



MAURO GUILHERME BARROS CARDOSO

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS**

LAVRAS – MG

2018

MAURO GUILHERME BARROS CARDOSO

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso

Coorientadora

Profa. Dra. Silvana Marcussi

Lavras – MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Cardoso, Mauro Guilherme Barros.

Atividades biológicas de extratos de fungos endofíticos / Mauro
Guilherme Barros Cardoso. – 2018.

54 p.

Orientador(a): Patrícia Gomes Cardoso.

Coorientador(a): Silvana Marcussi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fungo endofítico. 2. Metabolitos secundários. 3. Proteases.
4. Fosfolipases A2. I. Cardoso, Patrícia Gomes. II. Marcussi,
Silvana. III. Título.

MAURO GUILHERME BARROS CARDOSO

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 08 de fevereiro de 2018.

Dra. Silvana Marcussi	UFLA
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dr. Clayton Zambele Oliveira	UFPB

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

Orientadora

Dra. Silvana Marcussi

Co-orientadora

LAVRAS - MG

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mostrar o tempo todo quão maravilhosa a vida é, e por ser o responsável pelas bênçãos alcançadas na minha vida, nunca me deixando desviar dos caminhos certos.

A minha mãe Neusa e minhas irmãs Taciane e Bibiana por todo amor, carinho dado a mim, além de sempre estarem ao meu lado acreditando no meu potencial, me apoiando e mostrando sempre o caminho certo, fazendo com que eu possa vencer todas as dificuldades impostas em minha vida e me mostrando que a família é o maior bem que se pode ter.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao setor de microbiologia agrícola, por possibilitarem minha formação acadêmica e por se tornar o lugar onde pude abrir minha mente, conhecer novas pessoas e ter novas experiências que levarei por toda a vida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

As professoras Patricia Gomes Cardoso e Silvana Marcussi, pela orientação, amizade e paciência, que foram de suma importância para a conclusão de mais esta etapa em minha vida.

Aos orientados da professora Silvana Marcussi, pelo apoio, empenho, dedicação, e por participarem significativamente da condução e realização dos experimentos que geraram este trabalho.

Aos alunos da pós-graduação da microbiologia pelos seus conhecimentos passados, incentivo e amizade.

A todas as minhas amizades formadas durante esses dois anos de trajetória no curso, por proporcionarem momentos de descontração, risadas, alegrias e por me ajudarem das mais variadas formas quando necessitei. E também agradecer ao Marcos Paulo pelo companheirismo, amizade e por sempre estar disposto a me ajudar e apoiar em minhas decisões.

“Fecho os olhos e crio um mundo imaginário
abro os olhos e vejo que era imaginação
mas se eu não abro os olhos,
passo a viver em um mundo de imaginário
num mundo dominado pelo medo de abrir os olhos”

Regina Rosa

RESUMO

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de metabolitos secundários, os quais desempenham um papel importante na diversificação e adaptação desses microrganismos para vários nichos ecológicos. Estes metabolitos têm atraído interesse de grupos de pesquisadores e indústrias devido ao seu potencial para aplicações biotecnológicas, tais como desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e alimentos. Neste contexto, o objetivo no presente trabalho foi avaliar a presença de atividades enzimáticas em produtos do metabolismo de fungos endofíticos de café, utilizando como ferramenta enzimática as peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* e *Bothrops atrox* para a indução das atividades fosfolipásica, trombolítica, coagulante/anticoagulante e citotóxica sobre eritrócitos humanos. A atividade fosfolipásica foi realizada em gel de agarose incorporado com lecitinas de gema de ovo. A atividade de proteases foi avaliada sobre coágulos sanguíneos humanos que representam uma rica fonte de substratos proteicos. A atividade de coagulação foi avaliada pela contagem do tempo de coagulação de plasma citrato. A citotoxicidade sobre eritrócitos humanos foi avaliada com incorporação de hematócrito 1% em gel de agarose. Foram observadas inibições de 20,54%, 93,49% e 26,67% sobre as atividades fosfolipásica, trombolítica e hemolítica respectivamente. O tempo de coagulação, foi alterado na presença de apenas um fungo (*Muscodor vitigenus* HZM41), que se mostrou potencializador da ação coagulante. Em adição, os extratos de fungos cultivados não apresentaram citotoxicidade sobre eritrócitos humanos nas condições avaliadas. Estudos futuros poderão resultar na identificação dos inibidores enzimáticos presentes nos fungos, com vistas ao uso destes em aplicações fármaco-cosméticas de interesse humano.

Palavras chaves: Fungo endofítico. Metabolitos secundários. Proteases. Fosfolipases A₂.

ABSTRACT

Endophytic fungi are known to produce a wide variety of secondary metabolites, which play an important role in the diversification and adaptation of these microorganisms to various ecological niches. These metabolites have attracted interest from research groups and industries because of their potential for biotechnological applications such as drug development, cosmetics and food. In this context, the objective of the present work was to evaluate the presence of enzymatic activities in products of the metabolism of coffee endophytic fungi, using the snake venoms of the *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* species as an enzymatic tool for the induction of phospholipase, thrombolytic and coagulant activities / anticoagulant and cytotoxic activity on human erythrocytes. Phospholipase activity was performed on agarose gel incorporated with egg yolk lecithins. Protease activity was assessed on human blood clots representing a rich source of protein substrates. Coagulation activity was assessed by counting the coagulation time of plasma citrate. Cytotoxicity on human erythrocytes was assessed with incorporation of 1% hematocrit on agarose gel. Inhibitions of 20.54%, 93.49% and 26.67% were observed on phospholipase, thrombolytic and hemolytic activities, respectively. The coagulation time was altered in the presence of only one fungus (*Muscodora vitigenus* HZM41), which proved to be potentiating the coagulant action. In addition, cultured fungal extracts did not show cytotoxicity on human erythrocytes under the conditions evaluated. Future studies may result in the identification of enzyme inhibitors present in fungi, with a view to their use in drug-cosmetic applications of human interest.

Keywords: Endophytic fungi. Secondary metabolites. Proteases. Phospholipases A₂.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Fungos endofíticos	11
2.2	Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos	12
2.3	Peçonhas de serpentes	17
2.4	Metaloproteases de peçonhas ofídicas	18
2.5	Fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas	20
3	CONCLUSÃO	21
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5	ARTIGO 1 Prospecção de inibidores enzimáticos a partir de extratos de fungos endofíticos com enfoque nas enzimas fosfolipases A₂ e proteases presentes no extrato de peçonha de serpente	30
6	INTRODUÇÃO	33
7	MATERIAL E MÉTODOS	35
8	RESULTADO E DISCUSSÃO	41
9	CONCLUSÃO	49
10	AGRADECIMENTOS	50
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de metabolitos secundários, os quais desempenham um papel importante na diversificação e adaptação desses microrganismos para vários nichos ecológicos. Estes metabolitos têm atraído interesse de grupos de pesquisadores e indústrias devido ao seu potencial para aplicações biotecnológicas, tais como desenvolvimento de medicamentos, cosméticos, alimentos dentre outros.

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar danos aos seus hospedeiros. Portanto, os endófitos se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Evidentemente, essas distinções têm finalidades apenas didáticas, havendo sobreposição entre esses grupos de microrganismos. Microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary em 1866 quem primeiro delineou uma possível distinção entre endófitos e patógenos de plantas. Permaneceram praticamente esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma série de motivos, começaram a chamar atenção. Nessa época verificou-se que, longe de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse, como por exemplo, conferir proteção contra insetos-pragas, outros microrganismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir diversas enzimas, toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico.

Visando a área da indústria farmacêutica as fosfolipases A_2 e proteases são

enzimas relevantes na busca de novos fármacos. As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas de interesse médico científico e são componentes essenciais para o desenvolvimento de pesquisas por estarem relacionadas a uma grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos. Estas desempenham importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. PLA₂ foram identificadas e caracterizadas em tecidos de mamíferos e peçonha de artrópodes e serpentes.

Já as proteases ou peptidases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, esse processo é chamado de clivagem proteolítica, um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvido principalmente na digestão e na coagulação sanguínea.

A utilização de proteínas isoladas de venenos e peçonhas animais, assim como proteínas recombinantes, ou peptídeos sintéticos está se tornando cada vez mais frequente entre os grupos de pesquisas e as indústrias de biotecnologia. Os compostos biologicamente ativos das peçonhas de serpentes, cujos efeitos tóxicos são relevantes no âmbito de saúde pública e representados principalmente por: miotoxicidade, hemorragia, coagulação sanguínea, neurotoxicidade e citotoxicidade, têm sido amplamente utilizados como ferramentas laboratoriais para os estudos de novos compostos naturais capazes de inibir suas ações.

Neste contexto, pesquisas que visam caracterizar compostos produzidos por fungos endofíticos são de grande valia na busca por modelos para novos agentes biotecnológicos de interesse humano. O fato de serem bons produtores de substâncias bioativas os torna organismos de interesse, principalmente pela possibilidade da descoberta de novos princípios ativos. Aliado a isso, apresentam como vantagem o baixo custo de produção e a facilidade de manipulação das variáveis de cultivo, a fim de otimizar e viabilizar a produção dos metabólitos secundários em escala industrial.

Sendo assim esse trabalho visou avaliar os extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica* selvagem, quanto a suas potenciais atividades fosfolipásica, hemolítica, trombolítica e coagulante, assim como avaliar sua ação inibidora sobre estas atividades, com foco na inibição de fosfolipases A₂ e proteases que compõem algumas peçonhas ofídicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são fontes promissoras de novos produtos naturais (SCHULZ E BOYLE, 2005; STROBEL E DAISY 2003). A biodiversidade desses fungos é composta por representantes dos filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomerulomycota e Dothideomycete (ARNOLD, 2007), incluindo uma diversidade de *Muscodor*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, dentre vários outros (ALMEIDA et al., 2005).

Todas as plantas em seus ecossistemas naturais parecem ocorrer de forma simbiótica com fungos endofíticos (SCHULZ E BOYLE, 2005). A interação biológica mais simples neste sistema é a relação mutualística, onde a planta fornece nutrientes ao fungo e, em contrapartida, este fornece algum tipo de proteção (SCHULZ E BOYLE, 2005; BACKMAN E SIKORA, 2008; CASTILHO et al., 2007). Dentre os benefícios que a planta recebe, os microorganismos endófitos podem melhorar a absorção de nutrientes das plantas hospedeiras, promover o seu crescimento, aumentar a tolerância a estresses abióticos e resistência a patógenos, e eventualmente proporcionar um aumento da biomassa das plantas (MEI E FLIN, 2010). A energia perdida pelo vegetal na produção de biomassa endofítica é integralmente compensada pela melhoria da saúde da planta pela presença destes microrganismos mutualísticos (MEI E FLIN,

2010).

Alguns estudos demonstram uma proporção elevada de fungos endofíticos (80%) produziram compostos biologicamente ativos em testes para atividade antibacteriana, fungicida e herbicida. Mesmo não exibindo sintomas evidentes de doenças, 43% das plantas colonizadas por fungos endofíticos expressaram atividades herbicidas (SCHULTZ E BOYLE, 2005; SCHULZ et al., 1999).

Existe uma chamada geral para a descoberta de novos antibióticos mais eficazes no combate de doenças, assim como agentes quimioterapêuticos que tenham baixa toxicidade e agroquímicos que apresentem menor impacto ambiental. Esta pesquisa é impulsionada pelo desenvolvimento de microrganismos resistentes aos tratamentos existentes (STROBEL et al., 2004 e 2003). Estudos demonstraram que 51% de compostos bioativos isolados de fungos endofíticos possuem estruturas desconhecidas, tratando-se de novos compostos bioativos. Reforça-se, portanto, o grande potencial para a descoberta de substâncias bioativas e de baixa toxicidade (SCHULZ et al., 2005).

2.2 Substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura (como por exemplo, agentes de crescimento e herbicidas) e nas indústrias, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como fontes de metabólitos primários (RAJULU et al., 2011) e secundários (STIERLE et al., 1993). Desta forma, a bioprospecção de endofíticos é considerada uma estratégia inteligente para a busca de novos compostos, permitindo identificar novas moléculas e condições fisiológicas para a sua produção (YU et al., 2010; STROBEL E DAISY, 2003).

Uma diversidade de metabólitos secundários isolados de fungos

endofíticos foi descrita nos últimos anos, incluindo peptídeos, alcaloides, quinonas, terpenóides, esteroides, flavonoides, fenóis, dentre outros (YU et al., 2010; STROBEL et al., 2004). A maioria dos metabólitos secundários são derivados da ação de quatro classes de enzimas: policetídeo sintases (PKS), peptídeo sintases não ribossômicas (NRPS), terpeno sintases (TS) e dimetilalil difosfato triptofano sintases (DMATS), sendo que cada uma destas classes utiliza metabólitos primários como substrato, que são rearranjados ou condensados em moléculas mais complexas, como os policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenos e alcaloides (FOX E HOWLETT, 2008; KELLER et al., 2005).

A vincristina (figura 1), outra droga com atividade antitumoral e originalmente obtida de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), também foi detectada em culturas de um endófito, *Fusarium oxysporum*, na mesma planta (LINGQI et al., 2000). Este alcaloide é terapêuticamente utilizado no tratamento de várias doenças neoplásticas (MANN, 2002; OWELLEN e DONIGIAN, 1972).

Os alcaloides chaetoglobisinas A e C (Figura 1) foram isolados e caracterizados da cultura de *Chaetomium globosum*, proveniente originalmente das folhas de *Ginkgo biloba*. Estes metabólitos mostraram significativa atividade contra *Mucor miehei* e *Artemia salina* (QIN et al., 2009). As chaetoglobisinas A e C, juntamente com outras micotoxinas, agentes químicos e particulados, foram apontados como responsáveis pela diminuição da qualidade do ar em interiores de edifícios, causando a “Síndrome dos Edifícios Doentes” (FOGLE et al., 2007).

Ácido torreiânico, uma quinona dimérica seletivamente citotóxica e agente anticancerígeno, foi isolado do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* de *Torreya taxifolia*, árvore em extinção (Figura 1). Este composto foi testado em diversas linhagens de células cancerosas, demonstrando ser 5 a 10 vezes mais potentes nas linhagens sensíveis aos agonistas de proteína quinase C (LI et al., 2003).

Crytosporiopsis cf. *quercina* foi isolado como endófito de *Tripterigeum*

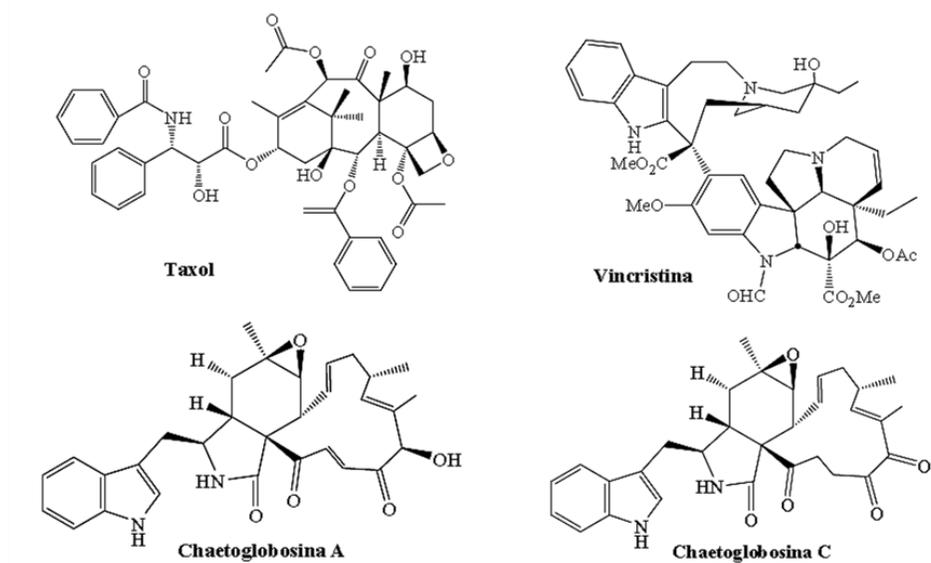
wilfordii, planta medicinal nativa da Eurasia, e demonstrou uma excelente atividade antifúngica contra alguns patógenos humanos, incluindo *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Um único peptídeo antimicótico denominado criptocandina foi isolado e caracterizado de *C. quercina*, contendo um número peculiar de ácidos hidroxilados além de um novo aminoácido, a 3-hidroxi-4-metilprolina (Figura 1). Criptocandina também é ativa contra fungos patogênicos de plantas incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, e atualmente está sendo considerada para o uso contra fungos que causam doenças de pele e unhas (STROBEL et al., 1999).

Sun et al. (2011) isolaram três novos metabólitos com esqueletos carbônicos contendo um anel espiro-5,6-lactona (Figura 1), do fungo endofítico *Massrison* sp. associado com *Rehmannia glutinosa* uma importante erva tradicional da China utilizada no tratamento de aftas e carcinoma de mama. Estes compostos mostraram-se ativos contra fungos patogênicos e células tumorais.

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).

Resultados de pesquisas com metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos podem levar também à novas terapias para o diabetes. Um metabólito fúngico não peptídico (L-783, 281) foi isolado do endofítico *Pseudomassaria* sp., coletado em uma floresta na República Democrática do Congo. A administração oral de L-783, 281 a dois ratos modelos para diabetes reduziu significativamente os níveis de glicose no sangue. Esse composto age como insulina mimética e, ao contrário da insulina, não é destruído no trato digestivo, podendo ser administrado por via oral (ZHANG B., et al., 1999)



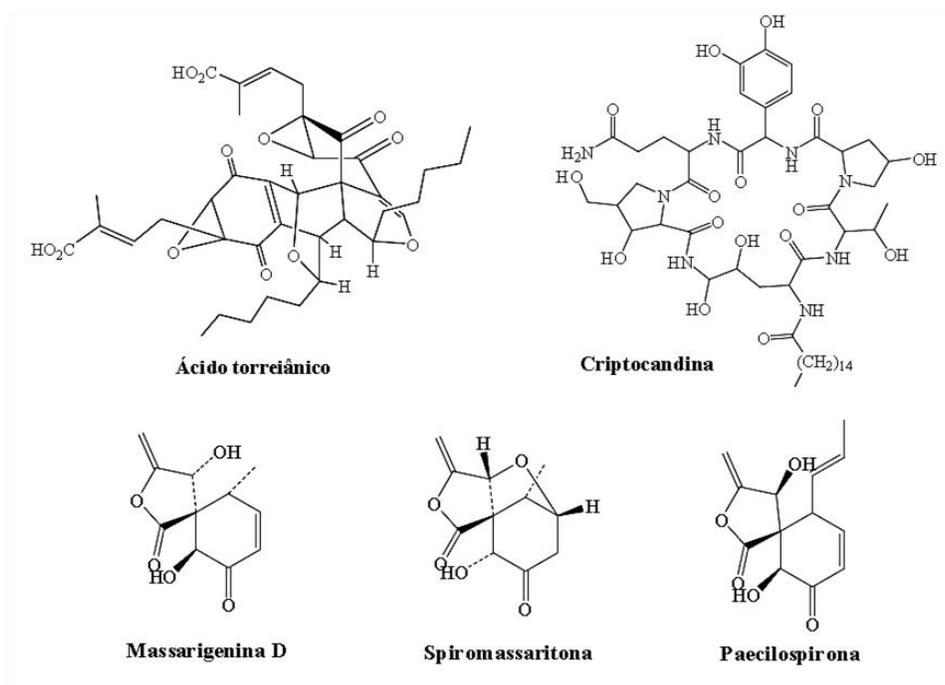


Figura 1. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos (ARAÚJO, 2012).

2.3 Peçonhas de serpentes

As peçonhas ofídicas são usadas tanto no mecanismo de defesa como de ataque, pois possuem componentes direcionados para imobilização e morte de suas presas bem como para facilitar o processo de digestão (HIDER et al., 1991). Estas peçonhas são uma complexa mistura de substâncias, em sua maioria de natureza proteica, que podem interferir bruscamente na homeostase, atuando em diversos processos fisiológicos em organismos humanos. De modo geral são constituídas de neurotoxinas, cardiotoxinas (citotoxinas), miotoxinas e fatores que alteram a hemostase, incluindo as hemorraginas (MENDEZ e RIET-CORREA, 1995).

As peçonhas dos ofídios do gênero *Bothrops* contêm uma mistura

complexa de proteínas com e sem atividade enzimática, proteínas de alta ou baixa massa molecular e peptídeos, com atividades biológicas distintas, sendo estes responsáveis por aproximadamente 95% do peso seco das peçonhas. Sua composição, em geral, contém hialuronidasas, que explica a rapidez da absorção da peçonha pelo aumento da perfusão através dos tecidos; L-aminoácido oxidases, geradoras de peróxido de hidrogênio resultando em estresse oxidativo e ampliando os danos celulares; fosfolipases A₂, promotoras da quebra de fosfolipídios alteram a permeabilidade das membranas e induzem inflamação local, necrose e dano ao epitélio vascular. A peçonha possui, também, ação proteolítica ou necrosante, coagulante, hemorrágica e nefrotóxica resultante principalmente da ação de proteases (MENDEZ e RIET-CORREA, 1995).

A utilização de proteínas isoladas de venenos e peçonhas animais, assim como proteínas recombinantes, ou peptídeos sintéticos está se tornando cada vez mais frequente entre os grupos de pesquisas e as indústrias de biotecnologia. Os compostos biologicamente ativos da peçonha de serpentes, cujos efeitos tóxicos possuem grande impacto no âmbito de saúde pública, têm sido amplamente utilizados no estudo de estruturas moleculares de receptores neuromusculares e contribuído na compreensão do sistema imunológico (STOCKER, 1999).

A ampla aplicabilidade médica atribuída diretamente ou indiretamente ao uso de toxinas isoladas de peçonhas enfatiza a necessidade de se realizar avaliações quanto aos efeitos das peçonhas e suas toxinas sobre o organismo humano, uma vez que estas análises podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação destas moléculas. Recentemente, uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Lachesis muta* nomeada LM-PLA₂-I com atividade hemolítica, inibidora de agregação plaquetária, edema e miotoxicidade, mostrou-se também ativa em promover a sobrevivência de células ganglionares da retina podendo ser útil no controle da sobrevivência de células neuronais axotomizadas (SILVA CUNHA, FULY e DE ARAÚJO, 2011).

Proteínas de peçonhas têm sido utilizadas como ferramentas para investigar processos fisiológicos como a coagulação do sangue e a resposta inflamatória, além de seu uso como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos naturais para o tratamento do envenenamento e de algumas patologias humanas (TRENTO et al., 2001).

2.4 Metaloproteases de peçonhas ofídicas

Durante o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, a alteração do equilíbrio hemostático geralmente está relacionada à ação de proteases (serinoproteases e metaloproteases) sobre diferentes fatores da cascata de coagulação, tais como o fibrinogênio e a fibrina (GASMI et al., 2000; DUNN E BROADY, 2001; TAKATSUKA et al., 2001; MATSUI, FUJIMURA E TITANI, 2000).

As metaloproteases (MPs) compreendem uma série de enzimas dependentes de zinco e de massa molecular variável. São altamente tóxicas na sua grande maioria, apresentam atividade fibrinogenolítica e são as principais responsáveis pelo efeito hemorrágico observado no envenenamento, induzido pelas serpentes da família Viperidae (KAMIGUTI et al., 1998), além de geralmente induzirem mionecrose, debridamento de tecidos e reação inflamatória (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; TEIXEIRA et al., 2005). Isoladas da peçonha de várias serpentes, são importantes objetos de estudo devido à complexidade funcional e estrutural.

As MPs podem interagir com diferentes fatores da cascata de coagulação (MATSUI, FUJIMURA e TITANI, 2000). A ação sobre os componentes da coagulação tais como o fibrinogênio, fator de Von Willebrand, fibrina e/ou plaquetas, tem sido o mais provável mecanismo responsável pela toxicidade induzida por MPs (BRAUD, BOM e WISNER, 2000; MATSUI, FUJIMURA e

TITANI, 2000; SWENSON e MARKLAND, 2005; MATSUI e HAMAKO, 2005). Assim, com algumas exceções, podem ser classificadas em α - ou β -fibrinogenases de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. Estas enzimas degradam preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio e com menor intensidade a cadeia β (MARKLAND, 1991; SWENSON et al., 2004).

As metaloproteases com atividade fibrinogenolítica são aplicáveis no tratamento de trombozes, pois diminuem o nível plasmático do fibrinogênio ou solubilizam os coágulos de fibrina, processo conhecido como trombólise (MATSUI et al., 2000; MATSUI e HAMAKO, 2005).

A botropase é uma preparação de hemocoagulase usada para deter sangramentos de diferentes etiologias com ação atribuída diretamente à proteína batroxobina isolada da peçonha *Bothrops atrox*. A enzima hidrolisa fibrinogênio de forma similar a trombina, liberando fibrinopeptídeo A, possui todas as características típicas de uma serinoprotease, tem um peso molecular de 27.000 Da e ponto isoelétrico de 7,5 (BELL, 1997; RAMESH et al., 1990). O composto é indicado em todas as situações em que se deseja obter um aumento da coagulação do sangue a nível distrital, como no caso de epistaxe (sangramento nasal) e em hemorragia após remoção das amígdalas (VERSTRAETE et al., 1977). Também é utilizado na profilaxia e prevenção de sangramento, antes de certas cirurgias (ZENG et al., 2009).

2.5 Fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas

Embora as peçonhas de serpentes contenham um grande número de proteínas bioativas, as fosfolipases A₂ (PLA₂s) constituem a maioria dos componentes tóxicos (KINI, 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

PLA₂s são enzimas que catalisam a hidrólise dependente de Ca²⁺ da

ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Além do seu papel fundamental no metabolismo de lipídeos, estas enzimas estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem participar de uma variedade de funções biológicas, como regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor (ARNI e WARD, 1996; KINI, 2005; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; DE MARIA et al., 2007).

As PLA₂s estão amplamente distribuídas na natureza e despertam elevado interesse médico-científico dado ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e em envenenamentos por peçonha de serpentes e de abelhas. As mais conhecidas e amplamente estudadas são encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nas peçonhas de répteis e insetos (DENNIS, 1994; SOARES et al., 2004a, b).

A atividade catalítica sobre as membranas sugere um importante papel das PLA₂s de peçonhas de serpentes na sua toxicidade. O desarranjo dos componentes fosfolipídicos ocasiona severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas com conseqüente influxo de íons cálcio (GUTIÉRREZ et al., 1989) acarretando a liberação de proteases dependentes do cálcio (DUNCAN, 1978), a ativação de PLA₂s endógenas (TRUMP et al., 1981) e o colapso mitocondrial (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984). A somatória de todas essas alterações moleculares pode resultar em morte celular.

O isolamento de toxinas e a caracterização proteômica de peçonhas de serpentes tornam-se necessários, pois originam potenciais benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico, e desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisas e drogas de potencial uso clínico (CALVETE et al., 2007).

3 CONCLUSÃO

No campo da indústria farmacêutica, cosméticas, entre outras ainda há muito a ser explorado com relação à utilização de microrganismos endofíticos. O fato de serem grandes produtores de substâncias bioativas os torna organismos de interesse, principalmente pela possibilidade da descoberta de novos princípios ativos.

Aliado a isso, apresentam como vantagem o baixo custo de produção e a facilidade de manipulação das variáveis de cultivo, a fim de otimizar e viabilizar a produção dos metabólitos secundários em escala industrial. Neste contexto a avaliação dos efeitos de compostos fúngicos sobre moléculas e células humanas assim como o estudo de sua ação na modulação de enzimas envolvidas em processos fisiopatológicos humanos, mostram-se de grande valia para definir futuras aplicações para estes compostos.

4 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, p. 467-470, 2005.

ARAÚJO, F. D. S. Aspectos da ecologia química de *Enterobacter sakasaki* (*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* e *tetragonisca angustula*. **Unicamp**, 2012.

ARNI, R. K., WARD, R. J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827 -841, 1996.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress,

challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2/3, p. 51-66, 2007.

BACKMAN, P. A., SIKORA, R. A. Endophytes an emerging tool for biological control. **Biol. Control**, v. 46, p. 1-3, 2008. 2008

BELL W. R., Jr Defibrinogenating enzymes. **Drugs**. v. 54(Suppl 3), p. 18–30, 1997.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CALVETE J. J., MARCINKIEWICZ C., SANZ L. Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **J. Proteome Res.** v. 6(1), p. 326-36, 2007.

CASTILHO, U. F., BROWNE, L., STROBEL, G., HESS, W. M., ERZA, S., PACHECO, G., ERZA, D. Biologically active *endophytic Streptomyces* from *Nothofagus* spp. And other plants in Patagonia **Microb. Ecol.**, v. 53, p. 12-19, 2007

DAISY, B. H., STROBEL, G. A., EZRA, D., CASTILLO, U., BAIRD, G. & HESS, W. M. *Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia*. **Mycotaxon** v. 81, 2002

DE MARIA L., VIND J., OXENBOLL K. M., SVENDSEN A., PATKAR S. Phospholipases and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 74, p. 290–300, 2007.

DEMAIN, A. L., FANG, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. In: Fiechter, A., Ed., History of Modern Biotechnology I, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, **Springer**, Berlin, v. 69, p. 1-39, 2000.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.13057 -13060, 1994.

DUNCAN, B. K., ROCKSTROCH, P. A., WARNER, H. R. (1978). **J. Bacteriol.** v. 134, 1039.

DUNN, R. D., BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1533, p. 29-37, 2001.

FOGLE, M. R., DOUGLAS, D. R., JUMPER, C. A., STRAUS, D. C. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. **Mycopathologia**, v. 164, p. 49-56, 2007.

FOX, E. M., HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Curr.Opin. Microbiol.**, v. 11, p. 481-487, 2008.

GASMI, A., SRAIRI, N., KAROUI, H., EL AYEB, M. Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal domain of residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1481, p. 209-212, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D.W., HAWGOOD, B.J., ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, p. 85-98, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F., GENE, J. A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z., SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v.27, p. 735-45, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.

HIDER, R. C., KARLSSON, E., NAMIRANIAN, S. Separation and Purification of toxins from snake venoms. In: Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics Pergamon Press. Ed. Harvey, A.L; **Elsiever**, UK pp. p. 1-34, 1991.

KAMIGUTI, A.S., ZUZEL, M., THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 31, p.853-862, 1998.

KELLER N. P., TURNER, G., BENNET, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KINI, R. M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom, **Toxicon**, v. 45, p. 1133–1145, 2005.

LI, C., JOHNSON, R. P., PORCO, J. A. JR Total synthesis of the quinine epoxide dimer (+)-torreyanic acid: application of a biometric oxidation/electrocyclization/Diels-Alder dimerization cascade. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 5095-5106, 2003.

LINGQI, Z., BO, G., HAIYAN, L., SONGRONG, Z., HUA, S., SU, G., RONGCHENG, W. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 31, p. 805-807, 2000.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p. 143-148, 2002.

MARKLAND, F. S. Jr. Inventory of alpha- and beta-fibrinogenases from snake venoms. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 65, p. 438-443, 1991.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1477, p. 146-156, 2000.

MATSUI, T., HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, v. 45, p. 1075-1087, 2005.

MEI, C., FLINN, B. The use of beneficial microbial endophytes for plants biomass and stress tolerance improvement. **Recent Pat. Biotechnol.**, v. 4, p. 81-95, 2010.

MENDEZ, M.C e RIET-CORREA F. Snakebite in sheep. **Vet Hum Toxicol**; v. 37(1), p. 62-73, 1995.

OWELLEN, R. J., DONIGIAN, D. W. [3H] Vincristine. Preparation and preliminary pharmacology. **J. Med. Chem.**, v. 15, p. 894-898, 1972.

QIN, J. C., ZHANG, Y. M., GAO, J. M., BAI, M. S., YANG, S. X., LAATSCH, H., ZHANG, A. L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, p. 1572-1574, 2009.

RAJULU, M. B. G., THIRUNAVUKKARASU, N., SUYANARAYANAN, T. S., RAVISHANKAR, J. P., EL GUEDDARI, N. E., MOERSCHBACHER, B. M. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 43-53, 2011.

RAMESH K. V., RAO C. M., BAIRY K. L., RAMANARAYAN K., KULKARNI D. R. Effects of procoagulants on wound healing. **Indian J Exp Biol**. v. 5, p. 28:43, 1990.

SCHALOSKE, R. H., DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, p 1246-1259, 2006.

SCHULZ, B., RÖMMERT, A. K., DAMMANN, U., AUST, H. J., STRACK, D. The endophyte-host interaction a balanced antagonism **Mycol. Res.**, v. 103, p. 1275-1283, 1999.

SCHULZ B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Res.**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SILVA CUNHA K. C., FULY A. L., DE ARAÚJO E. G. A phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon**. v. 57, p. 580-585, 2011.

SOARES, A. M., FONTES, M. R. M, GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr Org Chem.**, v.8, p.1677-1690, 2004a.

SOARES, A. M., SESTITO, W. P., MARCUSSI, S., STÁBLEI, R. G., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., CUNHA, O. A. B., VIERA, C. A., GIGLIO, J. R. Ankylation of mytoxic phospholipase A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to as enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.36, p.258-270, 2004b.

STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STOCKER, K. Use of snake venom proteins in medicine. **Schweiz Med Wochenschr.**, v. 129, p. 205-216, 1999.

STROBEL G. A., MILLER R. V., MARTINEZ-MILLER C., CONDRON, M. M., TELOW D. B., HESS, W. M. *Cryptosporiosis* cf. *quercina*. **Microbiology**, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their

natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G., DAISY, B.; CASTILLO, U., HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUN, Z. T., ZHANG, M., ZHANG, J. F., FENG, J. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrisson* sp. **Phytomedicine**, v. 18, p. 859-862, 2011.

SWENSON, S.; TOOMBS, C. F.; PENA, L.; JOHANSSON, J.; MARKLAND, F. S. Jr. Alpha-fibrinogenases. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.*, v. 4, p. 417-435, 2004.

SWENSON, S., MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

TAKATSUKA, H., SAKURAI, Y., YOSHIOKA, A., KOKUBO, T., USAMI, Y., SUZUKI, M., MATSUI, T., TITANI, K., YAGI, H., MATSUMOTO, M., FUJIMURA, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TEIXEIRA, C. F., FERNANDES, C. M., ZULIANI, J. P., ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 181-184, 2005.

TRENTO, E. P., GARCIA, O. S., RUCAVO, A., FRANÇA, S. C., BATALINI, C., ARANTES, E. C., GIGLIO, J. R., SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, p. 1521-1529, 2001.

TRUMP, B. F., BERESKY, I. K., OSORNIO-VARGAS, A. R., Cell death and the disease process, the role of calcium. In Bowen, Lockshin (eds) Cell death in

biology and pathology. **Chapman & Hall**, London, p. 209-242, 1981.

VERSTRAETE M., TYBERGHEIN J., DE GREEF Y., DAEMS L., VAN HOOFF A., estudos duplo-cegos com etamsilato, batroxobina ou ácido tranexâmico sobre a perda de sangue após adenoamigdalectomia., **Em Acta Clin Belg**, v. 32, n° 2, p. 136-41, 1977.

YU, H., ZHANG, L. Z., LI, L., ZHENG, C., GUO, L., LI, W.; SUN, P., QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiol. Res.**, v. 165, p. 437-449, 2010.

ZENG Z., SHI Y. X., SAMUDIO I. J., WANG R. Y., LING X., FROLOVA O., LEVIS M., RUBIN J. B., NEGRIN R. R., ESTEY E. H., KONOPLEV S., ANDREEFF M., KONOPLEVA M. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. **Blood**. v. 113(24), p. 6215-24, 2009.

ZHANG B., SALITURO G., SZALKOWSKI D., LI Z., ZHANG Y., ROYO I. et al. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 7, p. 284:974, 1999.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1

Normas do periódico - World Journal of Microbiology and Biotechnology
Artigo em fase de submissão no periódico World Journal of Microbiology
and Biotechnology

Prospecção de inibidores enzimáticos a partir de extratos de fungos
endofíticos com enfoque nas enzimas fosfolipases A₂ e proteases presentes
no extrato de peçonha de serpente

RESUMO

Os fungos endofíticos são conhecidos por produzirem uma grande variedade de metabolitos secundários. Estes metabolitos têm atraído interesse de grupos de pesquisadores e indústrias devido ao seu potencial para aplicações biotecnológicas. Neste contexto, o objetivo no presente trabalho foi avaliar a presença de inibidores enzimáticos em produtos do metabolismo de fungos endofíticos de café, utilizando como ferramenta as peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* e *Bothrops atrox* para a indução das atividades fosfolipásica, trombolítica, coagulante e citotóxica sobre eritrócitos humanos. A atividade fosfolipásica foi realizada em gel de agarose incorporado com uma fonte de fosfolipídios. A atividade de proteases foi avaliada sobre coágulos sanguíneos

humanos que representam uma rica fonte de substratos proteicos. A atividade coagulante foi realizada através do tempo de coagulação de plasma citratado. A citotoxicidade sobre eritrócitos humanos foi avaliada com incorporação de hematócrito 1% em gel de agarose. Foram observadas inibições significativas de 20,54%, 93,49% e 26,67% sobre as atividades fosfolipásica, trombolítica e hemolítica respectivamente. Para o teste de coagulação, apenas um fungo (*Muscodor vitigenus* HZM41) se mostrou potencializador da atividade, acelerando o processo de coagulação em 16 segundos. Em adição, os extratos de fungos cultivados não se mostraram citotóxico aos eritrócitos humanos. Estudos que demonstram os aspectos estruturais e funcionais de novos inibidores de PLA₂ e proteases podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de métodos alternativos nos tratamentos de desordens relacionadas as atividades dessas classes de enzimas.

Palavras-chaves: Fungo endofítico, Inibidores enzimáticos, Proteases e Fosfolipases A₂

ABSTRACT

Endophytic fungi are known to produce a wide variety of secondary metabolites. These metabolites have attracted interest from research groups and industries because of their potential for biotech applications. In this context, the objective of the present work was to evaluate the presence of enzymatic inhibitors in endophytic coffee fungi metabolism products, using snake venoms of *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* as a tool for the induction of phospholipase, thrombolytic, coagulant and cytotoxic effects on human erythrocytes. Phospholipase activity was performed on agarose gel incorporated with a source of phospholipids. Protease activity was assessed on human blood clots

representing a rich source of protein substrates. The coagulant activity was performed through the coagulation time of citrated plasma. Cytotoxicity on human erythrocytes was assessed with incorporation of 1% hematocrit on agarose gel. Significant inhibitions of 20.54%, 93.49% and 26.67% were observed on phospholipase, thrombolytic and hemolytic activities, respectively. For the coagulation test, only one fungus (*Muscodor vitigenus* HZM41) was potentiating the activity, accelerating the coagulation process in 16 seconds. In addition, cultured fungal extracts were not cytotoxic to human erythrocytes. Studies demonstrating the structural and functional aspects of new PLA2 inhibitors and proteases may provide support for the development of alternative methods in the treatment of disorders related to the activities of these classes of enzymes.

Keywords: Endophytic fungi. Enzyme inhibitors. Proteases. Phospholipases A₂.

6. INTRODUÇÃO

O estudo de produtos naturais (PN) constitui um dos mais importantes campos da ciência e a análise de compostos orgânicos e inorgânicos em PN tem ganhado considerável interesse nos últimos anos (ZHU et al 2013; THOLL et al, 2006; STASHENKO, 2008).

O termo "produtos naturais" é utilizado para definir metabólitos primários e secundários produzidos por um organismo, que na maioria dos casos funcionam como mecanismos de defesa contra herbívoros, micro-organismos, insetos e plantas concorrentes. Uma variedade de produtos naturais, tem sido usada por milhares de anos por uma fração significativa da população, sendo ainda usadas na área da saúde em muitos países ou regiões do mundo (MAJEED et al., 2012).

Os fungos endofíticos são fontes promissoras de novos produtos naturais

(SCHULZ e BOYLE, 2005; STROBEL e DAISY 2003). A biodiversidade desses fungos é composta por representantes dos filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomerulomycota e Dothideomycete (ARNOLD, 2007), incluindo uma diversidade de espécies pertencentes aos gêneros *Muscodora*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Alternaria* (ALMEIDA et al., 2005).

As várias classes de moléculas produzidas por fungos endofíticos podem possuir atividades, como por exemplo, hormonais, antibióticas, antitumorais (PEIXOTO, AZEVEDO e ARAÚJO, 2002), antifúngicas, citotóxicas (SILVA, 2010), antivirais, imunossupressoras e antiparasitárias (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Os produtos naturais obtidos de endófitos incluem principalmente alcalóides, esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocalasinas, flavonóides, peptídeos e xantonas (ALY et al., 2010; ZHANG, SONG e TAN, 2006; SCHULZ e BOYLE, 2005)

Apesar de poucos estudos químicos sobre os fungos endofíticos, foi isolado um número considerável de substâncias com atividade biológica, como por exemplo, com atividade antiparasitária, a palmarumicina CP17 (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ONDEYKA et al., 1997); com atividade neuroprotetiva, a crisogenamida A (ALY et al., 2010); antioxidante, a pestacina (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAM, 2011); propriedades imunossupressoras, a subglutanol A (STROBEL; DAISY, 2003); antiviral, ácido citônico B (STROBEL; DAISY, 2003; GUO et al., 2000). Foram relatados também substâncias com atividade anticolinesterásica, 16 α -hidroxi-5N-acetilardimina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011); antineoplásica, as antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006); citotóxica como o taxol, camptotecina, vincristina e podofilotoxina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ALY et al., 2010); antifúngica, a fomocromona B; e por fim, antibióticos, pestaloteol A e antidepressivos, como a hipericina (KUSARI, 2011).

No âmbito da procura por novos fármacos compostos por produtos naturais as proteases e fosfolipases A₂ representam valiosas ferramentas laboratoriais indutoras de atividade biológica passíveis de uso na caracterização de inibidores enzimáticos de interesse médico-científico. Considerando a grande variedade de atividades catalíticas e tóxico-farmacológicas induzidas por venenos, numerosos estudos usaram essas toxinas isoladas como ferramentas de laboratório de grande valor no campo científico. Essas ferramentas possuem aplicação *in vivo*, *in vitro* e *in silico* para avaliar a ação de inibidores, principalmente naturais, prospectando seus possíveis efeitos sobre enzimas, homólogas aos venenos, presentes em organismos animais, inclusive humanos (ESTÊVÃO-COSTA et al., 2000, MCCLEARY e KINI, 2013).

Um dos inibidores de protease mais bem caracterizado é o inibidor de tripsina, isolado de soja (KUNITZ, 1947), que foi complexado e cristalizado junto à tripsina de porco, servindo como o primeiro modelo metodológico para o estudo bioquímico de inibidores de proteases.

As Fosfolipases A₂ possuem uma diversidade de inibidores naturais já descritos em literatura, derivados de mamíferos, plantas e das próprias serpentes. Nos mamíferos encontramos o DM64, um inibidor de miotoxinas obtido da espécie *Didelphis marsupialis* (ROCHA et al. 2002), nas plantas um exemplo é o inibidor WSG (extraído de *Withania sonnifera*) que inibi fosfolipases A₂ de *Naja naja* (DEEPA e GOWDA 2002) e também podemos citar o inibidor de miotoxinas BaMIP PLI α isolado do plasma de serpentes da espécie *Bothrops asper* (LIZANO et al. 1997).

Sendo assim, entre as fontes estabelecidas de produtos naturais, microrganismos provaram ser candidatos promissores para a produção de novas substâncias comercializáveis (CRAGG; NEWMAN, 2013; DEMAIN, 2014) e com alto potencial de aplicação biotecnológicas e farmacêutica.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Identificação dos fungos endofíticos.

Pesquisas de campo foram realizadas durante 2011 na região da Zona da Mata, município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, para a obtenção de fungos endofíticos de cafeicultura. Foram obtidos 620 fragmentos de hastes (391), folhas (113) e frutos (116) da *Coffea arábica*.

Doze colônias de fungos endofíticos obtidas a partir dos fragmentos e crescidas em BDA (Batata dextrose agar) foram identificadas como *Muscodor coffeanum* (3), *Muscodor vitigenus* (4), *Muscodor yucatanensis* (2) e *Simplicilium* sp. (2) e *Acremonium* sp. (1), de acordo com pesquisas no banco de dados UNITE usando seqüências de DNA de espaçador transcrito interno (ITS), como descritos na Tabela 1 (MONTEIRO, 2016).

Tabela 1- Relação das estirpes isoladas da planta *Coffea arabicae* seu número de acesso ao GenBank.

Isolate	Origin	Accession no.
<i>M. coffeanum</i> (COAD 1842)	Leaf	KM514680
<i>M. coffeanum</i> (COAD 1899)	Leaf	KM514681
<i>M. coffeanum</i> (COAD 1900)	Leaf	KP862879
<i>M. vitigenus</i> (C20)	Stem	KU094049

<i>M. vitigenus</i> (HZM10)	Stem	KU094053
<i>M. vitigenus</i> (HZM39)	Stem	KU094054
<i>M. vitigenus</i> (HZM41)	Stem	KU094055
<i>M. yucatanensis</i> (HZM60)	Leaf	KU094056
<i>M. yucatanensis</i> (HZM64)	Leaf	KU094052
<i>Simplicillium</i> sp. (C18)	Stem	KU094050
<i>Simplicillium</i> sp. (C12 = HZM70)	Stem	KU094051
<i>Acremonium</i> sp. (C19)	Stem	KU094048

7.2 Obtenção dos extratos fúngicos

Para a obtenção dos extratos, os fungos foram cultivados em placas contendo o meio MEA (Extrato de Malte Ágar) por 7 dias a 25°C. Após o crescimento em placa, foram retirados cinco pequenos discos do meio MEA contendo partes do fungo de interesse e inoculados em 1000ml de meio ME (Extrato de Malte), deixando em agitação no shaker por 7 dias/25°C à 125rpm para o crescimento e produção dos metabolitos dos fungos.

Os fungos passaram por um processo de filtração para separar os micélios que foram totalmente desprezados do filtrado, e a esse filtrado foi adicionado acetato de etila na proporção de 1:0,5 (sobrenadante/acetato de etila) para a separação das partes orgânicas e inorgânicas. A fração de acetato de etila juntamente com os metabolitos produzidos das amostras foi submetida a um

processo de rotoevaporação a fim de se obter os extratos.

Os fungos utilizados no presente trabalho encontram-se na “Coleção Micológica de Viçosa - UFV e no Laboratório Biogen do Departamento de Microbiologia Agrícola- UFLA”.

7.3 Peçonha

As peçonhas usadas como ferramentas laboratoriais para a indução das atividades, por serem fontes ricas de fosfolipases A₂ e proteases, foram obtidas comercialmente no serpentário Bio-Agents (Batatais-SP). Para a atividade fosfolipásica foi padronizado o uso da peçonha de *Bothrops atrox* na dose de 10µg. As atividades trombolítica, hemolítica e coagulante foram padronizadas com uso da peçonha de *Bothrops moojeni* nas doses de 40µg, 40 µg e 5µg, respectivamente. Testes pilotos foram realizados para a determinação das doses mínimas de cada peçonha, responsáveis pela indução de cada atividade (CINTRA et al., 2012; OLIVEIRA; SIMÃO; MARCUSSI, 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

7.4 Divisão dos voluntários

Para avaliação de atividades *in vitro* sobre células sanguíneas isoladas e trombos constituídos de sangue total, foram coletadas amostras de sangue (5 mL) de voluntários, após obtenção de seu consentimento por escrito. O experimento conduzido está de acordo com os padrões do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP) da Universidade Federal de Lavras e aprovado por este comitê.

O sangue foi coletado em tubos contendo o anticoagulante heparina para os testes de citotoxicidade sobre eritrócitos e sem anticoagulante para os testes trombolíticos.

7.5 Ensaios de inibição enzimática

Nos ensaios de atividade Trombolítica e hemólise foram utilizadas para as incubações proporções massa:massa de peçonha:extrato fúngico, de 1:0,25; 1:0,5 e 1:1. Para a avaliação da atividade fosfolipásica, as proporções utilizadas foram 1:0,5; 1:1, 1:2 e para os ensaios de coagulação as proporções foram 1:0,5 e 1:1. O uso de diferentes peçonhas relaciona-se as melhores respostas durante a padronização das doses mínimas ativas e o uso de diferentes proporções refere-se a peculiaridades experimentais (visando não alterar o ambiente reacional), padronizadas após um amplo screening de doses avaliadas em ensaios piloto.

Os controles negativos receberam apenas tampão fosfato, os controles positivos receberam apenas peçonha e demais controles foram realizados utilizando apenas os extratos dos fungos. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e posteriormente submetidas à avaliação das diferentes atividades. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

7.5.1 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada em gel de ágar conforme método descrito por Gutiérrez et al. (1988). O gel foi elaborado com CaCl_2 0,01 M; gema de ovo como fonte de fosfolipídios (fosfatidilcolina e fosfatidiletanoamina), 1:3 v/v PBS pH 7,2; ágar bacteriológico 1%; azida de sódio 0,005%; sendo o meio vertido em placas em temperatura de 45 a 50°C. As amostras foram aplicadas em poços elaborados no gel e este permaneceu em câmara de cultivo celular a 37°C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do poço é um indicativo de atividade, no qual os halos foram medidos em centímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica.

7.5.2 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Esta atividade foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Gutiérrez et al. (1988), com adaptações referentes a substituição do substrato. Para tanto, uma amostra de sangue humano (5mL) foi coletada e diluída em PBS (25 mL). Os eritrócitos foram então lavados três vezes por meio de centrifugações a 400 g com duração de 10 minutos cada, sendo o sobrenadante retirado e substituído por PBS a cada passo de centrifugação. O hematócrito foi otimizado para aproximadamente 1% na composição do gel. A quantidade de peçonha (μg) considerada como DheM (dose hemolítica mínima) corresponde a dose responsável pela formação de um halo no gel com diâmetro entre 15 e 20 mm.

7.5.3 Atividade trombolítica

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro*, em placas de 96 poços, conforme metodologia descrita por Cintra et al. (2012). As amostras foram aplicadas sobre os coágulos, em triplicata, e as placas mantidas em câmara de cultivo celular por período de 24 horas a 37 °C.

A atividade trombolítica foi quantificada pelo volume de líquido liberado pelos trombos, considerando como controles o volume da amostra (controle PBS), volumes liberados pelos trombos que receberam tratamento apenas com peçonha (controle positivo).

Amostras dos extratos fúngicos também foram avaliadas isoladamente, assim como sua ação modulatória sobre enzimas presentes nas peçonhas foi avaliada após incubações (37°C por 30 minutos) do filtrado com a peçonha em diferentes proporções (m/m).

7.5.4 Atividade coagulante

Para avaliar o tempo de coagulação os extratos fúngicos foram previamente incubados com a peçonha de *B. moojeni*, por um período de 5 minutos, a 37°C, nas proporções de 1:0.5 e 1:1; (peçonha: extrato, m:m). Tubos contendo plasma citratado (200µL) foram mantidos em banho a 37°C, as amostras incubadas foram adicionadas ao plasma e o tempo cronometrado até formação do coágulo (RODRIGUES et al., 2000). Controles contendo apenas os extratos também foram realizados. A dose mínima coagulante foi definida previamente, sendo esta a menor quantidade de peçonha capaz de induzir a coagulação em um intervalo entre 50 e 180 segundos.

7.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média das triplicados \pm desvio padrão. A significância das diferenças entre os tratamentos foi determinada pela análise de variância, seguida do teste t de Student onde os tratamentos foram comparados com o controle. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Atividade fosfolipásica

Os extratos de *Muscodor yucatanensis* (HZM64 e HZM60), avaliados nas proporções 1:1 e 1:0,5, respectivamente, induziram uma redução significativa de 20,54% (HZM64) e 17,3% (HZM60) na atividade de fosfolipases, outros quinze extratos de diferentes amostras obtiveram resultados significativos de inibição sobre a atividade fosfolipásica de 15,14%; 13,51% e 11,89% aproximadamente (Figura 1). Nenhum extrato apresentou atividade fosfolipásica quando inoculado

ao gel de agarose contendo o substrato rico em fosfolipídios.

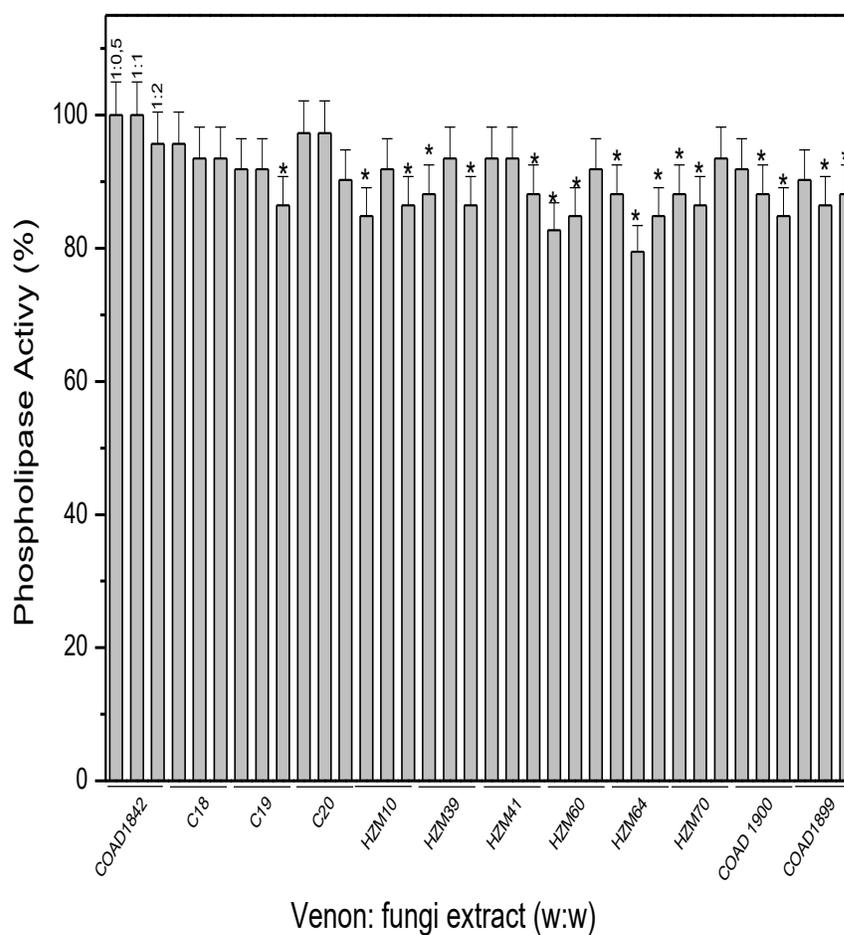


Figura 1: Efeito dos extratos fúngicos sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonha de *Bothrops atrox* (10 μ g). O controle contendo apenas peçonha foi considerado como 100%. Dados apresentados como médias de triplicatas \pm SD. (*) As médias diferem estatisticamente do controle positivo a 5% de significância.

A atividade catalítica sobre fosfolipídios presentes nas membranas

destaca o importante papel das fosfolipases de peçonhas de serpentes na indução de toxicidade durante envenenamento. O desarranjo dos componentes fosfolipídicos ocasiona severas alterações na integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas com conseqüente influxo de íons cálcio (GUTIÉRREZ et al., 1989) acarretando a liberação de proteases dependentes de cálcio (DUNCAN, 1978), a ativação de fosfolipases A₂ endógenas (TRUMP et al., 1981) e o colapso mitocondrial (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984). A somatória de todas essas alterações moleculares pode resultar em morte celular.

Em adição, no organismo humano, a ação enzimática de fosfolipases A₂ pode resultar na liberação de ácido araquidônico (precursor de lipídios bioativos pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase) e lisofosfolipídios que atuam principalmente na resposta inflamatória e na cascata de coagulação sanguínea (KIM et al., 2004; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008). Em 2004, Weber e colaboradores descobriram alguns metabolitos produzidos por fungos com ações anti-inflamatórias, o ácido mevinico e o phomol, sendo os dois extraídos de *Phomopsis* spp. um fungo endofítico da planta *Erythrina cristagalli*. Essa ação anti-inflamatória é resultante da inibição da atividade das fosfolipases A₂ impedindo que haja a ligação das mesmas aos substratos avaliados.

8.2 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Na avaliação da atividade hemolítica nenhum dos extratos apresentou citotoxicidade sobre os eritrócitos humanos. Os extratos HZM39 e HZM41 extraídos do fungo *Muscodor vitigenus* inibiram significativamente (26,67%) a hemólise causada pela ação da peçonha de *B. moojeni*. O extrato de código COAD 1899 extraído do fungo *Muscodor coffeanum* também inibiu significativamente a ação da peçonha em 23,33% (Figura 2).

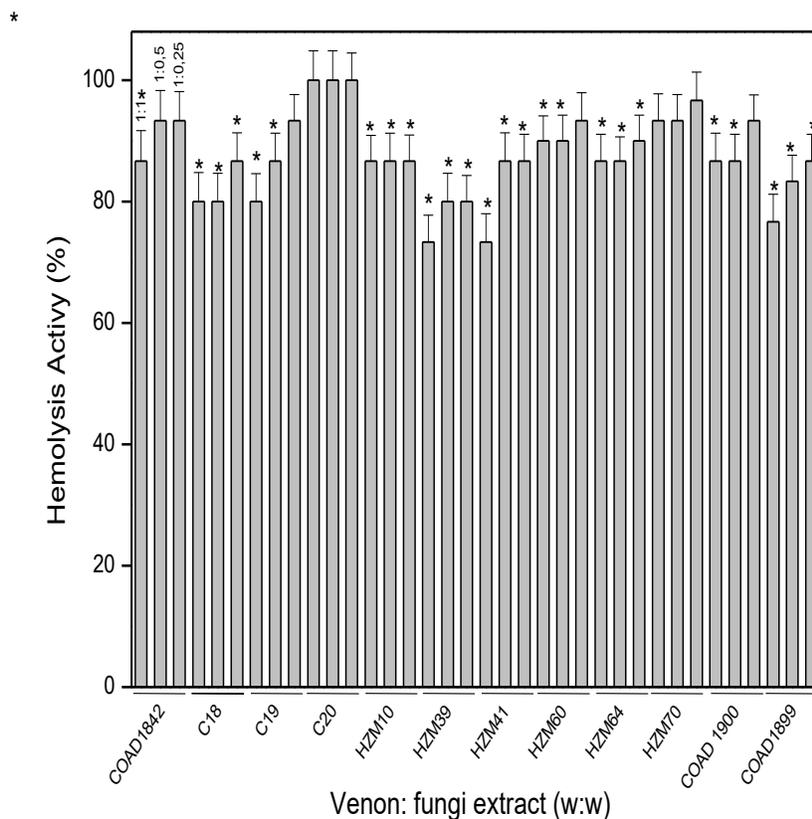


Figura 2: Efeito dos extratos fúngicos sobre a atividade citotóxica, avaliada em eritrócitos humanos, induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg). O controle contendo apenas peçonha foi considerado como 100%. Dados apresentados como médias de triplicatas ±SD. (*) As médias diferem estatisticamente do controle positivo a 5% de significância.

O mecanismo de ação das peçonhas de serpentes em relação à sua citotoxicidade é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com fosfolipídios e proteínas, induzindo uma deformação na membrana com conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular (KARABALIEV et al., 2003). Os ensaios de avaliação da

citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou anti-citotóxico das amostras, sendo de extrema importância durante o desenvolvimento de produtos (ex: farmacêuticos, alimentícios e cosméticos) destinados ao uso humano ou animal. Assim como no teste anterior já existem relatos de fungos que produzem metabolitos com ação anti-inflamatória, sendo assim os metabolitos produzidos pelos extratos de fungos testados possuem potencial inibidor da ação de fosfolipases A₂ sobre os eritrócitos humanos, reduzindo a hemólise e a produção de mediadores da inflamação. Outra hipótese plausível seria a interação dos metabolitos fúngicos com componentes da membrana celular, impedindo ou diminuindo a ação de algumas toxinas sobre lipídeos e ou proteínas das membranas. De acordo com o trabalho realizado por Weber e colaboradores (2004), o fungo da espécie *Phoma medicaginis* extraído das plantas *Medicago sativa* e *Medicago lupulina* possui ação antibiótica e ação inibidora de apoptose em células cancerosas.

8.3 Atividade trombolítica

Neste teste os extratos apresentaram resultados significativos relacionados principalmente ao fungo *Muscodor coffeanun* (COAD 1900) que promoveu 93,49% de inibição da diluição de trombos induzida pela peçonha. O mesmo extrato também foi capaz de inibir significativamente a atividade em suas menores concentrações 1:5 e 1:0,25 (66,86% e 66,27%, respectivamente). Outros extratos (HZM60, HZM64 e HZM70) também se mostraram efetivos na inibição da atividade trombolítica sendo responsáveis por inibições superiores à >50% (Figura 3).

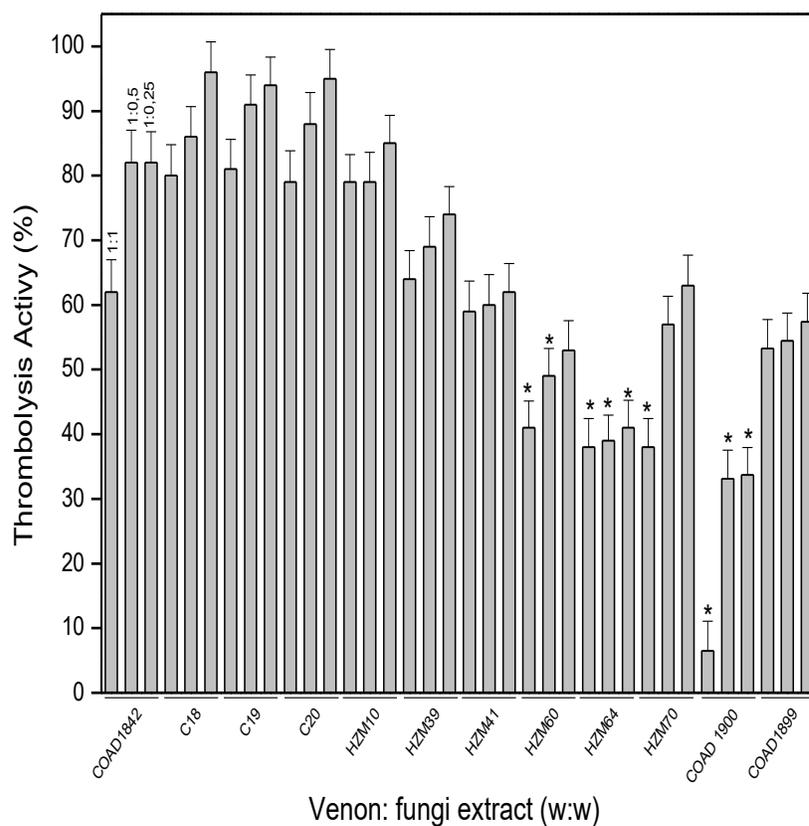


Figura 3: Efeito dos extratos fúngicos sobre a atividade trombolítica induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (40 μ g). O controle contendo apenas peçonha foi considerado como 100%. Dados apresentados como médias de triplicatas \pm SD. (*) As médias diferem estatisticamente do controle positivo a 5% de significância.

Considerando que as interações moleculares de enzimas com seus substratos ou inibidores geralmente ocorrem na razão molecular de 1:1, proporções de diferentes princípios ativos presentes no extrato em relação às diferentes classes de enzimas da peçonha (encontradas em concentrações

variadas) indicam que algumas proporções avaliadas na atividade trombolítica se aproximaram da razão molar ideal para ocorrer interações entre as moléculas. É válido mencionar que no ensaio de trombólise diferentes classes de enzimas podem atuar de forma independente (ex: fosfolipases A₂, serinoproteases e metaloproteases) assim como em sinergismo (ex: hialuronidases, L-aminoácido oxidases, etc.).

A atuação dos extratos fúngicos pode estar relacionada a ligação ao sítio ativo de algumas toxinas presentes nas peçonhas impedindo que as mesmas se liguem aos respectivos substratos. Interações com regiões hidrofóbicas poderiam explicar a ação de compostos de baixa polaridade, também presentes nos extratos.

8.4 Atividade coagulante

Os resultados apresentados para o teste de coagulação do plasma citratado foram bastante variados. O extrato do fungo *Simplicillium* sp. (C18) inibiu a coagulação da peçonha por 58 segundos, os extratos *Muscodor vitigenus* (HZM10), *Muscodor yucatanensis* (HZM60) e *Muscodor coffeanum* (COAD 1900) na proporção de 1:1 inibiram a ação da peçonha em 31s, 41s e 30s respectivamente. Outros extratos (COAD 1842, C19 HZM64 e HZM70) induziram inibições dessa atividade estendendo o tempo de coagulação por aproximadamente 10 segundos. Por outro lado, um dos extratos de *Muscodor vitigenus* (HZM41) potencializou a ação coagulante, acelerando a formação do coagulo em 16s em sua maior dose quando comparado com o controle contendo apenas peçonha bruta de *B. moojeni* (70s), como mostra os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito dos extratos fúngicos sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (10µg).

Sample	unincubated sample	1:1	1:0,5
<i>B. moojeni</i>	70	-	-
COAD 1842	-	88a	69
COAD 1899	-	77	72
COAD 1900	-	100a	69
C20	-	77	71
HZM10	-	101a	70
HZM39	-	73	70
HZM41	-	54b	61
HZM60	-	111a	74
HZM64	-	95a	76
C18	-	128a	76
HZM70	-	96a	88a
C19	-	92a	82a

Dados correspondem as médias de ensaios feitos em triplicatas \pm SD de peçonha:extrato fúngico (m:m). (a) Difere estatisticamente do controle em inibição. (b) Difere estatisticamente do controle em potencialização. (-) amostras não aplicadas. Foram considerados significantes diferenças de valores superiores a 11 segundos, considerando o tempo de protrombina entre 10 a 14 segundos. Resultados expressos na tabela em segundos (s).

Um grande número de microorganismos não patogênicos é capaz de produzir enzimas, dentre eles, os fungos filamentosos são particularmente interessantes devido ao seu fácil cultivo e produção de enzimas extracelulares com ampla aplicação industrial (GUIMARÃES et al., 2006). As enzimas proteolíticas merecem destaque, pois respondem por mais de 65% de todo o mercado mundial de enzimas (OSKOUIE et al., 2008), sendo 40% desse total de proteases de origem microbiana (RAO et al., 1998). Alguns fungos já são bastante conhecidos pela sua grande produção de proteases que é o caso de *Aspergillus oryzae*, uma espécie considerada não toxicogênica, apresentando um longo histórico de uso industrial (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009).

As inibições observadas para os extratos de fungos mostram um potencial de aplicações desses compostos como agentes anticoagulantes. Estudos posteriores poderão elucidar quais classes de moléculas produzidas por estes fungos são capazes de atuar como inibidores enzimáticos ou como adjuvantes da ação de enzimas.

9 CONCLUSÃO

Fungos como *Muscodor* sp. foram poucos descritos na literatura em vista dos efeitos de seus produtos metabólicos não voláteis. Este estudo mostra o grande potencial que esses fungos possuem na inibição de proteases e fosfolipases A₂ encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops* podendo representar novas fontes de substâncias com propriedades bioativas e de interesse industrial, principalmente fármaco-cosmético. Estudos que demonstram os aspectos estruturais e funcionais de novos inibidores de PLA₂ e proteases podem fornecer subsídios científicos para estudos de processos fisiopatológicos humanos, assim como possibilitam o desenvolvimento de terapias alternativas para os tratamentos de distúrbios relacionados às atividades dessas enzimas, considerando a alta

homologia estrutural e funcional que várias toxinas possuem em relação às enzimas humanas.

10 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os autores expressam sua gratidão à Universidade Federal de Lavras pelo apoio estrutural e logístico.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. V., YARA, R., ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, p. 467-470, 2005.

ALY, A. H., DEBBAB, A., PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2/3, p. 51-66, 2007.

CINTRA A. C., DE TONI L. G., SARTIM M. A., FRANCO J.J., CAETANO R. C., MURAKAMI MT AND SAMPAIO S. V. Batroxase, a new metalloprotease

from *Bothrops atrox* snake venom with Strong fibrinolytic activity. **Toxicon** v. 60, p. 70-82, 2012.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DEEPA M., GOWDA T. V. Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnifera*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 408, p. 42-50, 2002.

DEMAIN A. L., SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J Antibiot**, v. 62, p. 5-16, 2009

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185-201, 2014.

DUNCAN, B. K., ROCKSTROCH, P. A., WARNER, H. R. **J. Bacteriol.** v. 134, p. 1039, 1978.

ESTÊVÃO-COSTA, M. I., DINIZ, C. R., MAGALHÃES, A., MARKLAND, F.S., SANCHEZ, E.F. 'Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems', **Thromb. Res.**, v. 99, p. 363-376, 2000.

GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D. W., HAWGOOD, B. J., ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, p. 85-98, 1984.

GUIMARÃES, L. H. S., NOGUEIRA, S. C. P., MICHELIN, M., RIZZATTI, A. C. S., SANDRIM, V. C., ZANOELO, F. F., AQUINO, A. C. M. M., JUNIOR, A. B., POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of

enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUO, B. et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hcmv protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 602-604, 2000.

GUTIERREZ J. M., AVILA C., ROJAS E., CERDAS L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4: 411-13, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F., GENE, J. A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z., SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**. v.27, p. 735-45, 1989.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KARABALIEV, M., KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v. 88, p. 101-105, 2003.

KIM, H. P. et al. **Pharmacol.** p. 96, 229, 2004.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. general properties. **Journal of Genetic and Physiology**, v. 30, p. 291-310, 1947.

KUSARI, S., SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Report**, v. 28, p. 1203-1207, 2011

LIZANO S., LOMONTE, B., FOX, J. W., Gutiérrez J. M. Biochemical

characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. J.** v. 59, p. 326-853, 1997.

LÓPEZ-POSADAS, R. et al. **Biochem. Pharmacol.** p.76-495, 2008.

MAJEED, R. et al. Bakuchiol derivatives as novel and potent cytotoxic agents: a report. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 55-67, 2012.

MCCLEARY, R. J. R., KINI, R. M. 'Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads', **Toxicon**, v. 62, p. 56-74, 2013.

MONTEIRO, M. C. P. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **Bioscience Journal**, 2016.

OLIVEIRA C. H., SIMÃO A. A., TRENTO M. V., CÉSAR P. H., MARCUSSI S. Inhibition of proteases and phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. **An Acad Bras Cienc.**, v. 88, p. 2005-2016, 2016.

ONDEYKA, J. G. et al. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 38, p. 8809-8816, 1997.

OSKOUIE, S. F. G., TABANDEH, F., YAKHCHALI, B., EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 37-42, 2008.

PEIXOTO NETO P. A. S., AZEVEDO J. L., ARAÚJO W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciênc Desenvol.**, v. 29, p. 6276, 2002.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol R.**, v. 62, p. 597–635, 1998.

ROCHA, C. F. D., DUTRA, G. F., VRCIBRADIC, D., MENEZES, V. A. The terrestrial reptile fauna of the Abrolhos Archipelago: species list and ecological aspects. **Braz. J. Biol.**, v. 62, p. 285-291, 2002.

RODRIGUES, V. et al. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v. 381, p. 213-224, 2000.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SILVA E. O. Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxicas e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – **Universidade de São Paulo**; 2010.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 11, p. 2022-2031, 2008.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

THOLL, D. et al. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540-560, 2006.

TRUMP, B. F., BERESKY, I. K., OSORNIO-VARGAS, A. R., Cell death and the disease process, the role of calcium. In Bowen, Lockshin (eds) Cell death in biology and pathology. **Chapman & Hall**, London, p. 209-242, 1981.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A. G., SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 2009.

WEBER, A. P. M., SCHNEIDERREIT, J., VOLL, L. M. Using mutants to probe the *in vivo* function of plastid envelope membrane metabolite transporters. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 1231–1244, 2004.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHU, F. et al. Applications of *in vivo* and *in vitro* solid-phase microextraction techniques in plant analysis: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 794, p. 1-14, 2013.