L. C. dos-Santos, (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research* **88**: 963-968.
- Toul P, C. L., Hofman V, Bouchara JP, Chanalet S, Gari-Toussaint M., (2006) A pseudo tumoral sinusitis caused by *Bipolaris* sp. In: Journal of Infection. 235-237.
- Weikert-Oliveira, R. C. B., Resende, M.A., Valério, H.M., Caligiorne, R.B., Paiva, E., (2002) Genetic variation among pathogens causing "*Helminthosporium*" diseases of rice, maize and wheat. In: Fitopatologia Brasileira. 639-643.
- White, T. J., T. D. Bruns & S. B. Lee, (1989) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. G. J. Innis NA, Sninsky J, et al. (ed). San Diego, CA: Academic Press, 315-322.
- Wiyakrutta, S., N. Sriubolmas, W. Panphut, N. Thongon, K. Danwisetkanjana, N. Ruangrunsi & V. Meevootisom, (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**: 265-272.
- Yarrow, D., (1998). In: The yeast: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, 77-105.

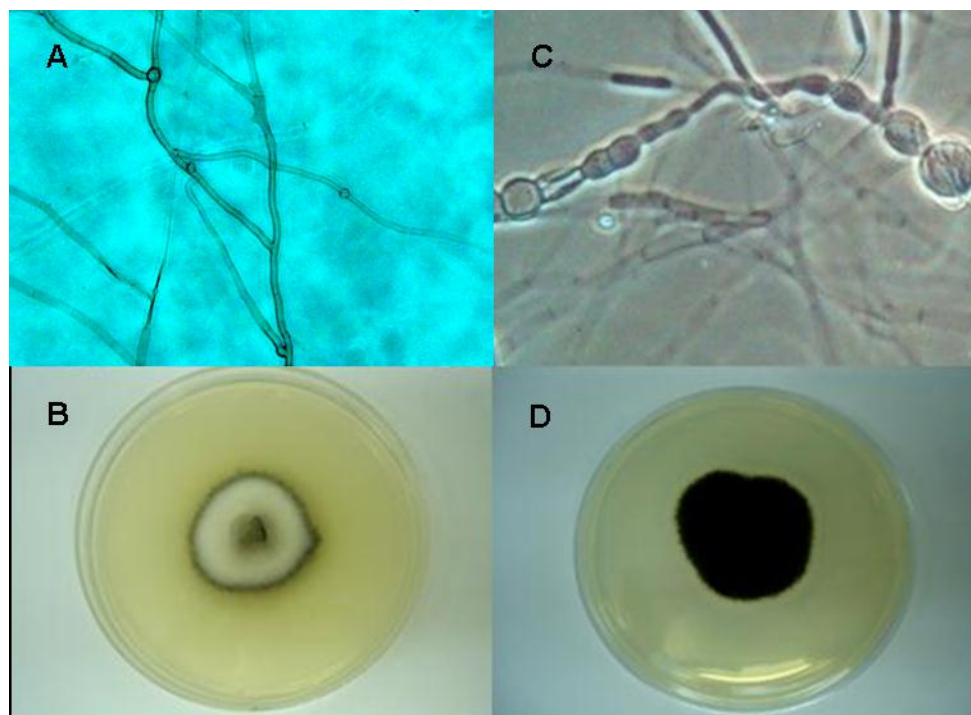


Figure 1 - Micrographs of the *Bipolaris* sp. A) monopolar germination of *Bipolaris* sp. UFMGCB-540; B) gray colony of *Bipolaris* sp. UFMGCB-540; C) clamidospores of *Bipolaris* sp. UFMGCB-554; D) black colony of *Bipolaris* sp. UFMGCB-554.

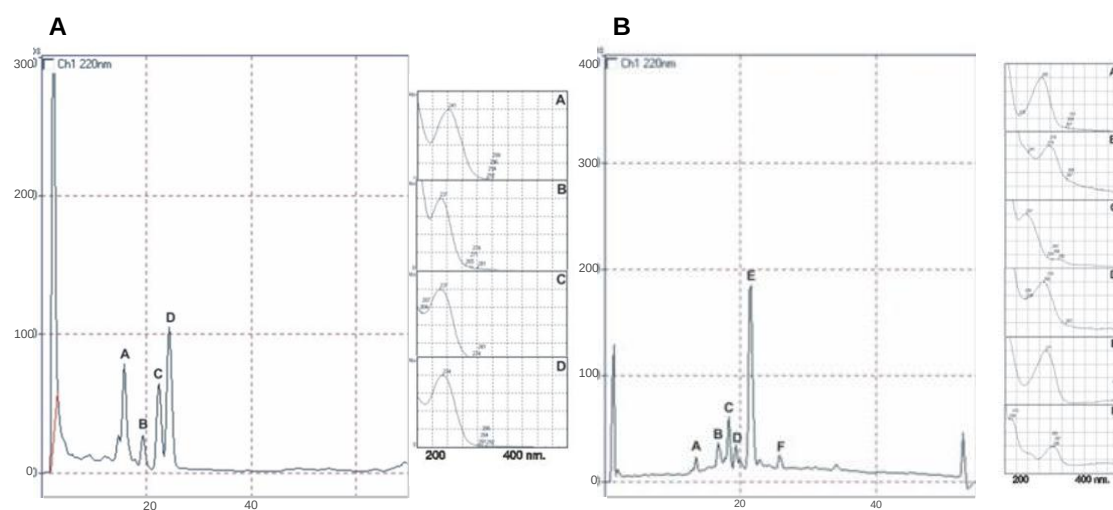


Figure 2. Fingerprint on High Performance Liquid Chromatography of two *Bipolaris* sp. from *Piptadenia adiantoides*. A) Strain UFMGCB-540; B) Strain UFMGCB-554; Chromatographic conditions: column Nova Pak RP18 3.9 x 150 mm, 1 mL min, ACN-H₂O 30-90% 40 min and 90-100% 10 min.

Table 1. Morphological characteristics of two fungi UFMGCB-540 and UFMGCB-554.

Fungi	Culture Medium	Colony diameter*		Colour	Aspect
		7 days	14 days		
UFMGCB-540	Corn meal	30	70	Gray	Velvet
	Oat	20	35	Gray	Velvet
	Sabouraud	29	75	Gray	Velvet
	Czapek	29	70	Gray	Velvet
	PDA	33	86	Gray	Velvet
UFMGCB-554	Corn meal	30	86	Black	Velvet
	Oat	37	86	Black	Velvet
	Sabouraud	35	86	Black	Velvet
	Czapek	39	86	Black	Velvet
	PDA	70	86	Black	Velvet

* diameter in mm.

Table 2. Biological activities of *Bipolaris* sp. UFMGCB-540 and UFMGCB-554. These fungi were tested in an IC₅₀ and EC₅₀ values in range to 100 to 0.19 µg mL⁻¹.

Samples	AMA ^a	TryR ^b	Cancer cell lines ^c			MICs ^d				Disk diffusion assay ^e				
			UACC-62	MCF-7	TK-10	Pb-01	Pb-18	Pb-608	Pb-B339	S.a	E.c	C.a	C.k	Cr.n
UFMGCB-540	22 ± 5	-	0.9 ± 0.5		2.7 ± 0.9	15 ± 5	15 ± 5	7.8 ± 2	1.8 ± 0.9	-	-	-	-	-
UFMGCB-554	18 ± 6	7.8 ± 4	3.5 ± 1		2.9 ± 1	7.8 ± 2	7.8 ± 2	3.9 ± 1	1.8 ± 0.9	-	-	-	-	-

^a Percentage of death of amastigote-like forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Control drug: amphotericin B at 0.2 µg mL⁻¹;

^b Percentage inhibition of the enzyme trypanothione reductase. Clomipramine at 6 µM was used as 50% inhibition control;

^c Cytocidal activity (percentage of death of human cancer cells relative to the initial inoculum). Control drugs: etoposide at 16 µg mL⁻¹ and colchicine at 8 µg mL⁻¹;

^d Minimal Inhibitory Concentration of the four strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Control Drug: amphotericin IC₅₀ at 0.62 µg mL⁻¹;

^e S.a = *Staphylococcus aureus*; E.c = *Escherichia coli*; C.a = *Candida albicans*; C.k = *Candida krusei*; Cr.n = *Cryptococcus neoformans* tested at 50 µg mL⁻¹ per disk. Control drugs: amphotericin B at 100 µg mL⁻¹ and chloramphenicol at 100 µg mL⁻¹.

The values represent the mean ± S.D. of at least 2 independent experiments.

The minus symbol (-) means inactive.

Discussão integrada

8. DISCUSSÃO INTEGRADA

A busca por novos produtos para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas, é um processo contínuo e que requer constante adaptação e uso de novos conhecimentos e tecnologias. Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, os fungos endofíticos são considerados como fontes de grande diversidade química e de uma variedade de atividades biológicas (Gunatilaka, 2006, Gallo *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2008). Os fungos endofíticos da planta *P. adiantoides* foram selecionados no presente trabalho para o isolamento e conhecimento de seus metabólitos com atividade contra DTNs, o câncer e as doenças infecciosas (causadas por bactérias e fungos).

Diversos trabalhos têm relatado a atividade biológica de fungos endofíticos isolados de plantas da família Fabaceae (Weber *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2006). Em um trabalho realizado por Weber e colaboradores, (2004), o fungo endofítico *Phomopsis* sp. foi isolado da planta *Erythrina crista-galli*, uma planta da família Fabaceae. A partir do estudo químico do extrato deste fungo foi isolado o phomol que apresentou atividade antibacteriana e antifúngica com CIM que variaram de 20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um outro estudo realizado com o fungo *Phomopsis cassiae* isolado da planta *Cassia spectabilis* (Fabaceae), revelou o potencial do fungo para a produção de metabólitos com atividade antifúngica. Os 5 derivados de sesquiterpenos isolados do extrato desse fungo apresentaram atividade contra *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (Silva *et al.*, 2006). No presente trabalho o fungo endofítico *Fusarium* sp. isolado da *P. adiantoides* apresentou atividade antifúngica contra o fungo *C. sphaerospermum* e contra onze isolados de *P. brasiliensis* (6 – artigo *Fusarium*). Em uma busca realizada na literatura, verificou-se que não existem trabalhos com fungos endofíticos isolados da planta *P. adiantoides* (Fabaceae), sendo este o primeiro trabalho realizado com os endofíticos desta planta.

No presente trabalho a metodologia clássica de cultivo e extração dos fungos para obtenção dos metabólitos bioativos foi utilizada, sem alterações e sem direcionamento para obtenção de um metabólito específico (5 – artigo *Cochliobolus*, 6 – artigo *Fusarium* e 7 – artigo *Bipolaris*). Uma das vantagens em se trabalhar com

microrganismos é a possibilidade de controlar os parâmetros de cultivo de maneira relativamente simples. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço e sob condições mais controladas. Além disso, as condições de cultivo, como por exemplo, tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração podem ser modificados a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos de interesse (Bills *et al.*, 2008, Bode *et al.*, 2002). Neste trabalho não se buscou otimizar as condições de cultivo para a obtenção de novos metabólitos. Entretanto, os extratos dos fungos isolados de *P. adiantoides* apresentaram atividades biológicas que justificam a investigação mais aprofundada destes fungos em relação a sua diversidade química.

Os protocolos utilizados para a identificação morfológica e molecular dos fungos endofíticos da *P. adiantoides* permitiram a identificação dos mesmos até o nível de gênero (5 – artigo *cochliobolus*, 6 – artigo *Fusarium* e 7 – artigo *Bipolaris*). A maior dificuldade encontrada foi em relação às características micromorfológicas dos fungos. Segundo Souza, (2004), a identificação de microrganismos isolados de plantas, principalmente os fungos filamentosos, é muito complexa. A taxonomia dos fungos é tradicionalmente baseada na comparação da morfologia e desenvolvimento de estruturas de reprodução sexuada. De fato, métodos de identificação por morfologia são trabalhosos e consomem muito tempo, além disso, a ausência ou a baixa esporulação dificultaram ainda mais a identificação dos fungos por estes métodos. Apesar desta dificuldade, os fungos da *P. adiantoides* apresentaram características micromorfológicas exclusiva dos gêneros encontrados. A presença de macroconídias e o tipo de germinação monopolar juntamente com as características macromorfológicas ajudaram na identificação destes gêneros (6 – artigo *Fusarium* e 7 – artigo *Bipolaris*). Para a identificação dos fungos por métodos clássicos é necessária a obtenção de informações sobre as estruturas destes fungos em vários meios de cultura, em especial das estruturas de reprodução sexuada ou assexuada. No presente estudo, os cinco meios de culturas utilizados não forneceram informações suficientes para uma identificação até o nível de espécie. Substâncias bioativas advindas de fungos endofíticos são representadas por diversas classes químicas, dentre elas, os tricotecenos, alcalóides, flavonoides, fenilpropanoides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, isocumarinas, quinonas, fenóis, citocalasinas, terpenóides, compostos alifáticos e clorados (Tan & Zou, 2001, Schulz *et al.*, 2002, Schulz & Boyle, 2005). No presente trabalho, duas quinonas foram

obtidas do fungo *Cochliobolus* sp. e dois tricotecenos obtidos do *Fusarium* sp. A (5 – artigo *cochliobolus*, 6 – artigo *Fusarium*).

Os fungos pertencentes ao gênero *Cochliobolus* são importantes patógenos de plantas. Alguns fungos do gênero *Cochliobolus* e seu anamorfo do gênero *Bipolaris*, produzem sesquiterpenos conhecidos como ophiobolinas que são fitotóxicas para uma grande variedade de plantas. Ghisalberti & Rowland, (1993) isolaram a substância 6-chlorodehydrocurvularina do fungo *C. spicifer*, mas a substância isolada não foi submetida para avaliação de seu potencial biológico. As substâncias cochlioquinona A (Lim *et al.*, 1996) e o cochlioquinol (Jung *et al.*, 2003) foram isoladas dos fungos *B. zeicola* e *B. cynodontis*, respectivamente. No nosso trabalho, as substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A foram isoladas do teleomorfo *Cochliobolus* sp. apresentando atividade biológica seletiva contra *L. (L.) amazonensis* (5 – artigo *cochliobolus*). Shen e colaboradores, (1999) relatam o isolamento e a identificação de um novo sesquiterpeno a 6-epi-3-anhydroophiobolina B e seis ophiobolinas previamente relatadas. De acordo com os mesmos autores a ophiobolina A apresentou potente atividade antitumoral e atividade antimalárica significativa. Ophiobolinas também já foram isoladas do fungo *Emericella variecolor* (Wei *et al.*, 2004), inibindo várias células tumorais, dentre elas, uma linhagem de leucemia em camundongos. No presente trabalho o extrato do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. apresentou atividade citotóxica para três linhagens de células tumorais humanas UACC-62, MCF-7 e TK-10 (5 – artigo *cochliobolus*). As substâncias responsáveis pela atividade citotóxica não foram isoladas no presente trabalho e serão objeto de investigações futuras..

Em um estudo realizado com a planta *Solanum cernuum* foram isolados 319 endofíticos, sendo que seis isolados foram identificados como *Bipolaris* sp. (Vieira, 2008). A mesma autora avaliou o potencial destes fungos contra *Bacterioides fragilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *Cladosporium sphaerospermum*, sendo somente um isolado de *Bipolaris* ativo contra *B. fragilis*. No presente trabalho os dados referentes a atividade antimicrobiana foram semelhantes aos obtidos por Vieira, (2008). Verificou-se que o extrato do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. foi inativo contra os microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (5 – artigo *Cochliobolus*). A ausência de atividade contra estes microrganismos foi observada também quando os extratos dos isolados UFMGCB-540 e 554 *Bipolaris* sp. foram testados contra os mesmos

microrganismos citados acima (7 – artigo *Bipolaris*). Apesar da ausência de atividade antimicrobiana destes extratos contra os microrganismos citados, os isolados UFMGCB-540 e 554 *Bipolaris* sp. inibiram o fungo dimórfico *P. brasiliensis* (7 – artigo *Bipolaris*). Diversos fatores podem influenciar na produção de metabólitos ativos contra microrganismos como, por exemplo, a planta hospedeira, a localização do fungo na planta hospedeira, o substrato que o fungo foi cultivado, temperatura, pH e agitação (Strobel & Daisy, 2003, Vieira, 2008).

Os fungos do gênero *Fusarium* são principalmente descritos como patógenos, mas também já foram encontrados colonizando assintomaticamente várias espécies de plantas (Wang *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2006, Santamaria & Bayman, 2005). No presente trabalho, o fungo endofítico *Fusarium* sp. foi avaliado para a produção de metabólitos ativos contra o fungo dimórfico *P. brasiliensis*. Phongpaichit *e colaboradores* (2006) testaram dois extratos de *Fusarium* obtidos de folhas de *Garcinia* sp., e observaram que os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana contra *Cr. neoformans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente a metilicina. No presente trabalho, o extrato do fungo *Fusarium* sp. foi inativo contra *Cr. Neoformans* e *S. aureus* mostrando dessa forma que outros fatores podem influenciar na atividade biológica dos fungos deste gênero. Espécies do gênero *Fusarium* têm sido intensamente investigadas devido à importância das mesmas como patógenos de plantas e como fonte substâncias com atividades biológicas. A vincristina, uma substância com importante atividade anticancer foi isolada pela primeira vez de plantas, mas de acordo com Tung, (2002) esta substância foi isolada também do extrato do fungo endofítico *F. oxysporum*. Outro trabalho relata o isolamento e identificação das substâncias cerebrosida e fusarisida isoladas do fungo *Fusarium* sp. a partir da planta *Quercus variabilis*. As duas substâncias isoladas apresentaram atividade antibacteriana (Shu *et al.*, 2004). Tricotecenos são frequentemente isolados de fungos do gênero *Fusarium* sp. Nitao *e colaboradores*, (2001) isolaram os tricotecenos 4,15-diacetilnivanelol e o diacetoxiscirpenol a partir do extrato do fungo *F. equiseti*. Ambos tricotecenos exibiram atividade contra nematóides de plantas. Para avaliar o potencial dos fungos do gênero *Fusarium* em produzir tricotecenos Cantalejo *e colaboradores*, (1999) isolaram tricotecenos de 49 gêneros *Fusarium* sp. Neste estudo verificaram que 15 isolados produziram HT2 toxina, 9 produziram T2 toxina, 14 produziram diacetoxiscirpenol e 10 produziram deoxinivalenol. No presente trabalho, dois tricotecenos foram isolados de

Fusarium sp. sendo a T2 toxin um deles. O outro tricoteceno isolado foi o 8-n-pentanoylneosolaniol (6 – artigo *Fusarium*).

No capítulo 5 – artigo *Cochliobolus* são mostrados a atividade biológica das substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A contra formas amastigotas like de *L. (L.) amazonensis*, sendo este o primeiro trabalho a mostrar a atividade destas substâncias contra uma espécie de *Leishmania*. Os resultados mostraram que estas substâncias foram muito tóxicas para os parasitas em baixas doses sendo necessários estudos mais detalhados de toxicidade assim como de atividade “in vivo” para saber se as substâncias isoladas poderão ser utilizadas futuramente como medicamentos para o tratamento da leishmaniose. Como consequência desta descoberta foi concedida a este trabalho a proteção na forma de patente de invenção que será detalhada no anexo 2 desta tese.

Na literatura existem diversos trabalhos relatando o mecanismo de ação de quinonas (Begleiter, 1983, Cohen *et al.*, 1987). Todavia, não foram encontrados dados sobre o modo de ação de cochlioquinonas. As quinonas com atividade antimicrobiana atuam na promoção da formação de radicais de oxigênio que são tóxicos para os microrganismos (Cohen *et al.*, 1987). Muitas drogas antitumorais utilizadas para o tratamento do câncer possuem o grupo quinona na sua estrutura. O mecanismo pelo qual o grupo quinona inibe as células tumorais parece estar relacionado a geração de radicais livres e ativos de oxigênio (Begleiter, 1983). Algumas quinonas, como por exemplo, a atovaquona, também são ativas contra parasitos, sendo que no *Plasmodium* o seu mecanismo primário de ação envolve a ligação irreversível ao citocromo bc1 mitocondrial (Kaneshiro *et al.*, 2000).

No capítulo 6 – artigo *Fusarium* relata-se o isolamento de dois tricotecenos que apresentaram atividade biológica contra onze isolados de *P. brasiliensis*. Devido ao fato de serem tóxicos para os animais e o homem, poucos trabalhos relatam a atividade biológica dos tricotecenos. Zonno & Vurro, (1999) avaliaram o efeito de 14 tricotecenos obtidos de fungos sobre a germinação da erva daninha *Striga hermonthica*. Entre as toxinas testadas a T2 toxina foi a única que apresentou 100% de inibição da germinação da semente na concentração de 10 nM. Segundo os mesmo autores, a alta atividade apresentada pela T2 toxina sugere que ela possa ser um potencial agente herbicida. No presente trabalho, a T2 toxina apresentou excelente atividade contra os isolados de *P.*

brasiliensis sendo o menor valor de inibição 75 nM. Como essa classe de tricotecenos já foi extensivamente estudada, devido a sua ação tóxica para os animais e o homem, os mecanismos de ação pelos quais a toxina atua já foram elucidados. Estes mecanismos estão basicamente relacionados à inibição da síntese de proteínas que pode ocorrer em células eucarióticas humanas e de outros mamíferos, aves, peixes, invertebrados e plantas (Isaka *et al.*, 1999).

Estudos voltados para o isolamento de substâncias bioativas com potencial terapêutico provenientes dos fungos endofíticos *Cochliobolus* e seu anamorfo *Bipolaris* ainda são incipientes. Apesar da existência de um maior número de trabalhos realizados com o fungo *Fusarium*, a diversidade química deste microrganismo ainda não foi totalmente explorada. Neste contexto, são necessários mais estudos para ampliar o conhecimento do potencial químico e farmacológico destes microrganismos.

_____ *Conclusões*

CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho relatando o estudo de fungos endofíticos da planta *P. adiantoides*. Os quatro fungos isolados e investigados apresentaram atividade biológica em um ou mais ensaios utilizados, deixando evidente o potencial destes fungos, para produção de metabólitos bioativos. A taxonomia clássica foi uma ferramenta útil, pois permitiu a visualização de estruturas características dos gêneros estudados, em especial para os fungos *Bipolaris* sp. (UFMGCB-554) e *Fusarium* sp. (UFMGCB-555). As técnicas de biologia molecular empregadas permitiram reforçar a identificação dos fungos endofíticos até o nível de gênero. Outras ferramentas de biologia molecular serão necessárias para viabilizar a completa identificação das espécies dos fungos estudados.

A metodologia empregada para a extração dos metabólitos a partir da cultura dos fungos mostrou-se eficiente para extrair metabólitos bioativos nos ensaios utilizados. O fracionamento biomonitorado dos extratos foi efetivo, pois pela primeira vez se relata a atividade das substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A contra formas amastigotas like de *L. (L.) amazonensis*. Este ensaio foi um dos empregados para guiar o fracionamento dos extratos. A atividade apresentada pelas substâncias foi seletiva quando comparada com a ação sobre células tumorais, o que justifica a investigação futura destas substâncias como ponto de partida de desenvolvimento de novos fármacos para doenças causadas por parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

De forma semelhante, está é a primeira vez que se relata a atividade de dois tricotecenos o 8-*n*-pentanoylneosolaniol e a T2 toxina contra onze isolados de *P. brasiliensis*. Novamente, alguma seletividade foi observada, pois as substâncias se mostraram cem vezes menos ativas contra a levedura *C. albicans*, sugerindo que as substâncias avaliadas não apresentam uma toxicidade geral. Contudo, vale ressaltar que são necessárias maiores investigações sobre o potencial destas substâncias para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da paracoccidioidomicose ou também como ferramentas bioquímicas para pesquisa.

Neste trabalho relata-se pela primeira vez a atividade biológica dos extratos de dois isolados de *Bipolaris* sp. em ensaios com a forma amastigota-“like” de *L. (L.) amazonensis*, a enzima tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi*, e com quatro isolados do fungo *P. brasiliensis*. Os dois extratos de *Bipolaris* apresentaram perfis diferentes quando avaliados por CCD e também por CLAE, mostrando a diversidade química existente entre isolados do mesmo gênero obtidos da mesma planta.

Estes resultados mostram que apesar de terem sido isolados fungos de gêneros bastante conhecidos e investigados, novas atividades biológicas para substâncias já conhecidas foram identificadas, o que aumenta o potencial de aplicabilidade das mesmas como fontes de inspiração no desenvolvimento de novos fármacos ou como ferramentas na investigação das bases bioquímicas/químicas dos mecanismos de ação sobre os organismos/enzimas alvo.

10. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos até o momento, as perspectivas para este trabalho são:

- O cultivo em larga escala do fungo endofítico *Cochliobolus* para isolamento de maiores quantidades da cochlioquinona A e da isocochlioquinona A;
- Testes *in vivo* das substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A em camundongos infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Testes de toxicidade com as substâncias cochlioquinona A e isocochlioquinona A;
- Realização de novos estudos de taxonomia dos quatro isolados de fungos estudados neste trabalho para auxiliar na identificação e possivelmente chegar a espécie;
- Realizar ensaios *in vivo* com os tricotecenos obtidos do fungo *Fusarium* para obter dados da ação destas substâncias *in vivo*, bem como, verificar possível toxicidade;
- Realizar estudos mais acurados para saber a espécie dos fungos classificados no gênero *Bipolaris* sp;
- Realizar o perfil cromatográfico dos fungos *Bipolaris* em Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas a fim de se obter um perfil mais refinado e com dados de massa dos extratos dos fungos em questão.

Referências Bibliográficas

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C., MIMS, CW & BLACKWELL, M., (1996) *Introductory Mycology*, p. 869, New York.
- Anoca, (2006) Fabaceae. In.: www.anoca.org/family/called/fabaceae.html. 01/2006.
- Azevedo, A. C. R., M. L. Vilela, N. A. Souza, C. A. AndradeCoelho, A. F. Barbosa, A. L. S. Firmo & E. F. Rangel, (1996) The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilheus, State of Bahia, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **91**: 75-79.
- Bacon, C. W., JF., (2000) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York.
- Bagagli, E., (2006) Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infection, Genetics and Evolution* **V. 6**: p. 344-351.
- Barbosa, M. A. G., K. G. Rehn, M. Menezes & R. Mariano, (2001) Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* **32**: 98-104.
- Bard, M., A. M. Sturm, C. A. Pierson, S. Brown, K. M. Rogers, S. Nabinger, J. Eckstein, R. Barbuch, N. D. Lees, S. A. Howell & K. C. Hazen, (2005) Sterol uptake in *Candida glabrata*: Rescue of sterol auxotrophic strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **52**: 285-293.
- Barnett, H. H., BB, (1972) *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Begleiter, A., (1983) Cytocidal action of the quinone group and its relationship to anti-tumor activity. *Cancer Research* **43**: 481-484.
- Berman, J. D., (1988) Chemotherapy for leishmaniasis - biochemical-mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases* **10**: 560-586.
- Bern, C., J. Adler-Moore, J. Berenguer, M. Boelaert, M. den Boer, R. N. Davidson, C. Figueras, L. Gradoni, D. A. Kafetzis, K. Ritmeijer, E. Rosenthal, C. Royce, R. Russo, S. Sundar & J. Alvar, (2006) Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* **43**: 917-924.
- Bills, G. F., G. Platas, A. Fillola, M. R. Jimenez, J. Collado, F. Vicente, J. Martin, A. Gonzalez, J. Bur-Zimmermann, J. R. Tormo & F. Pelaez, (2008) Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 1644-1658.

- Bills, G., Dombrowski, A., Pelaez, F., Polishook, J., Na, Z., (2002) Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: *Tropical Mycology: Micromycetes*. New York, p.165-194.
- Bode, H. B., B. Bethe, R. Hofs & A. Zeeck, (2002) Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **3**: 619-627.
- Body, B., (1996) Cutaneous Manifestations of Systemic Mycoses. *Dermatologic Clinics* **14**: p. 125-135.
- Bond, C. S., Y. H. Zhang, M. Berriman, M. L. Cunningham, A. H. Fairlamb & W. N. Hunter, (1999) Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure with Folding & Design* **7**: 81-89.
- Brandt, M. E. & D. W. Warnock, (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *Journal of Chemotherapy* **15**: 36-47.
- Burgess, L. W. & B. A. Summerell, (1992) Mycogeography of *Fusarium* - survey of fusarium species in subtropical and semiarid grassland soils from Queensland, Australia. *Mycological Research* **96**: 780-784.
- Butler, M. B., AD, (2005) Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? In: *Biochemical Pharmacology*. p. 919-929.
- Cantalejo, M. J., P. Torondel, L. Amate, J. M. Carrasco & E. Hernandez, (1999) Detection of fusarin C and trichothecenes in *Fusarium* strains from Spain. *Journal of Basic Microbiology* **39**: 143-153.
- Cerrado, Redes de Sementes do Cerrado (2006) www.sementesdocerrado.bio.br/Especies/Leguminosae_3904/Piptadenia/adiantos_3421/index. 01/2006.
- Clardy, J. & C. Walsh, (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* **432**: 829-837.
- Cohen, M. S., Y. Chai, B. E. Britigan, W. McKenna, J. Adams, T. Svendsen, K. Bean, D. J. Hassett & P. F. Sparling, (1987) Role of extracellular iron in the action of the quinone antibiotic streptonigrin - mechanisms of killing and resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**: 1507-1513.
- Coura, J. R. & S. L. de Castro, (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **97**: 3-24.
- Dagne, E., A. A. L. Gunatilaka, S. Asmellash, D. Abate, D. G. I. Kingston, G. A. Hofmann & R. K. Johnson, (1994) Two new cytotoxic cytochalasins from *xylaria-obovata*. *Tetrahedron* **50**: 5615-5620.

- Daisy, B. H., G. A. Strobel, U. Castillo, D. Ezra, J. Sears, D. K. Weaver & J. B. Runyon, (2002) Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology-Sgm* **148**: 3737-3741.
- de Almeida, S. M., C. L. K. Rebelatto, F. Queiroz-Telles & L. C. Werneck, (2005) Major histocompatibility complex and central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. *Journal of Infection* **51**: 140-143.
- Demain, A. L., (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 455-463.
- Demain, A. L., (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* **18**: 499-514.
- Desjeux, P., (2001) Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology* **190**: 77-79.
- Desjeux, P., (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **27**: 305-318.
- Desjeux, P., M. Boelaert, S. Sundar, S. Croft, K. Stuart, M. Tibayrenc, P. D. McMahon, M. Maroli, S. Reed, A. Dessein, J. Blackwell, J. Alvar, C. Davies, N. Saravia, B. Menne, A. M. El Hassan & T. D. R. R. G. leishmaniasis, (2004) Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 692-693.
- Dias, J. P., C. Bastos, E. Araujo, A. V. Mascarenhas, E. M. Netto, F. Grassi, M. Silva, E. Tatto, J. Mendonca, R. F. Araujo, M. A. Shikanai-Yasuda & R. Aras, (2008) Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **41**: 296-300.
- Dixon, D. M. & A. Polakwyss, (1991) The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses* **34**: 1-18.
- Fairlamb, A. H., (2003) Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology* **19**: 488-494.
- Fairlamb, A. H. & A. Cerami, (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology* **46**: 695-729.
- Felipe, M. S. S., F. A. G. Torres, A. Q. Maranhao, I. Silva-Pereira, M. J. Pocas-Fonseca, E. G. Campos, L. M. P. Moraes, F. B. M. Arraes, M. J. A. Carvalho, R. V. Andrade, A. M. Nicola, M. M. Teixeira, R. S. A. Jesuino, M. Pereira, C. M. A. Soares & M. M. Brigido, (2005) Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **45**: 369-381.
- Ferrara, M. A., (2006) Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. In: Revista Fitos. Rio de Janeiro 73-79.

- Filho, C. V. M., (1996) *Braúna, Angico, Jacarandá e outras leguminosas de Mata Atlântica: Estação biológica de Caratinga Minas Gerais*, p. 100. Fundação Botânica Margaret Mee/Fundação Biodiversitas/ AP. EBC/IEF/FZB-BH/SB-MG, Belo Horizonte.
- Fischer, C., A. Voss & J. Engel, (2001) Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology* **190**: 85-87.
- Gallo, M. B. C., B. C. Cavalcanti, F. W. A. Barros, M. O. de Moraes, L. V. Costa-Lotufo, C. Pessoa, J. K. Bastos & M. T. Pupo, (2008) Novel cytotoxic natural products from *Papulaspora immersa*, an endophyte in *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae). *Planta Medica* **74**: 1072-1072.
- Garrard, E. A., E. C. Borman, B. N. Cook, E. J. Pike & D. G. Alberg, (2000) Inhibition of trypanothione reductase by substrate analogues. *Organic Letters* **2**: 3639-3642.
- Ghisalberti, E. L. & C. Y. Rowland, (1993) 6-Chlorodehydrocurvularin, a new metabolite from *Cochliobolus spicifer*. *Journal of Natural Products* **56**: 2175-2177.
- Gontijo, C. M. F. & M. N. Melo, (2004) Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. In: Revista brasileira de epidemiologia. São Paulo, p. 11.
- Gunatilaka, A. A. L., (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* **69**: 509-526.
- Guo, B., Y. Wang, X. Sun & K. Tang, (2008) Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **44**: 136-142.
- Guo, B. Y., J. R. Dai, S. Ng, Y. C. Huang, C. Y. Leong, W. Ong & B. K. Carte, (2000) Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of Natural Products* **63**: 602-604.
- Handman, E., (2001) Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 229-+.
- Harper, J. K., A. M. Arif, E. J. Ford, G. A. Strobel, J. A. Porco, D. P. Tomer, K. L. O'Neill, E. M. Heider & D. M. Grant, (2003) Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **59**: 2471-2476.
- Hawksworth, D. L., (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**: 1422-1432.

- IBGE, (2006) Uma Espécie Brasileira. In.: www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/arvore/especie_brasileira.html. 01/2006.
- INCA, (2008) Estimativa/2008 Incidência de Câncer no Brasil.
- Isaka, M., J. Punya, Y. Lertwerawat, M. Tanticharoen & Y. Thebtaranonth, (1999) Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. *Journal of Natural Products* **62**: 329-331.
- Janbon, G., (2004) *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *Fems Yeast Research* **4**: 765-771.
- Jung, H. J., H. B. Lee, C. H. Lim, C. J. Kim & H. J. Kwon, (2003) Cochlioquinone A1, a new anti-angiogenic agent from *Bipolaris zeicola*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**: 4743-4747.
- Kaneshiro, E. S., D. Sul & B. Hazra, (2000) Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on ubiquinone biosynthesis in *Pneumocystis carinii* organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 14-18.
- Kirk, P., Cannon, PF, David, JC & Stalpers, JA, (2001) Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. In. Wallingford: CABI.
- Kogel, K. H., P. Franken & R. Huckelhoven, (2006) Endophyte or parasite - what decides? *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 358-363.
- Kuehnert, M. J., D. Kruszon-Moran, H. A. Hill, G. McQuillan, S. K. McAllister, G. Fosheim, L. K. McDougal, J. Chaitram, B. Jensen, S. K. Fridkin, G. Killgore & F. C. Tenover, (2006) Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *Journal of Infectious Diseases* **193**: 172-179.
- Kumar, D. S. S., H. Y. Cheung, C. S. Lau, C. Feng & K. D. Hyde, (2004) In vitro studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 295-300.
- Lee, J. C., E. Lobkovsky, N. B. Plam, G. Strobel & J. Clardy, (1995) Subglutinol-a and subglutinol-b - immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry* **60**: 7076-7077.
- Li, J. Y., G. Strobel, R. Sidhu, W. M. Hess & E. J. Ford, (1996) Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology-Uk* **142**: 2223-2226.
- Lim, C. H., H. Miyagawa, T. Tsurushima, T. Ueno & M. Sato, (1996) Cochlioquinol: A new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **60**: 724-725.
- Marques, S., (1998) Paracoccidioidomycose: atualização Epidemiológica Clínica e Terapêutica. In: Anais Brasileiros de Dermatologia. p. 135-146.

- Marques, S., (2003) Paracoccidioidomycose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. In: Anais Brasileiros de Dermatologia. pp. p 135-146.
- Martinez, S. & J. J. Marr, (1992) Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. *New England Journal of Medicine* **326**: 741-744.
- McGinnis, M. R., G. Campbell, W. K. Gourley & H. L. Lucia, (1992) Pheohyphomycosis caused by *Bipolaris spicifera* - an informative case. *European Journal of Epidemiology* **8**: 383-386.
- McGinnis, M. R., M. G. Rinaldi & R. E. Winn, (1986) Emerging agents of pheohyphomycosis - pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Journal of Clinical Microbiology* **24**: 250-259.
- Morel, C. M., T. Acharya, D. Broun, A. J. Dang, C. Elias, N. K. Ganguly, C. A. Gardner, R. K. Gupta, J. Haycock, A. D. Heher, P. J. Hotez, H. E. Kettler, G. T. Keusch, A. F. Krattiger, F. T. Kreutz, S. Lall, K. Lee, R. Mahoney, A. Martinez-Palomo, R. A. Mashelkar, S. A. Matlin, M. Mzimba, J. Oehler, R. G. Ridley, S. Pramilla, P. Singer & M. Y. Yun, (2005) Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. *Science* **309**: 401-404.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies & N. G. Saravia, (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577.
- Mutebi, J. P., B. Alexander, I. Sherlock, J. Wellington, A. A. Souza, J. Shaw, E. F. Rangel & G. C. Lanzaro, (1999) Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **61**: 149-157.
- Newman, D. J. & G. M. Cragg, (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products* **67**: 1216-1238.
- Nitao, J. K., S. L. F. Meyer, W. F. Schmidt, J. C. Fettingier & D. J. Chitwood, (2001) Nematode-antagonistic trichothecenes from *Fusarium equiseti*. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 859-869.
- Otero, L., M. Vieites, L. Boiani, A. Denicola, C. Rigol, L. Opazo, C. Olea-Azar, J. D. Maya, A. Morello, R. L. Krauth-Siegel, O. E. Piro, E. Castellano, M. Gonzalez, D. Gambino & H. Cerecetto, (2006) Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**: 3322-3331.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J, Papadopoulou, B., (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* **7**: p. 257-266.

- Park, H. G., J. R. Managbanag, E. K. Stamenova & S. C. Jong, (2004) Comparative analysis of common indoor *Cladosporium* species based on molecular data and conidial characters. *Mycotaxon* **89**: 441-451.
- Petrini, O., (1991) Fungal endophyte of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves. J. Andrews & S. S. Hirano (eds). New York: Springer Verlag, 179-197.
- Phongpaichit, S., N. Rungjindamai, V. Rukachaisirikul & J. Sakayaroj, (2006) Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **48**: 367-372.
- Ramos-e-Silva, M., (2000) Micoses profundas. In: Dermatologia Atual. 6-13.
- Ramos-E-Silva, M. & L. D. Saraiva, (2008) Paracoccidioidomycosis. *Dermatologic Clinics* **26**: 257-+.
- Rath, S., L. A. Trivelin, T. R. Imbrunito, D. M. Tomazela, M. N. de Jesus, P. C. Marzal, H. F. D. Junior & A. G. Tempone, (2003) Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: The state of the art. *Quimica Nova* **26**: 550-555.
- Restrepo, A., (1994) Treatment of tropical mycoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* **31**: 91-102.
- Rivitti, E. A. & V. Aoki, (1999) Deep fungal infections in tropical countries. *Clinics in Dermatology* **17**: 171-190.
- Roberts, L. J., E. Handman & S. J. Foote, (2000) Science, medicine, and future - Leishmaniasis. *British Medical Journal* **321**: 801-804.
- Rosa, L. H., (2006) *Piptadenia adiantoides*. In: JPG. Catas Altas.
- San-Blas, G. & G. Nino-Vega, (2008) *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* **165**: 183-195.
- San-Blas, G., G. Nino-Vega & T. Iturriaga, (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology* **40**: 225-242.
- Santamaria, J. & P. Bayman, (2005) Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* **50**: 1-8.
- Santiago, M., L. Linares, S. Sanchez & R. Rodriguez-Sanoja, (2005) Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase. *Biologia* **60**: 111-114.
- Saúde, (2009) Leishmaniose. In: www.saude.saude.com.br/leish.jpg. Leishmaniose cutânea.

- Sereno, D. & J. L. Lemesre, (1997) In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: Stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 1898-1903.
- Sette, L. D., M. R. Z. Passarini, C. Delarmelina, F. Salati & M. C. T. Duarte, (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **22**: 1185-1195.
- Schulz, B. & C. Boyle, (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**: 661-686.
- Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A. K. Rommert & K. Krohn, (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**: 996-1004.
- Shen, X. Y., S. B. Krasnoff, S. W. Lu, C. D. Dunbar, J. O'Neal, B. G. Turgeon, O. C. Yoder, D. M. Gibson & M. T. Hamann, (1999) Characterization of 6-epi-3-anhydrophorbol B from *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of Natural Products* **62**: 895-897.
- Shikanai-Yasuda, M. A., F. D. Telles, R. P. Mendes, A. L. Colombo, M. L. Moretti & P. Grp Consultores Consenso, (2006) Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **39**: 297-310.
- Shu, R. G., F. W. Wang, Y. M. Yang, Y. X. Liu & R. X. Tan, (2004) Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids* **39**: 667-673.
- Silva, G. H., H. L. Teles, L. M. Zanardi, M. C. M. Young, M. N. Eberlin, R. Hadad, L. H. Pfenning, C. M. Costa-Neto, I. Castro-Gamboa, V. D. S. Bolzani & A. R. Araujo, (2006) Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry* **67**: 1964-1969.
- Souza, A., Souza, A.D. L, Astolfi Filho, S, Belém Pinheiro, ML, Sarquis, MIM, Pereira, J.O., (2004) atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas de amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benth. In: Acta Amazônica. 185-195.
- Sporn, M. B. & K. T. Liby, (2005) Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nature Clinical Practice Oncology* **2**: 518-525.
- Stierle, A. A., G. A. Strobel & D. B. Stierle, (1993) Investigation of fungi associated with the pacific yew tree *taxus-brevifolia*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **205**: 8.
- Strobel, G. & B. Daisy, (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 491-+.

- Strobel, G. A., E. Dirkse, J. Sears & C. Markworth, (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology-Sgm* **147**: 2943-2950.
- Strobel, G. A., R. V. Miller, C. Martinez-Miller, M. M. Condrón, D. B. Teplow & W. M. Hess, (1999) Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiosis* cf. *quercina*. *Microbiology-Uk* **145**: 1919-1926.
- Summerell, B. A., B. Salleh & J. F. Leslie, (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* **87**: 117-128.
- Tan, R. X. & W. X. Zou, (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**: 448-459.
- Tavares, A., S. Silva, A. Dantasa, E. Campos, R. Andrade, A. Maranhão, M. Brígido, D. Passos-Silva, A. Fachin, S. Teixeira, G. Passos, C. Soares, A. Bocca, M. Carvalho, I. Silva-Pereira & M. Felipe, (2007) Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes and Infection* **9**: 583-590.
- Tong, K. K., D. Yang, E. Y. T. Chan, P. K. Y. Chiu, K. S. Yau & C. S. Lau, (1999) Downregulation of lymphocyte activity and human synovial fibroblast growth in rheumatoid arthritis by triptolide. *Drug Development Research* **47**: 144-153.
- Tortora, G. J., Funke, B.R, Case, C.L, (2005) *Microbiologia*, p. 894. Artmed, Porto Alegre.
- Tung, C. Y., Yang, D.B., Gou, M., (2002) A preliminary study on the condition of the culture and isolate of endophytic fungus producing vincristine. *Journal of Chuxiong Normal University* **V. 6**: 39-41.
- Uribe, S., (1999) The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for Leishmania transmission. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **94**: 729-734.
- Vieira, M. L. A., (2008) Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). In. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 117p.
- Wagenaar, M. M., J. Corwin, G. Strobel & J. Clardy, (2000) Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella*. *Journal of Natural Products* **63**: 1692-1695.
- Wang, J., J. Liu, H. Chen & J. Yao, (2007) Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 889-894.
- Weber, D., O. Sterner, T. Anke, S. Gorzalczancy, V. Martino & C. Acevedo, (2004) Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Journal of Antibiotics* **57**: 559-563.

- Wei, H., T. Itoh, M. Kinoshita, Y. Nakai, M. Kurotaki & M. Kobayashi, (2004) Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Tetrahedron* **60**: 6015-6019.
- Weinberger, M., L. Leibovici, S. Perez, Z. Samra, I. Ostfeld, I. Levi, E. Bash, D. Turner, A. Goldschmied-Reouven, G. Regev-Yochay, S. D. Pitlik & N. Keller, (2005) Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-albicans *Candida* species and predictors of mortality. *Journal of Hospital Infection* **61**: 146-154.
- WHO, (1999) World Health Organization. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. In: <http://www.who.int/csr/en/>. World Health Organization, 30 July 2008.
- WHO, (2002) Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. In: <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7744.pdf>. World Health Organization, 30 July 2008.
- WHO, (2003) Essential leishmaniasis maps. In: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html. World Health Organization, 30 July 2008.
- WHO, (2006) Control of the leishmaniasis. In: http://www.emro.who.int/afghanistan/Media/PDF/Leishmaniasis_EB118_4.pdf. World Health Organization, 30 July 2008.
- WHO, (2007) The World health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. World Health Organization, 25 November 2008.
- WHO, (2008a) Leishmaniasis – The disease and its epidemiology. In: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/. World Health Organization, 30 July 2008.
- WHO, (2008b) World Health Organization. Control of Neglected Tropical Diseases (NTD): Neglected tropical diseases frequently asked questions. http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index.html . World Health Organization, 31 May 2008.
- Wiyakrutta, S., N. Sriubolmas, W. Panphut, N. Thongon, K. Danwisetkanjana, N. Ruangrunsi & V. Meevootisom, (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**: 265-272.
- Worapong, J., G. Strobel, B. Daisy & U. F. Castillo, (2002) *Muscodor roseus* anam. sp nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. *Mycotaxon* **81**: 463-475.
- Yardley, V. & S. L. Croft, (2000) A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* **13**: 243-248.

- Zhan, J. X., A. M. Burns, M. P. X. Liu, S. H. Faeth & A. A. L. Gunatilaka, (2007) Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products* **70**: 227-232.
- Zonno, M. C. & M. Vurro, (1999) Effect of fungal toxins on germination of *Striga hermonthica* seeds. *Weed Research* **39**: 15-20.

12. ANEXOS

Anexo I – Introdução, Material e Métodos e Resultados e Discussão que foram desenvolvidos pelo projeto de isolamento de substâncias bioativas de leveduras

Introdução

Em experimentos realizados anteriormente com leveduras obtidas de diferentes ecossistemas brasileiros (Campos, 2005), extratos das mesmas foram avaliadas nos ensaios de inibição da enzima tripanotona redutase (TR), inibição do crescimento de três linhagens de células tumorais humanas, UACC-62 (câncer de pele), MCF-7 (câncer de mama) e TK-10 (câncer renal), ensaio de proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) contra três bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*; uma levedura, *Candida albicans*; e o fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum*. Dentre os 610 extratos avaliados, 135 apresentaram atividade em um ou mais dos ensaios biológicos e foram selecionadas para serem investigadas no presente trabalho. O objetivo inicial seria isolar as substâncias bioativas dos extratos de leveduras que confirmassem a atividade observada na triagem. Todavia, ao se repetir o cultivo e os ensaios com os novos extratos das leveduras não se observou qualquer atividade biológica. Esta perda da atividade pode ter ocorrido por falhas nos ensaios, possíveis alterações físico-químicas imperceptíveis durante o cultivo, instabilidade de vias metabólicas das leveduras testadas para a produção de metabólitos ativos, entre outros.

Material e Métodos

Recultivo das leveduras

Três alçadas de células das leveduras, após 24 horas de crescimento a 28 °C em agar sabouraud foram inoculadas em tubos cônicos de 50 mL contendo 25 mL de caldo

sabouraud. Os tubos foram incubados sob agitação a 200 rpm a 28 °C, durante sete dias. Após esse período, as amostras foram mantidas a -20 °C, até o momento do preparo do extrato.

Extração das leveduras

Os tubos com caldo do cultivo e a biomassa foram descongelados a temperatura ambiente e logo após foi feita a extração com acetato de etila (2 x 15 mL) para obtenção dos extratos orgânicos e aquosos. O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotatório e o restante foi seco em centrifuga à vácuo, sob baixa pressão. Todos estes procedimentos foram realizados em temperaturas inferiores a 40 °C.

Armazenamento dos extratos e suas soluções

Os extratos foram armazenados à - 40 °C. Soluções estoque a 10 mg/mL de cada extrato, incluindo o extrato do meio de cultura sem o crescimento fúngico, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, USA) e armazenadas a -80 °C na extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais – IRR/Fiocruz.

Ensaio biológicos

Ensaio de toxicidade para célula tumorais humanas

A manutenção, o cultivo celular e o ensaio de toxicidade de células tumorais foram realizados no LQPN por técnicos especializados.

Manutenção e cultivo celular – Foram utilizadas as linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e TK-10 (renal). As culturas de cada célula foram mantidas em garrafas de cultivo celular com o meio RPMI-1640 suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB). Os repiques de células foram realizados quando as mesmas apresentavam uma monocamada com 80% de confluência. Para realizar o repique, retirou-se das garrafas o meio RPMI-1640 suplementado com 5% (SFB), deixando nas garrafas somente as células aderidas. A monocamada de células aderidas na garrafa foi lavada suavemente com Hanks. Após esta etapa, a solução de Hanks foi removida a fim de eliminar as células mortas. Uma solução de tripsina/EDTA a 0,25% foi adicionada nas garrafas contendo as células e as garrafas foram incubadas em estufa

de CO₂ a 37 °C por aproximadamente 1 min. Após o desprendimento da monocamada de células da garrafa, as mesmas foram ressuspensas aos poucos adicionando 5 mL de RPMI-1640 suplementado. A suspensão da garrafa cultivada foi transferida para outras garrafas contendo RPMI-1640 suplementado. As garrafas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C, com as tampas semi-abertas. O crescimento celular foi observado todos os dias.

Ensaio de toxicidade – O efeito dos extratos, frações e substância(s) pura(s) sobre a proliferação celular foi avaliado utilizando-se as linhagens tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e TK-10 (renal) (Monks et al., 1991). De forma breve, as suspensões celulares foram diluídas de acordo com a linhagem de modo que 100 µL, adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços contenha: 10.000 células UACC-62, 10.000 células MCF-7 e 15.000 células TK-10. Os inóculos foram incubados por 24 horas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂ para estabilização. Em cada poço foi adicionado cada extrato de modo a atingir a concentração final de 20 µg/mL. As células foram incubadas na presença dos extratos por 48 horas, a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. A multiplicação destas células foi medida pelo método colorimétrico, empregando-se a sulfarrodamina B. A porcentagem de inibição é calculada pelo software por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{Se a amostra é citostática – Efeito} = 100 \times \left[1 - \frac{[\text{Abs amostra} - \text{Abs To}]}{[\text{Abs Contr Cel} - \text{Abs To}]} \right]$$

$$\text{Se a amostra é citocida – Efeito} = 100 \times \left[1 + \frac{[\text{Abs amostra} - \text{Abs To}]}{[\text{Abs Contr Cel} - \text{Abs To}]} \right]$$

Os testes foram realizados em triplicata e com controles positivos representado pelas drogas citotóxicas colchicina 16 µg/mL (Sigma, EUA) e etoposídeo 8 µg/mL (Sigma, EUA).

Ensaio com a enzima tripanotona redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi*

O ensaio colorimétrico foi conduzido em placas de 96 poços de acordo com os protocolos estabelecidos por Hamilton et al. (2003). Em cada poço (250 µL) foi adicionado: 6 mUI da enzima TR (gentilmente cedida pelo Prof. Alan Fairlamb, University of Dundee, Scotland), 0,25 nmol do substrato (T (S)₂) (Bachem, USA), 50 nmol de NADPH (Sigma, USA), 17,5 nmol de reagente de Ellman (DTNB, Sigma, USA), 10 µg de extrato e no controle, 1,63 nmol de clomipramina (Sigma, USA) (Borges et al., 1995). O tampão da reação foi preparado com Hepes 40 mM (Sigma, USA) e EDTA 1 mM (Sigma, USA), com o pH ajustado para 7,5. Controles com clomipramina e sem droga foram conduzidos em paralelo. As placas foram aquecidas a 30 °C por 30 minutos e após a adição de 25 µL DTNB, a leitura da absorbância a 412 nm no modo cinético foi realizada por 10 minutos. A inclinação da curva ($\delta OD/\delta t$) dos poços com as amostras foi comparada com a inclinação da curva gerada pelo controle sem droga para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os experimentos foram realizados em triplicata, e expressos em porcentagem de inibição da enzima segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs contr com enzima}} \right)$$

Ensaio para a avaliação da atividade antibacteriana

Staphylococcus aureus – ATCC 29213 e *Escherichia coli* – ATCC 25922, foram conservadas em tubos contendo agar “Brain Heart Infusion” BHI (acrescido de 2% de agar) inclinados e congelados em caldo BHI, com 20% de glicerol e preservadas a –86 °C. O inóculo das bactérias foi padronizado para 10³-10⁴ células/mL e cultivadas em agar BHI, onde após 24 horas de crescimento uma colônia foi transferida para tubos de ensaio contendo 6 mL de caldo BHI que foram incubados a 35 °C por 24 horas. Após crescimento, as bactérias foram esgotadas, por meio de “swabs”, em placas estéreis contendo agar BHI. Foram aplicados 5 µL de solução a 10 mg/mL de cada extrato, fração ou substância pura em DMSO 1% sobre os discos Blanc 6 mm depositados sobre

as placas (90 x 15 mm) com os microrganismos alvos. Foram considerados ativos os extratos, frações ou substâncias puras que apresentaram halo de inibição após 24-48 horas a 37 °C. Como controles, foi utilizado, o cloranfenicol a 100 µg/mL (Sigma, EUA). Foi realizado também o controle com o DMSO a 1%.

Ensaio para a avaliação da atividade antifúngica

Candida albicans – ATCC 18804, *Candida krusei* – ATCC 20298 e *Cryptococcus neoformans* – ATCC 32608, foram mantidas em agar GYMP inclinado e também congeladas em caldo GYMP com 20% de glicerol e preservadas a -86 °C. O inóculo das leveduras foi padronizado por meio da escala de MacFarland nº. 1 (Yarrow, 1998). As leveduras foram cultivadas em agar sabouraud a 28 °C por 24 horas, em seguida foram transferidas para tubos de ensaio contendo salina e esgotadas utilizando “swabs”, em placas estéreis contendo o meio agar sabouraud. Foram aplicados 5 µL de solução a 10 mg/mL de cada extrato, fração ou substância pura em DMSO 1% sobre os discos Blanc 6 mm depositados sobre as placas (90 x 15 mm) com os microrganismos alvos. Foram considerados ativos os extratos, frações ou substâncias puras que apresentaram halo de inibição após 24-48 horas a 37 °C. Como controles, foi utilizado, o cloranfenicol a 100 µg/mL (Sigma, EUA). Foi realizado também o controle com o DMSO a 1%.

Ensaio de inibição da proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP)

As células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) foram separadas conforme o método descrito por Gazzinelli et al, (1983) modificado por Souza-Fagundes, (2002). O sangue heparinizado foi aplicado em tubos siliconizados de 50 mL, contendo uma mistura de Ficoll-diatrozoato obtida comercialmente na proporção de uma parte de Ficoll-diatrozoato para duas partes de sangue. Essa preparação foi centrifugada a 18 °C por 40 min a 1450 rpm para formar o anel de células mononucleares na interface entre o Ficoll e o plasma. O anel foi removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para tubos estéreis de 50 mL de fundo cônico. Em seguida, foram adicionados às células 50 mL de meio de cultura MEM (Minimal Essencial Médium – GIBCO UK) e novamente centrifugado por 10 min, 1200

rpm a 4 °C. As células foram lavadas por mais duas vezes com cerca de 20 mL de MEM. As CMSP foram então ressuspensas em 1 mL de meio RPMI – 1640 e contadas em câmara de Neubauer testando sua viabilidade com solução isotônica de azul de tripan, 0,02%, com auxílio de um microscópio ótico. A densidade de células viáveis foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ células/mL.

No ensaio de proliferação celular in vitro (blastogênese), as células foram mantidas em meio de cultivo completo (CMBLAST) contendo RPMI -1640 suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh⁺, previamente inativado (Flow Laboratories, Royane, UN), 1,6% de L-Glutamina (solução estoque 200 mM, GIBCO UK, Grand Island, NY) e 3% da mistura antibiótico–antimicótico (solução estoque 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de fungisona). A cultura foi mantida em condições estéreis, em placas de 96 poços de fundo chato. Em cada poço, foram adicionados 100 µL da suspensão celular contendo $1,5 \times 10^6$ células mononucleares por mililitro de CMBLAST, 2,5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) e os extratos na concentração de 10 µg/mL. As placas foram mantidas em incubadoras de atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ a 37 °C por 72 horas. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Jiang & Xu, 2003) e os resultados expressos em termos de percentual de proliferação em relação a cultura estimulada com PHA. Foi utilizado como controle para a inibição das CMSP a dexametasona (SIGMA) numa concentração de 10 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

Atividade biológica dos extratos de leveduras

Foram obtidos 135 extratos de leveduras preparados para serem testados numa concentração final de 10 µg/mL. Somente nos testes de atividade antimicrobiana indireta os extratos foram usados numa concentração de 100 µg/mL. A utilização de tubos cônicos de 50 mL propiciou a obtenção dos extratos com massa suficiente para a realização dos ensaios biológicos. Os 135 extratos de leveduras foram testados nos seguintes ensaios: antimicrobiano, contra três bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*; no ensaio de inibição da enzima tripanotona redutase (TR); contra três linhagens de células tumorais humanas, UACC-62 (câncer de pele), MCF-7 (câncer de mama) e TK-10 (câncer renal) e no ensaio de proliferação das células

mononucleares do sangue periférico humano (CMSP). Os resultados estão representados na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Extratos de leveduras que inibiram a proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP)

Extratos ^a	Extratos ^b	Código UFMG ^c	% inibição das CMSP ^d	% inibição das CMSP ^e	Desvio	Espécies
EX3447 aq ^f	EX3928 aq	UFMGTOC 06	49	30	13	<i>Candida sp.</i>
EX3248 aq	EX3947 aq	UFMGTOC 44.1	57	33	17	NI
EX3275 aq	EX3949 aq	UFMGTOC 48.1	45	37	6	NI
EX3506 aq	EX3861 aq	UFMGA 134.3	60	39	15	NI
EX3459 aq	EX3946 aq	UFMGTOC 43.1	55	40	11	NI
EX3469 aq	EX3952 aq	UFMGTOC 68.1	56	42	10	NI
EX3521 aq	EX3923 aq	UFMGS 19	58	43	11	<i>Cryptococcus aerius</i>
EX3507 aq	EX3860 aq	UFMGA 132.6	59	44	11	NI
EX3348 or	EX3823 or	UFMGTOC 119.1	22	46	17	<i>Metschnikowia continentalis</i>
EX3622 aq	EX3916 aq	UFMGRD653	47	49	1	NI
EX3621 aq	EX3856 aq	UFMG96.381	40	51	8	NI
EX3610 aq	EX3855 aq	UFMG55	37	51	10	NI
EX3399 or	EX3819 or	UFMGS 38B	59	52	5	<i>Pichia guilliermondii</i>
EX3606 aq	EX3913 aq	UFMGRD616	44	52	6	NI
EX3347 or	EX3822 or	UFMGTOC 115	31	52	15	<i>Metschnikowia</i>
EX3480 aq	EX3937 aq	UFMGTOC 215.2	57	53	3	<i>Metschnikowia continentalis</i>
EX3617 aq	EX3911 aq	UFMGRD548	58	56	1	NI
EX3456 aq	EX3945 aq	UFMGTOC 40.1	55	59	3	NI
EX3234 aq	EX3953 aq	UFMGTOC 7.1	54	60	4	NI
EX3618 aq	EX3857 aq	UFMG96.394	45	60	11	NI
EX3246 aq	EX3948 aq	UFMGTOC 47	52	62	7	NI
EX3448 aq	EX3954 aq	UFMGTOC 7.2	46	62	11	<i>Rhodotorula</i>

^a extratos do primeiro cultivo; ^b extratos do segundo cultivo; ^c Código da coleção de culturas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

^d % inibição da proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano primeiro ensaio; ^e segundo ensaio de % inibição das CMSP;

^f extrato aquoso e or - extrato orgânico. obs: NI - Leveduras que não estão identificadas.

Pelos resultados mostrados na tabela acima, verificou-se que dos 135 extratos ativos apenas 22 repetiram a atividade no ensaio de inibição das CMSP. Os resultados obtidos não foram bons e, além disso, as leveduras não apresentaram atividade nos outros ensaios. Alguns fatores podem ter influenciado na ausência de atividade biológica das leveduras, sendo um deles a metodologia de produção dos extratos ou talvez quando foram cultivadas novamente deixaram de produzir os metabólitos produzidos outrora. De fato não se sabe com certeza o que ocorreu com as leveduras. MacWilliams (1959) realizou uma triagem visando detectar a produção de compostos antimicrobianos por leveduras isoladas do solo e da superfície de folhas, mas não detectou nenhuma atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. O autor concluiu que as leveduras não são fontes promissoras para a descoberta de novos compostos antimicrobianos, se comparadas a outros grupos microbianos. Em contrapartida, Zhao (1999), verificou que glicolipídeos, extraídos e purificados de *Candida antarctica* T-34, mostraram-se efetivos na inibição de células da linhagem B16 de melanoma de rato. A aplicação do glicolipídeo na concentração de 10 μ M causou condensação da cromatina e fragmentação da molécula de DNA, levando a apoptose. Diante dessas incertezas optou-se em trabalhar com os fungos endofíticos da *P. adiantoides*, pois quando cultivados novamente todos repetiram os resultados nos ensaios biológicos.

Anexo II – Patente

09/04/2008 020080052430
13 04 NPRJ
0000220802184933
Espaço reservado para o depósito

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERT

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas

1. Depositante (71):
1.1 Nome: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
1.2 CNPJ/CPF: 33781055000135
1.3 Endereço completo: AV. BRASIL 4365, MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO, BRASIL
1.4 CEP: 21045-900
1.5 Telefone: () 1.6 Fax: ()
1.7 E-mail: ☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição
Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):
METABÓLITOS LEISHMANICIDAS E INIBIDORES DA ENZIMA TRIPANOTONA
REDUTASE ISOLADOS DO FUNGO ENDOFÍTICO COCHLIOBOLUS SP. DE
PIPTADENIA ADIANTOIDES ☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº: Data de Depósito: / /

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista
O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

6. Inventor (72):
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: CARLOS LEOMAR ZANI
6.2 Qualificação: FARMACETICO 6.3 CPF:
6.4 Endereço completo: RUA VERALDO LAMBERTUCCI 97/302, BAIRRO SÃO LUCAS, BELO
HORIZONTE, MINAS GERAIS
6.5 CEP: 30240-540
6.6 Telefone: () 6.7 Fax: ()
6.8 E-mail: ☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97

- ☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de Graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Declaração na forma do art. 2º da Resolução/INPI nº 134 de 13/12/06

- ☐ 9.1 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Medida Provisória 2.186-16, de 23/08/01, informando ainda:

9.2 Número e a data da Autorização do acesso correspondente:

Nº: Data: / /

9.3 Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso:

☐ continua em anexo

- ☐ 9.4 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

10. Procurador (74):

10.1 Nome: **BHERING, ALMEIDA & ASSOCIADOS (KATIA F DE ALMEIDA)**

10.2 CPF/CNPJ: **02917066000176** 10.3 API/OAB: **1021**

10.4 Endereço completo: **RUA BENEDITINOS 16, 11º ANDAR, RIO DE JANEIRO, BR**

10.5 CEP: **20081050**

10.6 Telefone: **(21) 25166698** 10.7 FAX: **(21) 25161380**

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº. total de somente uma das vias de cada documento)

11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	11.5 Relatório Descritivo	25 fls.
11.2 Procuração	1 fls.	11.6 Reivindicações	2 fls.
11.3 Documentos de Prioridade	fls.	11.7 Desenhos	2 fls.
11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	11.8 Resumo	1 fls.
11.9 Outros (especificar) Declaração			1 fls.
11.10 Total de folhas anexadas			33 fls.

12. Declaro, sob penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Rio de Janeiro, 09/04/08

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Katia F. de Almeida (API 1021)

Bhering, Almeida & Associados

Bhering, Almeida & Associados S/C Ltda.

Rua Beneditinos, 16 - 11.º Andar - Centro

CEP 20081-050 - Rio de Janeiro - RJ

ANEXO

7. Inventor (72): Continuação...

- 7.1 Nome: **BETANIA BARROS COTA**
7.2 Qualificação: Farmacêutica
7.3 Endereço: Rua Minas Novas 97/601, Bairro Cruzeiro,
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 30310-090 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **TANIA MARIA DE ALMEIDA ALVES**
7.2 Qualificação: Farmacêutica
7.3 Endereço: Rua Bráz Cubas 77/202, Bairro Cruzeiro, Belo Horizonte,
Minas Gerais
7.4 CEP: 30310-220 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **ANA LÚCIA TELES RABELLO**
7.2 Qualificação: Médica
7.3 Endereço: Av. Barbacena 1467/602, Santo Agostinho,
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 30190-131 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **RACHEL BASQUES CALIGIORNE**
7.2 Qualificação: Bióloga
7.3 Endereço: Rua Bianca 320, Bandeirantes (Pampulha)
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 31340-610 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **FERNANDA FRAGA CAMPOS**
7.2 Qualificação: Bióloga
7.3 Endereço: Av. Augusto de Lima 345/303, Bairro Centro
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 30190-000 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **LUIZ HENRIQUE ROSA**
7.2 Qualificação: Biólogo
7.3 Endereço: Rua Cláudio Antônio 120, Bairro Aparecida
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 31250-040 7.5 Telefone:
- 7.1 Nome: **CARLOS AUGUSTO ROSA**
7.2 Qualificação: Biólogo
7.3 Endereço: Rua Cantor Luiz Gonzaga 75/202, Bairro Castelo
Belo Horizonte, Minas Gerais
7.4 CEP: 30840-340 7.5 Telefone:

Anexo III – Perfil dos fungos da *P. adiantoides* em CLAE e CCD.

Perfil cromatográfico

A caracterização cromatográfica dos extratos foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (Collins et al., 1997). A CLAE consiste num tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. A CLAE permite realizar separações e análise quantitativas de uma grande quantidade de compostos, em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins et al., 1997). A partir do emprego destas metodologias foram obtidos resultados descritos a seguir.

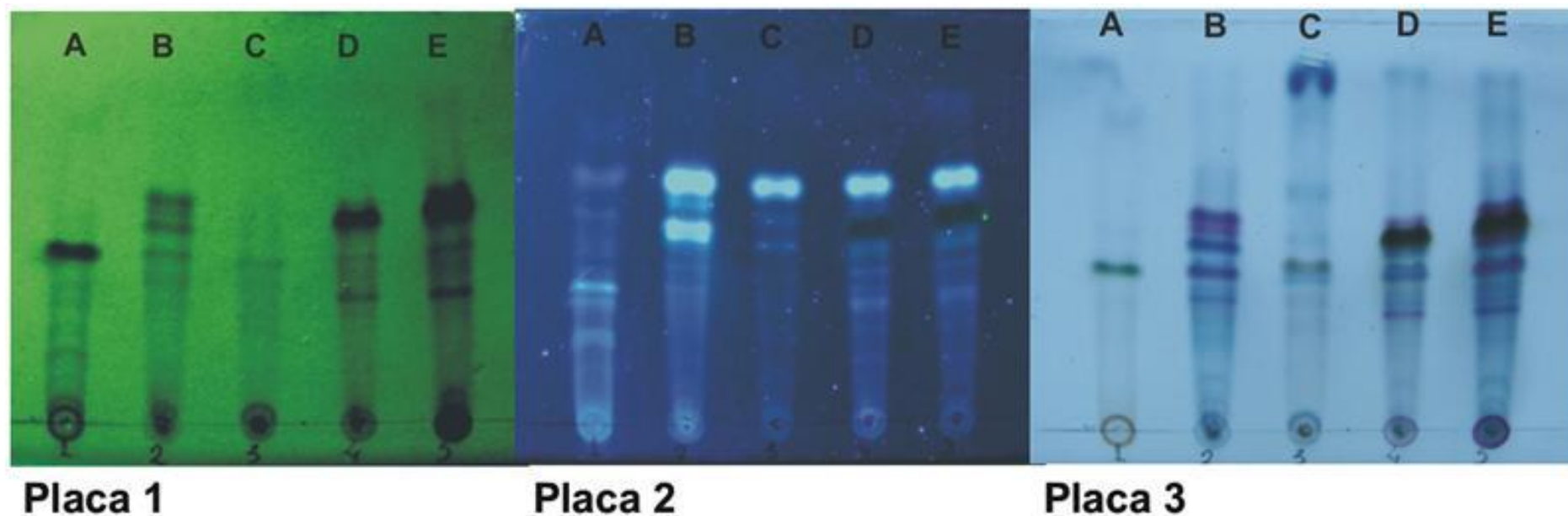


Figura 1 – Perfil cromatográfico em Cromatografia de Camada Delgada dos quatro fungos endofíticos e o meio de cultura sem o crescimento dos fungos. (A) – Meio de cultivo sem o crescimento dos fungos; (B) – UFMGCB 540; (C) UFMGCB 551; (D) UFMGCB 554; (E) UFMGCB 555. Placa 1 – Eluente: DCM/MeOH (95:5), luz UV 254 nm. Placa 2 – Eluente: DCM/MeOH (95:5), luz UV 366 nm. Placa 3 – Eluente: DCM/MeOH (95:5), revelada com vanilina/H₂SO₄.

Como pode ser visto na figura 1, existem diferenças consideráveis entre os extratos dos fungos quando os cromatogramas são observados com luz UV (Figura 1, placa 1 e 2) e após tratamento das cromatoplasas com reagentes especiais para a revelação dos compostos presentes na mistura (Figura 1, placa 3). Quando se compara os cromatogramas dos extratos dos fungos *Bipolaris* (UFMGCB540 e UFMGCB554) as diferenças observadas são significativas.

Por outro lado, os extratos dos fungos *Bipolaris* sp. UFMGCB554 e *Cochliobolus* sp. UFMGCB555, apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, indicando que aparentemente não houve diferenças significativas na produção de metabólitos secundários por estes isolados. Isto pode se dever ao fato do fungo *Bipolaris* ser o anamorfo do *Cochliobolus* (Figura 1, placas 1, 2 e 3) .

O extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB551 apresentou um rico perfil cromatográfico em CCD, especialmente quando revelado vanilina/H₂SO₄, indicando uma grande diversidade de metabólitos abrangendo um amplo espectro de polaridade.

Os perfis cromatográficos em CLAE foram inicialmente obtidos em coluna de fase reversa (Nova-pack RP-18, 3,9 x 150 mm, 1 mL/min, 220 e 254 nm) e usando gradiente ACN-H₂O (10-100% em 50 min e 100% até 10 min). Em seguida, o gradiente foi ajustado para cada extrato de fungo de forma a se obter picos mais bem resolvidos e distribuídos. As condições escolhidas para cada extrato estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições cromatográficas utilizadas para gerar o perfil cromatográfico dos fungos endofíticos em cromatografia líquida de Alta eficiência (CLAE).

Fungos	Condições cromatográficas
<i>Bipolaris</i> sp.(UFMGCB-540)	ACN-H ₂ O (30-90% em 40 min e 100% em 10 min)
<i>Fusarium</i> sp.(UFMGCB-551)	ACN-H ₂ O (20-100% em 45 min e 100% em 10 min)
<i>Bipolaris</i> sp.(UFMGCB-554)	ACN-H ₂ O (30-90% em 40 min e 100% em 10 min)
<i>Cochliobolus</i> sp.(UFMGCB-555)	ACN-H ₂ O (30-90% em 40 min e 100% em 10 min)

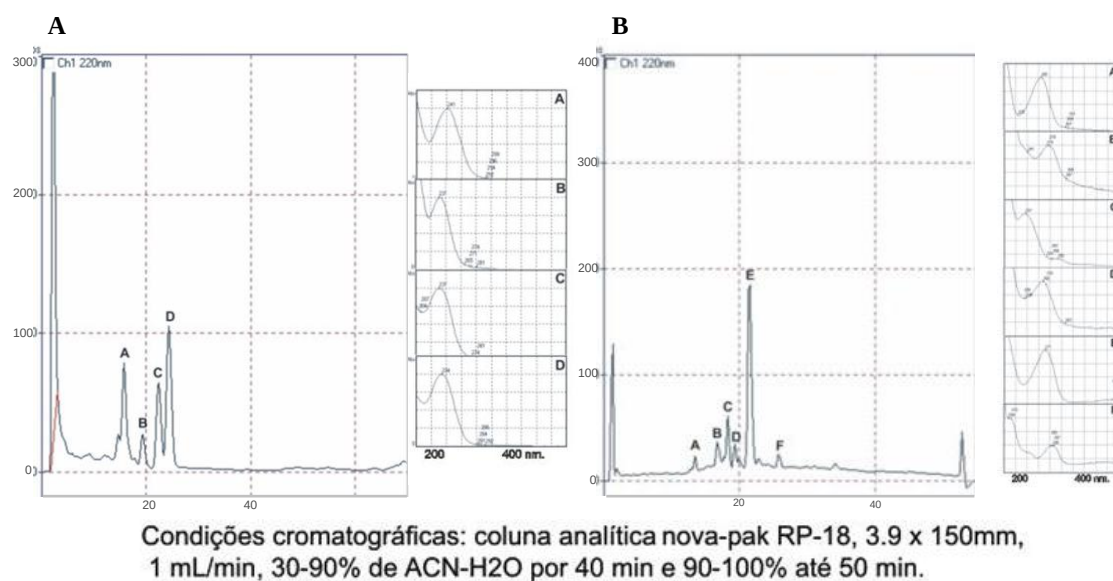
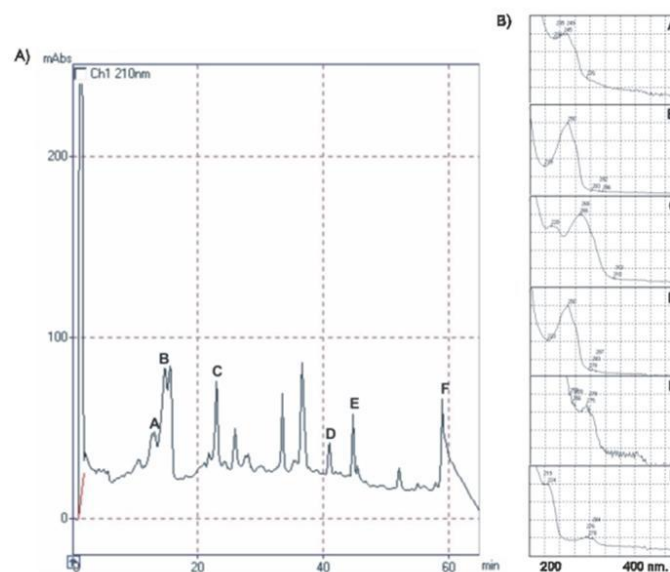
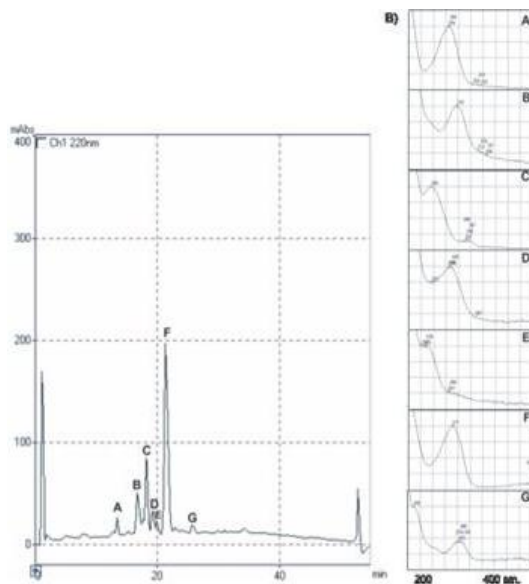


Figura 2 – Cromatograma e UV do extrato do fungo *Bipolaris* sp. A) isolado UFMGCB-540 e B) isolado UFMGCB-554



Condições cromatográficas: coluna analítica nova-pak RP-18, 3.9 x 150mm, 1 mL/min, 20-100% de ACN-H₂O por 45 min e 100% até 55 min.

Figura 3 – Cromatograma (A) e UV (B) do extrato do fungo *Fusarium sp.* UFMGCB551



Condições cromatográficas: coluna analítica nova-pak RP-18, 3.9 x 150mm, 1 mL/min, 30-90% de ACN-H₂O por 40 min e 90-100% até 50 min.

Figura 4 – Cromatograma (A) e UV (B) dos extratos dos fungos *Bipolaris sp.* UFMGCB554 e *Cochliobolus sp.* UFMGCB555

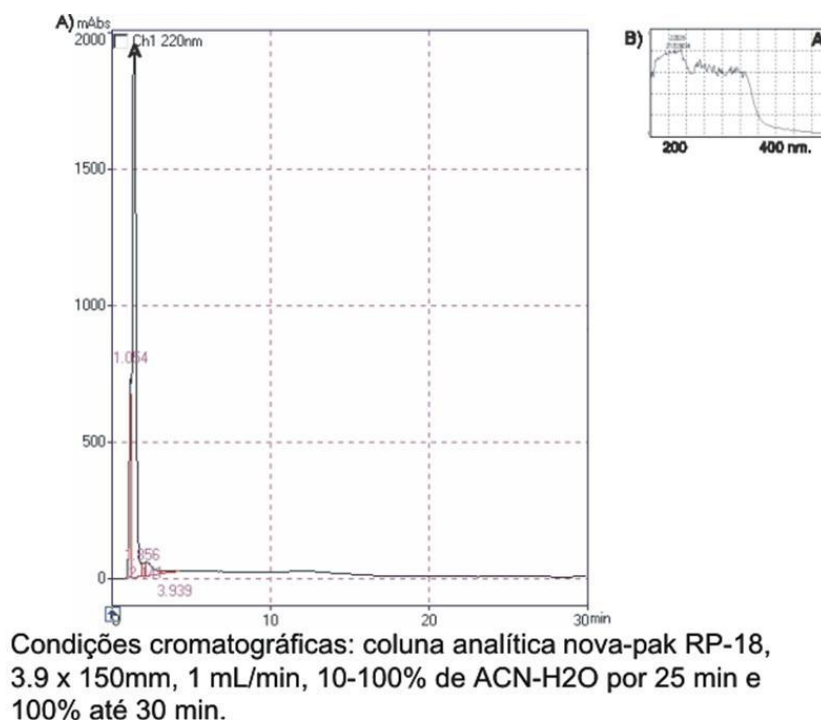


Figura 5 – Cromatograma (A) e UV (B) do meio extrato de malte em que foi cultivado os fungos endofíticos testados no presente trabalho.

Como podem ser observados nas figuras anteriores, na maioria dos casos, os cromatogramas indicaram uma moderada separação dos metabólitos (Figuras 2 a 5). Os metabólitos eluídos foram detectados usando um detector de rede de fotodiodos. Este método de detecção permite a obtenção do espectro de UV (200-400 nm) dos componentes separados pela coluna, cuja análise permite inferir a estrutura dos cromóforos destas substâncias.

O fungo *Fusarium* sp. UFMGCB551 apresentou um perfil com amplo espectro de polaridade, pois os metabólitos foram detectados a partir de 10 min e só acabaram de sair com 60 min (Figura 3). Isso pode indicar uma diversidade de metabólitos que existem no extrato desse fungo. Em todos os cromatogramas verificou-se a presença do meio de cultura com um tempo de retenção de aproximadamente 1,3 min.

Anexo IV – Trabalhos realizados durante o doutorado

Artigo publicado em periódico

Fernanda Fraga Campos, Luiz Henrique Rosa, Betania Barros Cota, Rachel Basques Caligiorne, Ana Lúcia Teles Rabello, Tânia Maria Almeida Alves, Carlos Augusto Rosa, and Carlos Leomar Zani¹ (2008). Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). PLOS Negl Trop Dis 2(12): e348.

Resumos publicados em anais de congressos

Campos FF; Rosa LH; Johann S; Vieira MLA; Cota BB; Rosa CA; Sá NP; Cisalpino PS, and Zani CL. 2008. Biological activity of the endophytic fungi *Fusarium* sp. against *Paracoccidioides brasiliensis*. In: VI Congresso Latinoamericano de Micologia, Mar Del Plata, Argentina.

Vieira MLA; Rosa LH; Gil VBS; Campos FF; Rosa CA. 2008. Antimicrobial activity of endophytic fungi from *Solanum cernuum*. In: VI Congresso Latinoamericano de Micologia, Mar Del Plata, Argentina.

Campos, F.F.; Rosa, L.H.; Johann, S.; Cota, B.B.; Rosa, C.A.; Sá, N.P.; Cisalpino, P.S.; Zani, C.L. 2008. Biological activity of the endophytic fungi UFMGCB 551 against *Paracoccidioides brasiliensis*. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud. V. 28, Suplemento N° 1, pg.208.

Fernanda Campos, Luiz Rosa, Betania Cota, Raquel Caligiorne, Tânia Alves, Ana Rabello, Carlos Rosa e Carlos Zani. 2008. Estudo químico biomonitorado do extrato do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. isolado da planta *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). In: IV Fórum de Microbiologia, Belo Horizonte – MG.

Vieira, M.L.A.; Rosa, L.H.; Campos, F.F.; Vaz, A.B.M; Gil, V.S.B.; Rosa, C.A. 2008. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). In: IV Fórum de Microbiologia, Belo Horizonte – MG.

Campos, F.; Rosa, L.; Cota, B.; Caligiorne, R.; Alves, T.; Rabello, A.; Rosa, C.; Zani, C. 2007. Estudo químico biomonitorado do extrato do fungo endofítico UFMGCB 555 isolado de uma espécie de planta da família Fabaceae. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife – PE.

Vieira, M.; Rosa, L.; Campos, F.; Rosa, C. 2007. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife – PE.

Campos, F.F. ; Rosa, L.H. ; Rosa, C.A. ; Alves, T.A. ; Zani, C.L. 2006. Fracionamento biomonitorado do extrato de um fungo endofítico utilizando cromatografia em contracorrente de alta eficiência (CCCAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). In: XX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, São João del-Rei – MG.

Campos, F.F; Rosa, L.H.; Fagundes, E.M.S.; Oliveira, R.C.; ALVES, T.A.M.; Zani, C.L.; Rosa, C.A. 2005. Produção de metabólitos bioativos por leveduras isoladas de ecossistemas tropicais. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos – SP.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Fernanda Campos, Luiz Rosa, Mariana Vieira, Rachel Caligiorne, Ana Rabello, Tânia Alves, Carlos Rosa e Carlos Zani 2008. Atividade biológica de fungos endofíticos isolados de *Piptadenia adiantoides*. In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, Fortaleza.

Mariana L. A. Vieira; Luiz H. Rosa; Fernanda F. Campos; Viviane S. Brey Gil; Carlos A. Rosa. 2008. Screening for antimicrobial activity of endophytic fungi from *Solanum cernuum* Vell. In: XI Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, Fortaleza.

Rosa, L.H., Vaz, A.B.M., Teixeira, L.C.S., Campos, F.F., Vieira, M.L., Brandão, L.R., Rosa, C.A. 2007. Fungos presentes em ecossistema antártico: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: XV Simpósio Brasileiro sobre Pesquisa Antártica, São Paulo – SP.

Patente de invenção

Campos, F. F.; Rosa, L. H.; Cota, B. B.; Caligiorne, R. B.; Rabello, A. T.; Alves, T. M. A.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. Metabólitos leishmanicidas e inibidores da enzima tripanotona redutase isolados do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. de *Piptadenia adiantoides*. Depósito PI08009473. 2008. In: Instituto de Propriedade Intelectual, Rio de Janeiro – RJ.

Cursos

ISO 22000:2005 Sistema de Gestão de Segurança Alimentar. Comêxito. 2008. Belo Horizonte – MG.

Introdução à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. XX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. 2006. São João Del-Rei – MG.

The biotechnical promise of endophytic microorganisms. Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. 2005. Belo Horizonte – MG.

Palestras ministradas

Potencial biológico de extratos de fungos endofíticos. Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Setembro/2006. Belo Horizonte – MG.