

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/08/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“**Júlio de Mesquita Filho**”
Instituto de Química

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

**Bioprospecção de fungos endofíticos
da alga vermelha *Pyropia spiralis***

Luis Paulo de Sousa Costa
Departamento de Química Orgânica

Araraquara
2016

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha *Pyropia spiralis*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C837b Costa, Luis Paulo de Sousa
Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha
Pyropia spiralis / Luis Paulo de Sousa Costa. – Araraquara :
[s.n.], 2016
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Alga marinha. 3. Metabólitos.
4. Fungos marinhos. 5. Microorganismos. I. Título.

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 05 de agosto de 2016.

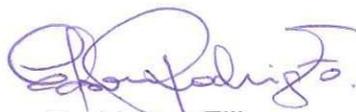
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química - UNESP – Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Luis Paulo de Sousa Costa

Filiação: João Barroso Costa e Raimunda Sotero de Sousa Costa

Nascimento: 25/08/1991 – Teresina-PI-Brasil

Endereço profissional

NuBBE “**Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais**”

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara -
Universidade

Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: luispaulo604@hotmail.com

Formação acadêmica

2009-2014

Graduação: Licenciatura Plena em Química

Instituição: Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina- PI

2014-2016

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto
de Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha *Pyropia spiralis*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siquiera Silva

Bolsa: CAPES

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos

- A) New macrolides from marine red algae *Pyropia spiralis* endophytic fungus. In:
5th Brazilian Conference on Natural Products and the XXXI Meeting on
Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM) (26 a 29 de
outubro de 2015 - Atibaia - SP)

Participação em eventos científicos

- a) 5th Brazilian Conference on Natural Products and the XXXI Meeting on
Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM) (26 a 29 de
outubro de 2015 - Atibaia - SP).

AGRADECIMENTOS

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química-
Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho.

A prof. Dra. Dulce Helena S. Silva pela orientação, dedicação, compreensão, ,
muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

Aos alunos do nosso grupo: Erika, Rebeca, Alana, Leonardo e aos ex- alunos;
Camila, Teresinha, Neirilson e Airton.

A prof. Dra. Angela Regina e ao prof. Dr. Alberto Cavalheiro que participaram do
exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos professores membros da banca prof. Dra. Angela Regina e prof. Edson
Rodrigues, que gentilmente aceitaram o convite para
avaliação desta dissertação.

Aos professores do departamento de Química Orgânica em especial ao NuBBE por
seus ensinamentos

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

Ao querido Nivaldo Boralle pela realização dos espectros de RMN, por estar sempre
disposto a compartilhar os seus conhecimentos.

Ao técnico Marquinhos, por ser tão prestativo. Aos técnicos João e Juliana que
sempre nos ajuda.

A prof. Dr. Maria Cláudia M. Young, Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso e ao prof. Dr.
Paulo Michel P. Ferreira pela realização dos ensaios biológicos.

À CAPES pela bolsa concedida e ao Instituto de Química pelo apoio e estrutura.

DEDICATORIA

A **DEUS** por me conceder essa grande vitória,
por sua presença e benção em minha vida.

A minha **Mãezinha** Raimunda Sotero, que hoje está no céu
Pois sei que seus ensinamentos, amor incondicional e carinho irão se perpetuar
por toda minha vida e por ser meu maior exemplo e espelho
na minha vida.

A **Meu Pai** João Barroso, que tanto luta e batalha para dar o seu melhor
por ser um homem integro.

A **Minha Irmã** Ana Beatriz, por todo seu amor,
carinho, atenção e apoio.

Aos **Meus Irmãos**, João Henrique e Well Fernandes por todo
incentivo, apoio e amor

A toda **Minha Família** por acreditarem e me ajudaram a realizar
esse tão querido sonho.

As **Minhas Avós** Maria Sotero e Teresinha Barroso, por sempre me ajudarem,
por suas doces palavras e abraços.

Aos **Meus Amigos** de Teresina, por toda amizade e confiança

Aos **Meus Amigos** do Piauí (nossa colônia) que estiveram junto
durante esse tempo longe de nossa querida terra, amigos que certos momentos eram
também minha família
pelo total apoio em todos os momentos.

Aos **Amigos** que aqui em Araraquara conquistei, do laboratório e UNESP pelos
momentos que compartilhamos das reuniões com muita animação e alegria.

em especial aos que convivi na **Rep. Lira** Vitor, João e Thulio.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização
deste trabalho. **MUITO OBRIGADO !!!**

RESUMO

Este trabalho consistiu no estudo dos micro-organismos *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp. (Ps-03) associados à macroalga vermelha *Pyropia spiralis*, coletada no litoral paulista. Os extratos foram obtidos em diferentes meios de cultivos: arroz, malte e Czapek, e induziram produção metabólica diversificada, conforme apontado pelas análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H , evidenciando que o perfil metabólico é dependente do meio de cultivo para estas linhagens. Os extratos e frações de *Sarocladium strictum* e *Coniothyrium* sp. foram avaliados em ensaios para atividade antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica e apresentaram uma ou mais potenciais atividades. A fração Ps-03 A-ACN de *Coniothyrium* sp. apresentou atividade antifúngica e citotóxica, e foi selecionada para fracionamento por cromatografia em coluna sob pressão em modo reverso (C18) com eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$. A purificação das frações por CLAE-DAD ou cromatografia flash em modo normal levou ao isolamento de uma dicetopiperazina, policetídeos e esteroides, que tiveram suas estruturas determinadas por análises na região do UV, RMN 1D e 2D, e por espectrometria de massas. Os policetídeos isolados neste estudo incluem três macrolídeos aromáticos (**1** – **3**): a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona e dois análogos à sonnerlactona, sendo um inédito na literatura e outro, inédito como produto natural; o butenolídeo aromático gymnoascolídeo A (**4**), e a tetralona antiviral 10-norparvulenona (**7**). Foram também obtidos os esteroides ergosterol-5,8-endoperóxido- $\Delta^{6,22}$ (**5**) e 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**), estruturalmente relacionados, provavelmente por rearranjo que inclui a abertura do anel endoperóxido e deslocamento da ligação dupla. A substância **8** uma dicetopiperazina: formada por unidades do aminoácido fenilalanina, e outra, do aminoácido treonina. Estes resultados confirmam a expressiva quimiodiversidade de fungos endofíticos de origem marinha, e seu potencial de bioatividade relevante, abrindo perspectivas atrativas para estudos de bioprospecção neste nicho ecológico

Palavras-chave: fungo endofítico. Alga marinha. Metabólitos. Fungos marinhos. Micro-organismo

ABSTRACT

This work dealt with the study of fungal strains *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp. (Ps-03) associated to the red macroalga *Pyropia spiralis*, collected at SP State shore. Their extracts were obtained in different culture media: rice, malt and Czapek, which induced diversified metabolic production, as shown by HPLC-DAD and NMR analyses and evidenced that the metabolic profile depends on culture media for these strains. Extracts and fractions from *Sarocladium strictum* and *Coniothyrium* sp. were evaluated in antifungal, anticholinesterasic and cytotoxic assays and presented one or more potential bioactivities. Fraction Ps-03 A-ACN from *Coniothyrium* sp. showed antifungal and cytotoxic activities, and was selected for reversed phase column chromatography under positive pressure and gradient elution with H₂O:MeOH. Fractions purification by HPLC-DAD or normal phase column chromatography led to the isolation of one diketopiperazine, polyketides and steroids, which had their structural elucidation by UV, 1D and 2D NMR, and MS analyses. The polyketides isolated in this study include three aromatic macrolides (**1** – **3**): (3*R*,5*R*)-sonnerlactone and two sonnerlactone analogues: one novel compound and one novel as a natural product; the aromatic butenolide gymnoascolide A (**4**), and the antiviral tetralone 10-norparvulenone (**7**). Two steroids: ergosterol-5,8-endoperoxido- $\Delta^{6,22}$ (**5**) and 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**) were also isolated. They are structurally related, probably due to rearrangement, which includes opening of the endoperoxide ring and double bond shift. Compound **8** is a diketopiperazine, that results from one unit phenylalanine and one of threonine. Such results confirm the strong chemodiversity of marine-derived endophytic fungi and their relevant bioactivity potential, which represents an open and attractive path towards deeper bioprospection studies on such ecological niche.

Keywords endophytic fungi, marine alga, metabolites, marine fungi, microorganisms

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 0.1- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em diferentes meios líquidos.....	33
Fluxograma 0.2- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em meio sólido.....	34

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Catálise da acetilticolina e reação de Ellman	42
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma da F-5 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm	37
Figura 2. Cromatograma da análise de F-3 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:ACN 28-65% em 40 min e detecção em 254 nm.....	38
Figura 3. Cromatograma da F-2 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm.	39
Figura 4. Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença de inibidor padrão a 200 µmol L ⁻¹	43
Figura 5. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) Ps-02 Malte; (b) Ps-02 A-ACN; (c) Ps-02 Czapek; (d) Ps-02 A-Aq.	46
Figura 6. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) P3-02 Malte; (b) Ps-03 Czapek; (c) Ps-03 A-CN; (d) Ps-03 -Aq.....	46
Figura 7. Espectros de RMN de ¹ H de Ps-02 A-Hex (CDCl ₃ , 300 MHz) e Ps-02- A-Aq e Acn, Ps-02 Malte e Czp (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	48
Figura 8. Espectros de RMN de ¹ H de Ps-03 A-Hex (CDCl ₃ , 300 MHz) e Ps-03- A-Aq e Acn, Ps-03 Malte e Czp (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	49
Figura 9. Espectro no Ultravioleta da Substância 1	52
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H da Substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz)	53
Figura 11. Espectro de RMN ¹³ C da Substância 1 (CD ₃ OD, 150 MHz).	54
Figura 12. Espectro de RMN DEPT-135° da Substância 1 (CD ₃ OD, 150 MHz).	55
Figura 13. Mapa de correlações de COSY ¹ H- ¹ H da Substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz).	56
Figura 14. Mapa de correlações de HMBC 1H-13C da Substância 1 (600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C, CD ₃ ODa)	58
Figura 15. Estrutura da Substância 1	59
Figura 16. Espectro no Ultravioleta da Substância 2.....	61
Figura 17. Espectros de RMN de ¹ H das substâncias 1 e 2 (CD ₃ OD, 600 MHz).	62
Figura 18. Espectro DEPT-135° da substância 2 (CD ₃ OD, 150 MHz).....	63
Figura 19. Estrutura da Substância 2.	65

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da Substância 3 (CD_3OD , 600 MHz).	67
Figura 21. Espectro de RMN de DEPT-135 $^\circ$ da substância 3 (CD_3OD , 150 MHz). ..	68
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CD_3OD , 150 MHz).....	69
Figura 23. Principais correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 3.....	70
Figura 24. Estrutura da Substância 3	71
Figura 25. Espectro no Ultravioleta da Substância 04.....	72
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da Substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).	73
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 4 (CD_3OD , 150 MHz).....	74
Figura 28. Principais correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 4.....	75
Figura 29. Estrutura da Substância 4.....	76
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da Substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).	80
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 5 (CD_3OD , 150 MHz).....	81
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da Substância 6 (CDCl_3 , 600 MHz).....	84
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 6 (CDCl_3 , 150 MHz).....	85
Figura 34. Espectro na região do UV da substância 07.....	87
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da Substância 7 (CD_3OD , 600 MHz).	90
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da Substância 8 (CD_3OD , 600 MHz).	93
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 8 (CD_3OD , 150 MHz).....	94
Figura 38. Mapa de correlações de HSQC ^1H - ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a)	96
Figura 39. Mapa de correlações de COSY ^1H - ^1H da Substância 8 (600 MHz, CD_3OD^a)	97
Figura 40. Mapa de correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	98
Figura 41. Substâncias isoladas de <i>Coniothyrium</i> sp	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos aprovados pela FDA para tratamento clínico	18
Tabela 2. Massa (mg) dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para as linhagens de fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida.....	34
Tabela 3. Sistemas de eluentes otimizados para os ensaios biológicos em CCD dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para os fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida.....	35
Tabela 4. Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações dos fungos endofíticos e seus Rf.	50
Tabela 5. Atividade citotóxica dos extratos brutos e frações	51
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 1 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	60
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 2 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	64
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de substância 3 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	71
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 4 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	77
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 5 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa).....	79
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 6 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , (CD_3OD^a)	86
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 7 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	89
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Organismos marinhos.....	16
1.2 Fungos marinhos e sua quimiodiversidade	19
1.3 Gênero <i>Coniothyrium</i>	23
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Macroalga e micro-organismos associados	29
3.1.2 Solventes e equipamentos gerais	29
3.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	29
3.1.4 Cromatografia em coluna	30
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	30
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	30
3.1.7 Espectrometria de Massas	31
3.1.8 Cultivo dos fungos endofíticos:.....	31
3.2 Métodos	31
3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas	31
3.2.2 Obtenção dos extratos.....	32
3.2.3 Fracionamento da Fração Acetonitrila de Ps-03 A-ACN (escala reduzida).....	35
3.2.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações.	39
3.2.5 Identificação das cepas fúngicas.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos e frações obtidos em diferentes meios de cultivos (escala reduzida) dos fungos Ps-02 e Ps-03.....	45
4.2 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos e frações (escala reduzida) em CLAE-DAD	45
4.3 Perfil químico dos extratos brutos e frações (peq. escala) em RMN de ¹ H.	47
4.4 Avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica.....	50
4.5 Atividade citotóxica	51
4.6 Identificação e Elucidação estrutural das substâncias produzidas pelo endófito (Ps-03) <i>Coniothyrium</i> sp.	51
4.6.1 Determinação estrutural da substância 1	51
4.6.2 Determinação estrutural da substância 2	60
4.6.3 Determinação estrutural da substância 3	65

4.6.4	Determinação estrutural da substância 4	72
4.6.5	Determinação estrutural da substância 5	77
4.6.6	Determinação estrutural da substância 6	82
4.6.7	Determinação estrutural da substância 7	87
4.6.8	Determinação estrutural da substância 8	91
5.	CONCLUSÕES	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Organismos marinhos

Os oceanos ocupam cerca de 3/4 da superfície da Terra, são habitados por espécies de animais, plantas, esponjas, octocorais, ascídeas e briozoários, além de enorme quantidade de micro-organismos. As pesquisas com produtos naturais marinhos tiveram impulso acentuado na década de 50 com advento de grande investimento da indústria farmacêutica, além da popularização e desenvolvimento de técnicas de mergulho em maiores profundidades. Entretanto, estudos com micro e organismos marinhos vêm se desenvolvendo de maneira crescente a partir da década de 90, já que podem viver em condições adversas em ecossistemas extremos como em regiões polares e profundezas dos oceanos suportando altas pressões, em que a evolução e sobrevivência dessas espécies estimulam a compreensão do rico habitat marinho (PINTO et al., 2002; SCOPEL, 2012).

Com o isolamento dos nucleosídeos antivirais espongouridina (I) e espongotimida (II) da esponja *Cryptotethya crypta* foi possível, somente após 15 anos, obter seus derivados sintéticos: citarabina (III) (Ara-C), utilizado no tratamento câncer e vidarabina (IV) (Ara-A), um antiviral. Outros exemplos de substâncias que foram aprovadas para uso clínico pela FDA (Food and Drug Administration) incluem o ziconotídeo, derivado do peptídeo ω -conotoxina (V), que foi isolado do molusco *Conus magnus* e é constituído por 25 aminoácidos, para uso no tratamento de dores crônicas, e que confirma ser viável e muito atrativo o uso de substâncias oriundas de organismos marinhos no desenvolvimento de novos fármacos. Foram relatados 2600 novos compostos oriundos de fontes marinhas entre os anos de 1963 e 2014 (BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016), sendo que só no ano de 2014 foram descritos 1378 compostos (BLUNT et al., 2016), o que mostra o intenso crescimento no interesse em compostos de origem marinha, em especial nos últimos 5 anos

Este cenário é decorrente de importantes descobertas relacionadas com o estabelecimento do potencial de bioatividade de produtos naturais de fontes marinhas que resultaram no desenvolvimento de agentes terapêuticos, além dos já citados, como o mesilato de eribulina, obtido a partir do macrolídeo citostático halicondrina B, isolado a partir da esponja marinha *Halimnobia okadae*. O mesilato de eribulina, Halaven® foi aprovado pelo FDA em 2010 para tratamento de

pacientes com câncer de mama metastático (DYBDAL-HARGREAVES et al., 2015; COSTA-LOTUFO et al., 2009)

Outro agente terapêutico, a trabectedina, é um alcaloide tetraidroisoquinolínico, isolado do tunicato marinho *Ecteinascidia turbinata*, encontrado nos mares das Caraíbas. Atualmente encontra-se aprovado pela Comissão Européia para tratamento de sarcomas de tecidos moles. A trabectedina é obtida por síntese química a partir da cianosafracina B, oriunda da cultura da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (COSTA-LOTUFO et al., 2009; BEESOO et al., 2014).

Merece destaque também, o Brentuximab vendotin, um derivado sintético da dolastatina 10, um peptídeo citostático natural, que contém em sua estrutura várias unidades de aminoácidos, e foi isolado a partir do molusco marinho *Dolabella auricularia*. A dolastatina 10 foi relatada pela primeira vez em 1987 por Pettit et al., (1987) e estudos posteriores evidenciaram que a dolastatina é produzida pela cianobactéria *Symploca* sp., que são consumidas pelo molusco como alimento (PETTIT et al., 2001).

Além destes, estudos recentes demonstram a importância de ácidos ômega-3 na dieta, como forma de proteção ao sistema nervoso central, bem como por suas propriedades, que auxiliam no combate de patologias como o câncer, asma, diabetes, hipertensão arterial, distúrbios neurológicos e doenças cardiovasculares. Estas descobertas contribuíram para a aprovação do éster etílico de ácidos ômega-3 como agente terapêutico para tratamento de hipertrigliceridemia (VAZ et al., 2014)

Atualmente existem 07 compostos de origem marinha aprovados pela FDA (**Tabela 01**) com atividade antitumoral, anti-inflamatória, antiviral ou anti-hipertrigliceridemia, utilizados no tratamento clínico.

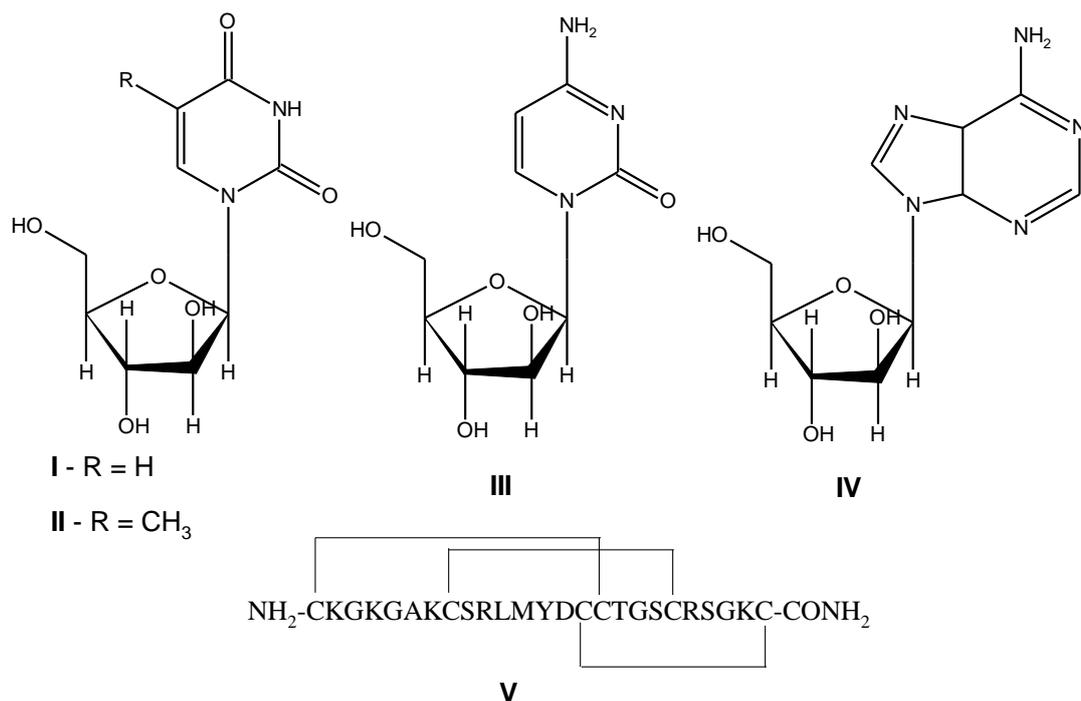


Tabela 1. Compostos aprovados pela FDA para tratamento clínico

Ano de aprovação	Composto	Organismo marinho	Uso
1969	Citarabina (Ara-c)	Esponja	Câncer: Leucemia
1976	Vidarabina (Ara-A)	Esponja	Antiviral
2004	Ziconotídeo	Caracol (molusco)	Dor crônica
2010	Mesilato de Eribulina	Esponja	Câncer de mama
2004	Omega-3-ácido-etil ésteres	Peixe	Hipertrigliceridemia
2015	Trabectedina (ET-743)	Tunicato	Câncer de ovário e sarcoma
2011	Brentuximab vedotina (SGN-35)	Molusco	Câncer linfomas

Fonte: <<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>>

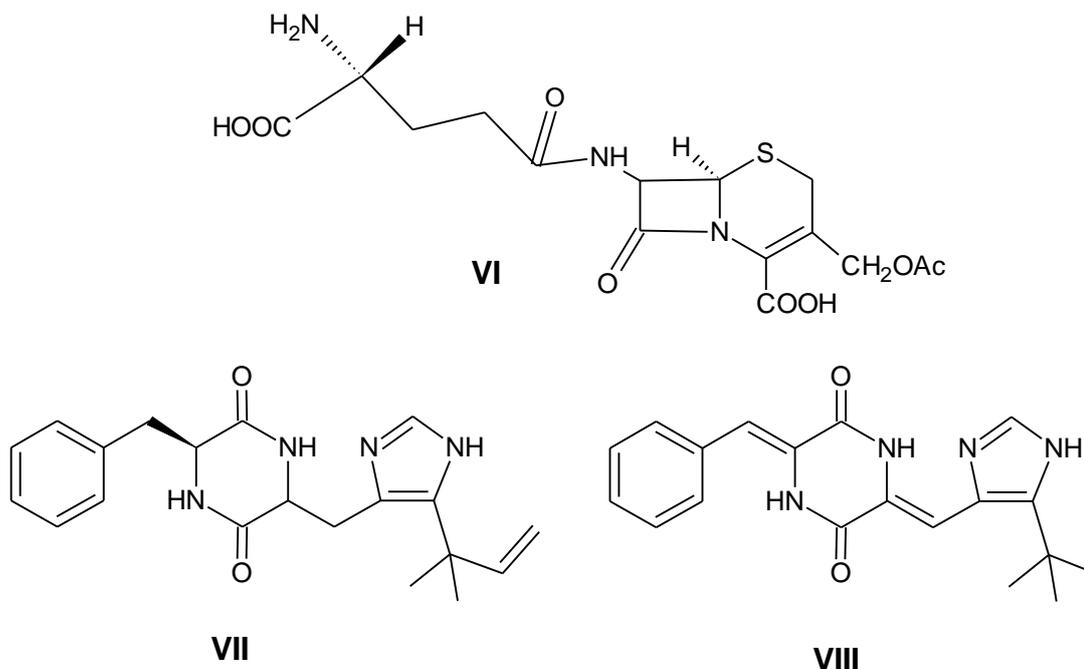
1.2 Fungos marinhos e sua quimiodiversidade

Fungos marinhos podem ser classificados em dois grupos: obrigatórios e facultativos. Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuário, enquanto os facultativos podem viver em água doce ou ambiente terrestre e são capazes de crescer e esporular no ambiente marinho (KOHLMEYER & KOHLMEYER, 1979). Até 2010 foram listadas 530 espécies de fungos obtidos do ambiente marinho distribuídos em 03 filos e 321 gêneros, grande parte pertencente ao filo Ascomycota, com 424 espécies (pertencentes a 251 gêneros), 94 espécies anamórficas (pertencentes a 61 gêneros) e apenas 12 espécies inseridas em Basidiomycota (distribuídas em 09 gêneros) (EBEL e RATEB, 2011). Estes podem estar presentes de forma independente ou associados a diversos nichos como plantas marinhas, incluindo algas, ervas marinhas e plantas de mangue, bem como em invertebrados marinhos, principalmente em esponjas, corais, acídias e crustáceos, e ainda, em vertebrados (peixes) ou, matéria inorgânica (solos e sedimentos) (WIESE et al., 2011).

Os micro-organismos marinhos são capazes de produzir uma grande diversidade metabólica em função das condições de crescimento incluindo diversos parâmetros como fonte de nutrientes, temperatura e tempo de cultivo, tipo de água (mar e ultrapura), dentre outros, produzindo grande variedade de produtos naturais como policetídeos, terpenoides, alcaloides, peptídeos, além de metabólitos de biossíntese mista. Muitos destes têm mostrado também enorme diversidade de substâncias bioativas, sendo muitas pertencentes a classes químicas novas e sendo ainda não encontradas em fontes terrestres. A importância destes micro-organismos, produtores de substâncias bioativas, é evidenciada pelo grande número de novos compostos isolados. De acordo com Blunt e colaboradores (2016), 540 novos compostos de micro-organismos de origem marinha foram relatados entre 2013 e 2014, sendo que a fonte predominante de diversidade de fungos são as algas, seguidas por esponjas e espécies do habitat de mangues (EBEL e RATEB, 2011).

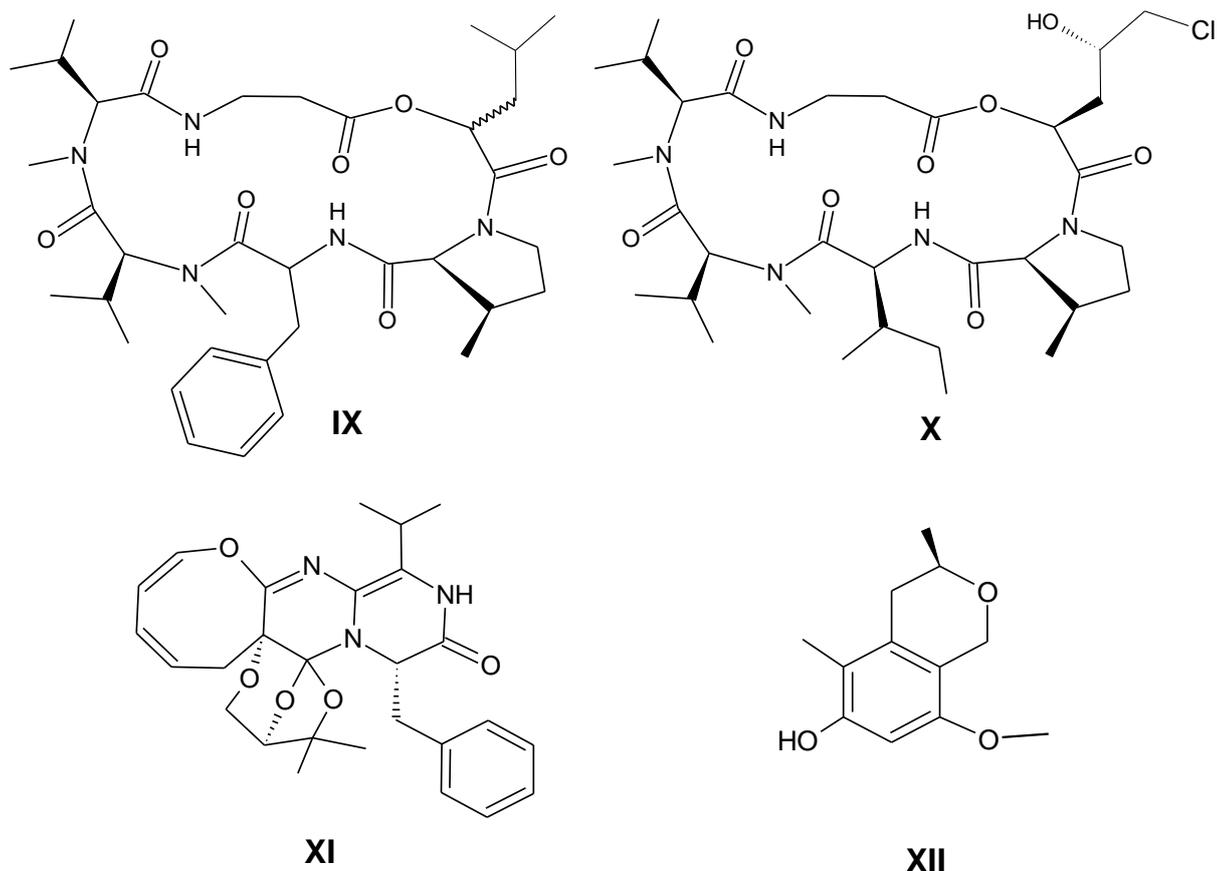
Desde o primeiro metabólito bioativo isolado do fungo *Cephalosporium* sp. obtido de água do mar, o antibiótico cefalosporina C (VI), em 1951 (BURTON e ABRAHAM, 1951), os fungos marinhos têm se revelado uma fonte atrativa para a descoberta de novas substâncias e agente antivirais, antibacterianos, antiplasmódicos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (DUARTE et al., 2012).

Sendo as algas detentoras da maior diversidade de micro-organismos, muitos estudos têm focalizado em algas de diferentes filós (Rhodophyta, Chlorophyta, Phaeophyta) na busca por linhagens fúngicas associadas para investigação químico-biológica. O estudo do fungo *Aspergillus sp.*, isolado da alga verde *Halimeda copiosa*, levou ao isolamento da dicetopiperazina halimida (**VII**), que apresentou potente atividade citotóxica contra células de carcinoma de ovário e cólon. Para a obtenção de análogos visando à otimização da bioatividade, foram planejadas modificações estruturais que forneceram a plinabulina (**VIII**), atualmente em fase III de testes clínicos para o desenvolvimento de agente terapêutico antitumoral (Clinical Trials, 2015).



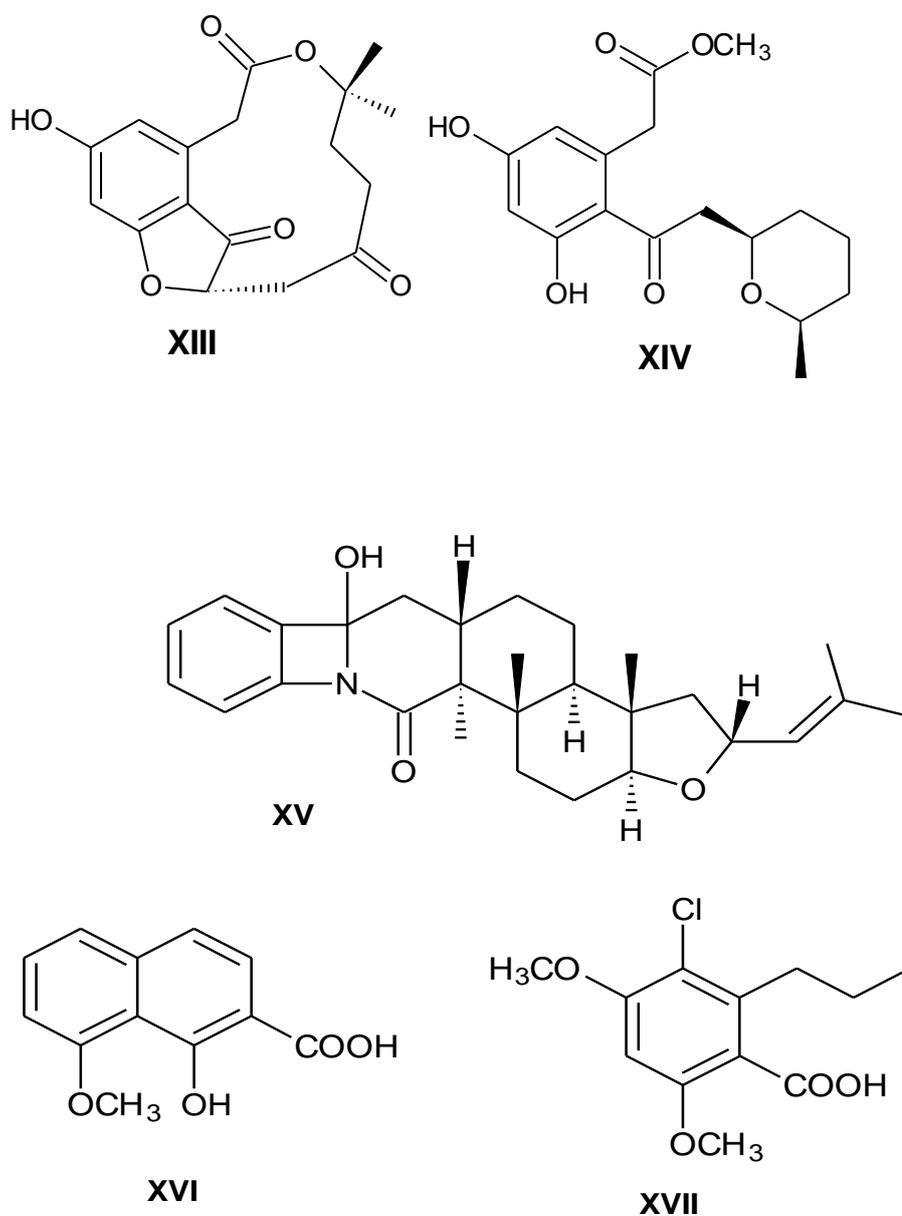
Outros exemplos da diversidade estrutural dos metabólitos produzidos por fungos são apresentados no estudo realizado por Vita-Marques e colaboradores (2008), que investigaram o fungo *Beauveria felina* associado à alga *Caulerpa sp.* Este estudo levou ao isolamento de dois novos derivados do ciclodepsipeptídeo destruxina, que apresentou potencial inseticida e também foram isoladas do fungo de solo *Metarhizium anisopliae*. Estes derivados, a pseudodestruixina C (**IX**) e destruxina E β-Me-Pro chlorohydrin (**X**) apresentaram potencial acaricida (MORAIS-URANO et al., 2012).

Zhang e colaboradores (2014) isolaram do fungo *Paecilomyces variotii* da alga vermelha *Grateloupia turuturu* um novo alcaloide, varioxepine A (**XI**), com atividade contra fungo patogênico *Fusarium graminearum*. Da cultura do fungo *Penicillium steckii* isolado da alga do gênero *Sargassum* identificou-se o (S)-8-metoxi-3,5-dimetilisochroman-6-ol (**XII**) com atividade antimicrobiana (KOSSUGA et al., 2011).

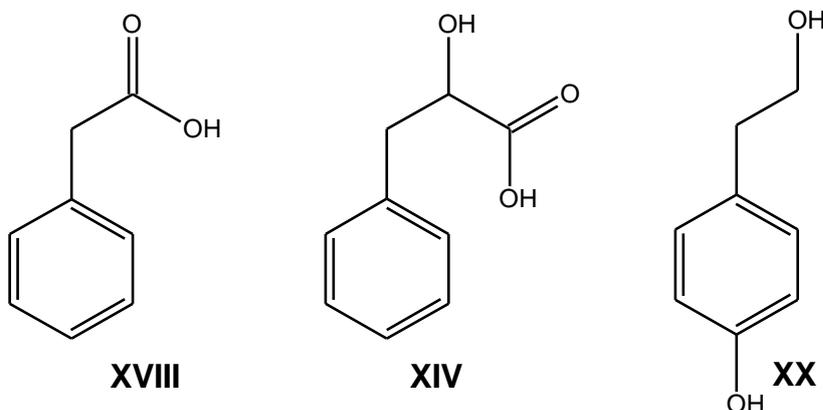


Os endófitos isolados de algas vermelhas (Rodofíceas) apresentam em geral substâncias com estruturas químicas interessantes e potencial biológico. Dentre estas, destacam-se os macrolídeos **XIII** e **XIV**, do tipo curvularina, isolados de *Curvularia* sp., que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana, bem como um novo derivado indoloditerpênico (**XV**) isolado do fungo *Aspergillus oryzae*, que foi obtido da alga vermelha *Heterosiphonia japonica*. Outros exemplos incluem policetídeos como o 2-carboxi-8-metoxi-naftalenol (**XVI**), que apresentou atividade

citotóxica e contra o fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* e foi obtido da cultura do fungo associado à alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, e ainda, o acremonisol A (**XVII**), um policetídeo aromático isolado do fungo *Acremonium* sp. associado à alga *Plocamium* sp. (DAI et al, 2010; QUIAO et al, 2010; PONTIUS et al, 2008; TARMAN et al, 2011), que evidenciam a quimiodiversidade marcante apresentada por fungos associados a algas vermelhas.



A partir da cultura do fungo *Cladosporium* sp., associado a alga *Pyropia yezoensis*, Ding et al. (2008) isolaram o ácido fenil-acético (**XVIII**), L-β-fenil-lático (**XIX**) e o tirosol (**XX**), que apresentaram forte atividade antimicrobiana.



O desenvolvimento de estudos com fungos endofíticos apresentam diversas vantagens em relação outros organismos, por exemplo, por apresentarem crescimento mais rápido, demandarem menor espaço para cultivo, além de representarem uma fonte renovável de material para as pesquisas e aplicações. Além disso, modificações no tipo de meio de cultivo (fonte de carbono) e/ou condições como temperatura, pH, aeração, dentre outras, podem controlar ou direcionar os processos de produção metabólica de interesse (GLOER, 2007). Estas considerações permitem prever uma ampla gama de investigações visando aplicações biotecnológicas para produtos oriundos ou derivados de fungos endofíticos, com destaque para aqueles associados a organismos marinhos.

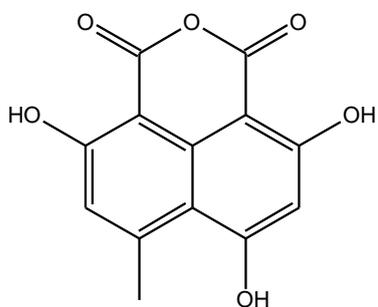
1.3 Gênero *Coniothyrium*

O gênero *Coniothyrium* pertence ao filo *Ascomycota* e família *Leptosphaeriaceae*, possuindo algumas espécies relatadas em ambiente marinho, segundo a base de dados acessada em www.marinespecies.org. Algumas espécies são relatadas como fitopatogênicas, como *Coniothyrium diplodiella*, associado à podridão branca de uvas (ZHANG et al., 2013).

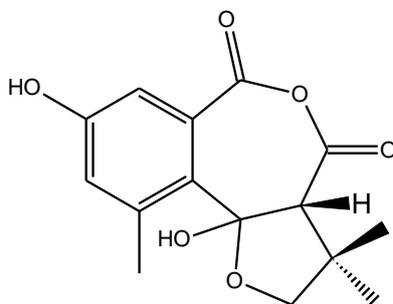
O estudo com o fungo *Coniothyrium cereale*, isolado da alga *Enteromorpha* sp. levou ao isolamento de uma série de derivados de fenalenonas (**XXI**) (ELSEBAI et al., 2011), policetídeos (**XXII**) e alcaloides (**XXIII**) com atividades antimicrobiana, citotóxica (ELSEBAI et al., 2011a, 2011b).

Diversos estudos relatam o isolamento de substâncias bioativas a partir de espécies de *Coniothyrium* obtidas de plantas terrestres. Krohn e colaboradores (2008) estudaram o fungo *Coniothyrium* sp., isolado da *Sideritis chamaedryfoliai*, isolando nitronaftalenos (**XXIV** e **XXV**) com atividade antibacteriana e antifúngica, e inibição do crescimento de algas. De *Carpobrotys edulis*, espécie ornamental conhecida como 'chorao-da-praia', foi isolado o fungo *Coniothyrium* sp., cujos extratos revelaram a presença de massarilactona (**XXVI**), massarigenina E (**XXVII**) e coniothyrenol (**XXVIII**), espirolactonas com potencial antimicrobiano e herbicida (KOCK et al., 2007).

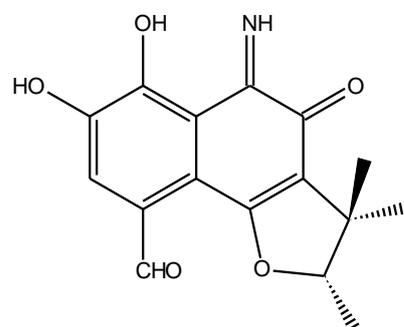
Uma nova classe de antibióticos, as palmarumycinas C₂, C₃ e C₅, apresentou atividades antibacteriana, antifúngica e herbicida, e foi isolada de cultura de *Coniothyrium* sp., obtido de alga marinha. A determinação estrutural da palmarumycinas **XXIX**, **XXX** e **XXXI** foram realizados por análise de raios-X (KROHN et al, 1994). Estudos com linhagens de *Coniothyrium* sp. isoladas de solo revelaram a presença da coniothyriomycina (**XXXII**), uma imida de cadeia aberta, de estrutura relativamente simples, com forte potencial antifúngico. Posteriormente Krohn et al., (1992) realizaram estudos de estrutura e atividade de seus análogos sintéticos.



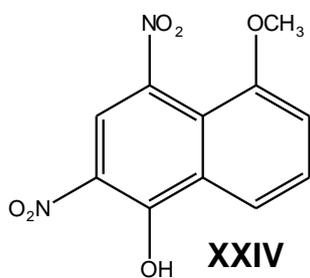
XXI



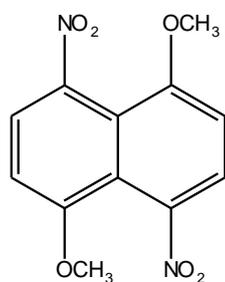
XXII



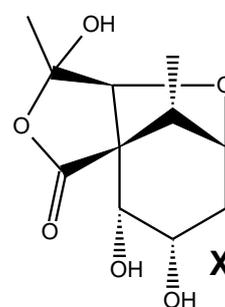
XXIII



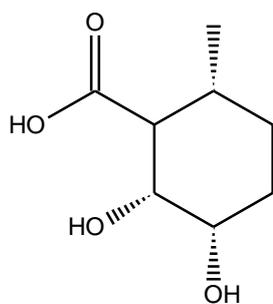
XXIV



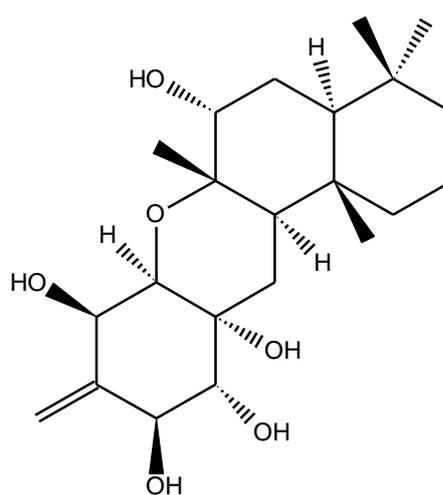
XXV



XXVI



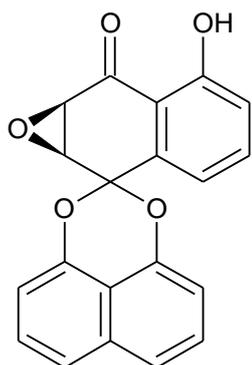
XXVII



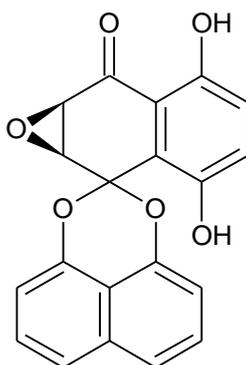
XXVIII

A espécie *Coniothyrium minitans* é considerada um micoparasita (antagonista) que realiza o controle biológico de fitopatógenos como as espécies *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia cepivorum*, responsáveis por causar o mofo branco em plantas. A cultura de *Coniothyrium minitans* em meio líquido de Czapek forneceu como metabólito majoritário o macrosphelídeo A (**XXXIII**) (McQUILKEN et al, 2003).

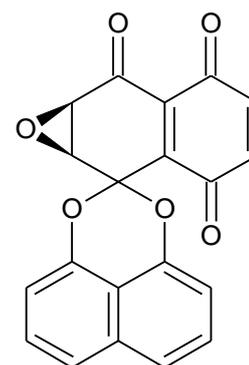
A investigação de linhagem de *Coniothyrium* sp., realizada por HUSSAIN et al., (2014), levou ao isolamento de um novo éter fenoxi-fenílico (**XXXIV**) e outros compostos já conhecidos, como o coniol (**XXXV**) e (+)-epoxydon (**XXXVI**) que apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus megaterium* e inibidora do crescimento da alga *Chlorella fusca*.



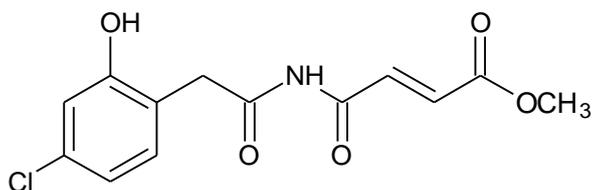
XXIX



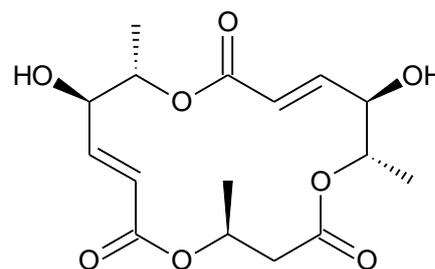
XXX



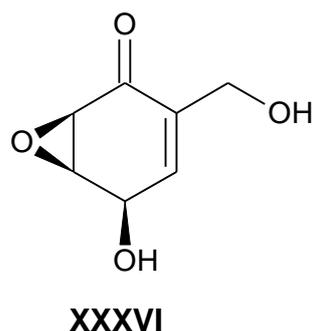
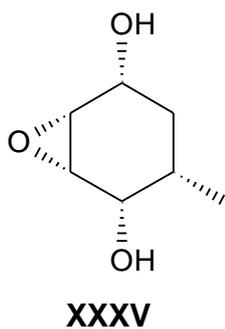
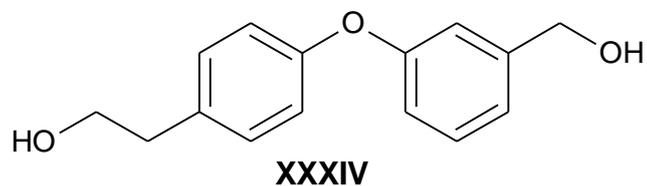
XXXI



XXXII



XXXIII



Para este estudo foram selecionados fungos endofíticos isolados da alga marinha vermelha *Pyropia spiralis*, visando contribuir para o conhecimento da quimiodiversidade de fungos de origem marinha e explorar as potencialidades biológicas e biotecnológicas de organismos oriundos da costa brasileira como fonte de metabólitos biologicamente ativos. O ambiente marinho é ainda subexplorado no Brasil e os esforços direcionados a um maior conhecimento de suas características podem também contribuir para ações que visem à proteção dos frágeis ecossistemas num contexto que privilegie o desenvolvimento sustentável.

5. CONCLUSÕES

Os trabalhos realizados com os micro-organismos *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp (Ps-03) permitiram uma avaliação da potencialidade dos extratos brutos e frações, para a produção de metabólitos secundários. Os dois meios de cultivo líquidos comerciais (Extrato de Malte e Czapek®) e o meio sólido (Arroz) induziram uma produção metabólica diversificada para ambas as linhagens, conforme apontado pelas análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H , evidenciando que o perfil metabólico é dependente do meio de cultivo para estas linhagens. Foi demonstrado também, que os cultivos em meio líquido produziram massa muito pequena de extrato, com exceção de Ps-03 (*Coniothyrium* sp.), quando cultivado em meio Czapek.

A potencialidade biológica dos extratos e frações obtidos em escala reduzida frente aos ensaios anticolinesterásico, antifúngico e citotóxico mostraram resultados relevantes, sendo que os extratos ou frações, tanto de *Sarocladium strictum* como de *Coniothyrium* sp., apresentaram uma ou mais potencial atividade, confirmando a importância de fungos endofíticos como fontes promissoras de protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

Algumas frações foram selecionadas para avaliação de potencial antimicrobiano. Dentre elas, a fração Ps-03 Acn e subfrações F-3, F-5 e F-7 não apresentaram atividade significativa frente aos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (UBC 8161); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA (ATCC33591); *Bacillus subtilis* (H344) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

Esse estudo destacou ainda a eficiência da abordagem que incluiu o estabelecimento do perfil químico das linhagens de fungos endofíticos em estudo por CLAE-DAD e por RMN de ^1H , bem como a avaliação preliminar do potencial de bioatividade do extrato bruto de cada linhagem. A análise conjunta destes dados foi essencial para a seleção das amostras mais promissoras para prosseguimento do estudo, permitindo alcançar resultados relevantes sobre a química e bioatividade linhagens de fungos em estudo.

Merece ainda destaque a marcante quimiodiversidade apresentada pela linhagem Ps-03, identificada como *Coniothyrium* sp, cujo extrato foi submetido a

fracionamento cromatográfico e resultou no isolamento de uma dicetopiperazina, policetídeos e esteroides.

Os policetídeos representam uma classe de produtos naturais de grande importância, com diversos exemplos de protótipos para o desenvolvimento de fármacos, alguns já em estudos de fase clínica e outros já em uso na terapêutica. Os policetídeos isolados neste estudo incluem três macrolídeos aromáticos (**1** – **3**): a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona, que mostrou potencial inibidor de células de carcinoma multi-resistentes em estudos anteriores, além de dois análogos à sonnerlactona, sendo um inédito na literatura e outro, inédito como produto natural, que foi relatado anteriormente apenas como produto de síntese. Foram obtidos também o gymnoascolídeo A (**4**), um butenolídeo aromático anteriormente isolado do ascomiceto *Gymnoascus reessii*, obtido do solo australiano, e a 10-norparvulenona (**7**), uma tetralona com atividade antiviral contra o vírus influenza da gripe (A/PR/8/34), relatada anteriormente como produto do fungo associado às cascas de *Sonneratia apetala* e também do fungo endofítico *Pulvinula* sp. 11120, isolado das folhas de *Cupressus arizonica*.

Os esteroides isolados, ergosterol-5,8-endoperóxido $\Delta^{6,22}$ (**5**) e 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**), são estruturalmente relacionados, provavelmente através de rearranjo que inclui a abertura do anel endoperóxido, decorrente do ataque de água em C6 e deslocamento da ligação dupla para a posição C7-C8. O ergosterol-5,8-endoperóxido- $\Delta^{6,22}$ apresentou atividade antibacteriana e citotóxica anteriormente e já foi isolado de *Aspergillus versicolor* obtido da alga parda *Sargarssum thunbergii*, bem como de fungos terrestres, incluindo linhagens obtidas no deserto do Atacama.

As dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, formados através de duas ligações amídicas, com duas ou mais unidades de aminoácidos, produzidas por diferentes organismos como mamíferos, leveduras, líquens, fungos, bactérias e actinomicetos marinhos. A substância **8**, identificada como gliovictina, é uma dicetopiperazina que apresenta em sua estrutura átomos de enxofre constituindo grupos metil-sulfeto, e metilações nos átomos de nitrogênio, caracterizando a subclasse das epiditiodicetopiperazinas. Diversos estudos biossintéticos foram realizados com substâncias desta subclasse, que indicaram a provável quebra da ligação dissulfeto de derivados da gliotoxina, uma

epiditiopiperazina contendo ciclo com ponte de dissulfeto, e posteriormente metilações nos átomos de nitrogênio do anel piperazínico.

Com base nestes resultados, pode-se também concluir que a costa brasileira é um ambiente que demanda investigações mais amplas e aprofundadas do ponto de vista químico, já que representa importante fonte de material para novos estudos de bioprospecção. Merecem destaque as substâncias produzidas por microorganismos e por fungos endofíticos de origem marinha, em particular, decorrente de sua expressiva quimiodiversidade e potencial de bioatividade relevante, conforme demonstrado neste estudo.

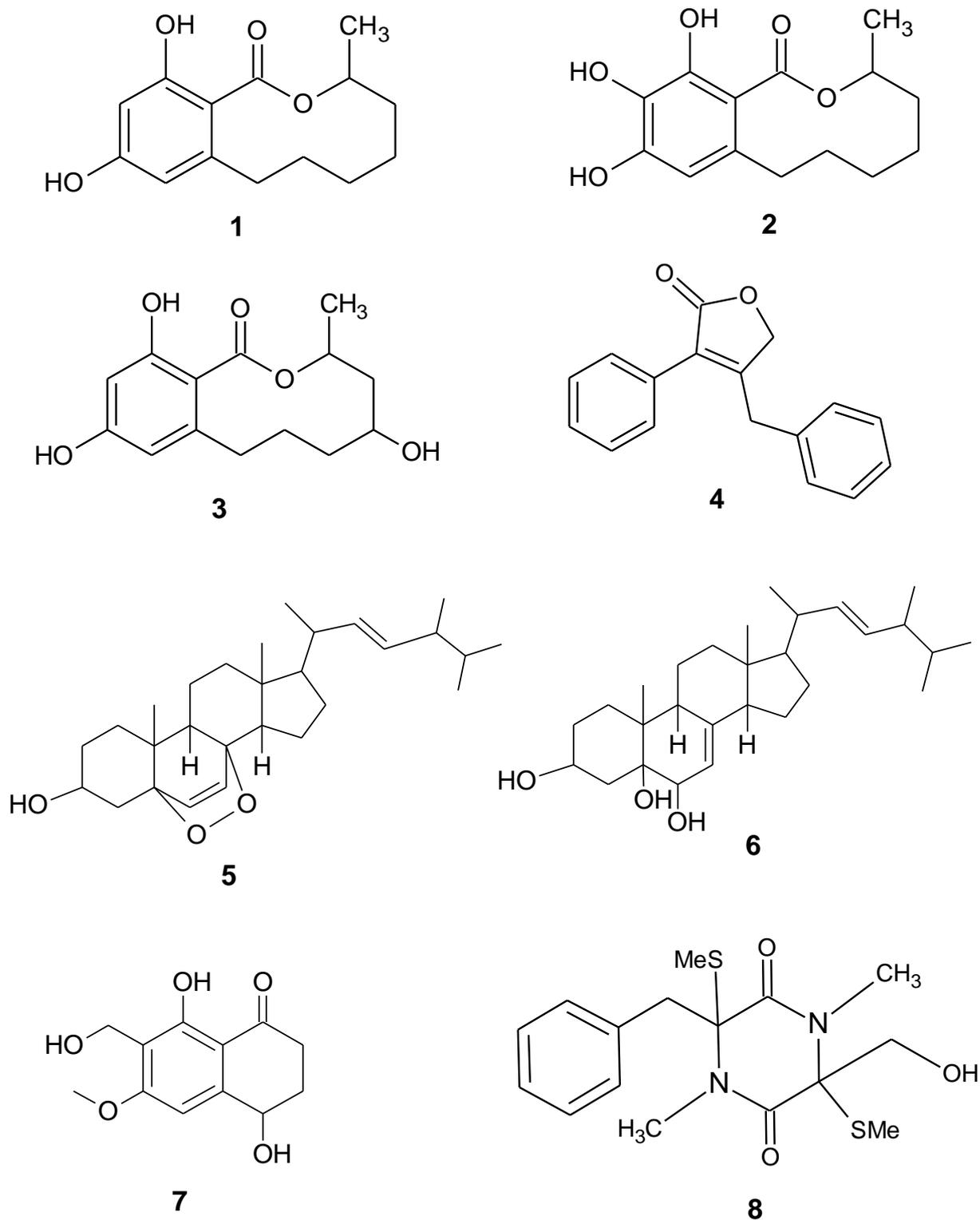


Figura 41. Substâncias isoladas (1-8) de *Coniothyrium* sp

REFERÊNCIAS

BARBOSA, L. C. A. et al. Estratégias para a síntese de γ -alquilidenobutenolídeos. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1163-1174, 2010.

BASSETII, M.; D'ANNIBALE, A. Formation of five- and six-membered α,β -unsaturated lactones through ring-closing metathesis of functionalized Acrylates. applications to synthesis of natural products. **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 264-2677, 2013.

BEESOO, R. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. **Mutation Research**, v. 768, p. 84-97, 2014.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nature Products Reports** v. 32, p. 116-211, 2015.

BRINGMANN, G. et al. Gymnoascolides A-C: aromatic butenolides from a Australian isolate and the soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1226-1230, 2005.

BURTON, H. S.; ABRAHAM, E. P. Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. **Biochemical Journal**, v. 50, p. 168-174, 1951.

CLINICAL TRIALS. **Randomized phase 3 assessment of second line chemotherapy with docetaxel + plinabulin compared to docetaxel alone in patients with advanced non-small cell lung cancer with at least 1 large lung lesion**. Bethesda, 2015. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02504489/2015_07_21>. Acesso em: 10 jul. 2016.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928-6937, 2010.

DING, L. et al. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. **Current Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 229-235, 2008.

DUARTE, K. et al. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 97-110, 2012.

DYBDAL-HARGREAVES, N. F. et al. Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule-targeting agent. **American Association for Cancer Research Journals**, v. 21, p. 2445-2452, 2015.

EBEL, R.; RATED, M. E. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nature Products Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, July 1961.

ELSEBAI, M. F. et al. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 802-808, 2011a.

ELSEBAI, M. F. et al. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2282-2285, 2011b.

FENICAL, W.; SHIN, J. Isolation of gliovictin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3347, 1987.

GLOER, J. B. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (Ed.). **Environmental and microbial relationships**. Springer-Verlag, 2007. Chap. 15, p. 257-286. (The mycota, v. 4).

GONÇALVES, V. N. et al. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. **Environmental Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 232-245, 2016

GULDER, T. A. M. et al. Isolation, structure elucidation and total synthesis of lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus*. **Marine drugs**, v. 10, n. 10, p. 2912-2935, 2012.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HUSSAIN, H. et al. Coniothyre: a new phenoxuphenyl ether from endophytic fungus, *Coniothyrium* sp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 11, p. 1094-1098, 2014.

ISAKA, M. et al. Unique diketopiperazine dimmers from the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. **Organic Letters**, v. 7, n. 11, p. 2257-2260, 2005.

KAWAGISHI, H. et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2777-2779, 1988.

KOCK, I. et al. New massarilactones, massarigenin E, and coniothyrenol, isolated from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp., from *Carpobrotus edulis*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 13, p. 2186-2190, 2007.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology: the higher fungi**. New York: Academic Press, 1979.

KOSSUGA, M. H. et al. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 257-267, 2012.

KROHN, K. et al. Isolierung, synthese und biologische Wirkung von Coniothyriomycin sowie synthese. und siotestung analoger offenkettiger Imide. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 12, n. 8, p. 789-798, 1992.

KROHN, K. et al. Palmarumycins C1 to C16 from *Coniothyrium* sp. isolation, structure elucidation, and biological activity. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 11, p. 1099-1108, 1994.

KROHN, K. et al. Bioactive nitronaphthalenes from an endophytic fungus, *Coniothyrium* sp., and their chemical systhesis. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 3615-3618, 2008.

KWON, H. C. et al. Cytotoxic ergosterol from *Paecilomyces* sp. J300. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 851-855, 2002.

LI, Y. C. et al. The metobolites of mangrove endophytic fungus Zh6-B1 from the South Chia Sea. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3326-3328, 2010.

LIU, Q. A. et al. The chemistry and bioactivity of macrolide from marine microorganisms. In: RAHMAN, Atta-ur. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 44, chap. 7, p. 353-401.

MARSTON, A.; KISSILING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

McQUILKEN, M. P. et al. Production of macrosphelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbioly Letters**, v. 219, p. 27-31, 2003.

MIAO, F. P. et al. Secondary metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* strain. **Marine Drugs**, v. 10, n. 1, p. 131-139, 2012.

MORAIS-URANO, R. P.; CHAGAS, A. C.; BERLINCK, R. G. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 3, p. 362-366, 2012.

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

OMURA, S. et al. A new anti-influenza virus antibiotic 10-Norparvulenone from *Microspheropsis* sp. FO-5050. **The Journal of Antibiotcs**, v. 53, n. 10, p. 1215-1218, 2000.

PETTIT, G. R. et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, p. 6883-6885, 1987.

PETTIT, G. R. et al. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. **Journal Natural Products**, v. 64, p. 907-910, 2001.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PONTIUS, A. et al. Aromatic polyketides from marine algicolous fungi. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 272-274, 2008.

QUIAO, M.-F. et al. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5677-5680, 2010.

RAHALISON, L. et al. Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopatogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v. 60, p. 41-44, 1994.

SCOPEL, M. **Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichononas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SILVA, J. I. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44-52, Jan. 2013.

TARMAN, K. et al. Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 294-306, 2011.

VAZ, D. S. S. et al. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 48-54, 2014.

WELCH, T. R.; WILLIAMS, R. M. Epidithiodioxopiperazines occurrence synthesis and biogenesis. **Nature Produce Reporter**, v. 31, n. 10, p. 1376-1404, 2014.

WIESE, J. et al. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 561-585, 2011.

WIJERATNE, E. M. et al. Pulvinulin A, graminic C, and *cis*-gregatin B – new natural furanones from *Pulvinula* sp. 11120, a fungal endophyte of *Cupressus arizonica*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 1, p. 107-111, 2015.

YAOITA, Y. et al. Sterol constituents from five Edible Mushrooms. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 944-950, 1998.

YOSHIHARA, T.; YANG, Q.; TOSHIMA, H. Syntheses of β -resorcylic acid derivatives, novel potato micro-tuber inducing substances isolated from *Lasiodiplodia theobromae*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 5377-5384, 2001.

YU, S. et al. 5,8-Epodioxysterols and related derivatives from a Chinese soft coral *Sinularia flexibilis*. **Steroids**, v. 71, p. 955-959, 2006.

ZHANG, G. et al. Antifungal metabolites produced by *Chaetomium globosum* no.04, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Indian Journal Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 175-180, 2013.

ZHANG, P. et al. Varioxepine A, a 3 *H*-oxepine-containing alkaloid with a new oxacage from the marine algal-derived endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. **Organic Letters**, v. 16, n. 18, p. 4834-4837, 2014.

ZHAO, Y. et al. The individual lipid compositions produced by *Cunninghamella* sp. Salicorn 5, an endophytic oleaginous fungus from *Salicornia bigelovii* Torr. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 621-633, 2014.