



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química



**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTICOLINESTERÁSICA E LARVICIDA DO
FUNGO *Curvularia lunata* E LEVANTAMENTO
QUIMIOTAXONÔMICO DO COMPLEXO
*Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus***

HÊNIA JOELIA MAGALHÃES CRUZ

Salvador

2013

HÊNIA JOELIA MAGALHÃES CRUZ

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTICOLINESTERÁSICA E LARVICIDA DO
FUNGO *Curvularia lunata* E LEVANTAMENTO
QUIMIOTAXONÔMICO DO COMPLEXO
*Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus***

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Bahia, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Química, para a obtenção
do título de Mestre em Química**

**Orientadora: Dra. Regina M. G. dos Santos
Co-Orientadora: Dra. Elisangela F. Boffo**

SALVADOR

2013

Cruz, Hênia Joelia Magalhães.

Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobianas, anticolinesterásica e larvicida do fungo *Curvularia lunata* e levantamento quimiotaxonômico do complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* / Hênia Joelia Magalhães Cruz. - 2014.

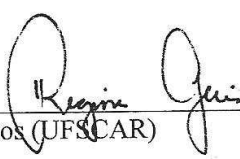
155 f.; il.

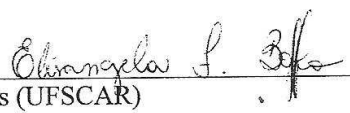
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina Maria Geris dos Santos.


HÊNIA JOÉLIA MAGALHÃES CRUZ

Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana, anticolinesterásica e larvicida do fungo *Curvularia* sp e levantamento quimiotaixonômico do complexo fúngico *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Regina Maria Geris dos Santos - Orientadora 
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Elisângela Fabiana Boffo – Co-Orientadora 
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta 
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Frederico Guará Cruz 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 14 de junho de 2013.

Ofereço,

*Ao bom Deus, minha fortaleza, pela
presença constante em minha vida, por
guiar e iluminar meus caminhos e me
amparar nos momentos difíceis.*

Dedico,

*Aos meus pais Orlando (in
memorian) e Zenaide, pelo exemplo,
amor e dedicação ao longo desta
caminhada.*

*Ao Luciano e Laura, meus bens mais
preciosos!*

Agradecimentos

Ao bom Deus, por ter me guiado ate aqui.

À Profa. Dra. Regina Geris, pela orientação, paciência e apoio ao longo da realização deste trabalho, não apenas nas questões profissionais, mas principalmente pela amizade desenvolvida durante estes anos.

À Profa. Dra. Elisangela Boffo, pela co-orientação e amizade.

À minha mãe, Zenaide, pelo exemplo de força e caráter, pelo amor incondicional, pelos conselhos sempre certos, por entender minhas escolhas e por aceitar a distância.

Ao meu marido, Luciano, pelo companheirismo, pelo carinho e paciência, por aturar meus momentos de estress, por acreditar em mim e pelas contribuições.

À minhas irmãs, Gisélia e Heloisa e prima Jaqueline, pela compreensão e paciência.

À querida professora Nídia Franca Roque, pelas contribuições, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao querido amigo Paulo Ribeiro, pelo incentivo e pelas contribuições.

Aos professores do Instituto de Química da UFBA pelo convívio, amizade e ensinamentos, em especial aos professores Frederico Guaré, Jose Roque e Marcos Malta.

Às professoras Isley Fehlberg e Lourdes Cardoso, pela orientação na realização dos ensaios antimicrobianos e pela amizade.

Ao professor Massuo Jorge Kato pela contribuição na realização dos espectros de massas.

Aos professores Eudes Veloso e Marta Valéria, por disponibilizarem seus laboratórios para o desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, Filipe Neves e Luís Eduardo, pela colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos (LBQM): Ailton, Ivan, Bárbara, Mauricio, Luiz Henrique e Leonardo, pela amizade e companhia no dia a dia e em especial à Adriana Fontes pela providencial ajuda.

Aos amigos do GESNAT, em especial Miquéias, Gaúcho, Heiter e Carine, pela torcida.

Aos amigos Roberto, Laiana e Lílian, por estarem ao meu lado se fazendo presentes desde 2005.1, pelas horas de estudo e diversão, pelo apoio e pela torcida.

À minhas amigas Carina, Marcela e Lidiane por não me deixarem desistir, por me ajudarem na concretização desse sonho e pela torcida, sempre.

Aos meus queridos amigos e companheiros de Universidade, pela torcida, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e bons momentos de descontração.

Aos demais amigos e familiares, pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA, pela oportunidade de crescimento profissional e ao CNPq e Fapesb, pelo apoio financeiro.

“Que a gente nunca desaprenda a recomeçar.

E se preciso, todos os dias...”



Fonte: Quino (2003, tira 487)

Sumário

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
EPÍGRAFE.....	VI
SUMÁRIO.....	VIII
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XXI
PRINCIPAIS ABREVIATURAS.....	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos Gerais.....	2
1.2 Sustâncias Bioativas Obtidas de Microrganismos.....	5
1.3 Obtenção de Perfil de Extratos Brutos.....	10
1.4 Fungos.....	11
1.5 O Gênero <i>Curvularia</i>	18
1.6 O Complexo <i>Bipolaris-Curvularia-Cochliobolus</i>	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	26

3.3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	40
3.4 MICRORGANISMO.....	40
3.4.1 Obtenção do Microrganismo.....	40
3.4.2 Confirmação do Espécie.....	40
3.4.3 Crescimento Radial.....	40
3.5 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO.....	41
3.5.1 Reativação do Microrganismo.....	41
3.5.2 Meios de Cultura e Fermentação.....	41
3.5.3 Obtenção dos Extratos.....	41
3.5.4 Análise dos Extratos por Cromatografia em Camada Delgada.....	45
3.5.5 Análise dos Extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos de Diodo (CLAE-DAD).....	45
3.5.6 Análise dos Extratos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	46
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO.....	46
3.6.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica (AChE).....	46
3.6.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	47
3.6.3 Avaliação da Atividade Larvicida.....	48
3.7 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO <i>Curvularia</i> EM MEIO ME E CZAPECK.....	49
3.7.1 Cultivo em Larga Escala.....	49
3.7.2 Obtenção dos metabólitos secundários isolados do extrato micelial em meio ME.....	50
3.7.2.1 Estudo das frações CL-MEM-1, CL-MEM-2, CL-MEM-3 e CL-MEM-5.....	51
3.7.2.3 Estudo da fração CL-MEM-5.....	52
3.7.2.4 Estudo da fração CL-MEM-7.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

4.1 O COMPLEXO <i>CURVULARIA-BIPOLARIS-COCHLIOBOLUS</i>	54
4.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Curvularia lunata</i>	68
4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA ESPÉCIE <i>Curvularia lunata</i>	70
4.3.1 Crescimento do <i>Curvularia lunata</i> em diferentes meios de cultura.....	70
4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos Extratos.....	74
4.3.3 Determinação do Perfil Químico dos Extratos Brutos a partir de CLAE-DAD e RMN de ¹ H.....	75
4.3.3.1 Perfil do extrato do fungo cultivado em meio batata e dextrose.....	76
4.3.3.2 Perfil do extrato do fungo cultivado em czapeck enriquecido com extrato de levedura 2%.....	80
4.3.3.3 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de malte.....	83
4.3.3.4 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de malte e dextrose.....	86
4.3.3.5 Perfil do extrato do fungo cultivado em farinha de arroz.....	88
4.3.3.6 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de levedura.....	91
4.3.3.7 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de levedura e dextrose.....	94
4.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTOS	98
4.4.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica (AChE).....	98
4.4.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	99
4.4.3 Avaliação da Atividade Larvicida.....	102
4.5 ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO DE <i>CURVULARIA LUNATA</i> CULTIVADO EM EXTRATO DE MALTE	103
4.5.1 Análise da Fração CL-MEM-5.5.17.3.....	103
4.5.1.1 Elucidação estrutural da substância CL-01.....	105
4.5.2 Análise da Fração CL-MEM-5.5.17.2.....	124

4.5.2.1	Elucidação estrutural das substâncias CL-02 e CL-03.....	124
4.5.3	Estudo Biossintético das Perilenoquinonas.....	131
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

Resumo

“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTICOLINESTERÁSICA E LARVICIDA DO FUNGO *Curvularia lunata* E LEVANTAMENTO QUIMIOTAXONÔMICO DO COMPLEXO *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus*” A revisão bibliográfica sobre os metabólitos secundários isolados de espécies fúngicas dos gêneros *Curvularia*, *Bipolaris* e *Cochliobolus* foi realizada com o objetivo de comparar o perfil metabólico deste três gêneros visando contribuir para a classificação taxonômica deste complexo. Como resultados, foram encontrados metabólitos secundários pertencentes às classes dos policetídeos (incluindo antraquinonas, lactonas macrocíclicas e compostos fenólicos), terpenoides (sesterpenoies e sesquiterpenoides), esteróides e alcalóides. Os policetídeos como as lactonas macrocíclicas curvularinas foram descritas somente para fungos do gênero *Curvularia* e alguns *Cochliobolus*, enquanto que os sesterpenoides foram encontrados nos gêneros *Bipolaris* e *Cochliobolus*, permitindo sugerir que as lactonas sejam marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Curvularia* e as espécies de *Cochliobolus* relacionadas (teleomórficas), e que os sesterpenoides são marcadores do gênero *Bipolaris* e os teleomorfos do gênero *Cochliobolus*. A análise dos extratos oriundos do cultivo de *Curvularia lunata* em diferentes meios de cultura foi realizada para verificação da influencia da fonte de carbono sobre a produção de metabólitos secundários. Os métodos utilizando a cromatografia em camada delgada comparativa, cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear de hidrogênio permitiram estimar a diversidade química conforme a fonte de carbono usada. Os meios de cultura Czapeck, batata e dextrose e extrato de malte apresentaram mais sinais nos cromatogramas e nos espectros de RMN de ^1H com relação aos demais, por isto estes meios foram considerados os meio de culturas ideais para o estudo do metabolismo secundário. Além disso, foi possível inferir a presença da 11- α -metoxicurvularina nos extratos do fungo cultivado em batata e dextrose e farinha de arroz. Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos (atividade antimicrobiana, anticolinesterásica e larvicida). Os extratos obtidos do cultivo do fungo em batata e dextrose apresentaram atividade contra a levedura *Candida albicans*, enquanto os extratos oriundos do meio contendo extrato de levedura

mostraram atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Com relação à atividade anticolinesterásica, todos os extratos brutos oriundos do micélio continham um sinal com fator de retenção igual 0.7 que mostrou inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, destacando os extratos fúngicos resultantes do cultivo em meio contendo extrato de malte e meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura por apresentarem maior halo de inibição. Nenhum dos extratos apresentou atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Finalmente o fungo *Curvularia lunata* foi cultivado em larga escala em meio contendo extrato de malte selecionado pela sua atividade anticolinesterásica. A investigação química inicial resultou no isolamento de três derivados perilenoquinônicos: dois já descritos na literatura como dihidroalterperilenol e alterperilenol, mas obtidos pela primeira vez no gênero *Curvularia* e o perileno de estrutura inédita, identificado como 12-metilstemfitriol.

Abstract

“CHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ASSAYS (ANTIMOCROBIAL, ANTICHOLINESTERASIC AND INSECTICIDAL) FROM THE FUNGUS *Curvularia lunata* AND QUIMIOTAXONOMIC SEARCH FROM THE FUNGAL COMPLEX *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus*” A literature revision of secondary metabolites isolated from fungal species of *Curvularia*, *Bipolaris* and *Cochliobolus* genera was performed with the aim of get their metabolic profile in order to contribute to the taxonomic classification on this complex. As result were found secondary metabolites belonging to the polyketides (including anthraquinones, macrocyclic lactones and phenolic), terpenoids (mainly sesterpenoids), steroids and alkaloids. Polyketides like the macrocyclic lactone curvularins were described only for fungi from the genus *Curvularia* and the related teleomorphic *Cochliobolus* species, while sesterpenoids such as ophiobolins was described for *Bipolaris* species as well as their related *Cochliobolus*, suggesting these lactones and sesterpenoids as quimiotaxonomic marker for *Curvularia* and *Bipolaris* genera, respectively. An analysis of extracts derived from cultivation of *Curvularia lunata* on several media was performed to investigate the effect of carbon source on secondary metabolism of the fungus. As analytical strategy based on TLC (thin layer chromatography), high performance liquid chromatography with diode array detection and nuclear magnetic resonance of hydrogen allowed to get an estimative about chemical diversity under different carbon sources. Malt extract, Czapeck plus 2% of yeast extract and potato and dextrose extracts were the media that exhibited the most signals in chromatograms and ¹H NMR spectra, indicating them as the ideal culture media for secondary metabolism studies. Furthermore, we can suggest that the compounds 11- α -methoxycurvularin were found in fungal extracts derived from the cultivation of *Curvularia* in potato and dextrose and rice flour media. In addition, those extracts were also evaluated for their biological activities (antimicrobial, anticolinesterásico and insecticidal). Extracts obtained from fungal growth in potato and dextrose media exhibited activity against the yeast *Candida albicans*, while extracts derived from the yeast extract cultivation showed antibacterial activity against *M. luteus*, *S. aureus* and *B. subtilis*. With respect the anticholinesterasic activity, all mycelial extract had a signal (R_f 0.7) that inhibited the enzyme AChE activity, being the fungal extracts from malt extracts and czapeck plus 2% yeast extract that had a marked inhibition halo. None of these

extracts had an activity against larval stage of the mosquito *Aedes aegypti*. Finally, the fungus *Curvularia lunata* was cultivated in large scale on malt extract medium, selected for its anticholinesterasic activity. Initial chemical investigation had resulted in the isolation of three perylene derivates: known dihydroalterperyleneol and alterperyleneol but being described for the first time in *Curvularia* genera and the novel perylene having a metabolic group, which was named as 12-methyl-stemphytriol.

Lista de Figuras

Figura 1. Salicilatos que marcaram o início do desenvolvimento dos fármacos: salicina (1), ácido salicílico (2) e acetil-salicílico (3).	3
Figura 2 Principais fontes de novos fármacos entre 1981 a 2006 (Adaptado de NEWMAN; CRAGG, 2013)	4
Figura 3 Exemplos de alguns metabólitos obtidos a partir de microrganismos e seus derivados semissintéticos usados na terapêutica e seus organismos produtores.	6
Figura 4 Exemplos de alguns metabólitos obtidos a partir de microrganismos que estão em fase de validação como potenciais agentes antimicrobianos e anticancerígenos (LAM, 2007).	8
Figura 5 Esquema de distribuição taxonômica dos seres vivos segundo Whittaker. Fonte: http://www.cientific.com/tema_classif_img4.html (24.10.12, 15:09h)	12
Figura 6. Exemplos de fungos unicelulares (6a e 6b) e pluricelulares (6c e 6d). Fig. 6a-b: a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : vista em microscopia eletrônica de varredura (6a) e colônias vistas em placa de Petri (6b). Fig. 6c-d: o fungo filamentosso <i>Monilinia fructicola</i> : hifas vistas em microscopia eletrônica de varredura (6c) e colônia vista em placa de Petri (6d) Fonte: www.pontociencia.org.br , acessado em 18/04/2013 as 10:35h	13
Figura 7 Exemplos de esporos assexuais; 07.a) esporangiósporos dentro do esporângio; 07.b) conídios organizados nas extremidades do conidióforos. Fonte: Morfologia, Fisiologia e Classificação dos Fungos – Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.	14
Figura 8 Exemplos de alcalóide do Ergot comumente encontrados em espécies do gênero <i>Claviceps</i>	16
Figura 9 Exemplos de fitoalexinas, substâncias responsáveis pela defesa das plantas contra microrganismos patógenos.	17
Figura 10 Exemplos de fitotoxinas produzidas por fungos	18
Figura 11 Diferenciação entre os grupos de espécies do gênero <i>Curvularia</i> .11-a: grupo “geniculata”; 11-b: grupo “maculans”; 11-c: Grupo “lunata”. Fonte: Adaptado de Watanabe, 2002.	20
Figura 12 Morfologia dos conídios em espécies dos gêneros <i>Cochliobolus</i> , <i>Bipolaris</i> e <i>Curvularia</i>	23
Figura 13 Esquema de obtenção dos extratos.	44
Figura 14 Crescimento fungico em ME em larga escala.	51
Figura 15 Esquema de obtenção dos extratos	51
Figura 16 Esquema de obtenção das substâncias CL-01, CL-02 e CL-03	53
Figura 17 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Curvularia</i>	58

Figura 18 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Curvularia</i> (continuação).....	59
Figura 19 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Curvularia</i> (continuação).....	60
Figura 20 . Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Bipolaris</i>	61
Figura 21 . Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Bipolaris</i> (continuação).....	62
Figura 22 . Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Bipolaris</i> (continuação).....	63
Figura 23 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Cochliobolus</i>	64
Figura 24 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero <i>Cochliobolus</i> (continuação).....	65
Figura 25 . Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos compostos isolados a partir de espécies do gênero <i>Curvularia</i> , NR = não relatado	66
Figura 26 Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos compostos isolados a partir de espécies do gênero <i>Bipolaris</i> , NR = não relatado.....	67
Figura 27 Aspectos macroscópicos do fungo <i>Curvularia lunata</i>. a) Fotografia retirada de http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiace_ous)/Curvularia/ e b) Fotografia do <i>Curvularia lunata</i> em placa de Petri com meio BDA – Depositado	69
Figura 28 Imagens de microscopia óptica do fungo <i>Curvularia lunata</i> ; a e b) Isolado fúngico LBQM-04; c, d e e) <i>Curvularia lunata</i> , fonte: FURTADO, 2007.....	70
Figura 29 Análise do crescimento radial do fungo <i>Curvularia lunata</i> em função do tempo. O fungo foi cultivado em meio de batata-dextrose-ágar e o diâmetro da colônia (mm) medido a cada 24 horas	71
Figura 30 Crescimento do <i>Curvularia lunata</i> em diferentes meios de cultura; a) BD; b) Czapeck; c) ME; d) MED; e) YE; f) YED; g) R; h) RD.....	74
Figura 31 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em meio Batata e Dextrose; a: Filtrado,b: Micélio, c: Controle (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min ⁻¹)	77
Figura 32 . Espectros de RMN de 1H em CDCl ₃ dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio batata e dextrose; a) filtrado, b) micélio e c) controle.....	78
Figura 33 Ampliação do espectro de RMN de 1H em CDCl ₃ do extrato bruto micelial cultivado em BD e estrutura da 11- α -metoxicurvularina (39).....	80
Figura 34 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em meio czapeck enriquecido com extrato de levedura 2%; a: Filtrado,	

b: Micélio, c: controle (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5mL.min ⁻¹)	81
Figura 35 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio czapeck, enriquecido com extrato de levedura 2%; a) filtrado, b) micélio e c) controle.....	82
Figura 36 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em extrato de malte; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0. 5mL.min ⁻¹).....	84
Figura 37 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio extrato de malte; a) filtrado, b) micélio c) controle.....	85
Figura 38 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em extrato de malte e dextrose; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min ⁻¹)	87
Figura 39 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio extrato de malte e dextrose; a) filtrado b) micélio c) controle	88
Figura 40 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em Extrato de Farinha de Arroz; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5mL.min ⁻¹)	89
Figura 41 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio de Farinha de Arroz; a) Filtrado, b) Micelial e c) Controle	90
Figura 42 Ampliação do espectro de RMN de 1H extrato bruto micelial cultivado em RD e estrutura da 11- α -metoxicurvularina (39)	91
Figura 43 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em extrato de levedura; a: Filtrado, b: Micélio, c: Branco (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min ⁻¹).....	92
Figura 44 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio de extrato de levedura; a) Filtrado, b) Micélio e c) Controle	93
Figura 45 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por <i>Curvularia lunata</i> em extrato de levedura e dextrose; a: Filtrado, b: Micélio, c: Branco (H ₂ O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min ⁻¹)	94
Figura 46 Espectros de RMN de 1H dos extratos brutos produzidos por <i>Curvularia lunata</i> em meio de extrato de levedura e dextrose; a) Filtrado, b) Micélio e c) Controle.	96
Figura 47 Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (RHEE et al, 2001) para os extratos brutos obtidos do cultivo do fungo <i>Curvularia lunata</i> .; 1: 0,1 mM de eserina (padrão); 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 correspondem aos extratos do filtrado, respectivamente; extrato de levedura, extrato de levedura e dextrose, farinha de arroz,	




czapeck, extrato de malte e dextrose, batata e dextrose e meio extrato de malte; 3, 5, 7, 9, 11, 13, e 15 correspondem respectivamente aos meios miceliais.....	99
Figura 48 Estrutura do curvularideo B.....	101
Figura 49 Estruturas do 4-epiradicinol (42) e da lunatina (43).....	102
Figura 50 Estrutura e Correlações observadas nos espectros de ^1H - ^1H COSY (—) e ^1H - ^{13}C HMBC () do monoacilglicerídeo	104
Figura 51 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01.....	112
Figura 52 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 6,5 e 13,0 ppm.....	113
Figura 53 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 6,5 e 8,5 ppm.....	113
Figura 54 . Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 0,4 e 5,0 ppm.....	114
Figura 55 Espectro de RMN de ^{13}C [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01...	115
Figura 56 Espectro de DEPT 135° [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01	116
Figura 57 . Espectro de ^1H - ^1H gCOSY [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01	117
Figura 58 Espectro de ^1H - ^1H gCOSY [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 2,2 e 5,0 ppm.....	118
Figura 59 Espectro de gHSQC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01....	119
Figura 60 . Espectro de gHSQC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 2,0 e 5,0 ppm x 20 e 100 ppm	120
Figura 61 Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01....	121
Figura 62 Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 6,5 e 13 ppm x 100 e 172 ppm	122
Figura 63 . Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 2,2 e 5,0 ppm x 40,0 e 100 ppm	122
Figura 64 . Correlações observadas nos espectros de ^1H - ^1H COSY (—) e ^1H - ^{13}C HMBC () da substância CL-01.....	107
Figura 65 . Proposta de estruturas parciais para os anéis A e B atribuídas para a substância CL-01.....	107
Figura 66 . Estruturas parciais A e B e correlações ^1H - ^1H COSY (—) e ^1H - ^{13}C HMBC () da substância CL-01.....	108
Figura 67 . Estruturas parciais I, II, III e IV para substância CL-01.....	108

Figura 68. Estruturas parciais V e VI para a substância CL-01.....	109
Figura 69. Possíveis estruturas para a substância CL-01.....	109
Figura 70. Estrutura da substância CL-01.....	110
Figura 71. Estereoquímica relativa proposta para a substância CL-01.....	124
Figura 72. Stemfritriol isolado a partir de culturas do fungo <i>Monodictys fluctuata</i>	127
Figura 73 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03.....	128
Figura 74. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03, região entre 6,5 e 13.0 ppm.....	128
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03, região entre 6,5 e 8,5 ppm.....	129
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03, região entre 0,5 e 6.0 ppm.....	130
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03.....	131
Figura 78. Estruturas químicas das substâncias dihidroalterperilenol e alterperilenol.....	131
Figura 79. Estruturas representativas das classes de perilenoquinonas.....	133

Lista de Tabelas

Tabela 01. Produtos naturais de origem microbiana em fase de desenvolvimento como agentes antimicrobianos ^a e antitumorais ^b	7
Tabela 02. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Curvularia</i> e suas atividades biológicas.....	27
Tabela 03. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Bipolaris</i> e suas atividades biológicas.....	32
Tabela 04. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Cochliobolus</i> e suas atividades biológicas.....	42
Tabela 05. Código e massa dos extratos brutos obtidos.....	44
Tabela 06. Frações, sistema de solventes e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto micelial em ME.....	51
Tabela 07. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir do fungo <i>Curvularia lunata</i>	100
Tabela 08. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN de ¹ H e deslocamentos de RMN de ¹³ C da substância CL-01.....	111
Tabela 19. Deslocamentos químicos, multiplicidade e constante de acoplamento no espectro de RMN de ¹ H e deslocamentos de RMN de ¹³ C do dihidroalterperilenol....	125
Tabela 10. Deslocamentos químicos, multiplicidade e constante de acoplamento no espectro de RMN de ¹ H e deslocamentos de RMN de ¹³ C do dihidroalterperilenol....	126

Principais Abreviaturas

AAS – Ácido acetil-salicílico

AChE – Acetilcolinesterase

ACN - Acetonitrila

ACTI – Iodeto de acetilcolina
APA – Área de Proteção Ambiental
ATCC – American Type Culture Collection
B. – Bipolaris
BD - Caldo de batata e dextrose
BDA - batata-dextrose-ágar
C. – Cochliobolus
CC – Cromatografia em coluna
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodo
Cu. – Curvularia
CZ - Caldo de czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura
DEPT 135° - Distortionless Enhanced Polarization Transfer
DMSO – dimetilsulfóxido
DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EM – Espectrometria de Massa
EUA – Estados Unidos da América
FDA - *Food and Drug Administration*

HTS - High Throughput Screening
IES-EM - Espectro de Massa de Alta Resolução com Ionização por “Electrospray”
ME - caldo de extrato de malte
MEA – extrato de malte-ágar
MED - caldo de extrato de malte e dextrose
ppm – partes por milhão
R - arroz
RD - Caldo de farinha de arroz
RMN - Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TMS – tetrametilsilano
UV – Ultravioleta
YE - Caldo de extrato de levedura
YED - Caldo de extrato de levedura e dextrose

Introdução

1.1 Aspectos Gerais

Ao longo da história, a Natureza tem provado ser uma rica fonte de compostos, que têm mostrado inúmeros fins, sendo as civilizações Orientais e Ocidentais ricas em exemplos do uso destes recursos. O emprego de fontes naturais tais como plantas, animais e microrganismos tem sido uma grande aliada da humanidade, pois oferecem uma variedade significativa de aplicações que englobam desde a alimentação até o tratamento de doenças (BOLZANI, 2006).

Com base em observações empíricas e no folclore, extratos de produtos naturais foram os primeiros e por um longo período de tempo, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade (GANESSEN, 2008). O estudo de plantas, conhecidas pelo saber popular, deu início à pesquisa em produtos naturais, buscando o isolamento de suas substâncias ativas. Devido à impossibilidade de obtenção de dados espectroscópicos naquela época a determinação estrutural destes compostos era realizado em um período consideravelmente longo, sendo que muitas vezes o processo de identificação dessas substâncias só era concluído apenas muito tempo depois de seu isolamento (YUNES, 2001). Dada a importância das plantas para o tratamento medicinal da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que possibilitou um rápido desenvolvimento de seus campos específicos, permitindo que muitas substâncias ativas fossem inseridas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (VIEGAS, 2006). Diversas revisões na literatura discutem amplamente o uso destes compostos como fonte de novos medicamentos e descrevem uma infinidade de indicações terapêuticas, a saber: contra o câncer, infecções, diabetes, entre outras (GALM e SHEN, 2007; LAM, 2007; HURYN e WIPF, 2008; HARVEY et al., 2008).

Um marco no desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais oriundos de plantas foi a descoberta dos salicilatos isolados do salgueiro branco (*Salix alba*). A salicina (**1**), (Figura 1), foi isolada em 1828 como princípio ativo de *S. alba*, por Jonham A. Buchner. A partir dela outros cientistas se empenharam em melhorar o rendimento e a qualidade obtida do extrato natural até que, em 1860, Hermam Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (**2**). Porém, em 1898, Felix Hofmann trabalhando para a companhia Bayer sintetizou o ácido acetil-salicílico (AAS, **3**, Figura 1) menos ácido que o ácido salicílico, mas com as mesmas propriedades analgésicas, figurando como o início do uso de drogas sintéticas inspiradas em produtos naturais isolados de plantas (RISHTON, 2008). A Aspirina[®], como é conhecida popularmente, é o medicamento mais conhecido e vendido em todo o mundo. Estima-se que apenas nos Estados Unidos mais de trinta bilhões de comprimidos são consumidos anualmente (CUNHA et al., 2009).

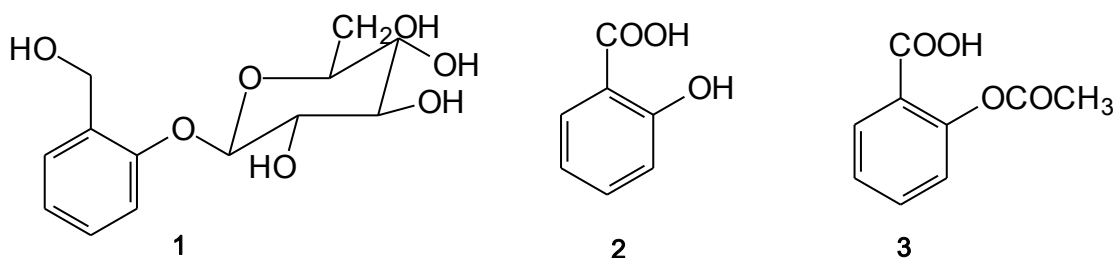


Figura 1. Salicilatos que marcaram o início do desenvolvimento dos fármacos: salicina (1), ácido salicílico (2) e acetil-salicílico (3).

Devido à enorme variedade estrutural dos compostos oriundos de fontes naturais, bem como, ao imenso potencial biológico desses compostos, pesquisas envolvendo produtos naturais constituem ainda, a melhor estratégia para descoberta de fármacos, visto que a diversidade química destes compostos é um dos fatores principais no processo de desenvolvimento de novas drogas, quaisquer que sejam suas fontes, sintéticas, naturais ou a partir de química combinatória (HARVEY, 2000).

Uma revisão da literatura feita por Furtado em 2004 relata que 244 substâncias produzidas desde 1995 foram testadas como protótipos para novas drogas, sendo que 83% são provenientes de origem natural, enquanto que apenas 17% são sintéticas. Estima-se que 63% e 75% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para o combate ao câncer e doenças infecciosas, respectivamente, eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007). Além disso, os produtos naturais, seus derivados sintéticos e compostos modelados em substâncias naturais representaram cerca de 66% dos fármacos aprovados neste período (Figura 2) (NEWMAN e CRAGG, 2007). Em um estudo mais recente, Newman e colaboradores (2013) reafirmam a importância dos produtos naturais como fontes de novas substâncias, mas não necessariamente como produtor da droga final. Além disso, o estudo destaca a rápida evolução no número de fármacos de produtos naturais de origem microbiana ou de interações de microrganismos com o hospedeiro em que foram isolados.

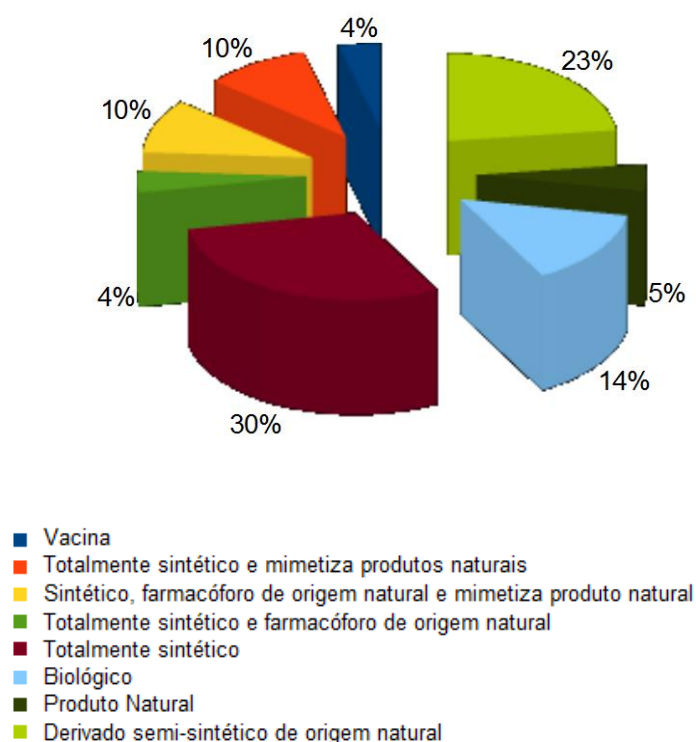


Figura 2 Principais fontes de novos fármacos entre 1981 a 2006 (Adaptado de NEWMAN; CRAGG, 2013)

Plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos interagem com o meio ambiente de forma complexa, produzindo metabólitos indispensáveis para sua sobrevivência (HARVEY, 2008). Strobel e colaboradores (2003) verificaram em seus estudos que do ponto de vista do metabolismo secundário, os microrganismos, como fungos e bactérias, ainda têm recebido pouca atenção. Apesar da literatura reportar uma grande diversidade em espécie e enorme variedade de aplicações biológicas, estes constituem um dos grupos menos estudados quimicamente (BERDY, 2005; PALMER e KELLER, 2010).

1.2 Sustâncias Bioativas obtidas de Microrganismos

A busca por compostos de origem microbiana tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. Em 1929, o acaso levou Fleming à descoberta da penicilina (4), fato que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas (PEREIRA e PITA, 2005). A partir daí, pesquisadores acadêmicos e de indústrias farmacêuticas intensificaram a procura por produtos bioativos derivados de microrganismos. Como resultado, obteve-se um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2008), tais como os antibióticos antibacterianos β -lactâmicos (4-7), aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos (8-9), glicopeptídeos e estreptograminas (10) (GUIMARÃES et al., 2009), agentes antitumorais como as antraciclinas (13), bleomicinas, actinomicinas (PUPO et al., 2006), agentes redutores do colesterol sanguíneo como as estatinas (11-12), agentes imunossupressores (14), entre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 1999; PEARCE, 1997), cujas estruturas químicas encontram-se apresentadas na Figura 3.

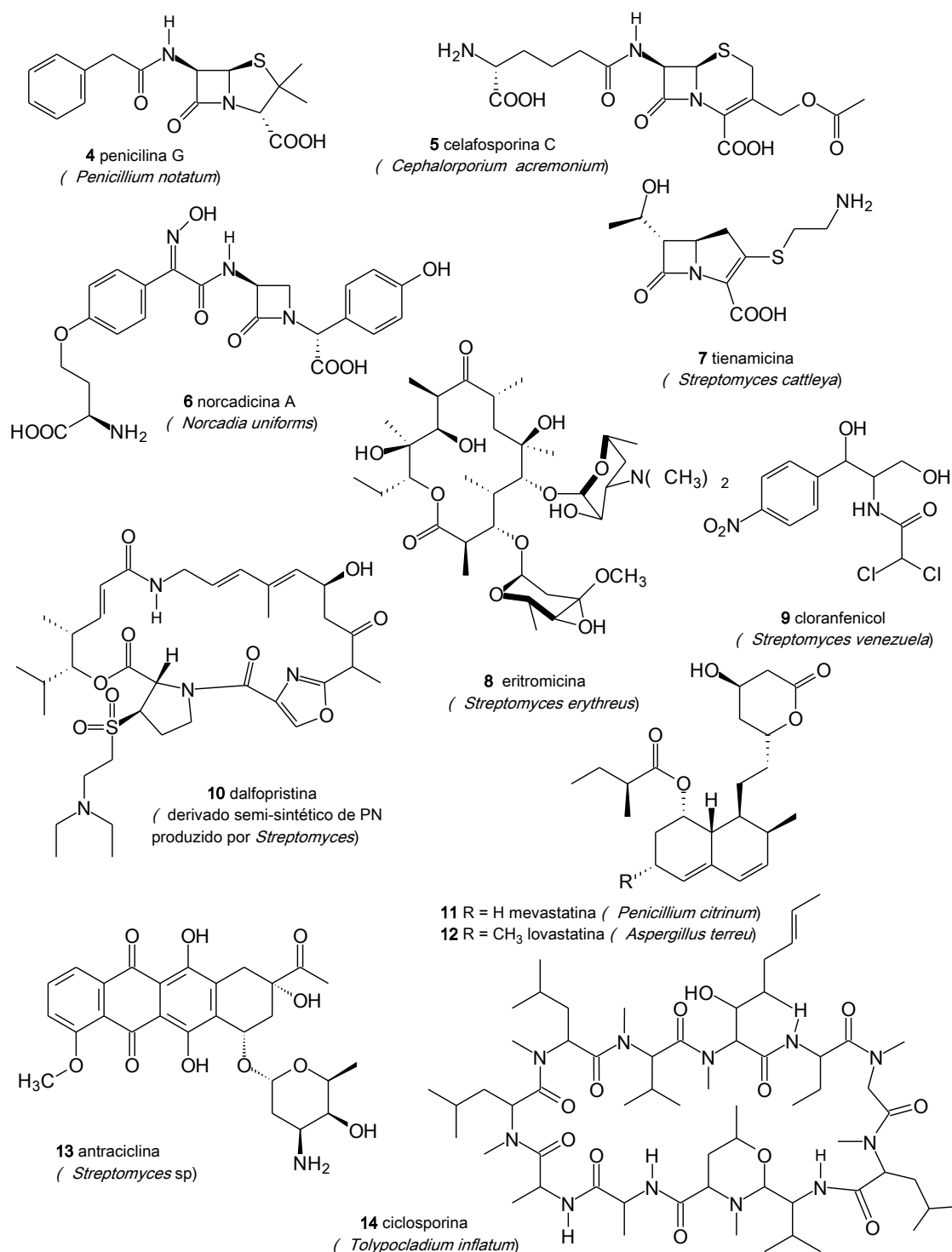


Figura 3 Exemplos de alguns metabólitos obtidos a partir de microrganismos e seus derivados semissintéticos usados na terapêutica e seus organismos produtores.

Além dos metabólitos microbianos já disponíveis no mercado existem aqueles que estão em fase de avaliação como possíveis agentes antimicrobianos e antitumorais (Tabela 1, Figura 4), demonstrando a contínua contribuição dos produtos naturais microbianos na busca por protótipos com

aplicações farmacêuticas importantes, como o tratamento de doenças infecciosas que se destacam em primeiro lugar como causa de morte no mundo seguido pelo câncer (LAM, 2007).

Tabela 01. Produtos naturais de origem microbiana em fase de desenvolvimento como agentes antimicrobianos^a e antitumorais^b.

Composto	Organismo produtor	Fase clínica¹	Ref.
arilomicina ^a (15)	<i>Streptomyces</i> sp	Pré-clínica	Kulanthaivel et al., 2004
irofulveno ^b (16)	<i>Clitocybe illudens</i>	Fase II	Yeo et al., 2007
ECO 0501 (17)	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Pré-clínica	Banskota, 2006
NPI 2358 ^b (18)	<i>Aspergillus</i> sp	Fase I	Nicholson et al., 2006
GE23077 (19)	<i>Actinomadura</i> sp	Pré-clínica	Mariani et al., 2005
vorinostatina ^b (20)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Fase II	Duvic et al., 2007
ixabepilona ^b (21)	<i>Sorangium cellulosum</i>	Fase III	Denduluri et al., 2007;

¹As fases clínicas segundo a ANVISA são definidas como:

- a) Fase pré-clínica: etapa em que a nova substância é testada em animais, após confirmação do potencial terapêutico com testes *in vitro*. Mais de 90% das substâncias testadas são eliminadas nesta fase, quer seja por não demonstrarem suficiente atividade farmacológica/terapêutica ou por se tornarem tóxicas em humanos.
- b) Fase I: Ocorre o primeiro estudo em seres humanos com pequenos grupos de pessoas voluntárias.
- c) Fase II: Primeiros estudos controlados em pacientes, para demonstrar efetividade da medicação
- d) Fase III: Estudos internacionais, de larga escala, em múltiplos centros, com diferentes populações de pacientes para demonstrar eficácia e segurança.
- e) Fase IV: Depois que um medicamento é disponibilizado para prescrição médica, informações adicionais são reunidas para avaliar seu uso, riscos e benefícios.

Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm> (acessado em 17/01/13, 09h18minh)

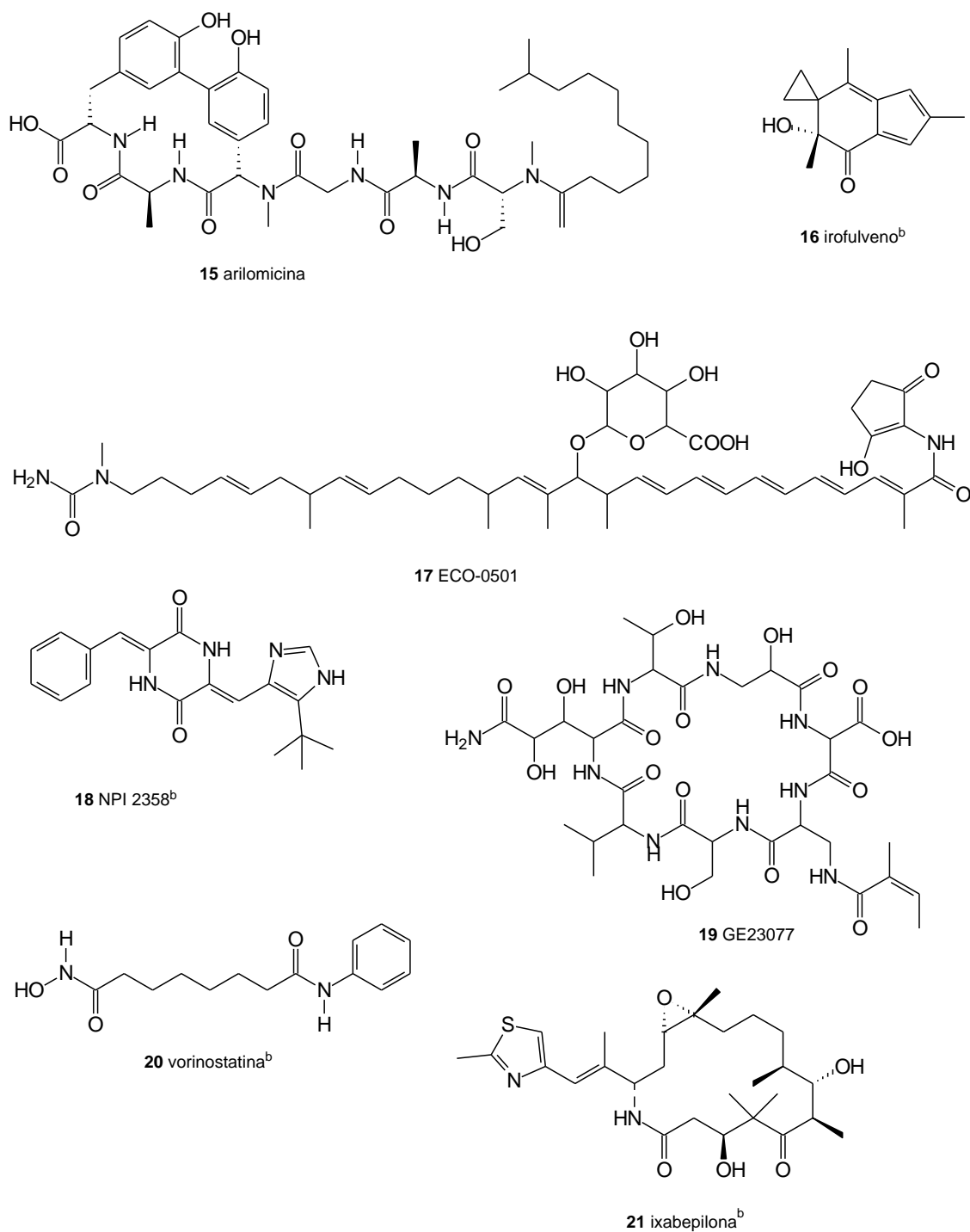


Figura 4 Exemplos de alguns metabólitos obtidos a partir de microrganismos que estão em fase de validação como potenciais agentes antimicrobianos e anticancerígenos^b (LAM, 2007)

Segundo Cortes et al. (2012), a ixabepilona (**21**), empregada em várias linhas de terapia anticâncer incluindo pacientes com resistência a taxanos, usado em tratamentos de câncer de mama metastático, já teve sua aprovação pela *Food and Drug Administration* EUA (FDA). O NPI 2358, oriundo de

Aspergillus sp, entrou na Fase I em 2006 como um novo agente vascular para o tratamento de tumores em período inicial e ainda se encontrava em fase de desenvolvimento (SHEN et al., 2010). Até o presente momento não foi encontrada nenhuma atualização sobre a fase atual em que se encontra o medicamento.

Uma das vantagens em se trabalhar com microrganismos está na possibilidade de se controlar os processos operacionais de isolamento e cultivo dos mesmos. Em comparação com plantas, por exemplo, os fungos apresentam crescimento em menor tempo e espaço e as condições de cultivo, tais como tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração, podem ser modificadas a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse (PEARCE, 1997). Além disso, o avanço das técnicas químicas de caracterização dos produtos naturais aliado ao isolamento de novas culturas de microrganismos a partir de novos nichos e substratos contribui significativamente para o aumento do número de metabólitos identificados (BORGES, 2008).

Recentemente, a literatura tem discutido novas abordagens na busca de compostos bioativos a partir de microrganismos, destacando-se o cultivo simultâneo de microrganismos (co-culturas) (BERTRAND et al., 2013), o remodelamento epigenético da biossíntese através de agentes químicos (WILLIAMS et al., 2008; ZHOU et al., 2011), o estudo sobre moléculas sinalizadoras (COX et al., 2010) e o uso de métodos genômicos para acessar e manipular as vias biossintéticas (SHERLACH e HERTEWECK, 2009).

O uso de técnicas como cromatografia em camada delgada (CCDC), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN) tem auxiliado os pesquisadores na identificação de compostos que futuramente possam ser avaliados para a produção de novas drogas (LARSEN et al., 2005). Outro ponto crucial para o sucesso na busca de novos fármacos é a utilização de ensaios biológicos mais robustos e confiáveis. Atualmente ensaios em larga escala conhecidos como *High Throughput Screening* (HTS) (BACKER et al., 2009) tem sido enormemente utilizados para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Estes ensaios são realizados por equipamentos automatizados que permitem triagem *in vitro* e *in vivo* de grandes

coleções de compostos, originados de química sintética, combinatória ou de extratos brutos, em escala reduzida (GUIMARÃES et al., 2009). As amostras que apresentam resultado promissor são, então, investigadas em etapas seguintes do processo.

1.3 Obtenção de perfil de extratos brutos

A obtenção do perfil de metabólitos secundários a partir de extratos brutos tem como objetivo a caracterização dos componentes principais do extrato, detecção de substâncias conhecidas na literatura e ainda identificar a presença de prováveis compostos inéditos, em um processo conhecido como desreplicação (LARSEN et al., 2005). A análise dos perfis metabólicos dos extratos serve ainda para se ter uma estimativa da diversidade química presente nos extratos (HIGGS et al., 2001).

O método mais simples de se obter o perfil dos compostos naturais em um extrato baseia-se na cromatografia em camada delgada (CCD). Os diferentes extratos são submetidos à CCD, sob condições padrão, e seus perfis de metabólitos são comparados. A utilização de padrões de substâncias conhecidas e de diferentes agentes reveladores nas placas cromatográficas podem ser usados para a detecção de compostos conhecidos e caracterização de grupos funcionais (LARSEN et al., 2005).

Outra técnica poderosa é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois permite a obtenção de *fingerprints* de muitos compostos encontrados em amostras altamente complexas. Estas impressões digitais podem ser usadas como ferramenta eficaz para a classificação, comparação, identificação ou tipificação de amostras e encontra generalizado uso, como exemplo, em investigações forenses e na caracterização quimiotaxonômica de microrganismos e plantas (HANSEN et al., 2005). A CLAE permite ainda, a separação de misturas complexas, como no caso de extratos brutos (LARSEN et al., 2005). A utilização da CLAE em associação com detectores de diodo (CLAE-DAD) permite a geração de espectros de absorção na região do UV para

a grande maioria das substâncias separadas durante o processo cromatográfico (SMEEDSGAARD & NIELSEN, 2005).

A técnica de ressonância magnética nuclear, tradicionalmente usada para elucidação estrutural de compostos puros ou misturas relativamente simples, tem sido empregada em alguns estudos na obtenção de perfil metabólico, embora seu uso ainda seja visto como um desafio (FOTAKIS et al., 2012; VANDENDRIESSCHE et al., 2013). A RMN é considerada rápida, conveniente e eficaz para diferenciar entre grupos de amostras relacionadas apenas com a comparação da distribuição e intensidade de sinais no espectro de RMN (LARSEN et al., 2005).

1.4 Fungos

Em 1866, o termo protista foi proposto para designar formas morfológicamente primitivas de vida, incluindo bactérias, algumas algas, protozoários, esponjas e os fungos (HAECKEL, 1866). Posteriormente, os seres procariotas foram separados dos eucariotas e os fungos foram incluídos no Reino Plantae. Contudo, Whittaker em 1969, propôs a divisão taxonômica dos organismos vivos em cinco reinos: Monera, Protista, Plantae, Fungi e Animalia, conforme esquematizado na Figura 5 (FEOFILOVA, 2000).

A criação de um reino a parte para classificação destes microrganismos foi possível graças à descoberta de algumas características inerentes a estes organismos que os diferenciavam das plantas, tais como: os fungos são microrganismos eucarióticos, quimiorganotróficos, com nutrição por absorção, produtores de esporos, sendo capazes de se reproduzirem tanto sexuada quanto assexuadamente; suas células estão envolvidas por parede celular rica em quitina e a membrana celular é rica em ergosterol (ALEXOPOULOS, 1996).

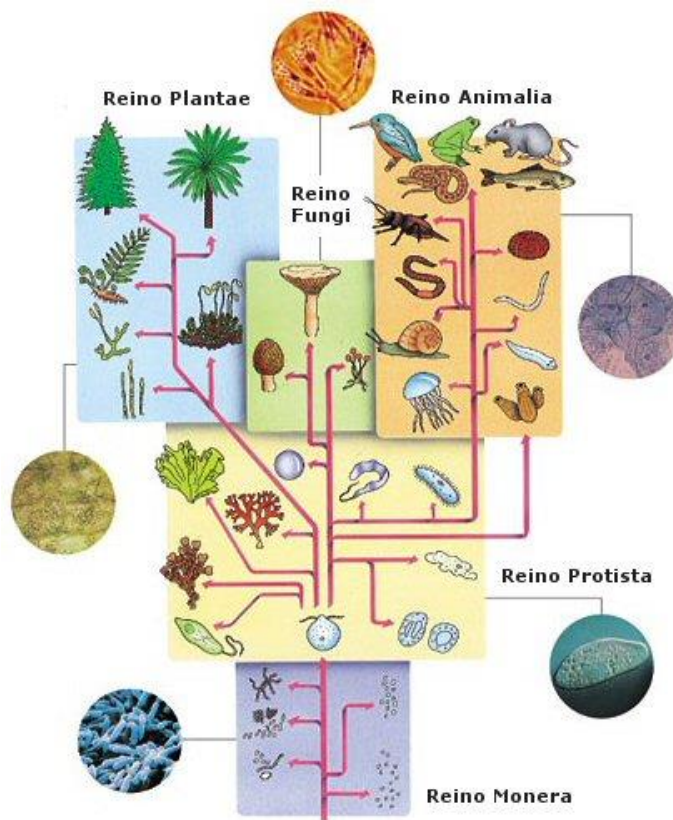


Figura 5 Esquema de distribuição taxonômica dos seres vivos segundo Whitaker. Fonte: http://www.cientic.com/tema_classif_img4.html (24.10.12, 15:09h)

Embora a divisão em cinco reinos seja a definição taxonômica mais difundida no meio educacional, atualmente os seres vivos foram redistribuídos em sete grandes reinos, a saber, Animalia, Protozoa, Eubacteria, Archaeobacteria, Fungi, Plantae e Chromista (FEOFILOVA, 2000).

O reino Fungi constitui o segundo maior grupo de organismos vivos sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos espalhadas pelo mundo, destas apenas cerca de 69.000 foram descritas até hoje, o que representa menos de 5% das espécies possivelmente existentes (HAWKSWORTH, 2001).

Fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou ainda multicelulares, como os fungos filamentosos, como mostra a Figura 6. Nos fungos multicelulares as células agrupam-se em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas. Esses filamentos celulares são denominados hifas

(Figura 6-c) e o agrupamento de hifas constituem o micélio (Figuras 6-d) (ALEXOPOULOS, 1996). O crescimento das hifas é apical, porém, existem algumas regiões com extrema capacidade de crescimento, principalmente àquelas relacionadas às funções reprodutivas. Um diminuto fragmento de hifa pode originar um novo indivíduo.

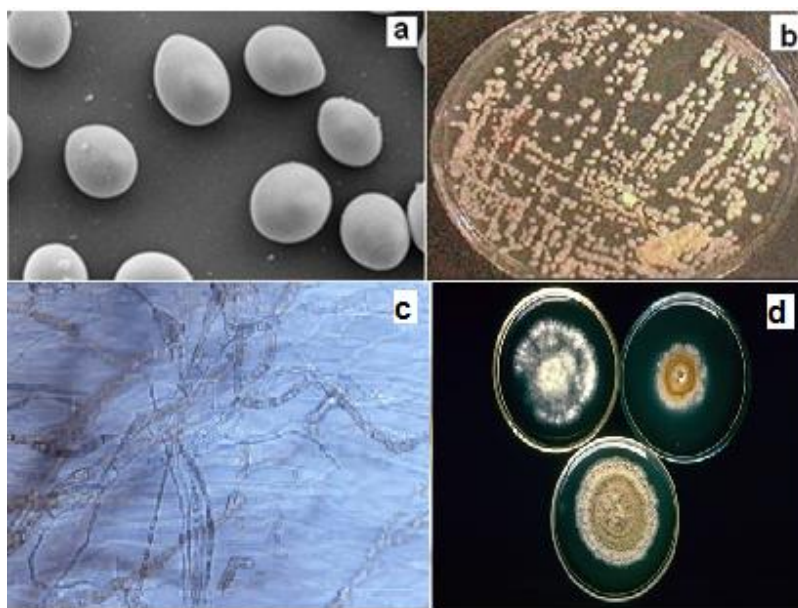


Figura 6. Exemplos de fungos unicelulares (6a e 6b) e pluricelulares (6c e 6d). Fig. 6a-b: a levedura *Saccharomyces cerevisiae*: vista em microscopia eletrônica de varredura (6a) e colônias vistas em placa de Petri (6b). Fig. 6c-d: o fungo filamentosso *Monilinia fructicola*: hifas vistas em microscopia eletrônica de varredura (6c) e colônia vista em placa de Petri (6d)
Fonte: www.pontociencia.org.br, acessado em 18/04/2013 as 10:35h

Os organismos vivos podem se reproduzir de duas maneiras: assexuada e/ou sexuadamente. Na reprodução sexuada dois indivíduos da mesma espécie sofrem fusão de suas características genéticas para reproduzir sua prole geneticamente recombinada, ao passo que, na reprodução assexuada ou clonal, um único indivíduo pode gerar sua prole, transmitindo a esta todo o seu material genético (LEE et al., 2010).

A maioria das espécies fúngicas pode se reproduzir de ambas as formas; assim a análise apenas de características morfológicas não deve ser utilizada para caracterizar o modo de reprodução destes organismos, uma vez que muitos

fungos que normalmente se autofertilizam possuem também a capacidade de se recombinarem com outros indivíduos. Muitos alternam a reprodução assexuada com a sexuada e em outros pode ocorrer apenas um modo de reprodução (TAYLOR et al., 2006). O termo teleomórfico é usado para descrever o estágio sexual de um fungo enquanto o termo anamórfico é usado para o estágio assexual (SHENOY et al., 2007).

Segundo Alexopoulos (1996), os métodos de reprodução assexuada podem ser sumarizados em quatro modalidades: (1) fragmentação da hifa, onde um fragmento pode se alongar para formar uma nova hifa; (2) fissão de células somáticas; (3) brotamento de células somáticas, onde cada broto produz um novo indivíduo e (4) produção de conídios. Na reprodução assexuada existem três tipos de esporos, a saber, esporangiósporos que são esporos internos formados dentro dos esporângios da hifa reprodutiva; conidióporos ou conídios, esporos externos imóveis produzidos na extremidade de um conidióforo e zoósporos são aqueles esporos móveis produzidos nos zoosporângios (ALEXOPOULOS, 1996). Na Figura 07, encontram-se ilustrados exemplos de esporos assexuais.

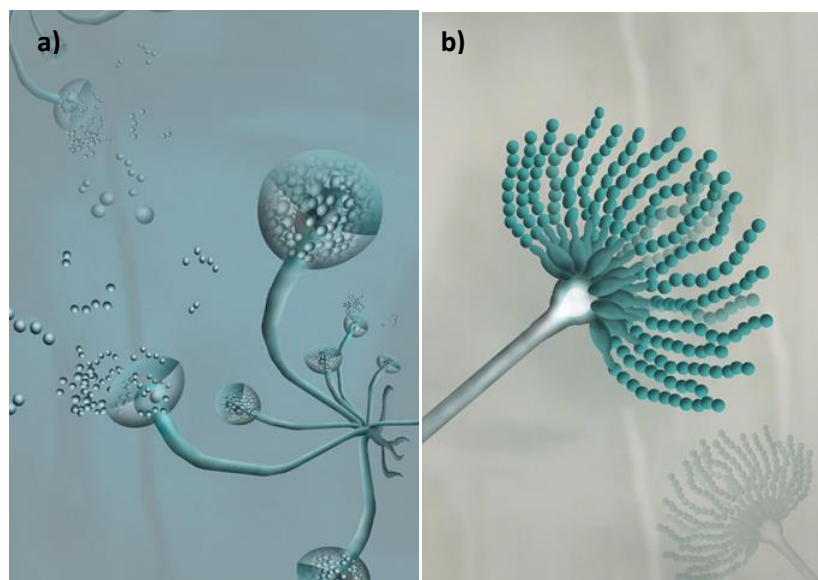


Figura 7 Exemplos de esporos assexuais; **07.a)** esporangiósporos dentro do esporângio; **07.b)** conídios organizados nas extremidades do conidióforos. Fonte: Morfologia, Fisiologia e Classificação dos Fungos – Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG.

Os fungos são encontrados na Natureza em associação com outros organismos, mantendo relações simbióticas. Essas associações podem ser positivas (mutualismo e comensalismo), negativas (predação e parasitismo) e neutras. Estes diferentes estilos de vida dependem do hospedeiro e de interações bióticas e abióticas (REDMAN et al., 2001). Em associações mutualísticas, o fungo convive pacificamente com o indivíduo hospedeiro, uma vez que os dois organismos sobrevivem assintomaticamente à associação, sendo ambos beneficiados. Em associações mutualísticas com plantas, por exemplo, o fungo recebe nutrição e abrigo, aumentando sua sobrevivência; a planta, em contrapartida, aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY e SCHARDL, 2002), e abióticos (SCHARDL et al., 2004). Dentre os fungos mutualísticos, existem os que vivem associados às raízes de plantas formando as micorrizas (mico = fungos; rizas = raízes); esta associação é fundamental para o crescimento e sobrevivência da planta hospedeira (TAHAT e SIJAM, 2012).

Outro exemplo de associação mutualista é observado nos fungos endofíticos do gênero *Claviceps*, encontrados principalmente em gramíneas; eles possuem a capacidade de produzir os alcalóides do Ergot, substâncias que, quando ingeridas junto com as plantas, provocam doenças em insetos e mamíferos herbívoros protegendo o fungo e a planta contra predadores (WALLWEY e LI, 2010). A Figura 08 exemplifica alguns alcalóides do Ergot.

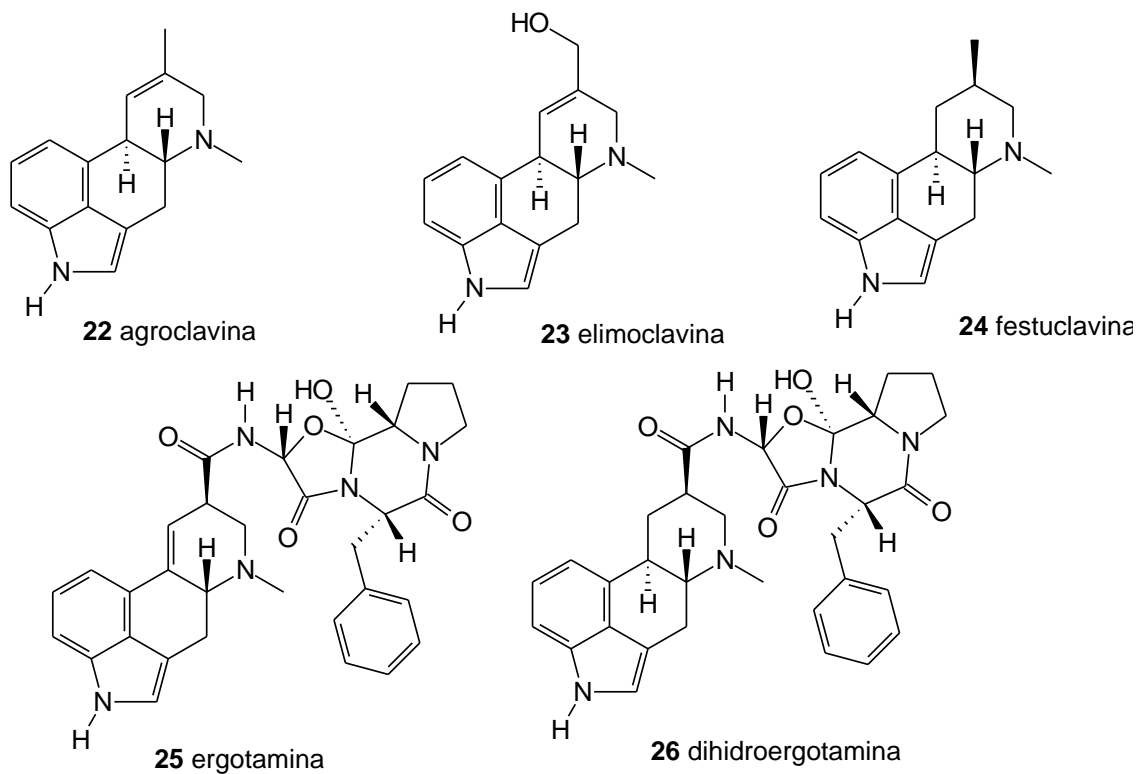


Figura 8 Exemplos de alcalóide do Ergot comumente encontrados em espécies do gênero *Claviceps*

Nas associações parasitárias, o fungo vive no interior dos tecidos do hospedeiro, de onde obtém proteção e nutrientes necessários para seu desenvolvimento, sendo neste caso, seu metabolismo prejudicial à planta, podendo, eventualmente causar a morte de seu hospedeiro (fungos predadores) (AGRIOS, 1988). A relação de parasitismo fungo-planta envolve a produção de fitoalexinas, que são substâncias produzidas pelas plantas em resposta ao estresse provocado por infecções ou contato com agentes patogênicos (Figura 09) (GLOER, 1995). Fitoalexinas são um grupo heterogêneo de compostos que mostram atividade biológica contra uma variedade de patógenos e são considerados marcadores moleculares de resistência a doenças (AHUJA et al., 2012).

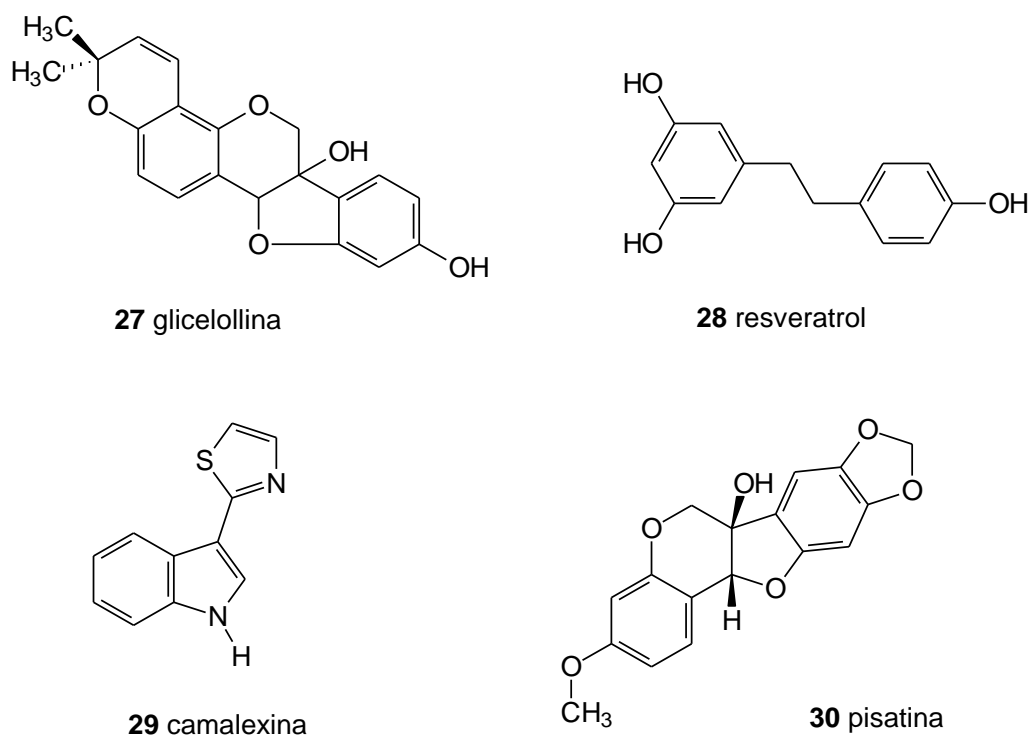


Figura 9 Exemplos de fitoalexinas, substâncias responsáveis pela defesa das plantas contra microrganismos patógenos.

Os fungos por sua vez produzem fitotoxinas que causam a necrose e/ou morte do tecido vegetal. Fungos patogênicos de ervas daninhas tem sido fonte de novos herbicidas, uma vez que fitotoxinas com estruturas novas e não usuais tem sido isoladas destes fungos. Na Figura 10 são exemplificadas algumas fitotoxinas como gliotoxina (**31**) produzida por *Trichoderma* spp, ciperina (**32**), sirodesmina (**33**) produzida por *Leptosphaeria maculans* e fusicoccina (**34**) produzida por *Aspergillus fumigatus* (MOBIUS e HERTWEK, 2009).

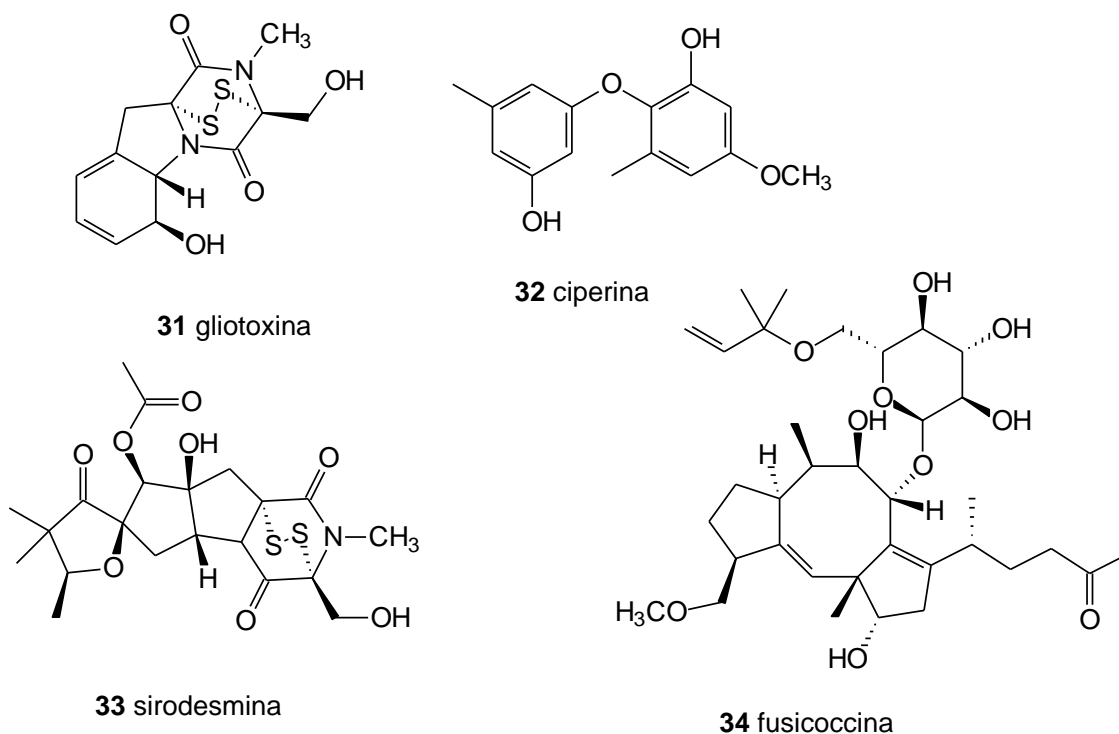
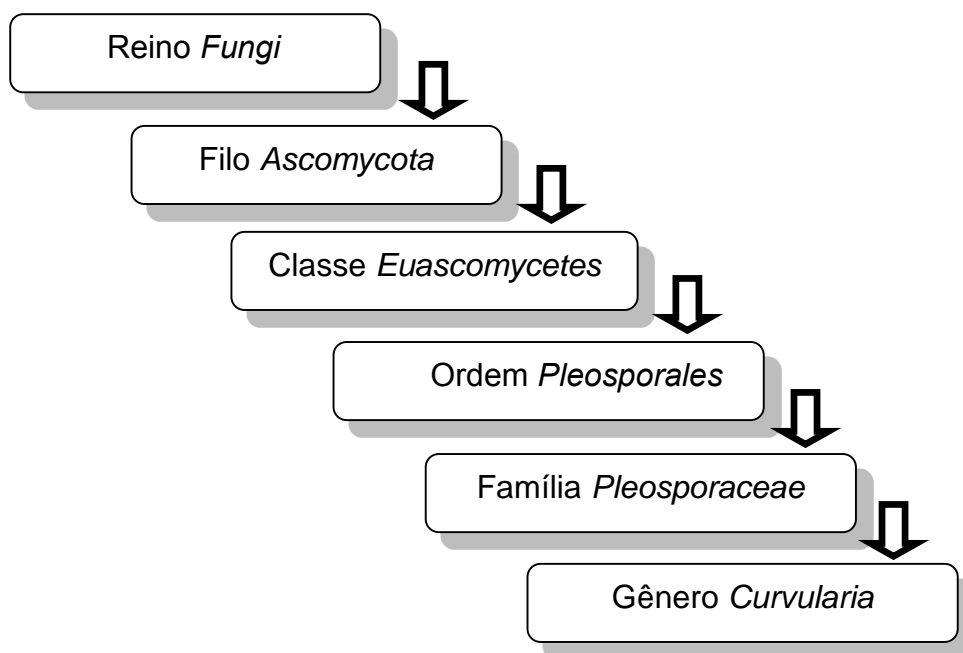


Figura 10 Exemplos de fitotoxinas produzidas por fungos

1.5 O gênero *Curvularia*

O gênero *Curvularia* constitui um grupo de microrganismos de ampla ocorrência visto a frequência com que são observados espécimes do gênero e ao elevado número de espécies que são normalmente identificadas (FURTADO, 2007). Espécies do gênero podem ser isoladas a partir de organismos marinhos, como de esponja *Niphates olemda* (JADULCO et al., 2002), de alga vermelha *Acanthophora spicifera* (GREVE et al., 2008), de organismo marinho do gênero *Annella* (TRISUWAN et al., 2011); a partir de plantas como *Catunaregam tomentosa* (CHOMCHEON et al., 2010), *Ocotea corymbosa* (TELES et al., 2005) e *Litchi chinensis* (WELLS et al., 1981), podendo ainda ser isoladas a partir do solo e ar. Apesar da maioria dos táxones do gênero ser conhecida como sapróbia em diferentes substratos vegetais, muitas espécies são fitopatogênicas, sobretudo em gramíneas e cereais (PRATT, 2005).

De acordo com Boedjin (1933) citado por SUN et al., 2003, a classificação taxonômica do gênero *Curvularia* é:



O gênero *Curvularia* é composto por cerca de 119 espécies, diferenciando-se pela morfologia dos conídios, números de septos e morfologia da colônia. Em consequência da enorme variabilidade morfológica observada nas espécies pertencentes a esse gênero, o mesmo foi dividido em três grupos, “*geniculata*”, com a espécie-tipo *Cu. geniculata*, o grupo “*lunata*”, representado por *Cu. lunata* e o grupo “*maculans*”, com a espécie-tipo *Cu. maculans*, que se diferenciam pela forma dos conídios e números de septos (HOSOKAWA, 2003). O grupo “*geniculata*” engloba as espécies que possuem conídios com quatro ou mais septos, enquanto que os grupos “*lunata*” e “*maculans*” representam as espécies que possuem conídios com três septos, porém distinguem-se pela curvatura mais pronunciada apresentada pelo grupo “*lunata*” somado a presença de célula mediana mais volumosa, exemplificado na Figura 11 (LIMA e FURTADO, 2007).

Algumas espécies deste gênero podem ocasionar doenças em animais, incluindo humanos. Os principais problemas relacionados a estes microrganismos relatados na literatura são sinusite alérgica, pneumonia, endocardite, feridas infecciosas, micetoma, onicomicose, queratites, abscessos

cerebrais entre outros. Fungos deste gênero geralmente causam doenças em indivíduos imunodeprimidos, embora alguns estudos relatem a patogenicidade também em indivíduos imunocompetentes, sendo a *Curvularia lunata* a principal causadora de infecções em humanos (CARTER; BOUDREAUX, 2004).

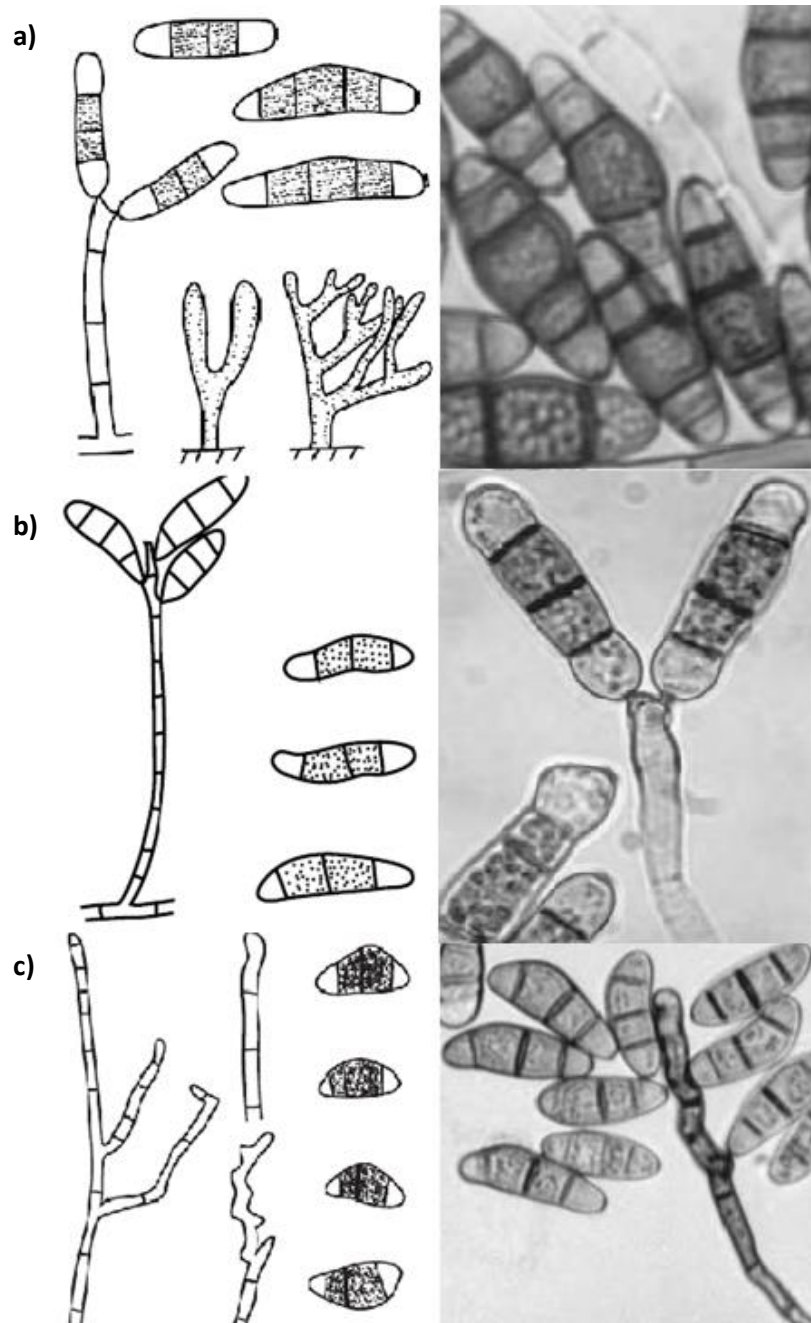


Figura 11 Diferenciação entre os grupos de espécies do gênero *Curvularia*. 11-a: grupo “geniculata”; 11-b: grupo “maculans”; 11-c: Grupo “lunata”. Fonte: Adaptado de Watanabe, 2002.

Espécies do gênero *Curvularia* e *Bipolaris* são semelhantes em muitos aspectos; ambas as espécies possuem teleomorfo conhecido no gênero

Cochliobolus (HYDE, 1998). Estes três gêneros formam um complexo que contem muitos agentes patogênicos de plantas, principalmente gramíneas, com uma distribuição mundial (BERBEE et al., 1999). A taxonomia deste complexo é confusa devido a freqüentes mudanças e refinamentos de nomenclatura ao longo do tempo. Não há uma fronteira morfológica clara entre os gêneros *Curvularia* e *Bipolaris* e algumas espécies demonstram morfologia intermediária (MANANGODA et al., 2012).

1.6 O complexo *Bipolaris-Curvularia-Cochliobolus*

Os gêneros *Bipolaris*, *Curvularia* e *Cochliobolus*, formam um complexo que inclui espécies com relevante importância ecológica e econômica, sobretudo devido a sua fitopatogenicidade (MANAMGODA, 2012). Espécies de *Curvularia* Boedjin (1933), *Bipolaris* Shoemaker (1959) (fases anamórficas) e *Cochliobolus* Drechsler (1934) (fase teleomórfica) são patógenos de distribuição universal que infestam principalmente gramíneas. Algumas espécies são responsáveis por epidemias devastadoras em culturas de arroz, trigo e milho (SIVANESAN, 1987; BERBEE et al., 1999).

As constantes mudanças na nomenclatura juntamente com refinamentos que ocorreram ao longo da história geraram uma confusão taxonômica envolvendo este complexo. Inicialmente, as espécies de *Curvularia* foram classificadas como pertencentes ao gênero *Helminthosporium* o qual foi subdividido em dois subgêneros por Nisikado (1928): *Cylindro-Helminthosporium* e *Eu-Helminthosporium* (RONG, 2001; MANAMGODA, 2012). Pouco tempo depois dessa primeira divisão o gênero *Curvularia* foi criado e diferenciado dos demais, principalmente devido a diferenças morfológicas que incluíam a presença de um conídio fortemente curvado cujas células centrais eram freqüentemente mais curtas e escuras do que as demais células dos conídios (RONG, 2001). Posteriormente, o subgênero *Cylindro-Helminthosporium* foi elevado à categoria de gênero e chamado de *Drechslera* por Ito (1930), que caracterizou os membros deste novo gênero como tendo conídio cilíndrico, não

curvado e sua fase teleomórfica associada ao gênero *Pyrenophora* (RONG, 2001; MANANGODA, 2012).

O gênero *Bipolaris* foi introduzido por Shoemaker (1959) e incluía os membros do subgênero *Eu-Helminthosporium*. Este gênero foi caracterizado por apresentar conídio normalmente curvado, germinação bipolar e a fase teleomórfica associada ao *Cochliobolus* (GOH et al., 1998). Estudos posteriores demonstraram que o gênero *Bipolaris* não estava tão bem definido como esperado originalmente. O gênero continha espécies cujos conídios exibiam hilo protuberante e outras espécies as quais não possuíam tal característica (RONG, 2001). Além disso, algumas espécies apresentavam fase teleomórfica associada à *Cochliobolus* enquanto outras eram associadas à *Trichomestaphaeria* (RONG, 2001; MANANGODA, 2012). Leonard e Suggs (1974) criaram um novo gênero que incluía as espécies que apresentavam hilo protuberante. Esse novo gênero foi chamado de *Exserohilum*. Eles introduziram também um novo gênero para acomodar seu estágio sexual denominado *Setosphaeria* (SIVANESAN, 1987).

Assim, as espécies de *Helminthosporium* foram segregadas em quatro gêneros distintos; *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum* (SIVANESAN, 1987; GOH et al., 1998; RONG, 2001; MANANGODA, 2012).

Espécies de *Bipolaris* e *Curvularia* são bastante semelhantes em muitos aspectos morfológicos. Por exemplo, elas podem ou não formar estromas, possuem conídios que germinam a partir de uma ou de ambas as células polares, formam um tubo germinativo basal originado próximo ao hilo e ambos os gêneros possuem *Cochliobolus* como fase sexuada (Figura 17). Os dois gêneros são diferenciados apenas por aspectos morfológicos dos conídios e tal divisão pode não ser suficiente, pois muitas espécies de *Bipolaris* e *Curvularia* possuem conídios que são intermediários entre os dois gêneros (GOH et al, 1998).

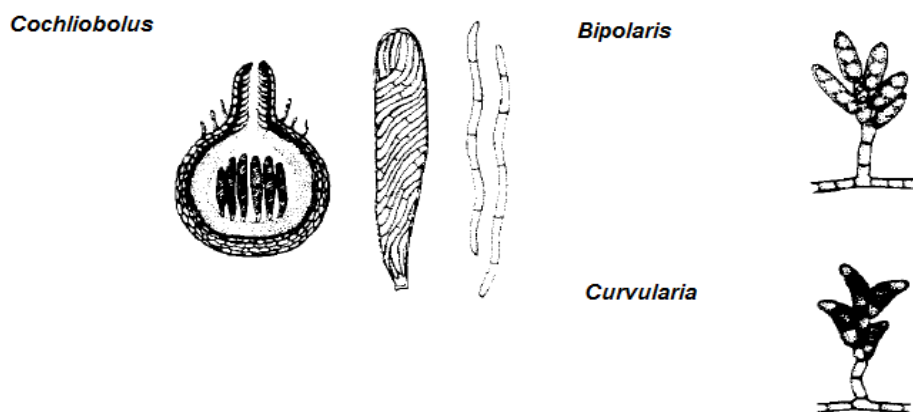


Figura 12 Morfologia dos conídios em espécies dos gêneros *Cochliobolus*, *Bipolaris* e *Curvularia*

Goh et al. (1998) demonstrou que as espécies de *Bipolaris* e *Curvularia* eram heterogêneas quando considerado os fenótipos de restrição, fornecendo mais evidências para sinonímia destes gêneros. A análise filogenética feita por Berbee et al. (1999) demonstrou que ambos os gêneros não eram monofiléticos². Alguns trabalhos consideram estes gêneros como sinônimos (LUTTREL, 1979). Porém outros autores preferem separá-los (ALCORN, 1983; SIVANESAN, 1987), mas a separação destes gêneros ainda gera controvérsia fazendo-se necessárias novas abordagens para resolver o dilema taxonômico destes gêneros (MANANGODA et al., 2012).

O Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB) permite que fungos pleomórficos³ possuam dois nomes. No entanto, em uma tentativa de harmonizar as diferentes nomenclaturas, alguns esforços têm sido feitos para que todos os fungos possuam apenas um único nome (HAWKSWORTH et al. 2011). Muitas espécies de *Cochliobolus* têm seus estados assexuados em qualquer um dos gêneros *Bipolaris* ou *Curvularia*. Por exemplo, *Cochliobolus heterostrophus* se apresenta como fase sexuada de *Bipolaris maydis* e *Cochliobolus geniculatus* de *Curvularia geniculata*. Há, contudo, algumas exceções; *Cochliobolus boutelouae*, *C. palmivora*, *C. sasae* e *C. sitharamii* não estão ligados a qualquer estado assexuado (ALCORN 1983). Há ainda,

² Chama-se monofilético a um grupo de organismos que possuem um único ancestral comum, incluindo o próprio ancestral.

³ Apresentam mais que um estado reprodutivo em seu ciclo de vida

numerosos fungos que perderam a sua capacidade de formar um teleomorfo (GEHLOT et al., 2010). Assim, muitas espécies de *Bipolaris* e *Curvularia* não estão ligadas a uma espécie de *Cochliobolus* devido à sua incapacidade em produzir o estado sexual.

Vários critérios podem ser utilizados durante a escolha de um nome único a ser adotado por determinada espécie de fungo. Estes critérios incluem o nome mais antigo, o nome teleomórfico, ou ainda, o nome economicamente mais importante (HYDE et al. 2011). Manangoda et al (2012) realizaram a análise filogenética de 19 espécies de *Bipolaris*, *Cochliobolus* e *Curvularia*, encontradas no norte da Tailândia baseado em quatro regiões de genes (ITS, GPDH, LSU e EFI- α). Este complexo foi dividido em dois grupos; o primeiro grupo que incluía as espécies de *Bipolaris* e *Cochliobolus* (todas altamente patogênicas e economicamente importantes) ao passo que as espécies de *Curvularia* foram agrupadas num segundo grupo. Foi proposto então que o conflito envolvendo a nomenclatura mais apropriada do complexo fosse resolvido dando prioridade aos nomes mais comumente utilizados: *Curvularia* e *Bipolaris*. No entanto, como o termo *Curvularia* (Boedijn 1933) é mais antigo do que o termo *Cochliobolus* (Drechsler 1934) e *Bipolaris* (Shoemaker 1959) e, uma vez que as mudanças ao Código Botânico estavam previstas para serem realizada em 2013 (HAWKSWORTH et al., 2011), em que o artigo 59 do CINB que permite a nomenclatura dual de fungos pleomórficos não seria mais aplicável, é possível que o termo *Curvularia* seja adotado para todas as espécies destes gêneros. Até o final da confecção deste trabalho nenhuma norma foi publicada sobre a concretização dessa mudança.

Enquanto não se define uma norma definitiva para a taxonomia deste complexo, no presente trabalho adotaremos os três gêneros individualmente para o levantamento bibliográfico. Sivanesan (1987) em seu estudo listou 35 espécies de *Cochliobolus*, 33 espécies de *Curvularia* e 46 de *Bipolaris*. Das 35 espécies de *Cochliobolus* descritas por ele, 33 estavam ligadas aos estados assexuados, sendo 23 espécies associadas ao gênero *Bipolaris* e 10 espécies associadas ao gênero *Curvularia*. Ainda segundo o autor, havia 22 espécies de *Curvularia* e 26 espécies de *Bipolaris* que não foram associadas a nenhuma espécie de *Cochliobolus* como estágio sexual. Uma busca realizada em 24 de

março de 2013 na base de dados *Index Fungorum* em 24 de março de 2013 revelou que atualmente existem 119 espécies de *Curvularia*, 116 espécies de *Bipolaris* e 56 espécies de *Cochliobolus*. Destes, apenas 16 espécies de *Curvularia* e 23 espécies de *Bipolaris* estão associadas à fase teleomórfica *Cochliobolus*.

Aliado as características morfológicas e modo de vida, o perfil de metabólitos secundários também pode ser empregado na sistemática fúngica (LARSEN et al., 2005). O perfil de metabólitos fúngicos consiste de todos os diferentes metabólitos que podem ser produzido por um fungo num determinado substrato. Entretanto, nem todos estes compostos podem ser empregados na quimiotaxonomia ou com propósito de classificação, apesar de serem de grande importância para os fungos (FRISVAD et al., 2008). A caracterização química baseia-se em todos os metabólitos que possuem poder de diferenciação e seu uso na sistemática de fungos inclui desde marcadores para delimitação de espécies em alguns gêneros de ascomicetos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Alternaria*, bem como para estudos quimiotaxonômicos de membros de uma mesma família, por exemplo, *Xylariaceae* (STADLER et al., 2004). Esta abordagem é baseada na premissa de que os perfis de metabolitos obtidos a partir de extratos brutos sob condições padronizadas são específicos para cada uma das espécies fúngicas, apesar de que semelhanças entre perfis de espécies distintas podem não refletir parentesco filogenético (FRISVAD et al., 2008).

Não é incomum que diferentes espécies de fungos produzam um ou mais metabólitos secundários em comum. A citocalasina D, por exemplo, é produzida por diferentes espécies de fungos, como *Coriolus vernicipes* (um basidiomiceto), *Zygosporium masonii* (um zigomiceto), *Metarrhizium anisopliae*, *Engleromyces goetzii* e *Hypoxyton terricola* (ascomicetos) (COLE e SCHWEIKERT, 2003). Fungos de gêneros diferentes podem produzir os mesmos metabólitos (LARSEN et al., 2005). Assim, mesmo que alguns grupos de genes para muito destes compostos pareçam ter sido transferidos lateralmente, outros provavelmente tenham surgido independentemente. Dessa forma, espécies não relacionadas filogeneticamente podem ter chegado ao mesmo composto de forma independente, devido à vantagem seletiva destes compostos bioativos (FRISVAD et al., 2008).

Sivanesan (1987) investigando a produção de metabólitos secundários e toxinas produzidos por espécies de *Cochliobolus*, *Curvularia* e *Bipolaris* concluiu que devido a similaridade entre os metabólitos produzidos por espécies de *Cochliobolus* e *Bipolaris* não há significância taxonômica para estes fungos, no que diz respeito à produção de metabólitos secundários. No entanto, existiam ainda muitas espécies de *Curvularia*, onde a produção de toxinas não havia sido investigada e até que isso fosse feito nenhuma conclusão poderia ser feita para se apoiar o sinônimo genérico sugerido para estes gêneros (SIVANESAN 1987).

Dessa forma, com o objetivo de contribuir para a quimiotaxonomia deste complexo realizamos um levantamento bibliográfico buscando identificar os metabólitos secundários descritos na literatura para cada um dos três gêneros, bem como as suas respectivas atividades biológica e classe química (Tabelas 2,3 e4).

Tabela 02. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Curvularia* e suas atividades biológicas

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>Cu. affinis</i>	pirenocina J (44)	Derivados do Pireno	Citotóxica contra células hepáticas tumorais	Zhang et al, 2012
<i>Cu. andropogonis</i>	1-O-β-D-(14-hidroxi-4,12-eicosadienol)-glicosídeo (45)		Fitotoxina	Alam et al, 1996
<i>Cu. eragrostidis</i>	α,β-dehidrocurvularina (46)	Lactona macrocíclica (policetídeo)	Fitotoxina	Jiang et al, 2007
<i>Cu. fallax</i>	ácido 4-hidroxi-3-(3'-metil-2'-butenil)-benzóico (47) ácido 4-hidroxi-3-(3'-metil-3'-buten-1'-inil)-benzóico (48) ácido anofínico (49) ácido 3,4-trans-dihidroxi-anofínico (50) ácido 2-(1'-metil-etenil)-benzofuran-5-carboxílico (51)	Ácido aromático	Antibiótica (45) Fitotoxina (46)	Abraham e Arfmann, 1989
<i>Cu. geniculata</i>	curvularídeo A-E (52-56)	Policetídeo-peptídeo	Antifúngica contra <i>C. albicans</i> (52)	Chomcheon et al, 2010
<i>Cu. geniculata</i>	radicinin (57)		NR	Krautscheid et al,
<i>Cu. inaequalis</i>	pirenocina A-B (58 -59)	Pirenocinos	Fitotoxinas	Kim et al, 2000
<i>Cu. inaequalis</i>	curvularona A (60) e 4-hidroxiradiantina (61)		Citotóxica	Pang et al, 2013
<i>Cu. lunata</i>	brefeldina A (62) e 7-epi-Brefeldina A (63)	Macrolídeo	Antibiótica (62)	Alman et al, 1982
<i>Cu. lunata</i>	cinodontina (64)	Antraquinona	Corante	Mabadeje et al, 1978; Hobson et al, 1997
<i>Cu. lunata</i>	lunatina (65) citoskirina A (66) ácido (+)-abscísico (67)	Antraquinona (65) Bisantraquinona (66) Ácido carboxílico (67)	Antibacteriana contra <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , e <i>E. coli</i> (65-66) Hormônio vegetal (67)	Jadulco et al, 2001

Tabela 02. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Curvularia* e suas atividades biológicas (Continuação)

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>Cu. lunata</i>	metil-2-acetil-3,5-dihidroxifenilacetato (68) ácido curvulínico (69) 2-acetil-5-hidroxi-3-metoxifenilacetato (70) metil-2-acetil-5-hidroxi-3-metoxifenilacetato (71) 4-epiradicinol (72) e radicinol (73)	Derivados do ácido fenilacético	Antimicrobiana e antioxidante Antibacteriana contra <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. choleraesuis</i> e <i>B. subtilis</i> (72-73)	Varma et al, 2006
<i>Cu. lunata</i>	ácido 5-hidroximetil-2-furan-carboxílico (74)		toxina	Liu et al, 2009
<i>Cu. lunata</i>	citocalasina B (75)		NR	Wells et al, 1981
<i>Cu. oryzae</i>	11- α -metoxicurvularina (76) (S)-5-etil-8,8-dimetil-nonanal (77)	Lactona macrocíclica (policetídeo) (76)	Antibacteriano, antifúngico e larvicida (76)	Busi et al, 2009
<i>Cu. pallescens</i>	cinodontina (64)	Antraquinona (policetídeo)	NR	Mabadeje et al, 1978
<i>Cu. pallescens</i>	espirostafiglotricina A, D, Q, R, U, V (78-83)	Alcalóide	NR	Abraham e Meyer, 1995
<i>Cu. pallescens</i>	curvupalídeo A-C (84-86)	Alcalóide	NR	Abraham e Meyer, 1995
<i>Cu. sp</i>	curvularol (87)	Tricoteceno	Citotóxica	Honda et al, 2001

Tabela 02. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Curvularia* e suas atividades biológicas (Continuação)

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>Cu. sp</i>	2-metil-5-metoxi-benzopiran-4-ano (88) (2R)-2,3-dihidro-2-metil-5-metoxi-benzopiran-4-ano (89) (2'S)-2-(propan-2'-ol)-5-hidroxi-benzopiran-4-ano (90) 2,3-dihidro-2-metil-benzopiran-4-ano (91)		Antifúngico contra <i>C. sphaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i> (88-89) Citotóxica contra células tumorais em rato (90)	Teles et al, 2005
<i>Cu. sp</i>	apralactona A (92) (10E,15R)-10,11-dehidrocurvularina (93) (10E,15R)-12-hidroxi-10,11-dehidrocurvularina (94) (10E,15R)-13-hidroxi-10,11-dehidrocurvularina (95) (15R)-12-oxocurvularina (96)	Lactona macrocíclica (policetídeos)	Citotóxica contra células humanas tumorais (92, 93, 95 e 96)	Koning et al, 2008
<i>Cu. sp</i>	curvulideo A (97), curvulideo B1 (98) curvulideo B2 (99), modiolideo A (100)	Lactonas(policetídeos)	NR	Greve et al, 2008
<i>Cu. sp</i>	curvulona A (101), curvulona B (102) (11R,15R)-11-hidroxicurvularina (103) (11S,15R)-11-hidroxicurvularina (104) α,β -dehidrocurvularina (46)	Lactonas macrocíclicas (policetídeos)	Antibacteriana contra <i>B. megaterium</i> e antifúngica contra <i>M. violaceum</i> e <i>S. tritici</i>	Daí et al, 2010
<i>Cu. sp</i>	curvulapirona (105) curvulalideo (106) modiolideo B (107) ácido curvulálico (108) pirenolideo A (109) stagnolideo E (110) micoepoxidieno (111) deacetilepoxidieno (112)	Lactonas (policetídeos) (106-107, 109-110)	NR	Trisuan et al, 2011

Tabela 03. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Bipolaris* e suas atividades biológicas

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>B. bicolor</i>	Cochlioquinona A (113) ,Cochlioquinona B (114) Stenfona (115), Isocochlioquinona A (116)	Sesterterpenoides	Fitotoxinas	Miyagawa et al, 1993
<i>B. coicis</i>	Radicinin (57) (2S,3R)-Radicinin (118) Radicinol (73) Epoxi-radicinol (120)		Fitotoxinas (117-118)	Nakajima et al, 1996
<i>B. cynodontis</i>	Cochlioquinol (121)		Fitotoxina	Lim et al, 1996
<i>B. cynodontis</i>	Bipolaroxina (122) Dihidrobipolaroxina (123)	Sesquiterpenoides	Fitotoxina	Sugawara et al, 1985
<i>B. cynodontis</i>	Cochlioquinona A (113) Cochlioquinona B (114) Isocochlioquinona A (116) Cochlioquinol (121) Cochlioquinona C (124) Cochlioquinona E (125) Isocochlioquinona C (126) Cochlioquinona D (127) Cochlioquinol II (128)	Sesquiterpenoides	Fitotoxinas	Lim et al, 1998
<i>B. cynodontis</i>	Bipolal (129)	Sesquiterpenoides	NR	Lim e Chi-Hwan, 1996
<i>B. orizae</i>	3-anidro-ofiobolina A (130) Ofiobolina I (131) Ofiobolina A (132) Anidrocochlioquinona A (133) Isocochlioquinona A (116) Isocochlioquinona C (126)	Sesterterpenoides (130-132) Sesquiterpenoides (133, 116 1126)	Citotóxica contra células tumorais humanas (133)	Phuwapraisirisan et al, 2007

Tabela 03. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Bipolaris* e suas atividades biológicas (Continuação)

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>B. sorghicola</i>	Ofiobolina A (132) Anidrocochlioquinona A (133)	Sesterterpenoides	Fitotoxina	Pena-Godrigues e Chilton, 1989
<i>B. sorokinana</i>	Cinodontina (64) Helmintosporina (134)	Antraquinonas (policetideos)	NR	Engstrom et al, 1993
<i>B. sorokinana</i>	Prehelmintosporol (135)	Sesquiterpenoides	Fitotoxina	Carlson et al, 1991
<i>B. sorokinana</i>	Prehelmintosporol (135) Sorokianina (136)	Sesquiterpenoides	Fitotoxina	Nakajima et al, 1997
<i>B. zeicola</i>	Cochlioquinona A1 (137)		Agente anti-agiogênico	Jung et al, 2003
<i>B. zeicola</i>	BZR-cotoxina IV (138)		Fitotoxina	Ueda et al, 1995
<i>B. sp</i>	Ofiobolina I (131) 6-epiofiobolina A (139) 3-anidro-6-epiofiobolina A (140)	Sesterterpenoides	Citotóxica contra células tumorais humanas	Jong-Woong et al, 1998
<i>B. sp</i>	Bipolarinona (141) Bipolarilideo (142) Paecilina B (143) (5S,10aR)-gonitolideo C (144) Espirostafilotriquina R (145) Etil acetato de 2-[(3,5-dihidroxi)fenila] (146) Curvulina (147) Ácido (2-carboxi-3-hidroxi-5-metoxifenil) acetato (148) Crisofanol (149) Emodin (150)	Cromanona dimérica (141)	NR	Arunpanichlert et al, 2012

Tabela 04. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Cochliobolus* e suas atividades biológicas

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>C. carbonum</i>	HC-Toxina (151)	Tetrapeptideo cíclico	Toxina	Weiergang et al, 2004
<i>C. heterostrophus</i>	3-anidro-ofiobolina A (130) Ofiobolina A (132) Ofiobolina B (152) Ofiobolina L (153)	Sesterterpenoides	NR	Li et al, 1995
<i>C. lunatus</i>	Ácido cochliobolico (154)	Ácido carboxílico	Inibe a ligação TGF- α ao receptor EGF de células humanas epidérmicas	Robinson et al, 1997
<i>C. lunatus</i>	Ácido lunatoico A (155)	Ácido carboxílico	NR	Nukina e Marumo, 1977
<i>C. lunatus</i>	Radicinin (57) Radicinol (73)		NR	Nukina e Marumo, 1977
<i>C. lunatus</i>	Cochliomicina A (156) Cochliomicina B (157) Cochliomicina C (158) Zeaenol (159) LL-Z1640-1 (160) LL-Z1640-2 (161) Paecilomicina F (162)	Lactonas macrocíclicas	Larvicida contra <i>Balanus amphitrit</i> (156-162); Antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>M. tetragenus</i> (156, 159 e 162)	Shao et al, 2011
<i>C. miyabeanus</i>	Ofiobolina B (152)	Sesterterpenoides	NR	Ohkawa e Tamura, 1966

<i>C. setariae</i>	Sis-Sativenediol (163) Trans-Sativenediol (164)		NR	Nukina e Marumo, 1975
--------------------	--	--	----	--------------------------

Tabela 03. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Cochliobolus* e suas atividades biológicas (Continuação)

Espécie	Substância	Classe	Atividade	Referência
<i>C. spicifer</i>	Espiciferinona(165) Espiceferona A, B., C (166-168)		Fitotoxina	Nakajima et al, 1992
<i>C. spicifer</i>	Curvularina (169) 6-Clorodehidrocurvularina (170)	Lactonas macrocíclicas (policetideos)	NR	Ghisalberti e Rowland, 1993
<i>C. spicifer</i>	Cochliospicina A (171)		Fitotoxina	Nakajima et al, 1996
<i>C. spicifer</i>	Espiceferina (172)		Reguladora do crescimento das plantas	Nakajima et al, 1990
<i>C. victoriae</i>	Victorina B, C, D, E (173-176) Victoricina (177)	Derivados de tetrahidrocromanonas (173-176)	Fitotoxinas	Wolpert et al, 1986
<i>C. sp</i>	Cochlioquinona A (113) Isocochlioquinona A (116)	Sesquiterpenoides	Larvicida contra leishmaniose	Campos et al, 2008
<i>C. sp</i>	Cochliona A (178) Cochliona B (179) Cochliona C (180) Cochliona D (181) 4-hidroxibenzaldeído (182) Ácido 4-hidroxi-3-(3-metilbutil-2-enil) benzóico (183) Ácido 2,2-dimetil-2H-cromene-6-carboxílico (184)		Citotóxica contra células tumorais humanas (175)	Wang et al, 2010
<i>C. sp</i>	Cochlioquinona B(114) Isocochlionona A (116)	sesquiterpenoides	Inibidora da neuranimidase	Zhang et al, 2011.

Isocochlionona B **(185)**

(185)

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a diversidade química e biológica do fungo *Curvularia lunata*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Revisar a história taxonômica do Complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* e a produção de seus metabólitos secundários
2. Analisar a influência da variação de fonte de carbono na produção de metabólitos secundários por uma espécie de *Curvularia lunata*
3. Avaliar o potencial biológico dos extratos brutos frente aos ensaios antimicrobianos, anticolinesterásico e larvicida
4. Iniciar os estudos visando conhecer alguns metabólitos produzidos pelo fungo cultivado em extratos de malte e meio czapeck com 2% de levedura, bem como isolar, purificar e determinar as estruturas químicas destes compostos.

Experimental

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

a) Suporte para cromatografia:

- Sílica gel 230-400 mesh (sílica flash), para cromatografia em coluna (CC);
- Sílica gel 70-230 mesh (sílica comum), para cromatografia em coluna (CC);
- Sílica gel 60 PF₂₅₄, para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).
- Sílica gel HF_{254 + 366} e sílica gel suportada em alumínio, para cromatografia em camada delgada comparativa
- Como suportes foram utilizados cromatofolhas de alumínio e placas de vidro.

b) Eluentes utilizados nos experimentos cromatográficos

- Foram utilizados solventes comerciais, após destilação, da QUEMIS, Merck, CHENCO e Hexis.

c) Solventes utilizados para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear:

- Solventes deuterados da Merck e Aldrich (RMN) 98-99.9%

d) Materiais utilizados nos ensaios de atividade anticolinesterásica:

- Tampão Tris/HCl 50 mM pH 8;

- Enzima Acetilcolinesterase de peixe elétrico (tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido – Sigma;
- Iodeto de acetilcolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®)
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman.

e) Materiais utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana:

- Os materiais utilizados para realização dos ensaios de atividade antimicrobianos foram esterilizados por calor úmido em autoclave. Dentre os materiais autoclavados estão placas de Petri, tubos de ensaios, vidros de penicilina e ponteiras. As placas de 96 poços, por serem termosensíveis, foram esterilizadas mediante exposição à radiação UV por 50 min.

f) Material utilizado nos ensaios larvicidas contra *Aedes aegyptii*

- Os ensaios larvicidas contra *Aedes aegyptii* foram realizados no Laboratório de Biologia, Fisiologia de Insetos e Xenodiagnóstico do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

a) Rotaevaporador

- As soluções foram concentradas em evaporador rotativo da Fisatom - Mod. 558 e da Buchi - Rotavapor- RE

b) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

- A análise do perfil cromatográfico dos extratos de *Curvularia lunata*. Foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se um cromatógrafo da linha CTO - 20A da SHIMADZU, acoplado com amostrador automático (*autosampler*) e detector de arranjos de diodo (DAD).

c) Espectrômetria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

- Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (desacoplado), DEPT 135° e os experimentos de RMN bidimensionais foram obtidos em espectrofotômetro Varian Gemini 2000 operando a 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono-13 e Inova 500 operando a 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13.

f) Estufa incubadora

- Os microrganismos em estudo neste trabalho foram incubados em Estufa Incubadora BOD TECNAL TE-371.

g) Capela de fluxo laminar

- A capela de fluxo laminar utilizada foi da LABCONCO - 36210

e) Triturador

- Tunatec Tecnal

3.3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

A revisão da literatura para o estudo taxonômico do complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* foi realizada nas principais bases de dados científicas, a saber, *Chemical Abstract – SciFinder* e *Web of Science*.

3.4 MICRORGANISMO

3.4.1 Obtenção do microrganismo

O fungo estudado neste trabalho foi isolado e purificado a partir de plantas coletadas na APA da Lagoa e Dunas do Abaeté. Esta etapa do estudo foi realizada pelo biólogo Fabio Fernandes Barbosa e o isolado identificado como *Curvularia lunata* está depositado na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Química de Microorganismo – LBQM do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, sob o número LBQM-04.

3.4.2 Confirmação da espécie

A confirmação do gênero foi realizada a partir de dados de Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura (MEV). Os dados de MEV foram obtidos pela aluna Adriana Fontes no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

3.4.3 Crescimento Radial

Foram preparados dois diferentes meios de cultura; batata-dextrose-ágar (BDA) e extrato de malte-ágar (MEA).

Após o preparo dos meios de cultura, estes foram distribuídos, sob condições assépticas, em placas de Petri (nove centímetros) em um volume de aproximadamente 20 mL para cada placa. Duas linhas perpendiculares foram

desenhadas em cada placa de maneira que se cruzassem no centro da placa. Cada placa foi inoculada com um disco micelial de aproximadamente 6 mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufa, com temperatura de 26° C e o crescimento medido ao longo das linhas perpendiculares diariamente, durante cinco dias, período em que o microrganismo ocupou o diâmetro total da placa. O experimento foi realizado em quintuplicata.

3.5 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO

3.5.1 Reativação do microrganismo

Para obtenção de colônias jovens, o microrganismo foi inoculado em placas de Petri com nove centímetros de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em uma câmara de crescimento a 27 °C durante cinco a sete dias.

3.5.2 Meios de cultura e fermentação

Para o cultivo em pequena escala foram testados oito meios de cultura, disponíveis em nosso laboratório, a fim de se avaliar o meio de cultura ótimo para a produção de metabólitos secundários pelo microrganismo em estudo. Destes, apenas um era sólido, o meio de cultura arroz, conforme mostra a Tabela 02.

Tabela 04. Meios de cultura selecionados para cultivo em pequena escala

Meio de cultura	Composição
Caldo de batata e dextrose (BD)	Fécula de batata, Dextrose; 30%
Caldo de extrato de Malte (ME)	Extrato de Malte; 30%
Caldo de extrato de malte e dextrose (MED)	Extrato de Malte, Dextrose; 30%
Caldo de extrato de levedura (YE)	Extrato de Levedura; 10%
Caldo de extrato de levedura e dextrose (YED)	Extrato de Levedura, Dextrose; 10%
Caldo de CZAPECK enriquecido com 2% de extrato de levedura (CZ)	czapeck
Caldo de farinha de arroz (RD)	Farinha de Arroz, Dextrose; 30%
Arroz (R)	Arroz; 90%

Após a reativação do microrganismo, descrita no item 3.5.1, foram preparados os meios de cultura selecionados segundo receita.

Para cada meio de cultura testado foram preparados cinco frascos de Erlenmeyer com capacidade de 1L, nos quais foram transferidos 300 mL de meio de cultura. Os mesmos foram autoclavados durante 20 min. (meio líquido) e 40 min. (meio sólido), esperou-se a resfrição dos frascos de Erlenmeyers e então foi realizada a inoculação do microrganismo. Um frasco de Erlenmeyer, de cada meio estudado foi reservado para o controle (branco).

Após a inoculação os frascos de Erlenmeyer foram incubados a temperatura ambiente, sobre o abrigo da luz, por 21 dias.

3.5.3 Obtenção dos extratos

Finalizado o período de incubação foi realizada uma filtração a vácuo, com a finalidade de separar o micélio do meio líquido.

Para a extração dos metabólitos secundários excretados no meio de cultura foi utilizada a metodologia de partição líquido-líquido. O solvente extrator utilizado foi o acetato de etila. Em um balão de separação de 1L foi adicionado 300 mL do meio de cultura e 300 mL de acetato de etila. Agitou-se o balão por três vezes e esperou-se a separação de duas fases imiscíveis; então recolheu-se a fase orgânica. O procedimento foi repetido por três vezes. A fase em acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador e, em seguida, levada ao dessecador, até a obtenção do extrato seco (Figura 12).

A extração dos metabólitos produzidos pelo micélio foi realizada adicionando 200 mL de MeOH e triturando como auxílio do triturador até que o mesmo se tornasse uma farinha fina e então foi deixado em repouso por 72 h. Após esse período, foi feita uma filtração e ao resíduo micelial foi novamente adicionado 200 mL de metanol e deixado em repouso por mais 72 h. Após a remoção do solvente via rotaevaporador os extratos brutos micelial foram reunidos e levados ao dessecador, até a obtenção do extrato seco, como mostra a Figura 12.

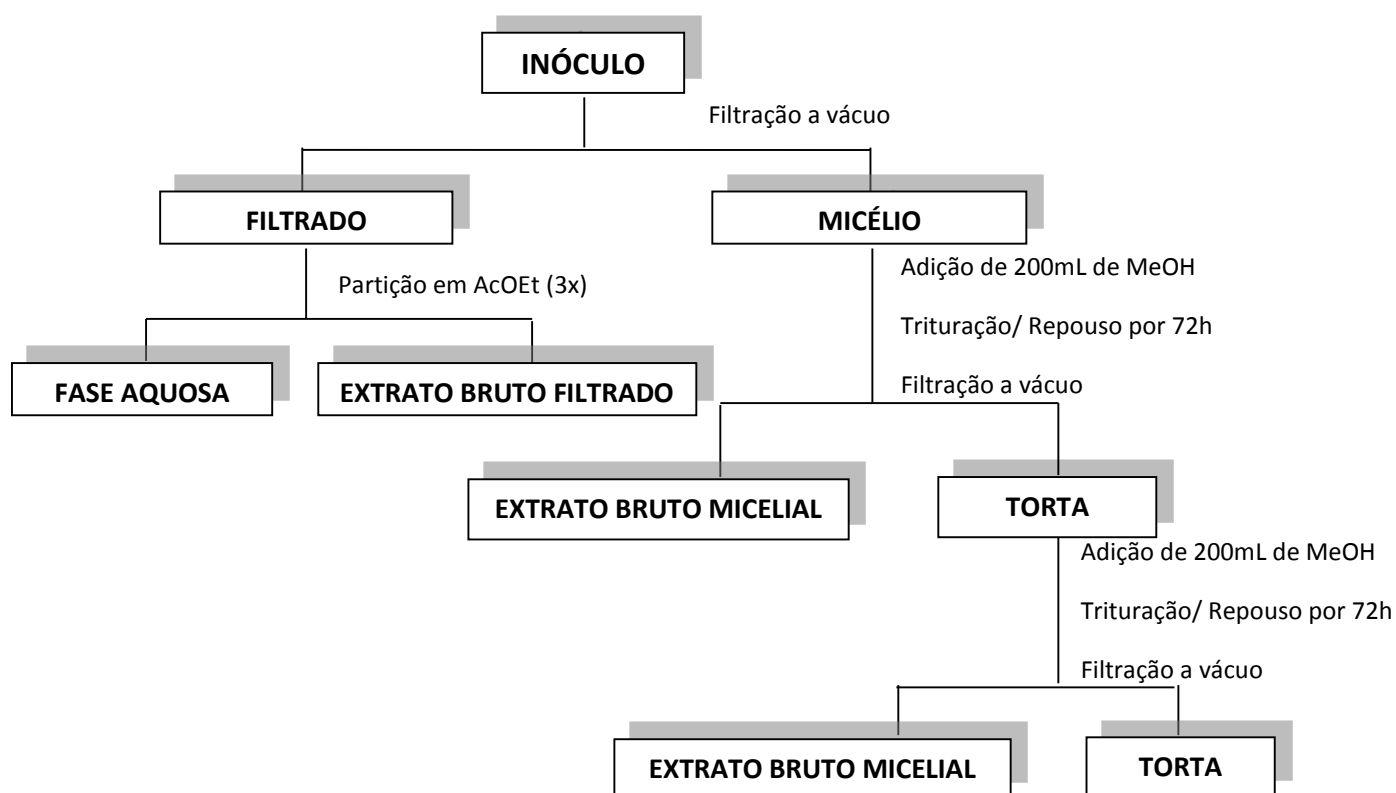


Figura 13 Esquema de obtenção dos extratos.

A metodologia utilizada para obtenção do extrato no meio sólido de arroz consistiu em adicionar 300 mL de metanol ao frasco de Erlenmeyer contendo o meio, macerar com a ajuda de um bastão de vidro e deixar em repouso por 72h. Seguidamente foi feita uma filtração a vácuo e novamente adicionados 300 mL de metanol ao resíduo e deixado em repouso por mais 72 horas. Os filtrados foram reunidos, e após remoção do solvente via rotaevaporação, obteve-se o extrato seco.

Do cultivo do *Curvularia lunata* nestes meios de cultura foram obtidos 24 extratos brutos, correspondendo a três extratos para cada meio de cultivo, incluindo o extrato micelial, o filtrado e o controle, com exceção do meio sólido, arroz, que originou apenas dois extratos brutos. As massas obtidas para cada extrato, após secagem, encontram-se discriminadas na Tabela 03.

Tabela 05. Código e massa dos extratos brutos obtidos.

Meio de Cultura	Código dos Extratos ²	Massa (mg)
MED	MEDB	43,1
	MEDF	34,1
	MEDM	181,7
ME	MEB	59,8
	MEF	91,5
	MEM	141,2
YED	YEDB	14,1
	YEDF	48,3
	YEDM	148,1
YE	YEB	21,9
	YEF	64,1
	YEM	44,2
BD	BDB	9,6
	BDF	17,3
	BDM	138,3
RD	RDB	16,8
	RDF	184,6
	RDM	68,2
CZ	CZB	49,5
	CZF	69,0
	CZM	270,9
R	RB	58,5
	R1	---
	R2	147,3

²B – Representa o branco de cada extrato; F – Extrato bruto filtrado; M – Extrato bruto micelial

3.5.4 Análise dos Extratos por Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos. Como suportes foram utilizados cromatofolhas de alumínio e placas de vidro.

Os extratos foram solubilizados em solvente adequado e foram aplicados nas cromatoplasmas com auxílio de capilares. Uma vez seca as placas foram inseridas em cubas contendo a fase móvel a ser testada. Várias combinações de solventes foram necessárias para se obter a fase móvel adequada para comparação e separação dos compostos.

Como reagentes reveladores foram utilizados solução de anisaldeído e solução de vanilina-ácido sulfúrico; além destes reveladores, utilizou-se também a lâmpada de radiação ultravioleta (254 e 366 nm) e câmara de vapor de iodo.

3.5.5 Análise dos Extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos de Diodo (CLAE-DAD)

Os extratos brutos obtidos foram submetidos a análise do perfil cromatográfico via CLAE-DAD em gradiente exploratório, sendo 1 mg do extrato solubilizado em 1 mL de metanol. As análises foram realizadas em uma coluna de fase reversa C18 com uma coluna de guarda C18. O volume de amostra injetado foi 30 μ L e eluição em gradiente MeOH/H₂O por 40 min., fluxo de 1,0 mL/min. e varredura de comprimento de onda de 190 - 400 nm, para posterior escolha do melhor comprimento de onda. Em algumas análises foi preciso aumentar o tempo de corrida para se ter certeza de que todos os compostos haviam sido eluídos.

Os cromatogramas e os espectros de absorção no UV dos extratos brutos foram impressos e comparados visualmente.

3.5.6 Análise dos Extratos por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Para a realização dos espectros de RMN de ^1H , pesou-se 10,0 mg das amostras e diluiu-se em 0,6 mL de clorofórmio deuterado. Em seguida, as soluções foram filtradas em esfera de algodão e armazenadas em tubo de vidro próprio para RMN.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO

3.6.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica (AChE)

A capacidade dos extratos brutos em inibirem a atividade da enzima acetilcolinesterase foi avaliada através do teste bioautográfico em cromatografia em camada delgada, baseado na metodologia de Ellman modificado por Rhee (RHEE et al., 2001).

Os extratos brutos foram dissolvidos em metanol e aplicados em uma cromatoplaça, juntamente com um padrão positivo, a galantamina. A placa foi eluída com a fase móvel adequada, previamente testada. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi então incubada em câmara úmida fechada a 37°C por 20 min., e em seguida borrifada com as soluções de iodeto de acetilcolina (ACTI) e o reagente de Ellman.

A coloração amarela aparece em aproximadamente 3 minutos. O aparecimento de manchas brancas sobre um fundo amarelo indica que houve a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

3.6.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas seis linhagens padrão, sendo três Gram-positivas: *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6638) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e três Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (isolado clínico), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Para avaliação antifúngica foram empregadas três linhagens: *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Cladosporium cladosporioides* (IMI 178517) e *Candida albicans* (ATCC 18804).

Previamente aos testes, as culturas de bactérias foram repicadas em ágar nutriente e incubadas por 24h a 37°C, e os fungos e leveduras por 72 h a 26°C em ágar malte e ágar levedura e malte, respectivamente. Após este pré-cultivo, o inóculo foi preparado a partir de suspensões destes microrganismos em água destilada esterilizada, com turvação correspondendo a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹).

O método utilizado foi a microdiluição em caldo, para determinar a concentração inibitória mínima dos extratos frente aos microrganismos usando microplacas de 96 poços esterilizadas.

As soluções estoque dos extratos foram preparadas utilizando 8 mg das amostras solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo uma concentração inicial de 8 mg.mL⁻¹.

Inicialmente foram distribuídos 100 µL de meio de cultura apropriado em todos os poços, sendo, caldo nutriente para bactérias, caldo de malte para fungos filamentosos e caldo de levedura e malte para levedura. Em seguida, na fileira A, foi adicionado mais 90 µL de meio de cultivo do primeiro até o décimo poço, totalizando 190 µL. Desses dez poços, nove correspondem ao ensaio de três amostras em triplicata e o décimo ao controle negativo. O volume desses poços foi preenchido com 10 µL da solução estoque em dimetilsulfóxido dos extratos e com 10 µL de dimetilsulfóxido no décimo poço, totalizando um volume final de 200 µL em cada poço. No décimo primeiro poço, o volume de 200 µL foi obtido com a adição de 100 µL do controle positivo. Em sequência, efetuou-se uma diluição seriada de razão dois com as amostras e com os controles negativo

e positivo. Ao final, foram adicionados, em todos os poços da placa, 100 µL da suspensão do inóculo do microrganismo em meio de cultivo. As placas contendo bactérias foram incubadas por 24 h a 37°C e as placas que continham fungos e levedura por 72 h a 27°C.

Foram usados como controle positivo benzilpenicilinabenzatina (Bepeben®) 20 µg.mL⁻¹, para bactérias Gram-positivas, sulfato de gentamicina (Garamicina®) 200 µg.mL⁻¹ para bactérias Gram-negativas e ciclopiroxolamina (Loprox®) 400 µg.mL⁻¹ para ensaios com fungos e leveduras.

A suspensão do microrganismo em caldo foi preparada utilizando 100 µL da suspensão em água para cada 10 mL de meio de cultivo.

Após a incubação, o crescimento do microrganismo foi observado através da presença de turbidez nos poços. O CIM foi definido como a menor concentração dos extratos que inibiu a turbidez.

Após o tempo de incubação as amostras que apresentaram atividade antimicrobiana foram caracterizadas como microbidas ou microbiostática. Para essa avaliação foi utilizado 10 µL do poço no qual foi obtido o CIM. Esse volume foi estriado numa placa com ágar apropriado sob condições adequadas de temperatura e tempo. Após o cultivo, a ação microbiostática da amostra é indicada através do crescimento do microrganismo e a ação microbida através do não crescimento.

3.6.3 Avaliação da Atividade Larvicida

Os ensaios larvicidas foram realizados no Instituto de Patologia tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pelos professores Ionizete Garcia da Silva e Heloísa Helena Garcia da Silva.

Os bioensaios foram realizados em câmara biológica climatizada similarmente à de criação (GUIMARÃES, 2000). Para cada amostra testada foi preparada uma solução-mãe, dissolvendo-as em DMSO (cerca de 0,2 mL) e acrescentando-se água até a concentração final de 500 ppm. A partir desta solução as concentrações desejadas foram obtidas por diluições seriadas. Para

cada bioensaio foram utilizadas 15 mL de cada solução-teste e 20 larvas de 3º estágio de *A. aegyptii*, para determinação das concentrações letais. Foi realizado um controle colocando a mesma quantidade de larvas em copinhos contendo somente água destilada e DMSO. As leituras foram feitas após 24 e 48 horas de incubação. As larvas foram consideradas mortas quando havia ausência total de movimentos, com escurecimento do corpo e cápsula cefálica (GUIMARÃES *et al*, 2001).

3.7 ESTUDADA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO *Curvularia* EM EXTRATO DE MALTE

3.7.1 Cultivo em larga escala

O meio de cultura escolhido para dar continuidade ao estudo foi o ME. Este meio foi selecionado com base nos resultados obtidos para o ensaio anticolinesterásico, onde o extrato ME obteve melhor resultado. Na época os dados de RMN e CLAE-DAD não estavam disponíveis.

O primeiro meio estudado foi o extrato de malte. Inicialmente foram preparados 15L do meio de cultivo e distribuídos igualmente 300 mL para 50 frascos de Erlenmeyer com capacidade de 1L. Após o preparo os meios foram esterilizados em autoclave e deixados esfriar. O microrganismo foi inoculado para os frascos de Erlenmeyer contendo o meio e os mesmos foram incubados em ausência de luz por 21 dias à temperatura ambiente.

Passado o período de incubação, observou-se que o microrganismo teve um bom crescimento, Figura 13, mas alguns frascos de Erlenmeyer apresentaram a presença de contaminação, estes foram excluídos. Foi realizada então a extração seguindo a mesma metodologia adotada para o cultivo em pequena escala. Com a diferença que, a fase aquosa oriunda da partição do filtrado em acetato de etila foi acidificada com HCl, 37%, até se atingir o pH 3 e novamente particionada com acetato de etila, na proporção de 1:1, 3 vezes.



Figura 14 Crescimento fungico em ME em larga escala.

Foram obtidos 3 extratos, CL-MEF6 (extrato bruto filtrado, pH 6), CL-MEF3 (extrato bruto filtrado, pH 3) e CL-MEM (extrato bruto micelial), exemplificado na Figura 14.

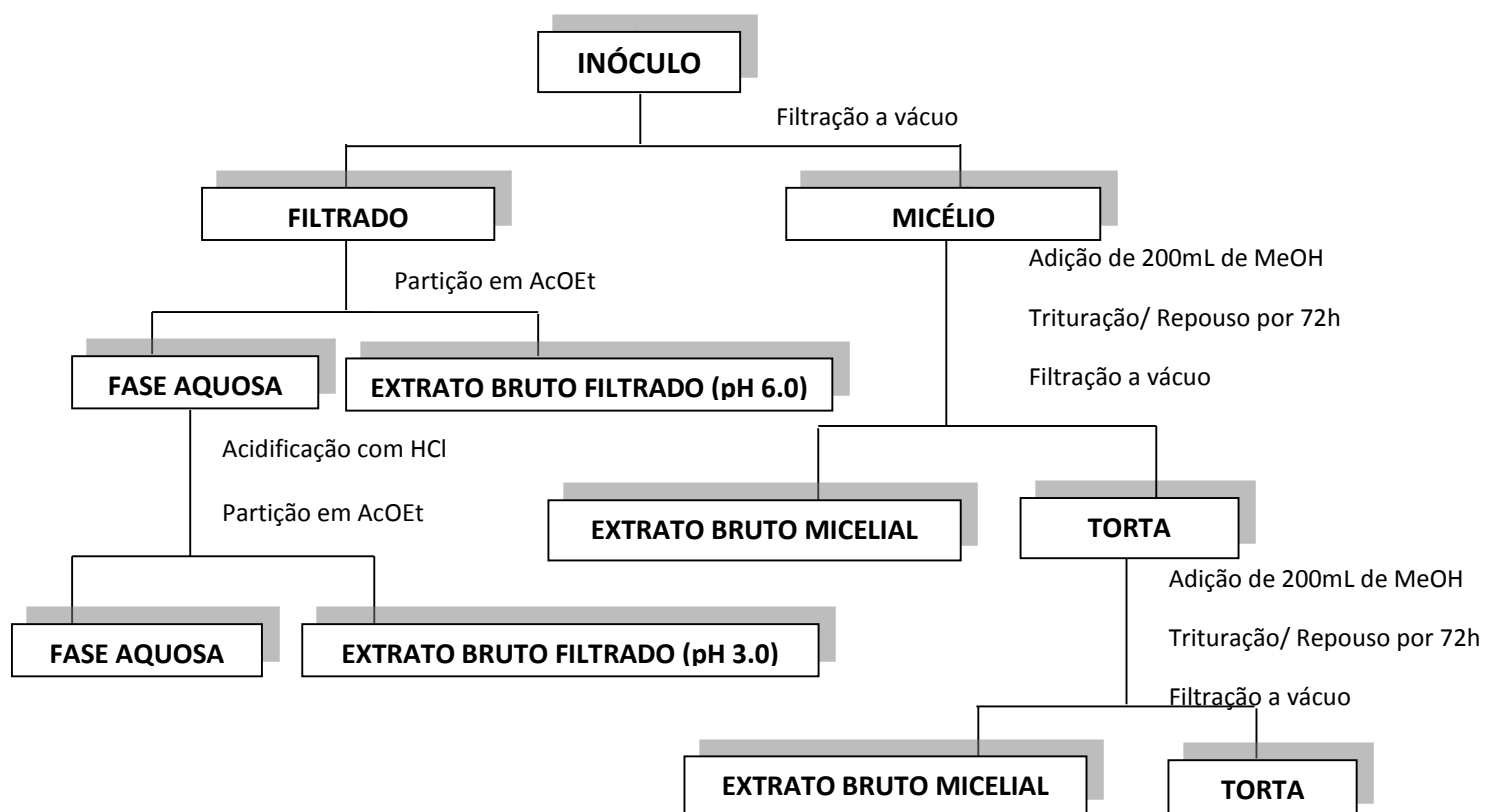


Figura 15 Esquema de obtenção dos extratos

3.7.2 Obtenção dos metabólitos secundários isolados do extrato micelial em meio ME

O extrato micelial (38,5 g), obtido a partir da extração em metanol do cultivado em extrato de malte, foi submetido a uma filtração em coluna de sílica gel 230-400 mesh, usando como eluentes Hex:AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas nove frações, denominadas CL-MEM-1 a CL-MEM-9, que após eliminação dos solventes foram analisadas via cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), Tabela 04.

Tabela 06. Frações, sistema de solventes e massas obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto micelial em ME.

Frações	Sistema de Solvente	Massa (mg)
CL-MEM-1	Hexano 100%	22,7
CL-MEM-2	Hexano 100%	16,8
CL-MEM-3	Hexano/AcOEt 1:1	50,2
CL-MEM-4	Hexano/AcOEt 1:1	204,8
CL-MEM-5	AcOEt 100%	818,3
CL-MEM-6	AcOEt 100%	171,3
CL-MEM-7	AcOEt/MeOH 1:1	971,5
CL-MEM-8	MeOH 100%	403,8
CL-MEM-9	MeOH 100%	932,8
Perda Total	-	311,6

3.7.2.1 Estudo da fração CL-MEM-1, CL-MEM-2, CL-MEM-3 e CL-MEM-4

Após análise de CCDC e RMN de ¹H dessas frações verificou-se que as mesmas eram constituídas em sua maioria por material graxo, sendo assim as mesmas não tiveram continuidade no trabalho.

3.7.2.2 Estudo da fração CL-MEM-5

A fração CL-MEM-5 foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes o sistema hex/AcOEt/MeOH em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 10 frações denominadas CL-MEM-5.1 a CL-MEM-5.10. Todas as frações obtidas foram submetidas à análise por CCDC. A subfração CL-MEM-5.5 foi então submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se como eluentes o sistema hex/AcOEt/MeOH em gradiente crescente de polaridade obtendo-se 23 subfrações. Após análise por CCDC, a subfração CL-MEM-5.5.17 foi escolhida para dar continuidade no trabalho, sendo realizada uma cromatografia em camada delgada preparativa originando as substâncias CL-01 e CL-02, como mostra o fluxograma da Figura 15.

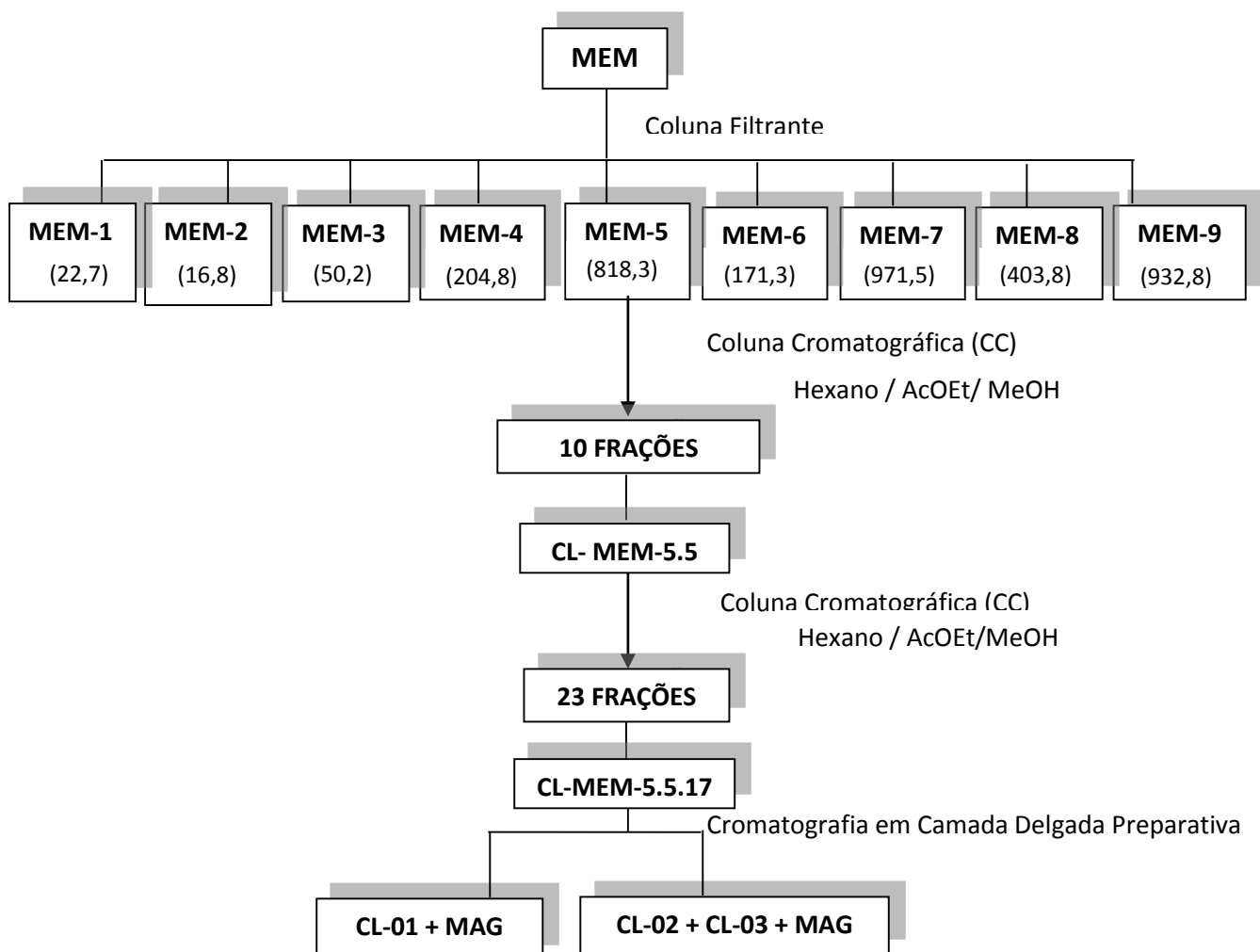


Figura 16 Esquema de obtenção das substâncias CL-01, CL-02 e CL-03

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

4.1 RESULTADO DO LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO COMPLEXO *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus*

Com base no levantamento de dados realizado no SciFinder verificou-se que das 119 espécies de *Curvularia* listadas no *Index Fungorum*, apenas nove espécies foram estudadas do ponto de vista químico, sendo a espécie *Curvularia lunata* alvo de um maior número de estudos. Setenta substâncias foram identificadas a partir do estudo dos extratos obtidos de espécies deste gênero (Figura 18), sendo que 43 compostos foram isolados a partir de espécies identificadas e 27 substâncias obtidas a partir de isolados do gênero não identificadas em nível de espécie. Com relação ao gênero *Bipolaris*, das 116 espécies conhecidas apenas seis foram estudadas do ponto de vista químico, totalizando 46 compostos isolados. No gênero *Cochliobolus*, por sua vez, das 56 espécies descritas na literatura, apenas seis delas foram estudadas do ponto de vista químico, das quais foram isolados 41 compostos. Fica evidente, portanto, que os microrganismos pertencentes a este complexo têm recebido pouca atenção no que diz respeito ao seu metabolismo secundário, embora sejam fungos de grande importância devido a sua fitopatogenicidade.

Os compostos isolados a partir do gênero *Curvularia* demonstram uma diversidade estrutural significativa, pertencendo principalmente à classe dos policetídeos, como as antraquinonas cinodontina (**64**) e lunatina (**65**), a bisantraquinona citoskirina A (**66**) e as lactonas macrocíclicas α,β -dehidrocurvularina (**46**), apralactona A (**92**) e curvulapirona (**105**), abrangendo também outras classes de metabólitos, como os alcalóides curvupalídeo A-C (**84-86**) e o terpeno curvularol (**87**) (Figura 18).

Os trabalhos publicados sobre o metabolismo secundário do gênero *Bipolaris* apontam para um total de 49 compostos, sendo em sua maioria sesterterpenoides, como as ofiobolinas I (**131**) e ofiobolina A (**132**), sesquiterpenoides, como a bipolaroxina (**122**) e bipolarol (**129**) e policetídeos, como cinodontina (**64**) e helmintosporina (**134**) (Figura 19). É possível observar também que o predomínio do estudo sobre esse gênero se concentrou nas

décadas de 80 e 90, sendo publicados apenas três artigos a partir dos anos 2000.

Os compostos produzidos por espécies de *Cochliobolus*, por sua vez, também apresentaram diversidade estrutural (Figura 20), onde a maioria das substâncias isoladas pertence à classe dos sesterterpenoides, como as ofiobolinas A (**132**) e B (**152**), os tetrapeptídeos cíclicos, como a HC-Toxina (**151**) e lactonas macrocíclicas, como as cochliomicinas A - C (**156-158**).

As micotoxinas produzidas por espécies destes três gêneros podem ou não ser hospedeiro-específicas (SIVANESAN, 1987). Espécies dos gêneros *Bipolaris* e *Cochliobolus* produzem micotoxinas com maior importância e poder de devastação do que as espécies de *Curvularia*. As micotoxinas produzidas por espécies de *Bipolaris* geralmente pertencem a um grupo de sesterpenoides chamado de ofiobolinas (sistemas de anéis tricíclicos 5-8-5) e foram recentemente revistos por Au et al. (2000). A espécie *B. cynodontis*, no entanto, produziu micotoxinas pertencente a um grupo diferente, chamado cochlioquinonas (LIM et al., 1998). A toxina HS (um peptídeo), produzida por *Cochliobolus victoriae*, HC toxina (um polipeptídeo) produzida por *Cochliobolus carbonum* e toxina T produzido por *C. heterostrophus* são exemplos de toxinas hospedeiro-específicas (SIVANESAN, 1987), enquanto que ofiobolinas (terpenoides), produzida por *C. miyabeanae* a carbotoxina produzida por *C. carbonum* são exemplos de toxinas não hospedeiro-específicas (SIVANESAN, 1987). Curvularinas são micotoxinas produzidas pela espécie *Curvularia lunata* e têm sido encontradas como contaminantes em grãos de arroz (ANTHONY et al, 2009).

Após uma avaliação da diversidade estrutural dos compostos produzidos pelos três gêneros, observou-se que os perfis químicos apresentados pelos gêneros *Curvularia* e *Bipolaris* mostraram-se divergentes. O gênero *Curvularia* exibiu maior produção de metabólitos conhecidos como curvularinas e seus derivados, que são lactonas macrocíclicas (octacetídeos) compostas por um esqueleto macrolídeo de 12 membros, como pode ser observado nos compostos: dehidrocurvularina (**46, 93-96**), 11- α -metoxicurvularina (**76**), e as hidrocurvularinas (**103 e 104**). Estes compostos não foram encontrados entre os

metabólitos produzidos por espécies de *Bipolaris*; no entanto a curvularina (**169**) e a 6-clorodehidrocurvularina (**170**) foram isoladas a partir de espécies do gênero *Cochliobolus*. Por outro lado, espécies do gênero *Bipolaris*, produziram majoritariamente sesquiterpenoides do tipo cochlioquinonas (**113-116, 121, 133 e 137**) e sesterterpenoides do tipo ofiobolinas (**130-132, 139 e 140**), cochlioquinonas também foram isoladas em extratos de *Cochliobolus*.

Com base na descrição destes metabólitos reportados na literatura podemos inferir que as lactonas macrocíclicas (grupo das curvularinas) poderiam ser utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Curvularia*, enquanto que os sesqui e sesterterpenoides (cochlioquinonas e ofiobolinas, respectivamente) possam caracterizar fungos do gênero *Bipolaris*. A espécie de *Cochliobolus* em que foi relatada a ocorrência das lactonas macrocíclicas é teleomorfo de *Curvularia spicifera*, ao passo que aquelas que produziram os terpenoides são teleomorfos de *Bipolaris oryzae* e *B. maydis*. Estes dados podem corroborar para a proposta de Manangoda et al. (2012) de segregar o complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* em dois gêneros de fungos, a saber *Bipolaris* e *Curvularia*. As espécies fúngicas do gênero *Cochliobolus* foram renomeadas para um destes dois gêneros conforme suas características morfológicas e genéticas (MANANGODA, 2012) e nossos estudos corroboram com estes dados. Entretanto, um estudo químico envolvendo um maior número de espécies deste complexo deve ser feito para validar esta hipótese feita com base somente nos metabólitos descrito na literatura.

Observou-se também que apenas os compostos radicina (**57**) e radicinol (**73**) foram isolados a partir de espécies dos três gêneros, a saber, *Curvularia geniculata* (KRAUTSCHEID et al., 2010), *Bipolaris coicis* (NAKAJIMA et al., 1996) e *Cochliobolus lunatus* (NUKINA E MARUMO, 1977). A cinodontina (**64**), uma antraquinona empregada como corante natural, foi encontrada em extratos de *Bipolaris sorokonina* (ENGSTROM et al., 1993), *Curvularia pallescens* (MABADEJE et al., 1978) e *Curvularia lunata* (HOBSON et al., 1997). Estes compostos pertencem a classe dos policetídeos que possuem ampla distribuição no reino Fungi, isto é, fungos de gêneros diferentes podem produzir os mesmos metabolitos (COLE e SCHWEIKERT, 2003). Dessa forma estes compostos não

podem ser utilizados como marcadores taxonômicos para separação entre os gêneros *Curvularia* e *Bipolaris*.

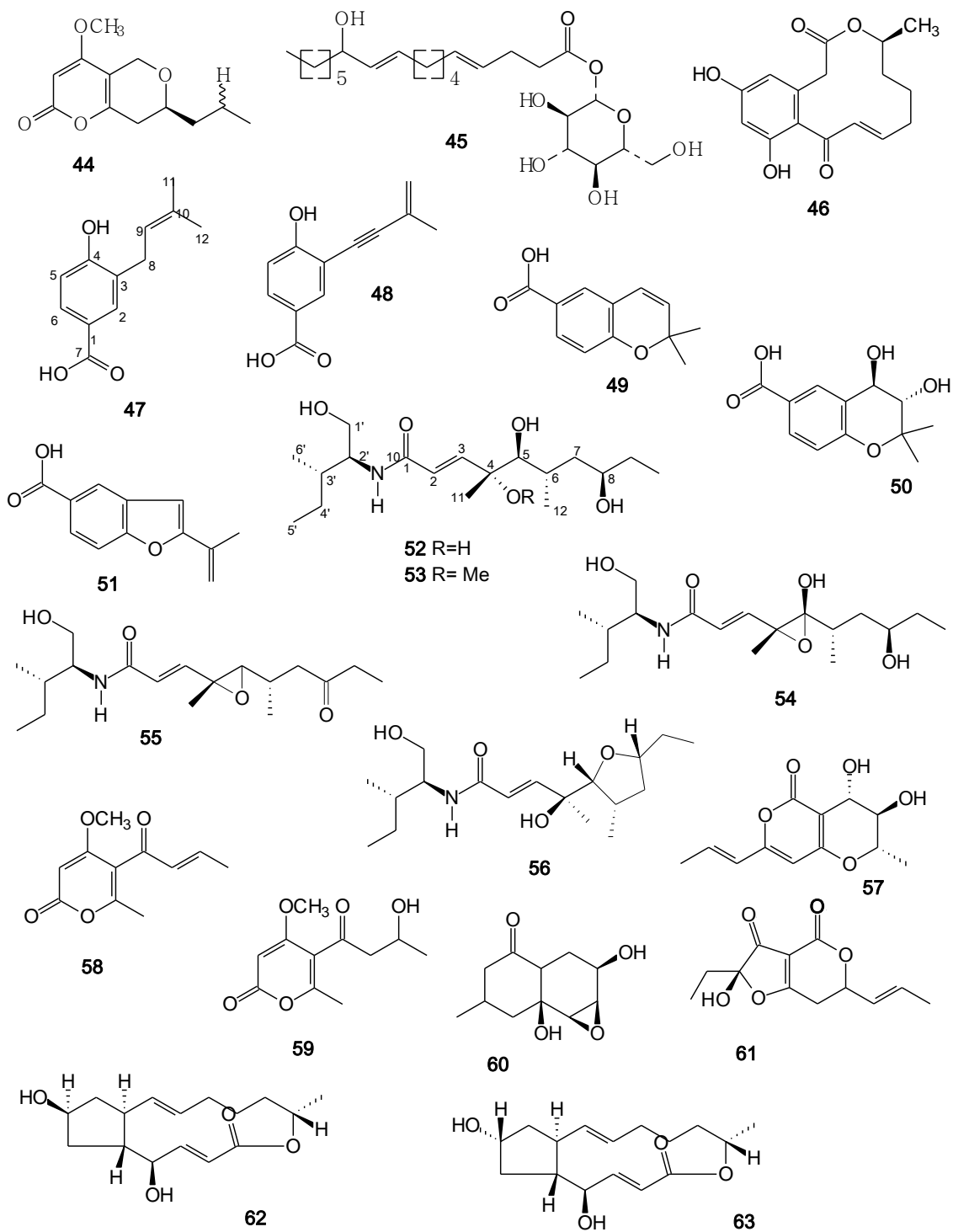


Figura 17 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Curvularia*

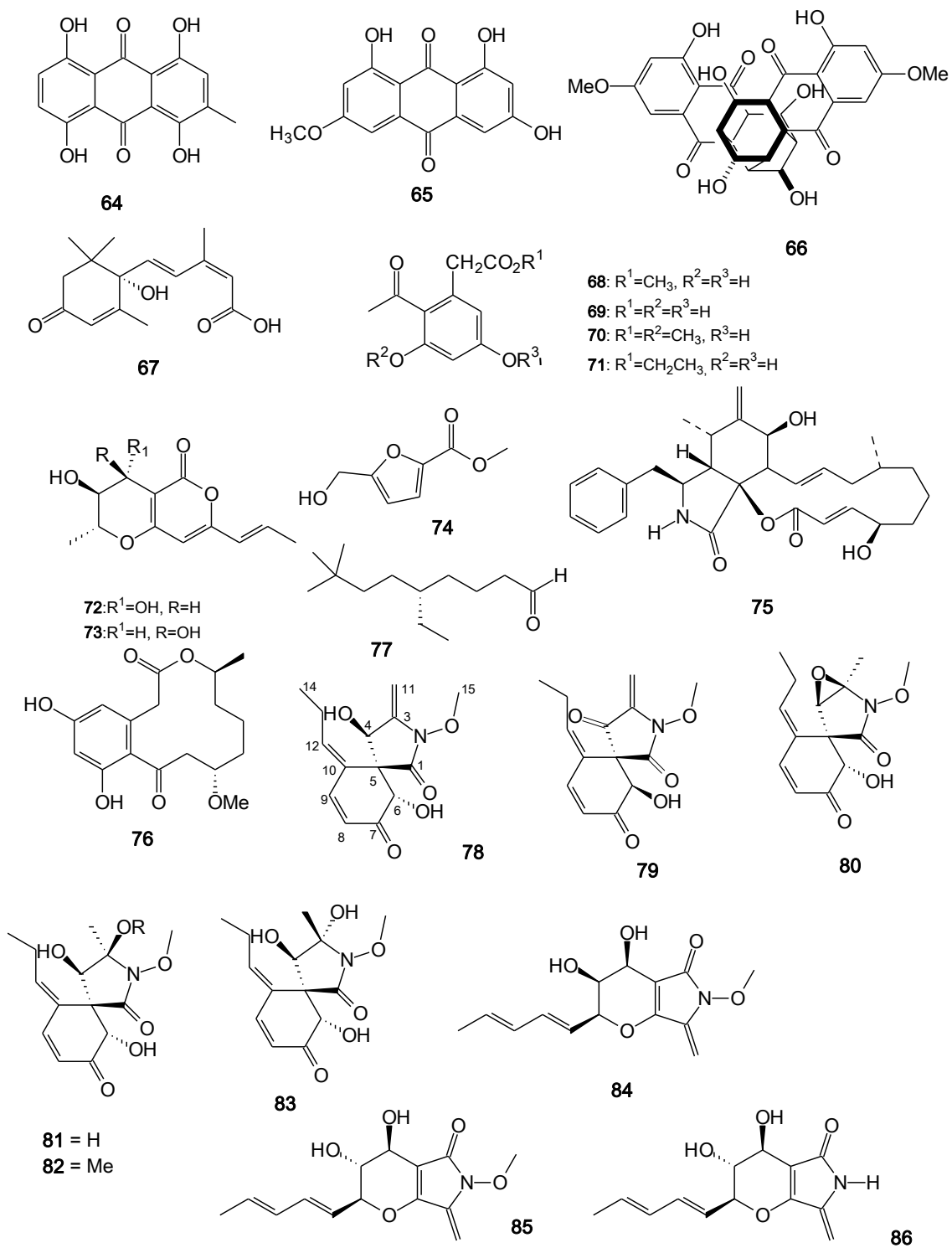


Figura 18 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Curvularia* (continuação).

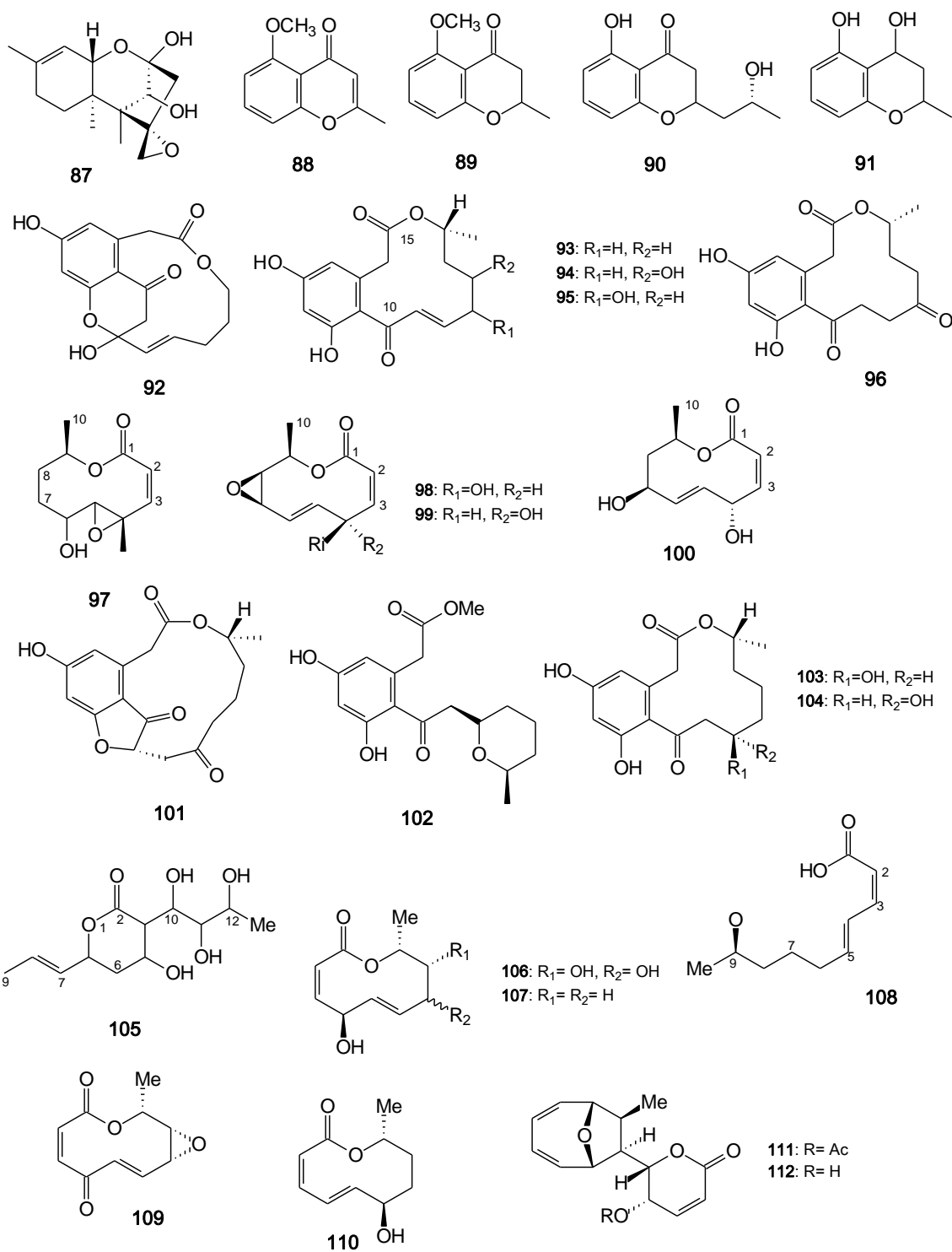


Figura 19 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Curvularia* (continuação).

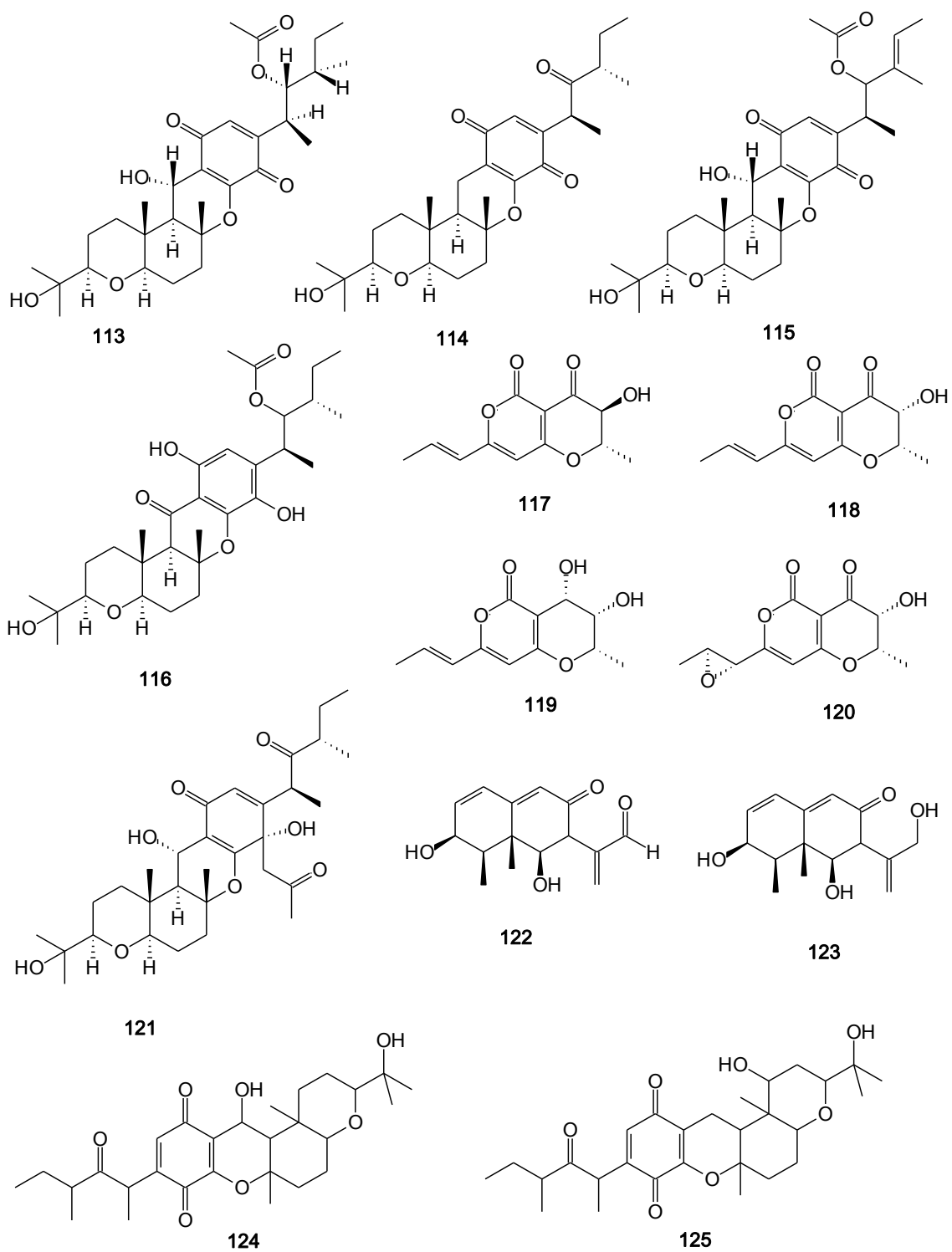


Figura 20 . Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Bipolaris*

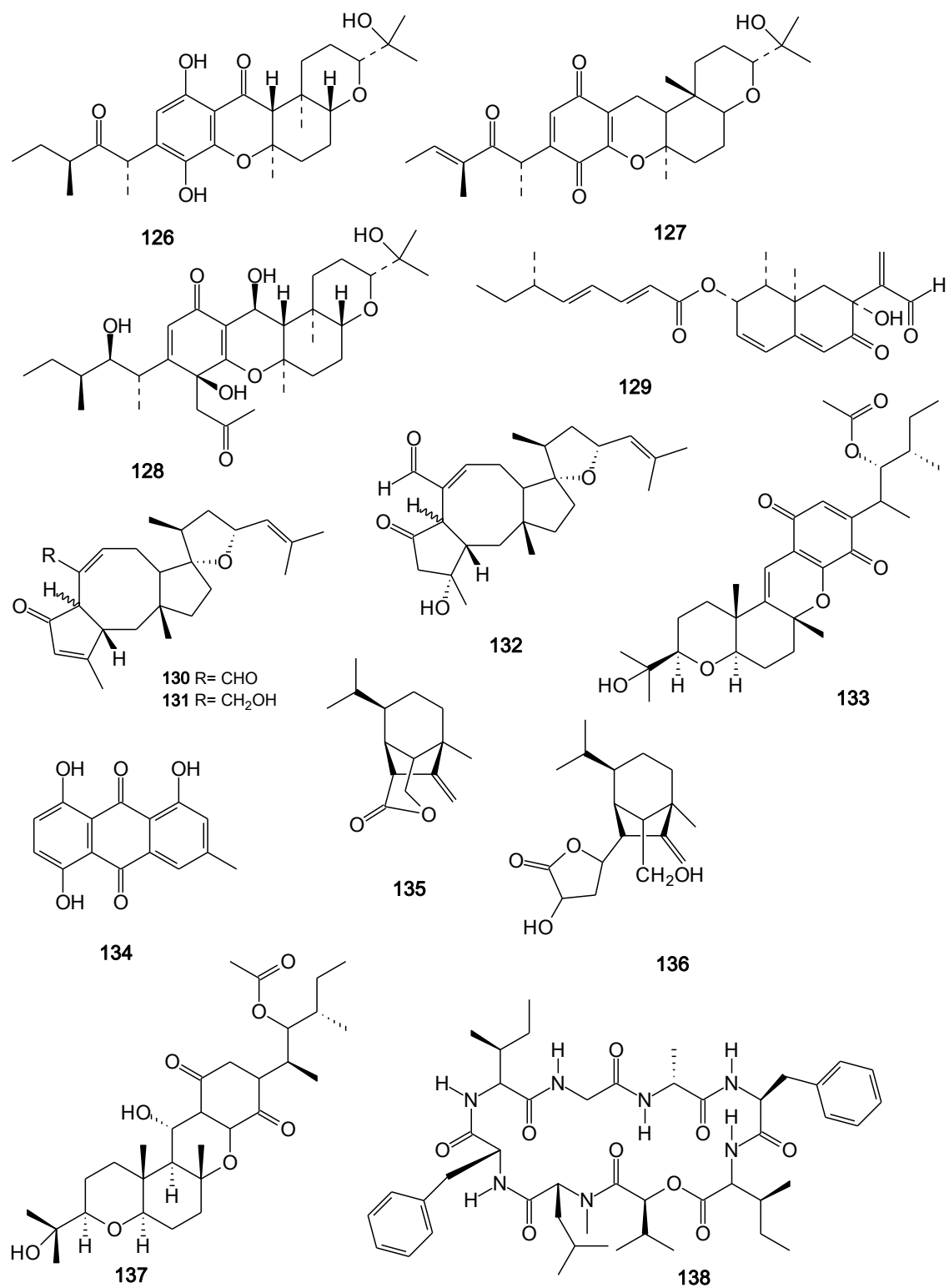


Figura 21. Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Bipolaris* (continuação)

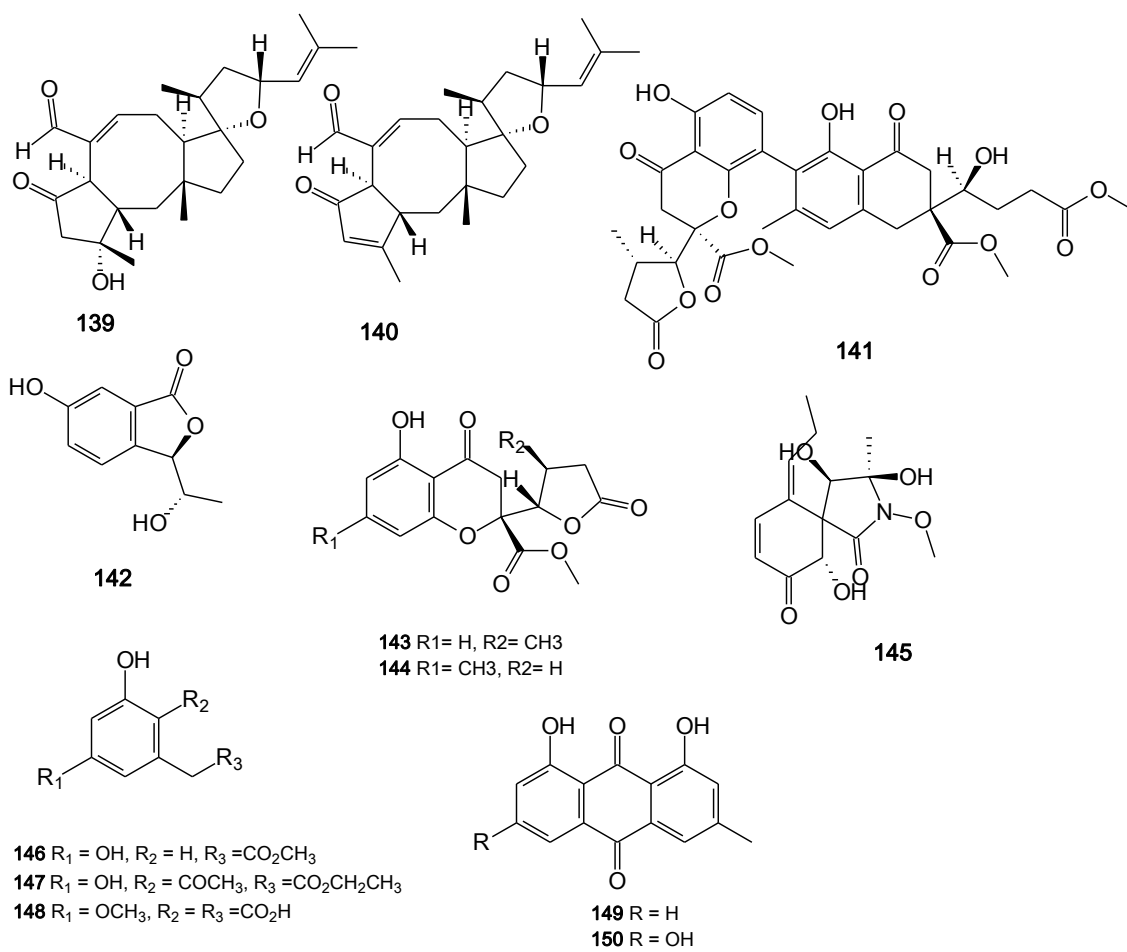


Figura 22. Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Bipolaris* (continuação)

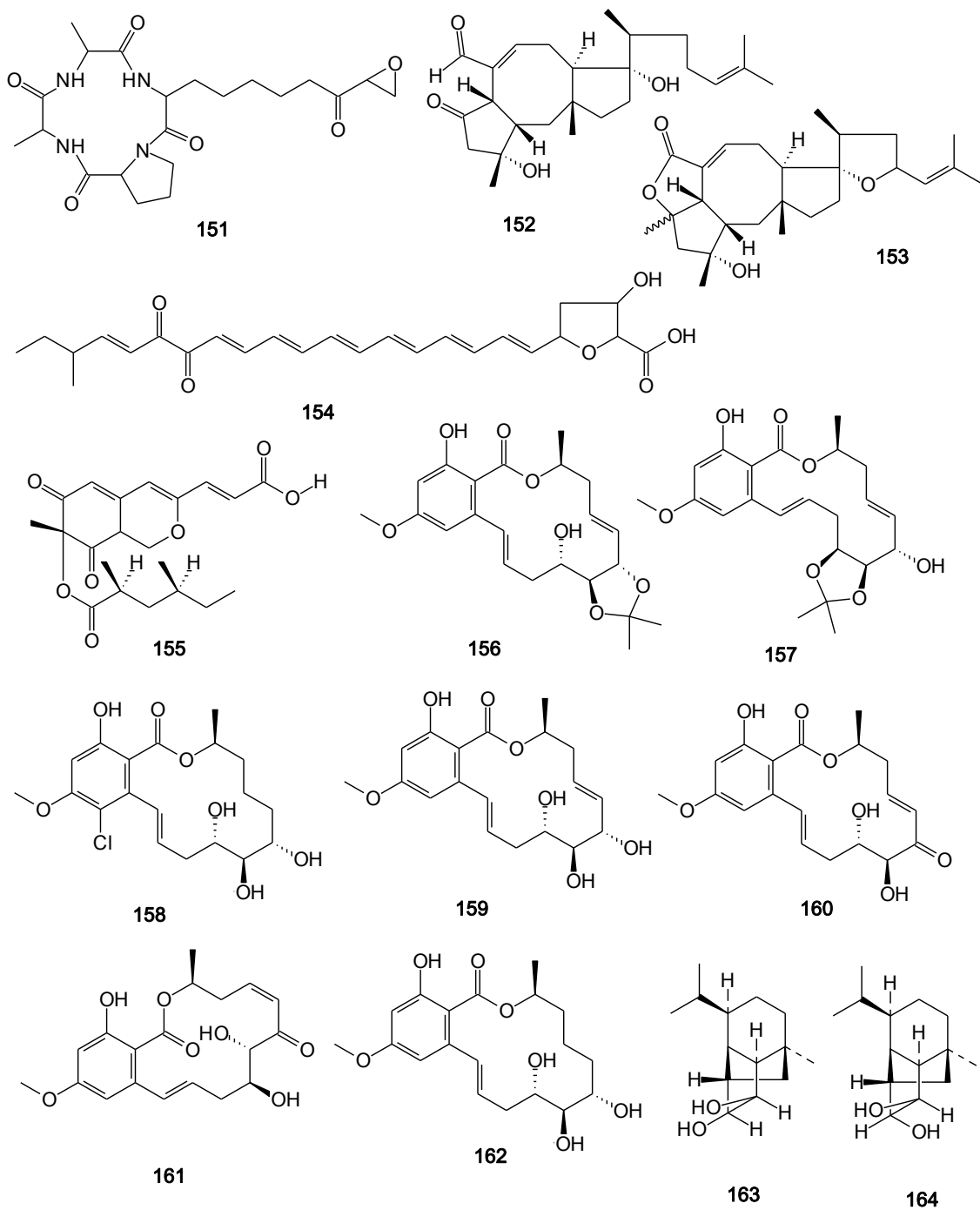


Figura 23 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Cochliobolus*

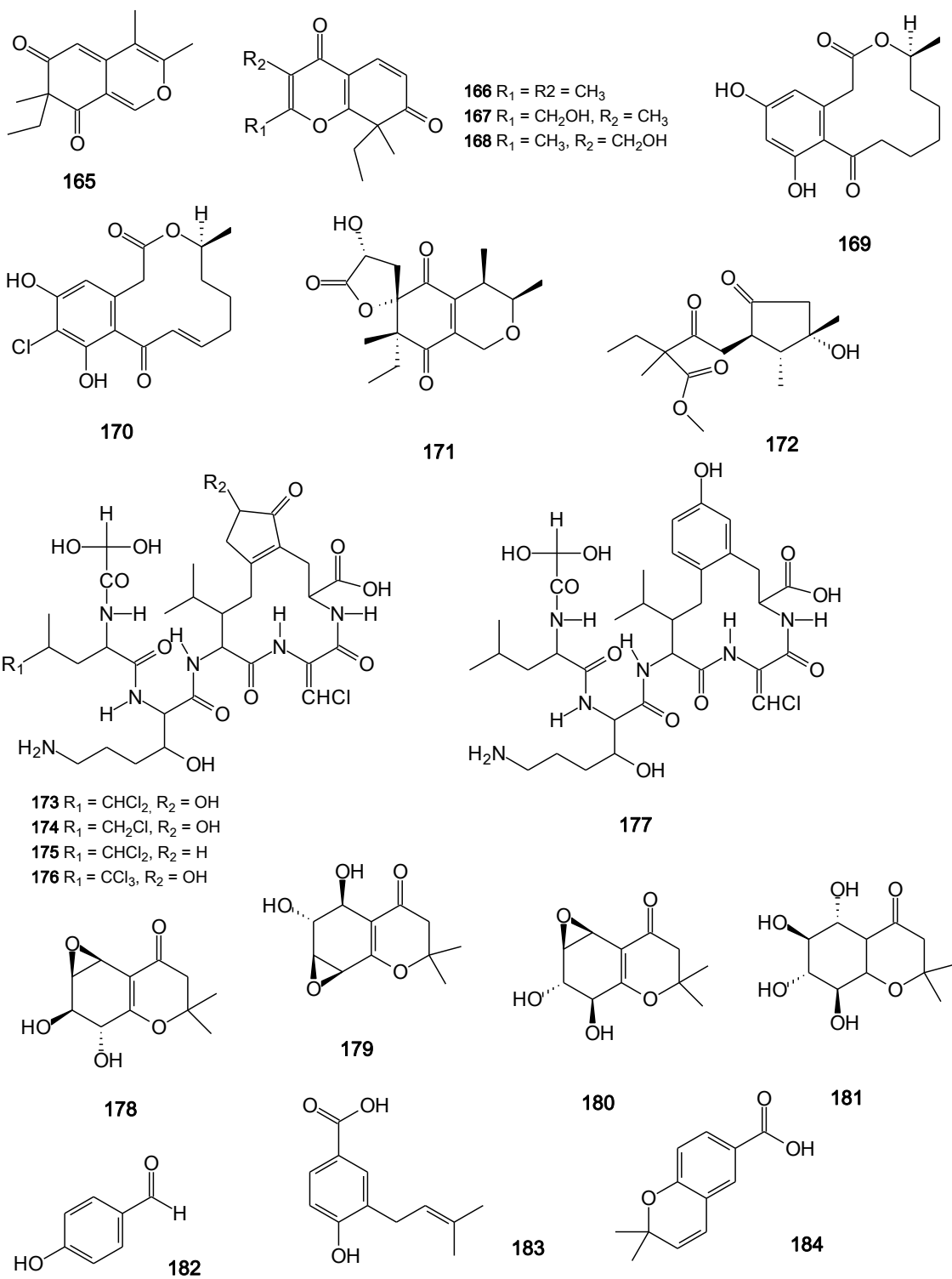


Figura 24 Estruturas químicas dos compostos isolados a partir do gênero *Cochliobolus* (continuação)

Durante o levantamento bibliográfico checamos as atividades biológicas dos metabólitos relatados. Foi constatado diversidade de ação biológica nos metabólitos produzidos por cada um destes gêneros.

Algumas micotoxinas têm propriedades medicinais e estas poderiam ser utilizadas no tratamento de diversas doenças. Por exemplo, as ofiobolinas possuem uma vasta gama de efeitos inibitórios contra nematóides, fungos e bactérias, enquanto as cochlioquinonas possuem propriedades antiangiogênicas e antagonista de receptores de quimiocinas humanos CCR5, um alvo importante para a terapia anti-HIV (PHUWAPRAISIRISAN et al, 2007).

Compostos isolados a partir de espécies do gênero *Curvularia* apresentam diversas atividades biológicas (Figura 21). A maioria dos compostos relatados (36%) não teve seu potencial biológico relatado, enquanto que das atividades biológicas descritas a maioria dos compostos (20%) apresentaram atividade antibacteriana, seguida por atividade citotóxica e antifúngica. Atividade larvívica e antioxidante foram encontrada em apenas 2% dos metabólitos descritos na literatura para o gênero *Curvularia*.

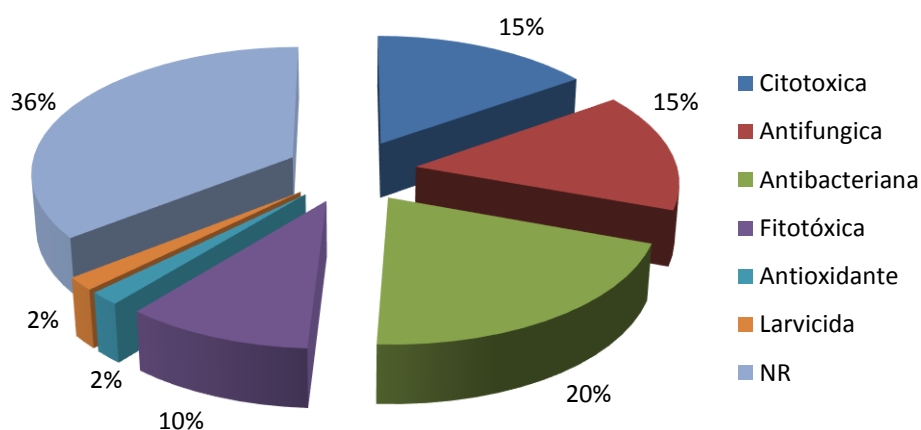


Figura 25 . Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos compostos isolados a partir de espécies do gênero *Curvularia*, NR = não relatado

Dentre os compostos que tiveram ação biológica confirmada, os curvularídeos A-E (52-56) produzidos pela espécie *Curvularia geniculata* apresentam propriedades antifúngicas, o curvularídeo B (52) mostrou atividade

antifúngica contra a *Cândida albicans*, que é um agente patogênico oportunista, especialmente em pacientes com HIV. O curvularideo B (**52**) exibiu efeito sinérgico com o fluconazol (CHOMCHEON et al., 2010). A pirenocina J (**44**) apresentou atividade citotóxica contra células hepáticas tumorais humanas (ZHANG et al, 2012), enquanto o curvularol (**87**) apresentou atividade citotóxica contra células tumorais em ratos (HONDA et al, 2001). As curvularinas e seus derivados exibem diversos efeitos biológicos, tais como as atividades fitotóxica e antimicrobiana (BUSI et al, 2009), assim como citotoxicidade contra células tumorais humanas (KONIG et al, 2008).

Com relação ao potencial biológico associado aos compostos descritos na literatura produzidos por espécies de *Bipolaris*, a grande maioria (57%) apresentou atividade fitotóxica (Figura 22). As ofiobolinas são encontradas comumente como fitotoxinas, sendo responsáveis por lesões e manchas castanhas características em culturas de arroz e milho (AU et al, 2000), mas alguns derivados ofiobolinas apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais humanas (JONG-WOONG et al, 1998). A cochlioquinona A1 foi isolada de extratos de *Bipolaris zeicola* e apresentou potente atividade anti-angiogênica e pode ser desenvolvida como um novo agente terapêutico para o tratamento de doenças relacionado à angiogênese (JUNG et al, 2003). Alguns trabalhos não avaliaram a atividade biológica dos compostos isolados.

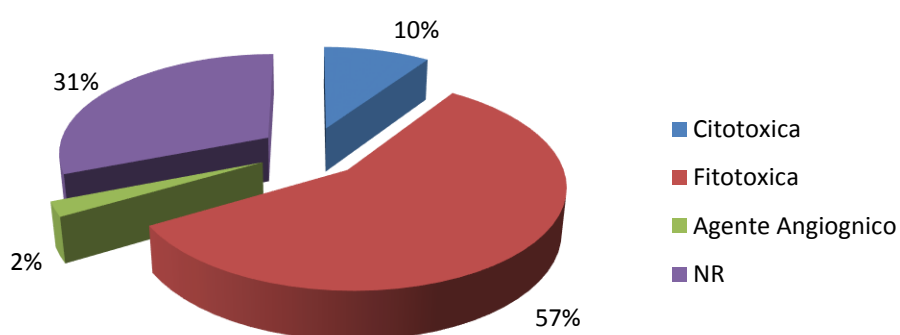


Figura 26 Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos compostos isolados a partir de espécies do gênero *Bipolaris*, NR = não relatado.

Os compostos isolados a partir de espécies de *Cochliobolus* também apresentaram atividade biológica. Curvularideos, cochlioquinonas, antraquinonas e algumas novas proteínas envolvidas na regulação do peptídeo cíclico e degradação da parede celular têm sido relatados em cepas *Cochliobolus*. Estes compostos podem ter importantes propriedades medicinais, tais como propriedades antifúngicas e, portanto, têm o potencial para serem utilizados na medicina (CHOMCHEON et al., 2010).

Finalmente, com base nos relatos das atividades biológicas dos compostos produzidos por fungos destes gêneros é possível constatar que os metabólitos isolados por espécies do gênero *Bipolaris* apresentaram maior efeito deletério como citotóxico e fitotóxico, enquanto que os compostos oriundos de espécies do gênero *Curvularia* podem apresentar potencial uso na medicina.

4.2 CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE *Curvularia lunata*

O fungo *Curvularia* sp, depositado na micoteca do Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos sob número LBQM-04, foi selecionado para o estudo químico e biológico durante este trabalho. A identificação em nível de espécie se deu através de suas características macro e microscópicas, e comparação com os dados disponíveis na literatura (WATANABE, 2002; FURTADO, 2007)

As características macroscópicas deste fungo foram observadas após o cultivo de um fragmento do isolado em uma placa de Petri contendo batata, dextrose e ágar como meio de cultura. Colônias abundantes de crescimento rápido e coloração marrom escura com reverso preto e textura aveludada sugeriu a presença de um fungo dematiáceo, como mostra a Figura 23b

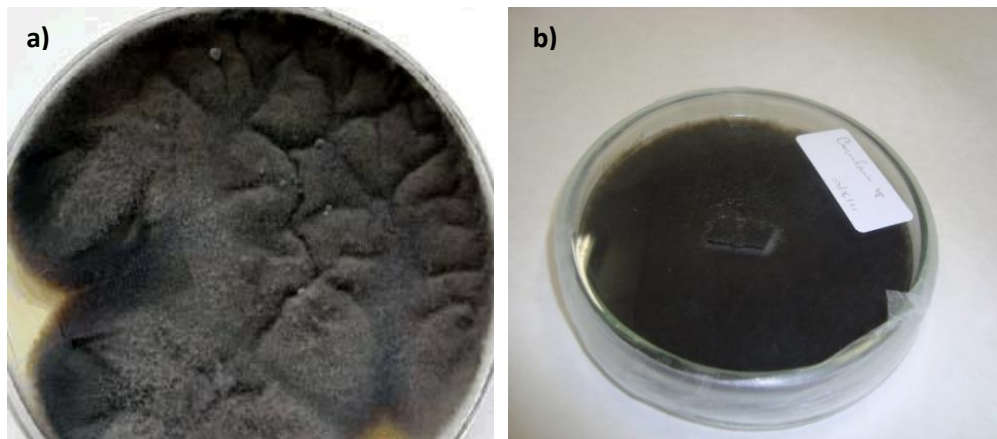


Figura 27 Aspectos macroscópicos do fungo *Curvularia lunata*. **a)** Fotografia retirada de [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(dematiaceous\)/Curvularia/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiaceous)/Curvularia/) e **b)** Fotografia do *Curvularia lunata* em placa de Petri com meio BDA – Depositado

Uma porção desta colônia foi observada no microscópio óptico utilizando azul de lactofenol como corante para visualização das hifas e conídios em um aumento de 10x e 40x. As hifas presentes são septadas e possuem coloração marrom. Os conídios, levemente curvados e elípticos de coloração marrom clara, apresentaram três septos transversais com quatro células, sendo as células centrais mais escuras que as células das extremidades. Além disso, o septo central também apresentou mais escuro e largo que os demais, sugerindo tratar-se da espécie *Curvularia lunata*. A comparação dos nossos dados com as características micromorfológicas feita por Furtado (2007) e Watanabe (2002) confirmam que o isolado LBQM-04 trata-se de *Curvularia lunata* (Figura 24).

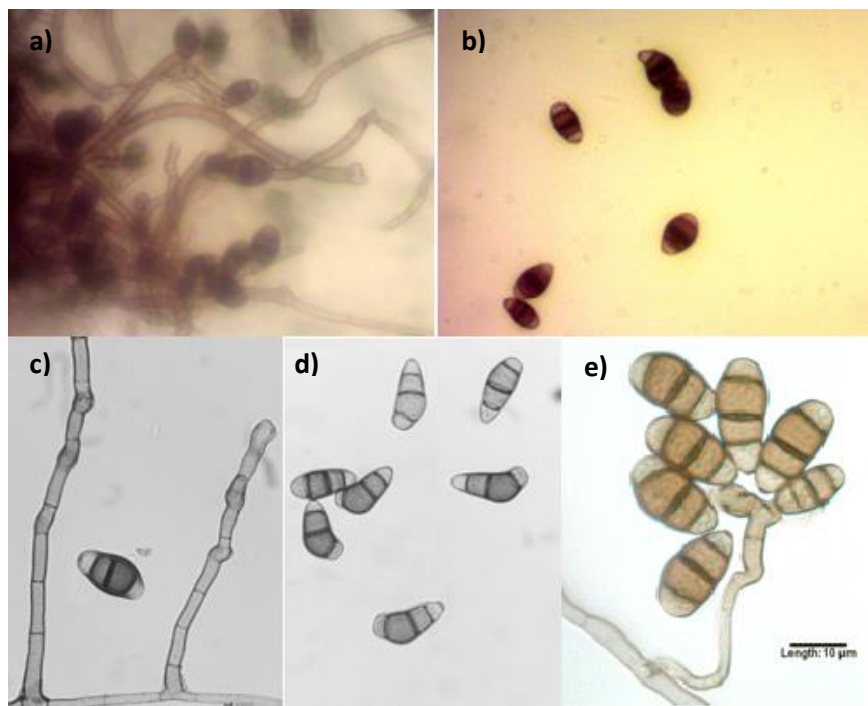


Figura 28 Imagens de microscopia óptica do fungo *Curvularia lunata*; a e b) Isolado fúngico LBQM-04; c, d e e) *Curvularia lunata*, fonte: FURTADO, 2007

4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Curvularia lunata*

Com a finalidade de avaliar a velocidade de crescimento fúngico efetuou-se uma curva de crescimento radial para o microrganismo em BDA (Figura 25). No estudo do metabolismo fungico é importante determinar o estágio de fermentação na qual os metabolitos são produzidos, não apenas para obter a produção máxima, mas também estabelecer o tempo adequado para estudos biossintéticos (HANSON, 2008).

A Figura 25 apresenta os valores do diâmetro da colônia (mm) em função do tempo (h), para o crescimento de *Curvularia lunata* em meio de batata-dextrose-ágar, na temperatura de 28°C. Trata-se de uma curva típica de crescimento de fungos filamentosos, constituída por três regiões: um patamar inicial, correspondente a fase lag (0-24 h), uma fase de crescimento exponencial ou fase log (24-120 h) e uma fase estacionária (a partir de 120 h) (HANSON, 2008). É durante a fase de crescimento exponencial ou fase log que os microrganismos produzem seus metabolitos característicos.

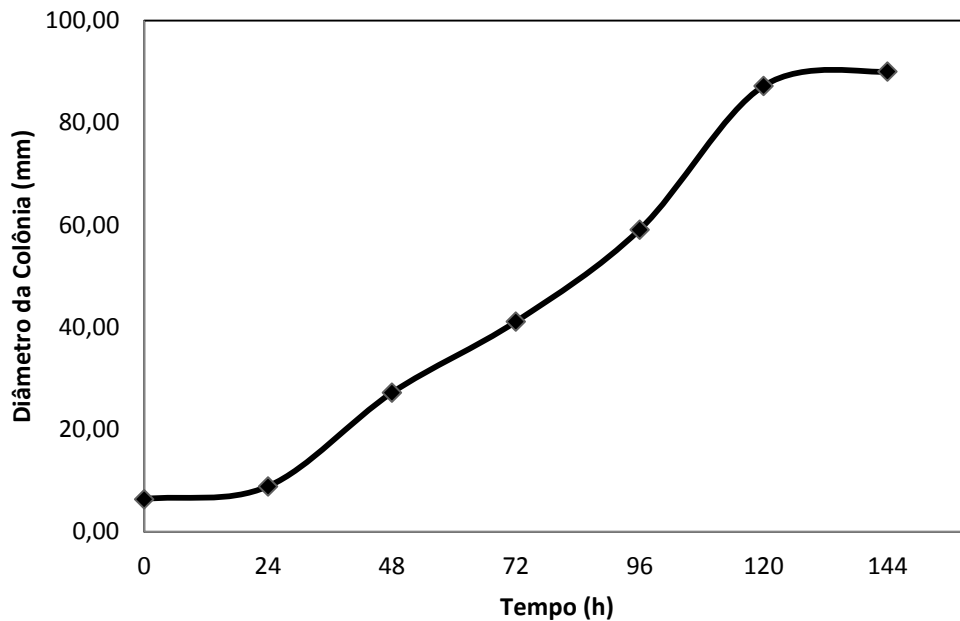


Figura 29 Análise do crescimento radial do fungo *Curvularia lunata* em função do tempo. O fungo foi cultivado em meio de batata-dextrose-ágar e o diâmetro da colônia (mm) medido a cada 24 horas

A velocidade de crescimento radial encontrada para o microrganismo no meio estudado foi de 0,66 mm/h, portanto o *Curvularia* é classificado como de crescimento moderado, e foi determinada pela declividade da reta obtida pela regressão linear, conforme Equação 1.

$$r(t) = a + v_{cr} \cdot t \quad (1)$$

Onde $r(t)$ é o raio da colônia (mm), a é a constante da regressão linear, v_{cr} é a velocidade de crescimento radial (mm/h) e t é o tempo de cultivo (h).

Segundo Dantigny et al. (2005) e Garcia et al. (2009), embora existam modelos mais sofisticados, como o de Baranyi e de Gompertz modificado, o modelo linear é simples e preciso. A análise da regressão linear revelou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0.9678. Isso indica que o modelo linear

adotado neste estudo é capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento do fungo observado nos experimentos.

4.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA ESPÉCIE *Curvularia lunata*.

4.6.1 Crescimento do *Curvularia lunata* em diferentes meios de cultura

Para avaliação da variação da fonte de carbono no crescimento e metabolismo do fungo *Curvularia lunata*, o mesmo foi cultivado em oito meios de cultura diferentes disponíveis em nosso laboratório. Sabe-se que a composição do meio de cultura influencia diretamente no crescimento, esporulação e na capacidade de produzir metabólitos secundários pelos microrganismos (NIELSEN et al., 2005; BERDY, 2005; SOOD, 2011).

A espécie *Curvularia lunata* apresentou diferenças em seu aspecto macroscópico quando cultivado nos diferentes meios de cultura (Figura 26).

Nos meios de batata e dextrose (BD) e farinha de arroz e dextrose (RD) o meio líquido apresentou coloração cinza, enquanto no meio czapeck (CZ) observou-se uma coloração laranja para o castanho e os demais meios de cultura apresentaram uma coloração marrom.

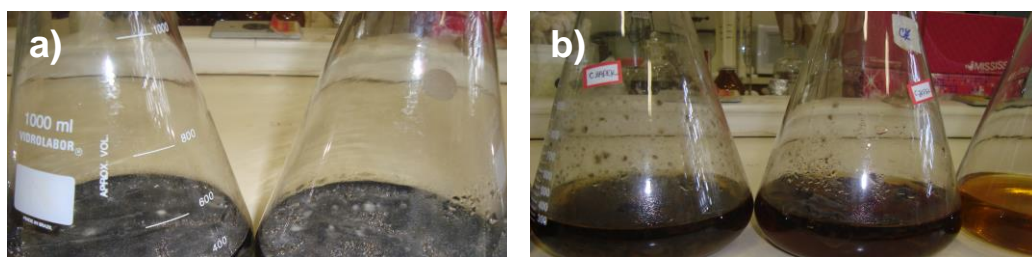
O meio BD apresentou colônia de coloração cinza com a presença de algumas hifas brancas com aspecto aveludado uniforme (Figura 26a), enquanto que o meio czapeck apresentou colônias de coloração marrom com crescimento não uniforme (Figura 26b). Os meios extrato de malte (ME) e extrato de malte e dextrose (MED) apresentaram colônias de coloração cinza com aspecto aveludado, com a formação de exsudatos de coloração marrom escura (Figura 26c e 26d, respectivamente). Os meios extrato de levedura (YE) e extrato de levedura e dextrose (YED) formaram colônias marrom escuras, com aspecto aveludado (Figuras 26e e 26f). O meio RD, por sua vez, formou colônias cinzas com aspecto aveludado, sem a formação de exsudatos. O meio arroz, por se

tratar de um meio sólido, não se pode observar o aspecto das colônias, mas foi possível verificar o crescimento do microrganismo de coloração negra sobre os grãos de arroz.

Após o crescimento nestes diferentes meios de cultura a maior biomassa foi obtida em meio BD e ME, seguido por RD, enquanto que os meios czapeck e YE foram os que apresentaram menor massa fúngica, o que pode estar relacionado a composição dos meios de cultura; uma vez que nos meios de batata e dextrose, extrato de malte e farinha de arroz e dextrose há uma maior disponibilidade de macronutrientes, sobretudo carbono, essenciais ao desenvolvimento do microrganismo.

Tais mudanças nas colorações dos sobrenadantes, bem como alterações morfológicas no micélio sugerem a influência do meio de cultura no crescimento do microrganismo, o que está de acordo com os resultados obtidos por RIZNER e ROMIH (2007) que estudaram a influência do meio de cultura na morfologia e na atividade 17 β -HSD em uma espécie de *Curvularia lunata*.

A condição ideal para crescimento e desenvolvimento do metabolismo varia muito de acordo com a espécie. Fatores como fonte de carbono, nitrogênio, temperatura, aeração, tempo de cultivo podem impactar no desenvolvimento de determinada espécie enquanto que outros microrganismos requerem a estimulação por moléculas sinalizadoras provenientes de outros microrganismos (LARSEN et al., 2005). Em nosso estudo avaliamos a influência apenas da variação da fonte de carbono no crescimento e produção de metabólitos secundários por *Curvularia*. sp.



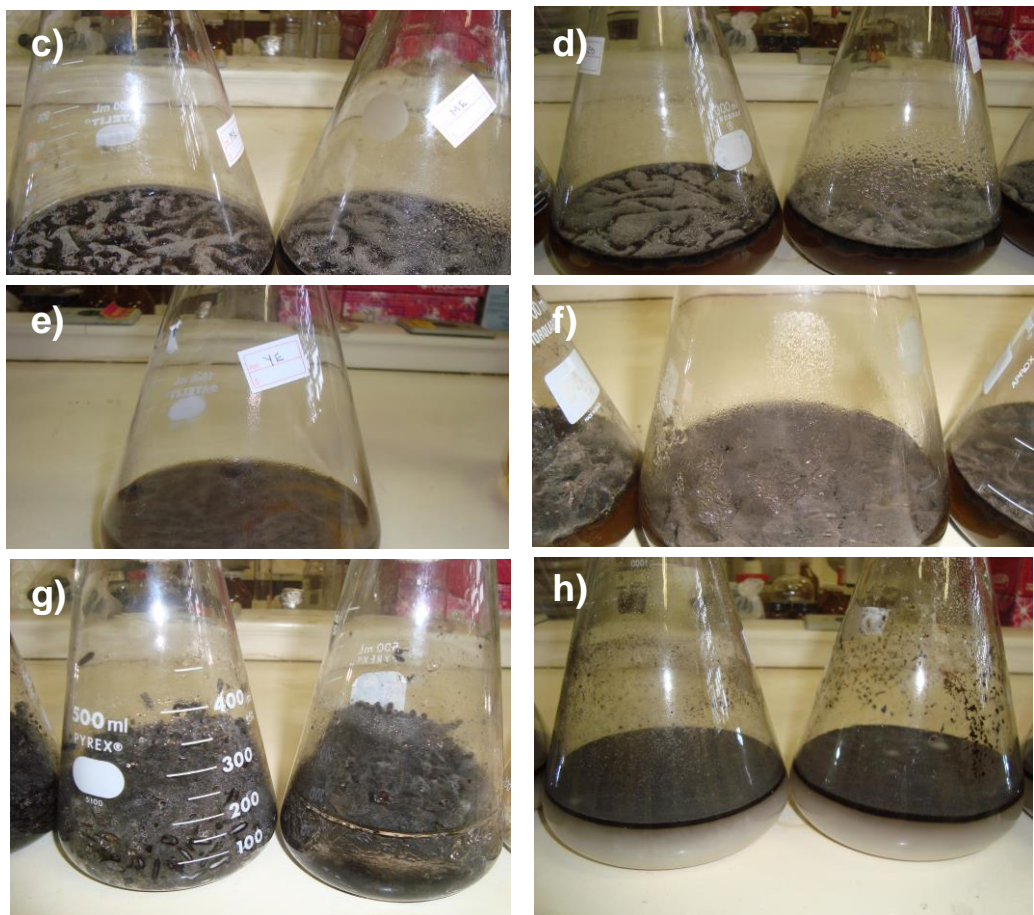


Figura 30 Crescimento do *Curvularia lunata* em diferentes meios de cultura; a) BD; b) Czapeck; c) ME; d) MED; e) YE; f) YED; g) R; h) RD.

4.6.2 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos Extratos

Os extratos obtidos foram primeiramente avaliados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) utilizando como reagentes reveladores solução de anisaldeído e solução de vanilina/ácido sulfúrico; adicionalmente, utilizou-se radiação ultravioleta (254 e 366 nm) e câmara de vapor de iodo como agentes reveladores.

Através da análise das cromatoplacas foi possível observar a produção de uma grande quantidade de compostos com diferentes índices de retenção, o que reflete as diferenças em polaridade das substâncias, para todos os meios de cultura estudados. Alguns dos compostos foram revelados em anisaldeído, o que permite sugerir a presença de fenóis, açúcares, esteróides ou terpenos, enquanto que os compostos revelados em solução de vanilina/ácido sulfúrico sugerem a presença de terpenos e derivados policetídeos (STAHL, 1969). Além disso, os compostos revelados no vapor de iodo sugerem a presença de insaturações, inclusive de anéis aromáticos.

Foi possível observar sinais com fatores de retenção semelhantes (entre 0,3 e 0,5) para os extratos brutos miceliais em todos os meios de cultura, exceto para o meio farinha de arroz, sugerindo que estes metabólitos em específico foram produzidos em todos os diferentes substratos. Com relação aos extratos brutos filtrados observou-se uma menor produção de compostos, e estes apresentaram média a baixa polaridade, os mesmos apresentaram maior diversificação de um meio para outro.

Esse resultado está de acordo apresentado por Daí e colaboradores (2010) que atribuíram a este fungo um metabolismo secundário bastante desenvolvido e diverso. Além disso, os resultados obtidos nos perfis cromatográficos em camada delgada destacam a forte influência da composição do meio de cultura na diversificação de produção de metabólitos secundários, o que corrobora o trabalho descrito por Miao *et al* (2006).

4.6.3 Determinação do Perfil Químico dos Extratos Brutos a partir de CLAE-DAD e RMN de ¹H

Os extratos brutos obtidos a partir dos diferentes substratos foram submetidos a análises por CLAE-DAD e RMN de ¹H. Os cromatogramas e espectros de ressonância foram comparados a fim de se avaliar o melhor meio de cultura para a produção de metabólitos secundários pelo fungo, sem maiores interferências do próprio meio de cultura.

Para a análise via CLAE-DAD inicialmente um dos extratos foi usado para otimizar as condições do método a ser empregado nas análises posteriores. Foram testados os sistemas metanol/água (MeOH/H₂O) e acetonitrila/água (ACN/H₂O) em diferentes proporções, de maneira isocrática e também com gradiente de polaridade, onde foi verificado que a condição de análise mais adequada foi o sistema MeOH/H₂O 95:5 a 0:100 em 45 min com fluxo de 0.5 mL.min⁻¹. Foi realizada também uma varredura com comprimentos de onda entre 190-400 nm. De maneira geral o tempo de corrida foi de 45 min, mas em alguns extratos houve a necessidade de se estender esse tempo, pois apresentaram compostos que possuíam um tempo de retenção (T_r) alto, e portanto, foram adicionados mais alguns minutos para certificar que todos os compostos já haviam sido eluídos. Os comprimentos de onda escolhidos foram 210 e 254 nm, pois estes apresentaram melhor absorção dos sinais.

Em sua maioria, os extratos demonstraram uma grande quantidade de produção de ácidos graxos. A metodologia de extração poderia ter sido otimizada a fim de eliminar o material graxo e melhorar a qualidade dos cromatogramas. No entanto, a maioria dos metabólitos produzidos por fungos são de média a baixa polaridade e poderiam ser eliminados juntamente com os ácidos graxos. Dessa forma preferimos, em primeira análise, trabalhar com os extratos sem pré-tratamento.

Não foi possível realizar o estudo dos extratos com o meio de cultura sólido arroz devido a uma contaminação nos extratos, na fase de secagem na capela.

4.6.3.1 Perfil do extrato do fungo cultivado em meio batata e dextrose

O meio de cultura BD, tanto o meio líquido quanto com adição de ágar (meio sólido), é um meio de cultura classicamente utilizado para o cultivo de fungos, visando à produção de metabólitos secundários (GUNATILAKA, 2006).

A partir da análise comparativa dos cromatogramas em CLAE-DAD, em gradiente exploratório, dos extratos brutos (filtrado, micélio e branco) obtidos em meio de batata e dextrose (Figura 27) é possível observar diferenças nos perfis

apresentados pelo controle e extratos brutos, tanto no filtrado quanto no micélio, evidenciando a produção de metabólitos pelo fungo.

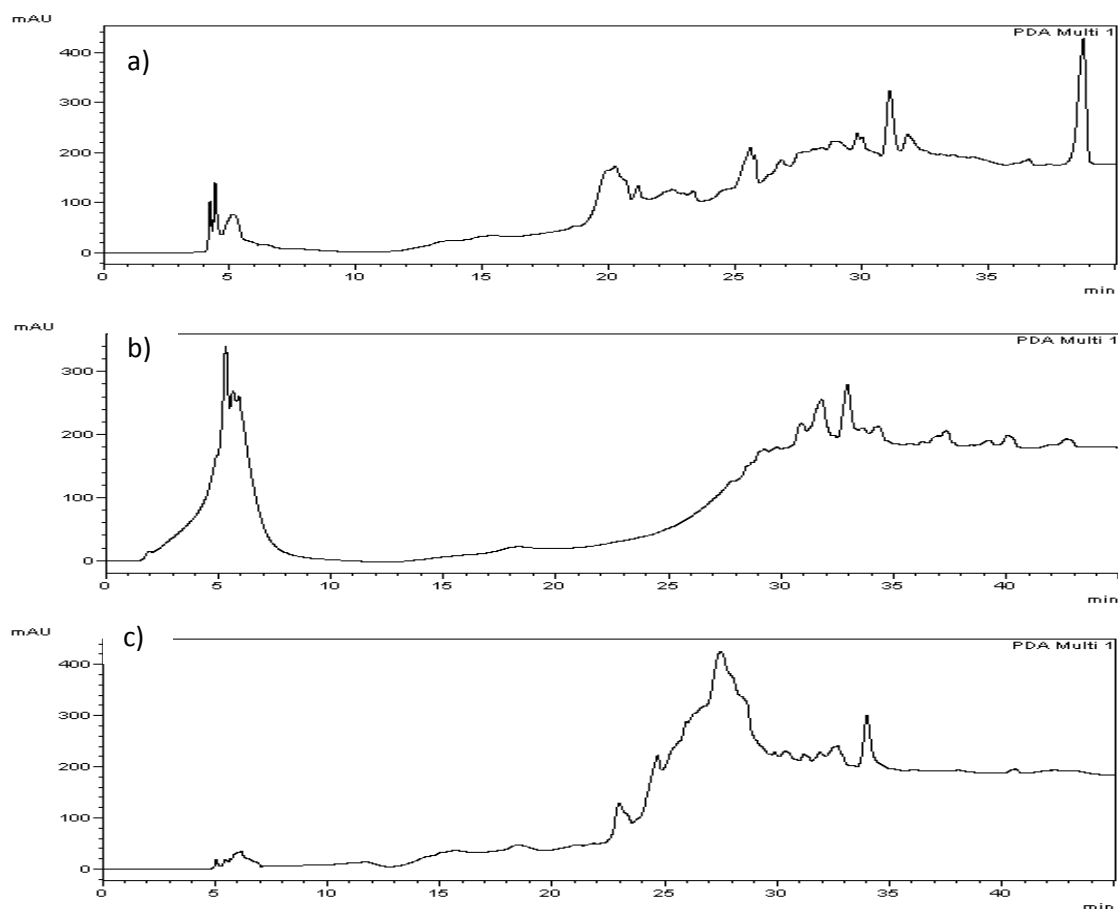


Figura 31 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em meio Batata e Dextrose; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min⁻¹)

O cromatograma do filtrado (Figura 31a) apresentou os primeiros picos com o tempo de retenção em torno de 20 min. Apresentou também um maior número de picos quando comparado com o cromatograma do micélio (Figura 31b). Os compostos produzidos pelo extrato bruto filtrado demonstraram ser mais polares do que os compostos produzidos no extrato bruto micelial. O extrato bruto micelial por sua vez, mostrou maior capacidade de produzir compostos de média a baixa polaridade, com os primeiros compostos sendo eluídos por volta de 30 min (31b).

A Figura 32, a seguir, apresenta os espectros de RMN de ¹H para os extratos brutos filtrado (a) e micélio (b) e controle (c) em meio BD.

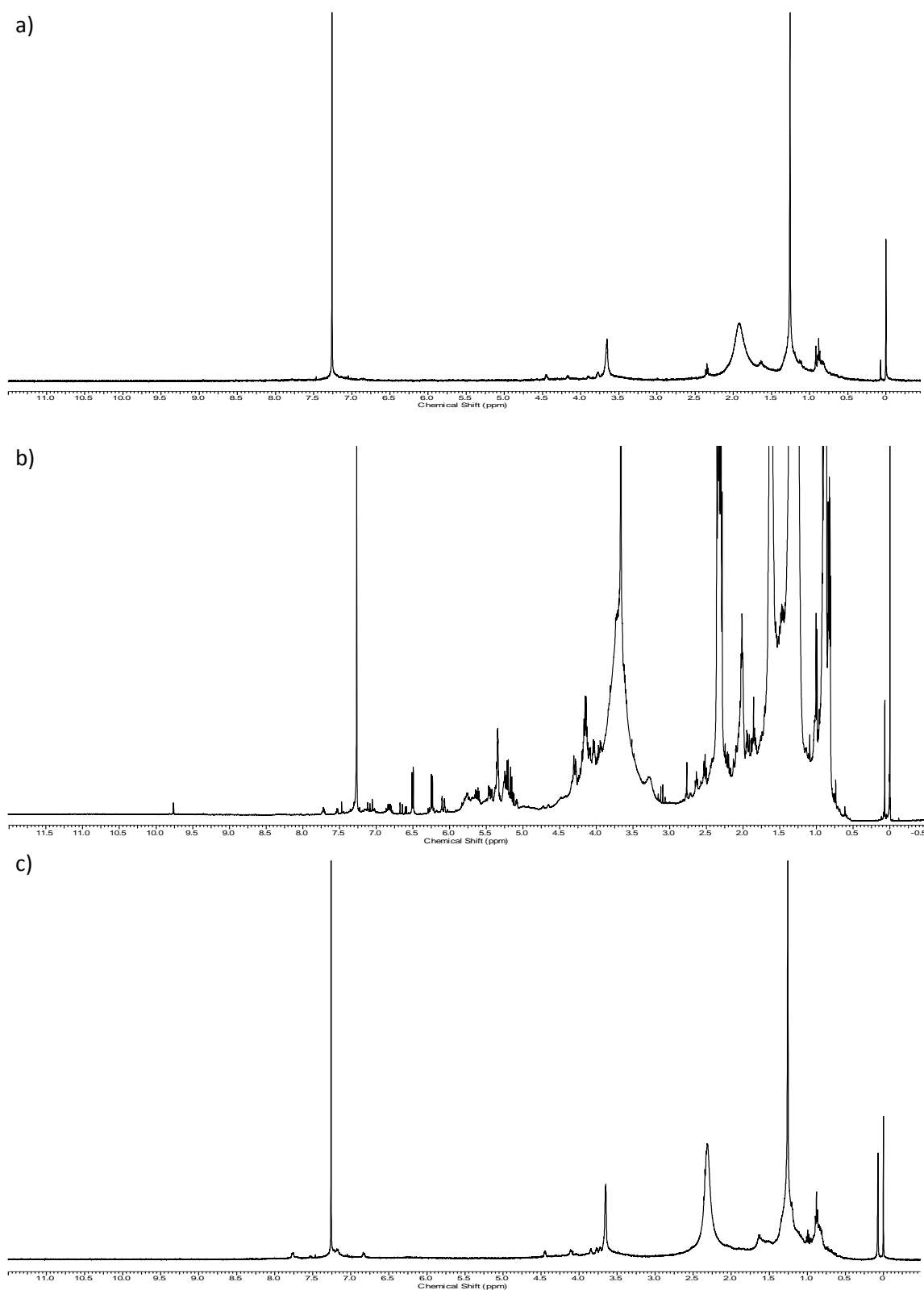


Figura 32 . Espectros de RMN de ¹H em CDCl₃ dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio batata e dextrose; a) filtrado, b) micélio e c) controle

No espectro de RMN de ¹H do extrato bruto filtrado (Figura 32a) não foi possível observar os sinais que evidenciassem a produção de metabólitos

secundários, como era esperado pela análise do respectivo cromatograma (Figura 31a). A grande quantidade de substâncias graxas, evidenciada pelos sinais com grande intensidade em 0.5 a 2.0 ppm, pode estar sobrepondo os sinais dos compostos produzidos pelo fungo, dificultando a visualização dos mesmos.

A Figura 32.b apresenta o espectro de RMN de ^1H para o extrato bruto micelial. Apesar dos sinais de maior intensidade representarem substâncias graxas (0.5 a 4.0 ppm), é possível observar a presença de uma grande quantidade de sinais com menor intensidade em toda região do espectro, principalmente na região características de compostos aromáticos (6.0 a 8.0 ppm) , bem como hidrogênios olefínicos (5.0 a 6.0 ppm) e hidrogênios carbinólicos (3.0 a 5.0 ppm).

A análise de ampliações do espectro de RMN de ^1H do extrato bruto micelial (Figura 33) revelou a presença de dois hidrogênios aromáticos meta substituídos em δ 6.07 (H-4, d, 1.8Hz) e em δ 6.10 (H-6, d, 1.8Hz) que associado a presença de um singlete em 9.76 ppm sugerem a presença de um derivado fenólico tetrasubstituído, sendo um dos substituintes um grupo hidroxílico que participa de ligação de hidrogênio com um uma carbonila. Os sinais descritos anteriormente associados à presença de um tripleto em 5.08 ppm (H-15, 5.33 Hz), um duplo dubleto em 4.20 (H-11, 6.5 e 15.8 Hz) e um dubleto em 1.01 ppm (6.6 Hz, Me) sugerem a produção da 11- α -metoxicurvularina (**39**) pelo *Curvularia* no meio de cultura de batata e dextrose. Trabalhos anteriores que também avaliaram a produção de metabólitos por *Curvularia* em meio de batata e dextrose relataram o isolamento deste composto que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e larvicida (BUSI et al, 2009).

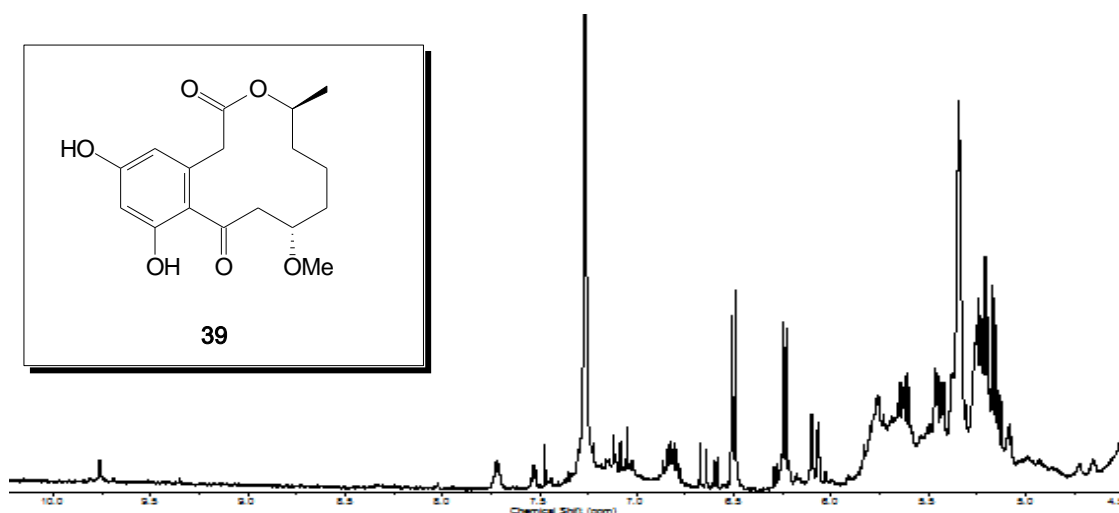


Figura 33 Ampliação do espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do extrato bruto micelial cultivado em BD e estrutura da 11- α -metoxicurvarina (39).

4.6.3.2 Perfil do extrato do fungo cultivado em czapeck enriquecido com extrato de levedura 2%

O meio de cultura czapeck é composto por glicose como fonte de carbono e micronutrientes necessários para o crescimento fúngico. Em nosso estudo enriquecemos este meio com 2% de extrato de levedura para aumentar a velocidade de crescimento fungico.

A análise dos cromatogramas dos extratos brutos filtrado (Figura 34a) e micelial (Figura 34b) e do controle (Figura 34c) permite inferir que o fungo produziu grande quantidade de compostos quando cultivado neste meio, devido a diferença no perfil dos cromatogramas. O tempo de corrida foi estendido para assegurar que todos os compostos haviam sido eluidos.

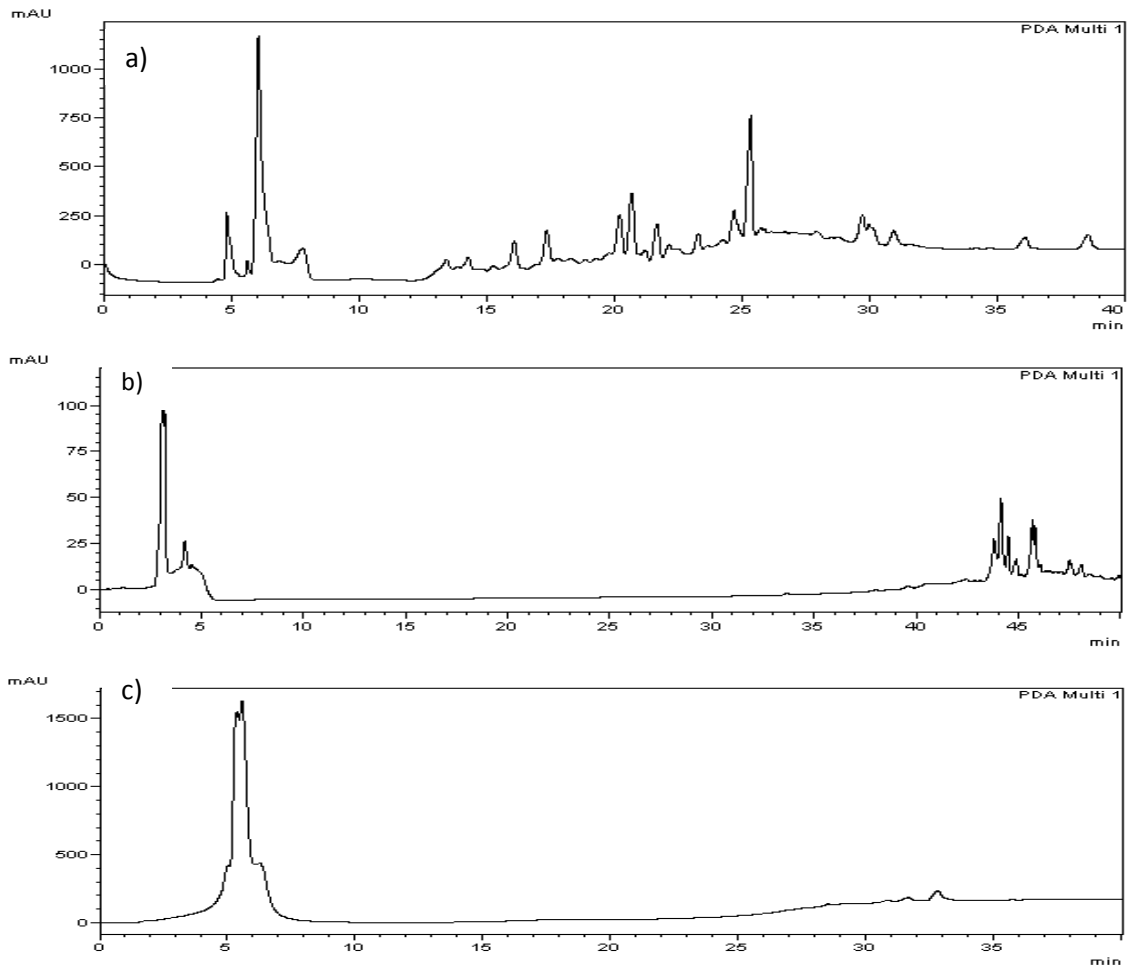


Figura 34 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em meio czapeck enriquecido com extrato de levedura 2%; a: Filtrado, b: Micélio, c: controle (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5mL.min⁻¹)

O cromatograma do filtrado (Figura 34a) mostrou-se rico em compostos, apresentando vários sinais em toda a região do cromatograma, com os primeiros compostos sendo eluídos com o tempo de retenção em torno de 10 min.

Os espectros de RMN de ¹H para o meio CZ encontra-se na Figura 35, a seguir.

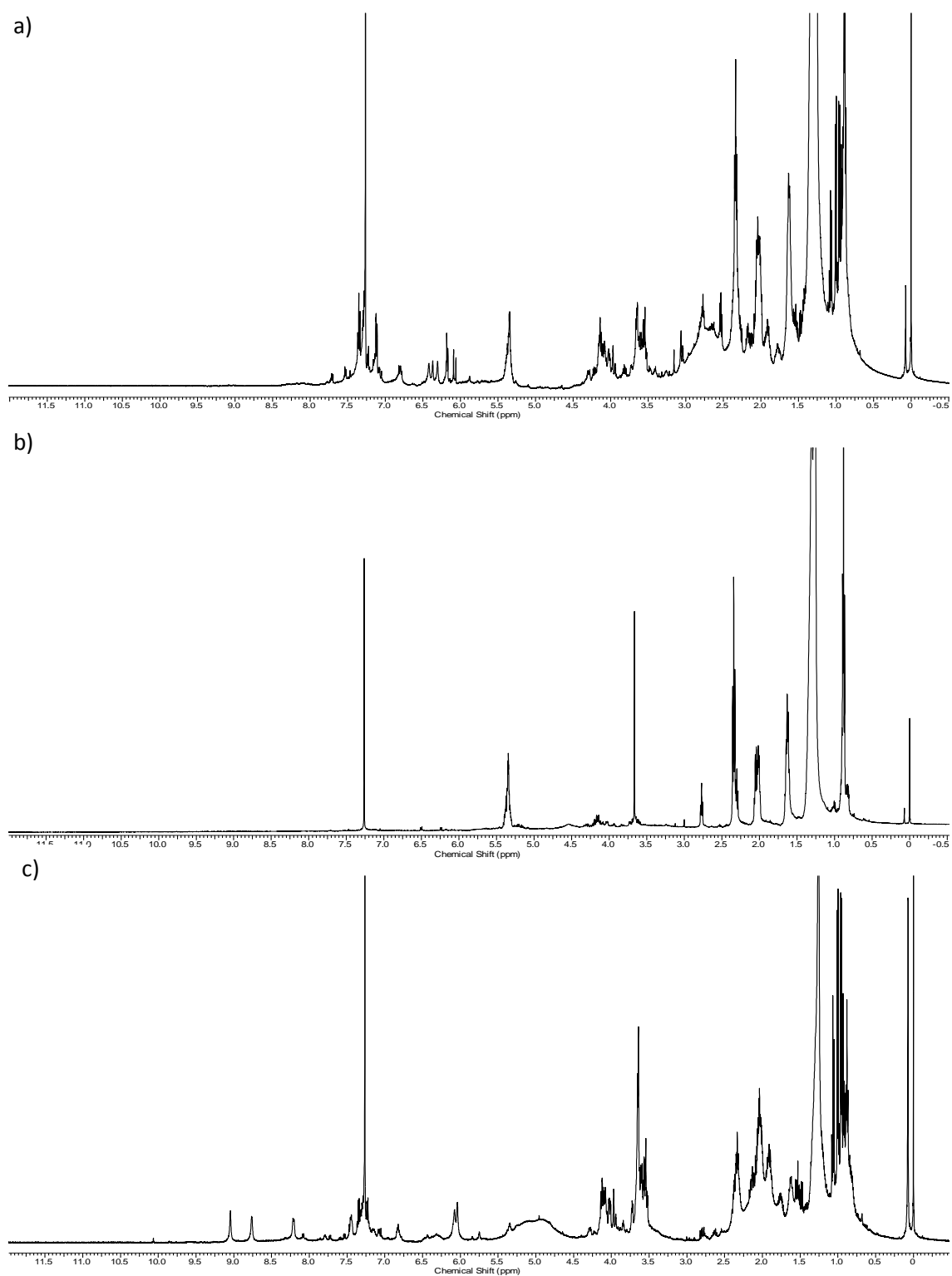


Figura 35 Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio czapeck, enriquecido com extrato de levedura 2%; a) filtrado, b) micélio e c) controle.

A análise dos espectros de RMN de ^1H dos extratos, Figura 35, corrobora com o apresentado pelos cromatogramas. No espectro de RMN de ^1H para o

extrato bruto filtrado (Figura 35a) foi possível observar maior quantidade de sinais do que no espectro do extrato bruto micelial (Figura 35b). Na Figura 35a observa-se a presença de sinais na região característica de compostos aromáticos, entre 7,0 e 8,0 ppm, e hidrogênios olefínicos, entre 6,0 e 7,0 ppm. Apresentou ainda um sinal largo em 5,3 ppm e uma grande quantidade de sinais entre 0,5 e 4,5 ppm, o que pode indicar a presença de metabólitos glicosilados.

No meio micelial (Figura 35b) observa-se apenas a presença em maior quantidade de substâncias graxas e com menor intensidade dois dubletos na região de δ_H 6,2 (8.8 Hz) e δ_H 6,5 (8.8 Hz) e pequenos sinais ao longo do espectro.

O espectro de RMN de 1H do controle (Figura 35c) mostrou-se bastante rico em sinais, aos quais atribuímos pertencer ao extrato de levedura que foi adicionado para enriquecer o meio czapeck, os mesmos não foram visto no cromatograma por não absorver no comprimento de onda visualizado.

4.6.3.3 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de malte

Com base na análise do perfil cromatográfico obtido em CLAE-DAD, o meio de cultura extrato de malte, Figura 36, também demonstrou ser um substrato capaz de fornecer condições favoráveis ao crescimento e, portanto produção de metabólitos secundários. Neste meio de cultivo observou-se que o extrato bruto micelial (Figura 36b) apresentou um maior número de picos e com melhor resolução cromatográfica do que o cromatograma do extrato bruto filtrado (Figura 36a). Além disso, ambos os extratos brutos apresentaram sinais na região de média a baixa polaridade, com os primeiros compostos sendo eluídos com tempo de retenção em torno de 30 min. Os picos com T_r em 31 e 33 min aparecem nos cromatogramas dos dois extratos brutos, sugerindo que o fungo produziu os mesmos compostos tanto no extrato bruto filtrado quanto no extrato bruto micelial.

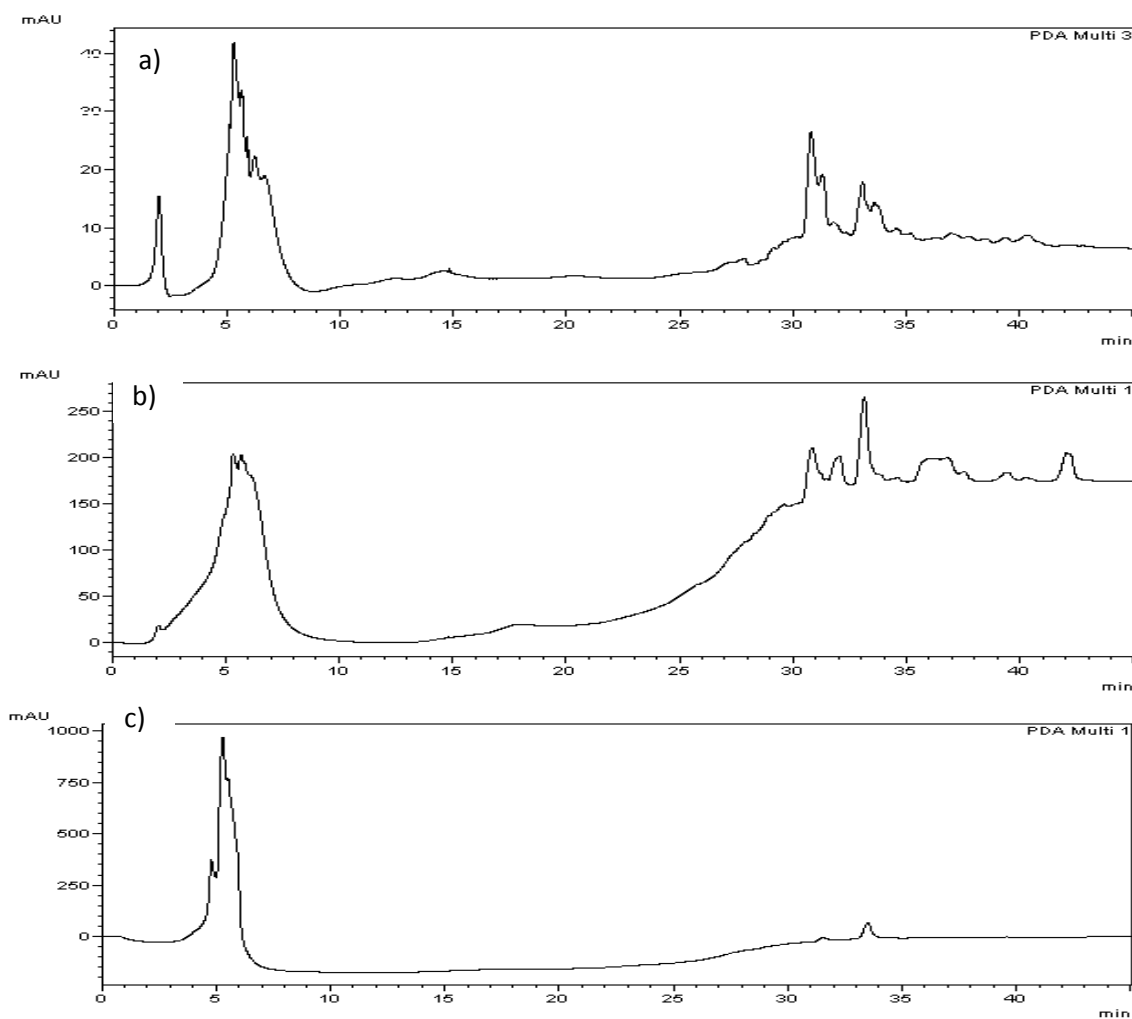


Figura 36 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em extrato de malte; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0. 5mL.min⁻¹)

O espectro de RMN de ¹H para o extrato bruto filtrado, Figura 37a, apresentou uma característica interessante, a presença de um conjunto de sinais alargados, principalmente na região de hidrogênios aromáticos entre 6.5 a 8.0 ppm. Além destes, sinais na região de 3.0 a 4.0 ppm sugerem a presença de hidrogênios ligados a carbonos diretamente ligados a átomos eletronegativos. É possível ainda identificar a presença de hidrogênios metílicos entre 0.8 e 2.0 ppm.

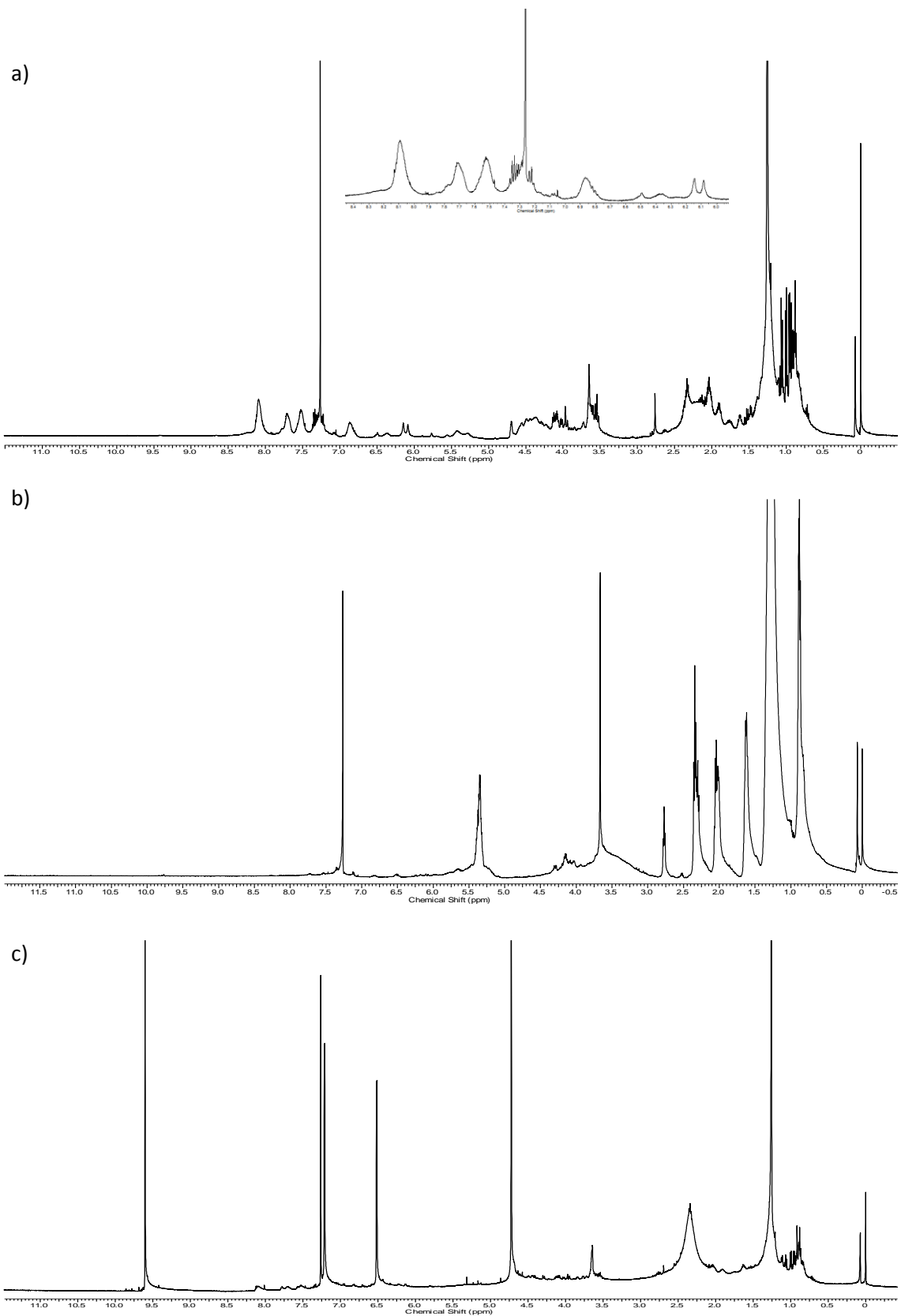


Figura 37 Espectros de RMN de ¹H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio extrato de malte; a) filtrado, b) micélio c) controle.

A Figura 37b apresenta o espectro de RMN de ^1H obtido para o extrato bruto micelial. Quando comparado com o extrato bruto filtrado, o mesmo apresenta uma maior quantidade na produção de substâncias graxas, sinais de grande intensidade em 0.5 e 3.0 ppm, que podem estar dificultando a visualização dos sinais dos possíveis metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo, visualizados anteriormente no cromatograma (Figura 36b).

4.6.3.4 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de malte e dextrose

O meio de cultivo extrato de malte foi enriquecido com dextrose para avaliar a influência da adição de glicose como fonte de carbono na produção de metabólitos secundários pelo *Curvularia lunata*.

Os cromatogramas obtidos para o extrato de malte e dextrose estão ilustrados na Figura 38. A análise dos mesmos demonstra a presença de poucos sinais, principalmente no cromatograma referente ao extrato bruto filtrado (Figura 38a), indicando que a adição da dextrose ao extrato de malte não influenciou positivamente na produção de metabólitos secundários.

A figura 38b refere-se ao cromatograma do extrato bruto micelial. Pode-se observar a presença de picos com tempo de retenção bastante curtos, co-eluído com o volume morto da coluna, indicando a presença de compostos mais polares do que os produzidos pelo meio ME sem adição de glicose.

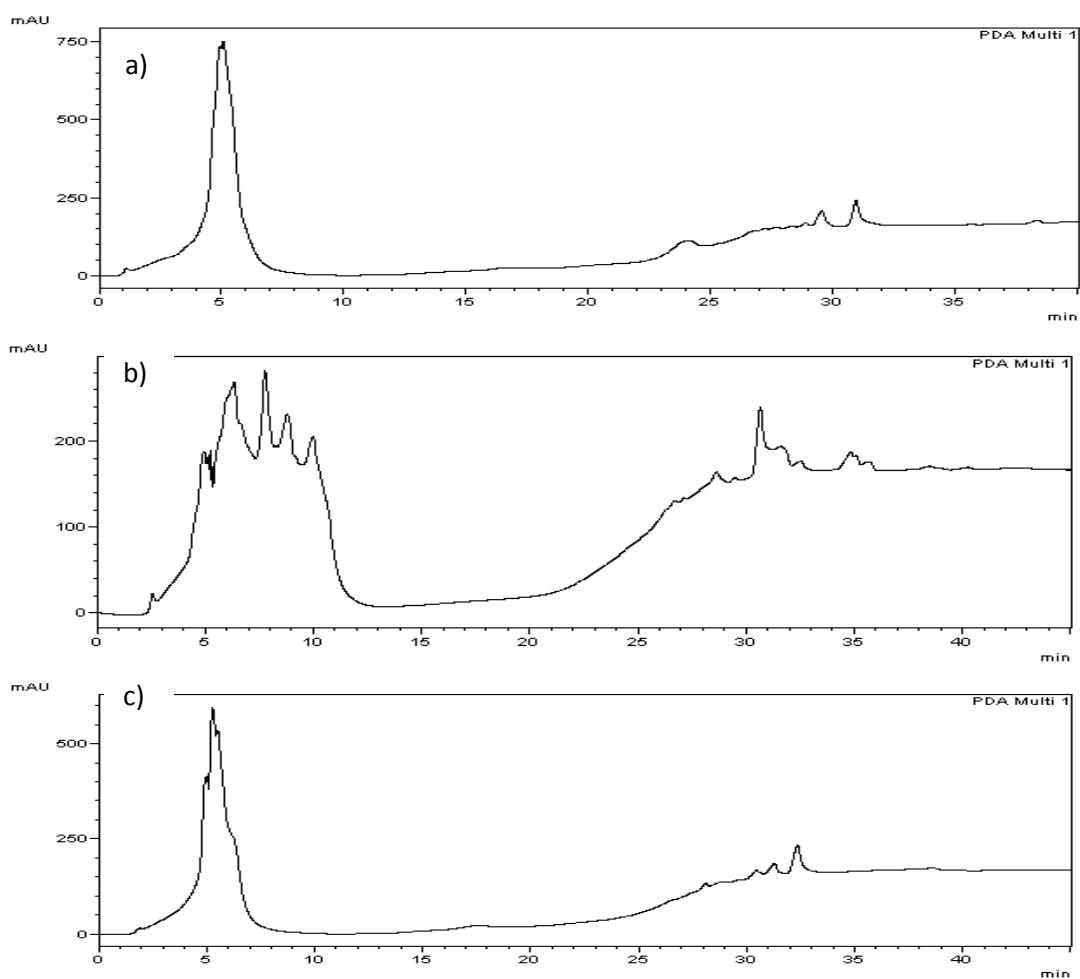


Figura 38 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em extrato de malte e dextrose; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min⁻¹)

Os espectros de RMN de ¹H dos extratos obtidos do cultivo do microrganismo em extrato de malte e dextrose encontram-se ilustrados na Figura 39.

A Figura 39a, correspondente ao espectro do extrato bruto filtrado, revela uma produção muito pequena dos sinais alargados vistos no espectro do filtrado para o extrato de malte sem adição de glicose, indicando que a adição da mesma inibiu a produção do composto referente a estes sinais. No entanto, o extrato bruto micelial, ilustrado na Figura 39b, apresenta similaridade quando comparado ao extrato bruto micelial do substrato sem adição de glicose. Mais uma vez a grande quantidade de material graxo prejudicou a visualização e interpretação dos espectros.

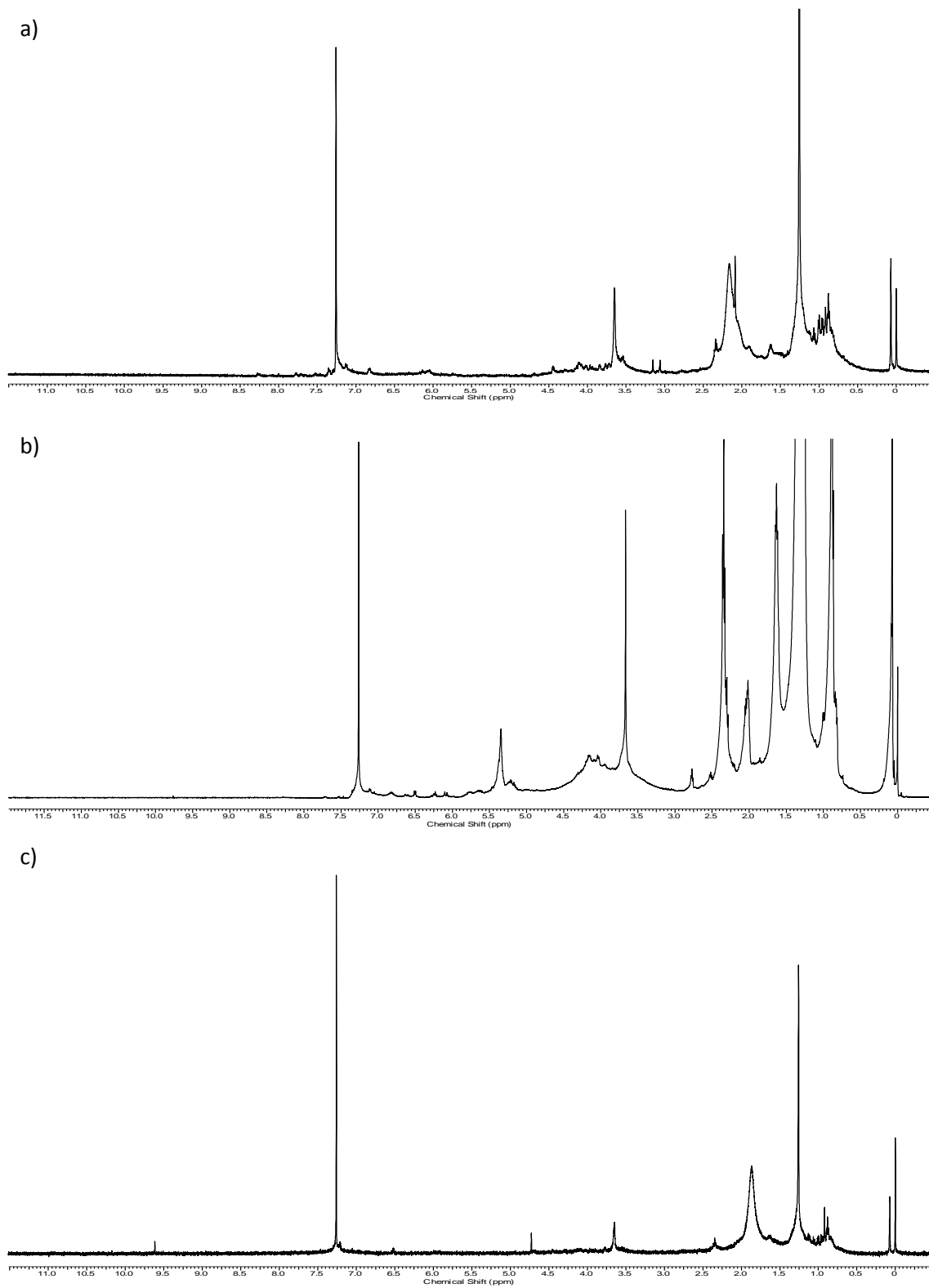


Figura 39 Espectros de RMN de ¹H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio extrato de malte e dextrose; a) filtrado b) micélio c) controle

4.6.3.5 Perfil do extrato do fungo cultivado em farinha de arroz

Os cromatogramas em gradiente exploratório obtido para este meio de cultivo indicaram a produção de compostos com média a baixa polaridade, tanto para o filtrado quanto para o micélio (Figuras 40.a e 40.b), com a presença de um composto majoritário para o filtrado e dois compostos em maior quantidade pra o micélio. O tempo de retenção dos compostos eluídos para ambos os extratos brutos sugerem a produção dos mesmos compostos.

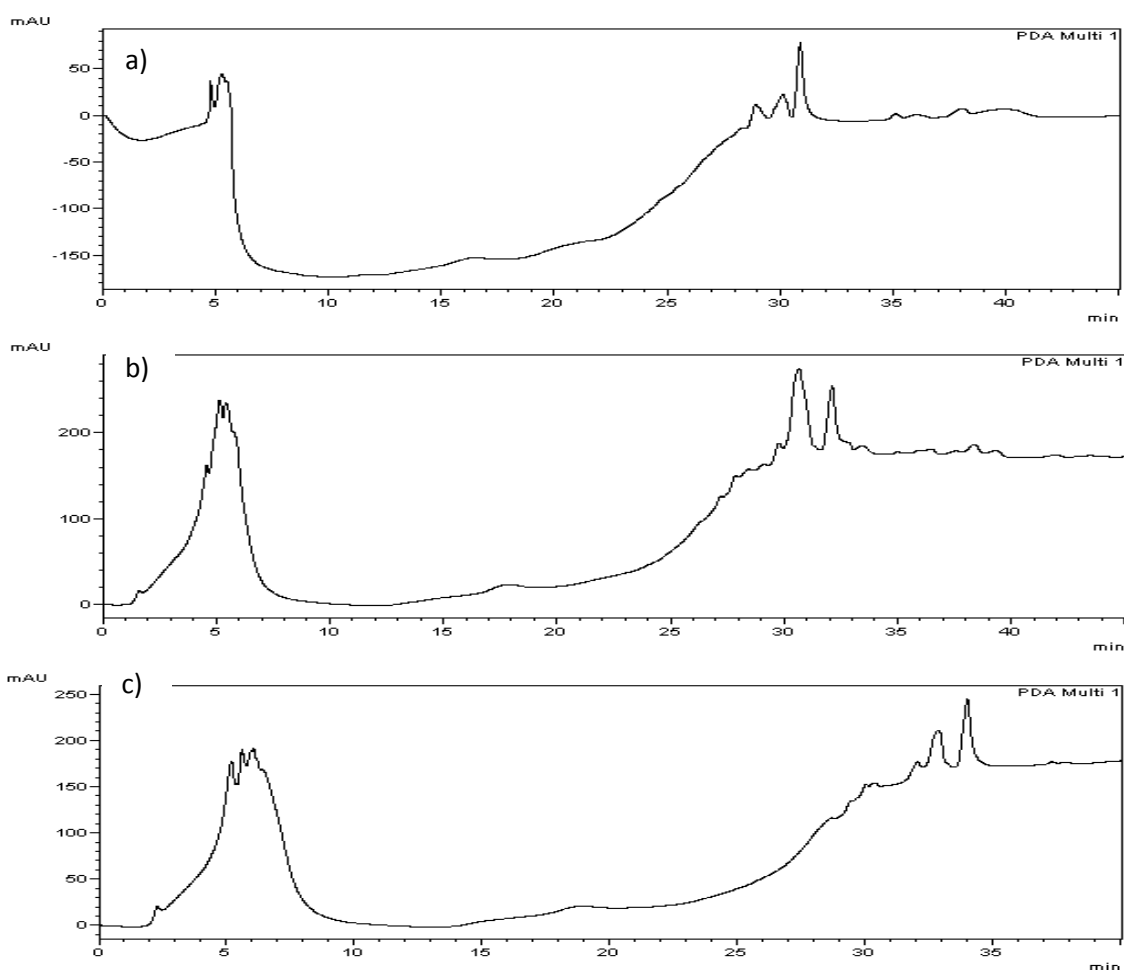


Figura 40 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em Extrato de Farinha de Arroz; a: Filtrado, b: Micélio, c: Controle (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5mL.min⁻¹)

A análise de RMN de ¹H dos extratos cultivados em meio de farinha de arroz demonstrou maior quantidade de sinais no espectro referente ao extrato bruto micelial (Figura 40c). O mesmo apresentou a presença de sinais em toda a faixa espectral e 0.0 a 8.0 ppm e ainda sinais na região entre 9.5 a 10 ppm, com a produção de material graxo majoritariamente. Os sinais na região característica de substâncias aromáticas, 7.0 a 8.0 ppm, indica a presença de

compostos aromáticos, há ainda sinais entre 5.0 e 6.0 ppm, sugerindo a ocorrência de compostos insaturados e os sinais entre 0.0 e 4.5 ppm indicam hidrogênios metílicos e metilênicos.

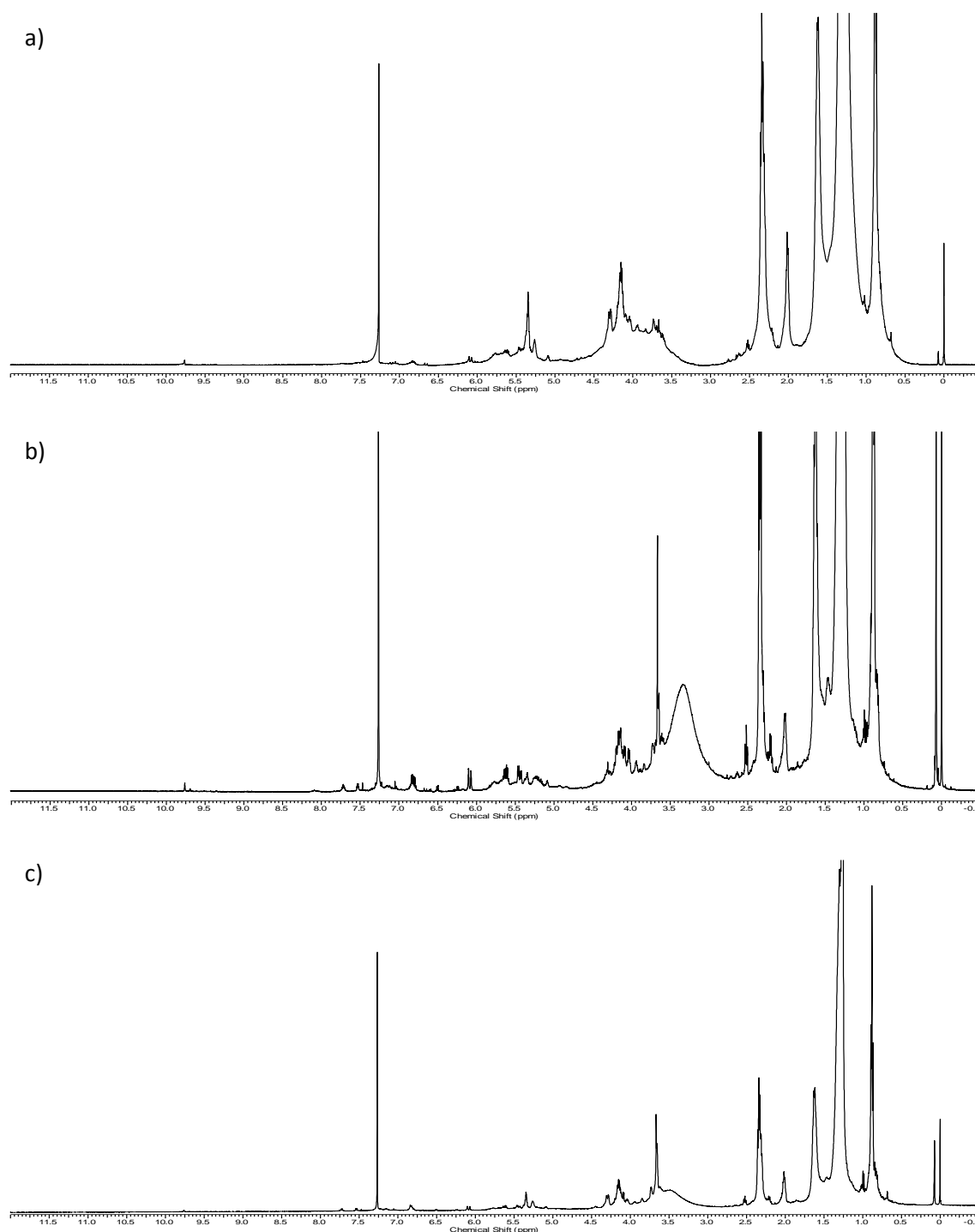


Figura 41 Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio de Farinha de Arroz; a) Filtrado, b) Micelial e c) Controle

Na análise de ampliações do espectro de RMN de ^1H do extrato bruto micelial (Figura 41) também encontramos os sinais característicos da 11- α -metoxicurricularina (**39**); a presença de dois hidrogênios aromáticos meta substituídos (δ_{H} 6.07 ppm, d, 1.8Hz e δ_{H} 6.10 ppm, d, 1.8Hz) associado a presença de um singlete em δ_{H} 9.76 ppm, um tripleto em δ_{H} 5.05 (5.5 Hz), duplo duplete em δ_{H} 4.11 ppm (7.0 e 16.0 Hz) e ainda um duplete em δ_{H} 0.98 ppm (6.2 Hz) Portanto, podemos inferir que o fungo produziu a mesma substância quando cultivado em farinha de arroz.

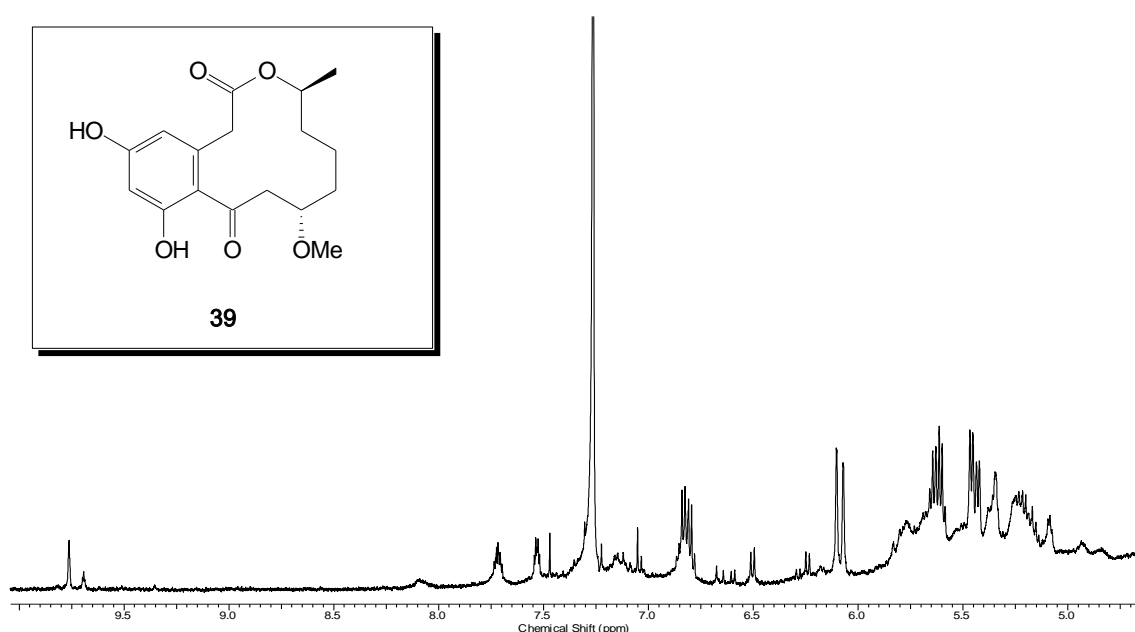


Figura 42 Ampliação do espectro de RMN de ^1H extrato bruto micelial cultivado em RD e estrutura da 11- α -metoxicurricularina (**39**)

4.6.3.6 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de levedura

A análise dos cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos obtidos em extrato de levedura (Figura 43), evidenciou a produção de compostos de baixa a média polaridade para ambos extratos brutos. É possível observar semelhança nos tempos de retenção dos compostos, sugerindo que o fungo produziu as mesmas substâncias nos dois extratos.

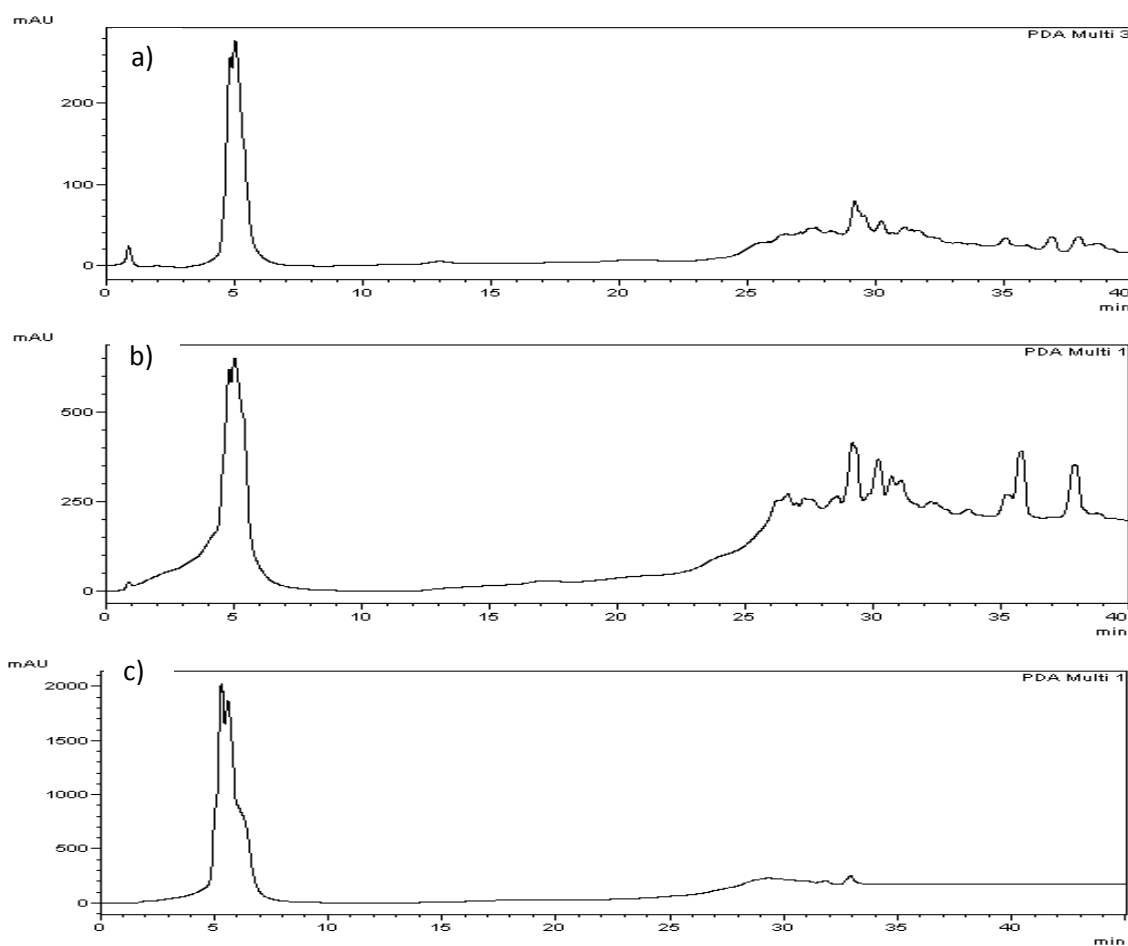


Figura 43 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em extrato de levedura; a: Filtrado, b: Micélio, c: Branco (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min⁻¹).

Quando analisamos a produção de metabólitos pelo espectro de RMN de ¹H é possível comprovar a grande quantidade de compostos produzidos e a semelhança no perfil dos sinais, tanto no extrato bruto filtrado, Figura 44a, quanto no extrato bruto micelial, Figura 44b. Aqui, assim como no meio ME, Figura 44b, também é possível observar a produção de compostos com a presença de sinais alargados tanto para o filtrado quanto para o micélio.

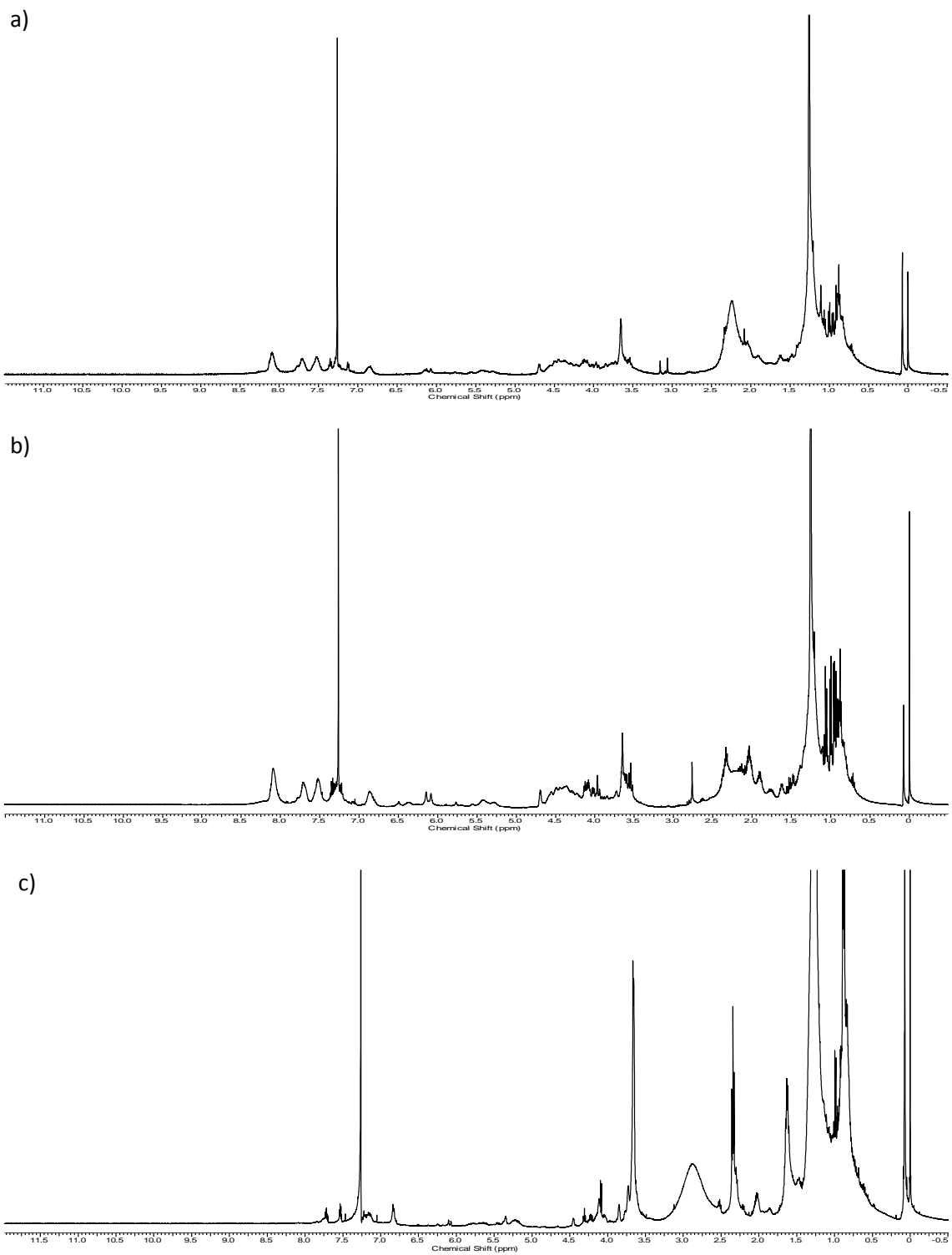


Figura 44 Espectros de RMN de ¹H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio de extrato de levedura; a) Filtrado, b) Micélio e c) Controle

4.6.3.7 Perfil do extrato do fungo cultivado em extrato de levedura e dextrose

Assim como no meio de cultura extrato de malte, enriquecemos o extrato de levedura com glicose para avaliar a influência no metabolismo microbiano.

A Figura 45 representa os cromatogramas obtidos para o cultivo em meio YED. A comparação destes cromatogramas com os obtidos anteriormente para o YE sem adição de glicose permite inferir que a adição de dextrose ao meio de cultura não provocou grande variação no perfil dos metabólitos produzidos pelo fungo.

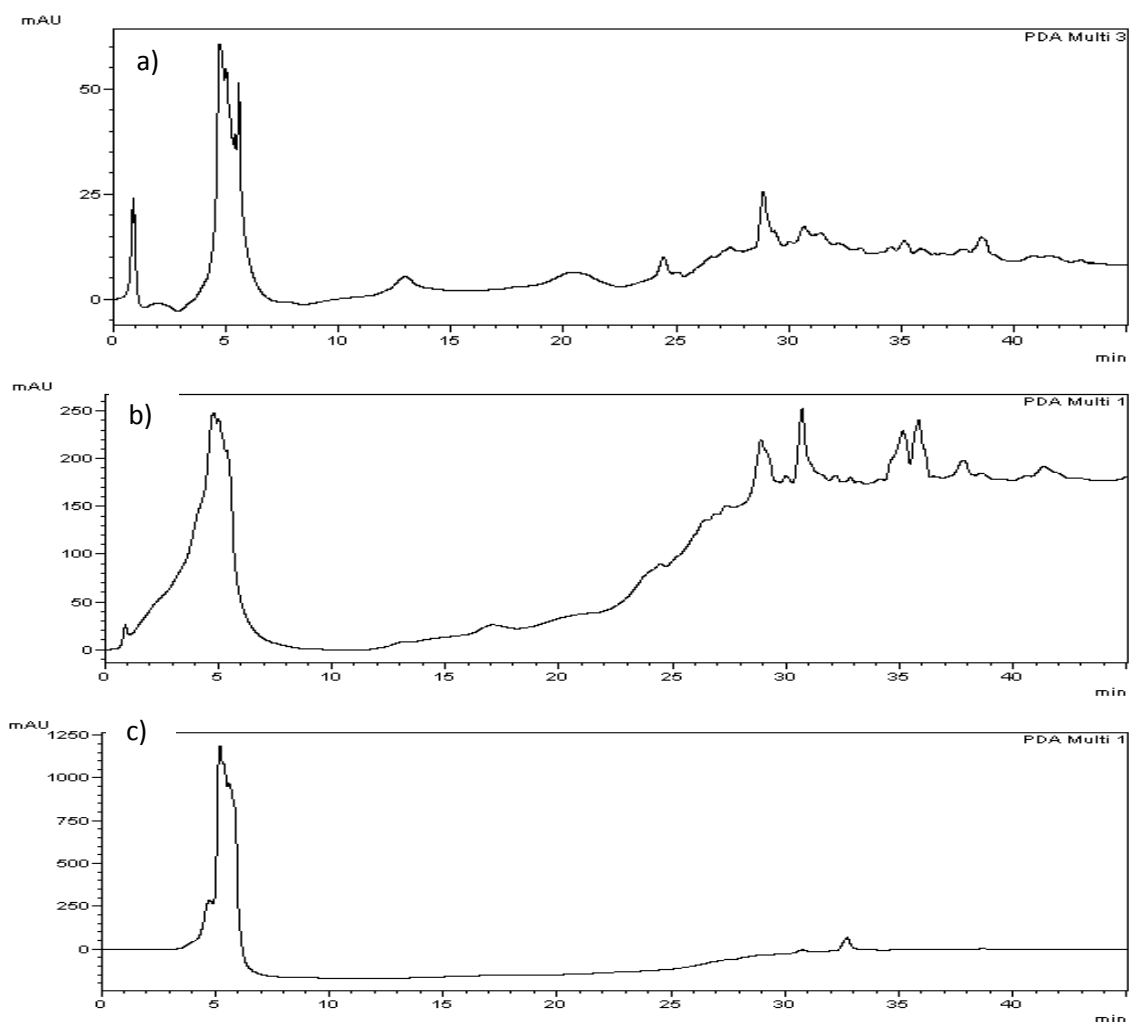


Figura 45 Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzido por *Curvularia lunata* em extrato de levedura e dextrose; a: Filtrado, b: Micélio, c: Branco (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 45 min em 210nm com fluxo de 0.5 mL.min⁻¹)

Na Figura 45a, correspondente ao extrato bruto filtrado, é possível observar o aparecimento de picos cromatográficos eluídos com tempos de retenção altos, indicando a presença de compostos mais polares do que no meio de cultura sem adição de glicose. O cromatograma do extrato bruto micelial, Figura 45b, indica a presença de quatro picos cromatográficos de maior intensidade e com tempo de retenção semelhante aos encontrados no YE sem adição de glicose, sugerindo a presença dos mesmos metabólitos.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos cultivados em YED encontram-se na Figura 46. A análise dos mesmos quando comparados ao controle comprovou a capacidade do fungo em produzir metabólitos no substrato em estudo.

O espectro de RMN de ^1H do filtrado (Figura 46a) também apontou a presença de substâncias aromáticas com os sinais alargados vistos anteriormente nos meios de cultura ME e YE, além destes, sinais entre 6,0 e 5,2 ppm, infere a presença de hidrogênios olefínicos. A região entre 0,0 e 4,0 ppm está superposta por sinais do branco e por ácidos graxos, porém os sinais com menor intensidade apontam a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos.

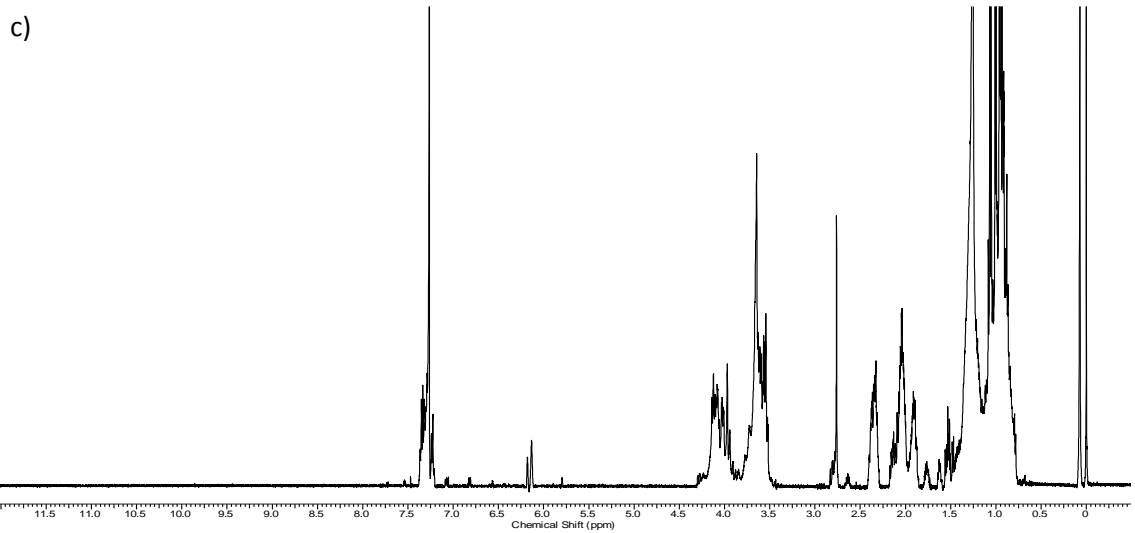
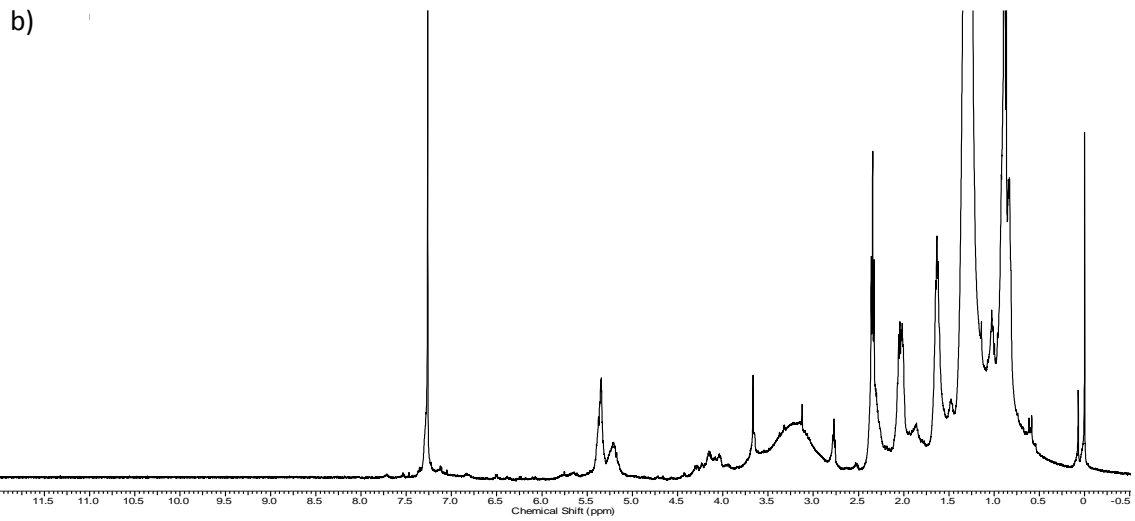
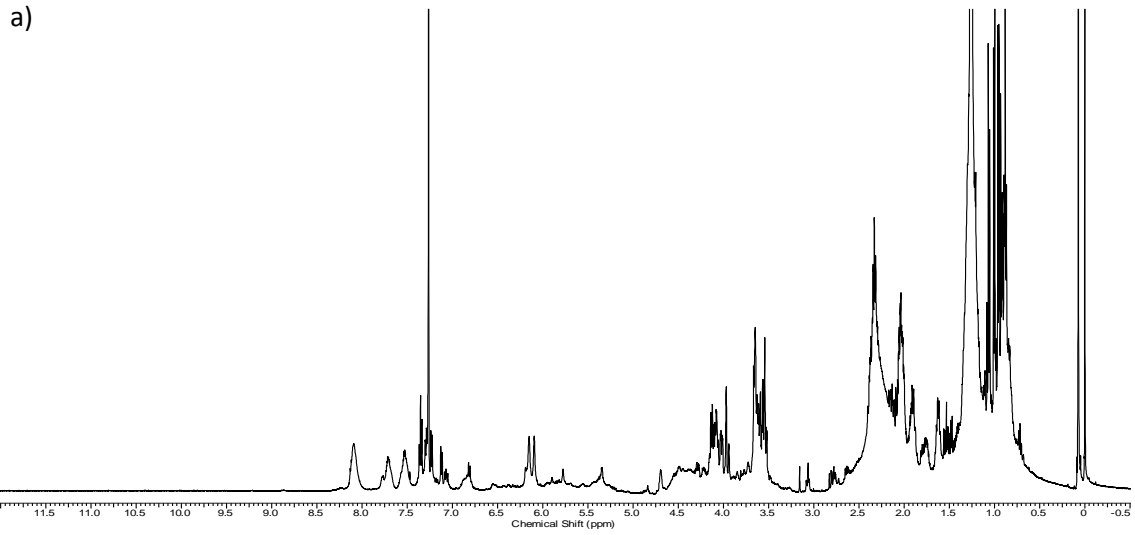


Figura 46 Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos produzidos por *Curvularia lunata* em meio de extrato de levedura e dextrose; a) Filtrado, b) Micélio e c) Controle.

Dessa forma, podemos concluir que o fungo se desenvolveu bem na maioria dos substratos testados. Dentre os extratos analisados CZF o foi o que apresentou maior quantidade de sinais, por tanto maior número de metabólitos secundários produzidos, seguido pelo BDF e BDM. Comparando os dados obtidos para estes dois meios de cultura, BD e CZ, podemos notar uma diferença no padrão dos sinais tanto para o filtrado quanto para o micélio, o que nos leva a supor que o fungo produziu compostos diferentes quando cultivados em substratos variando-se a fonte de carbono e nutrientes disponíveis para seu crescimento. É possível ainda notar que quando cultivado em meio BD o *Curvularia lunata* produziu um maior número de substâncias no extrato bruto micelial enquanto no meio de cultura CZ a maior quantidade de sinais concentrou-se no extrato bruto filtrado. A presença de ácidos graxos nos espectros de ambos os meios prejudicou a visualização e análise dos mesmos.

Os meios de cultura ME, YE e YED chamaram a atenção pela presença dos sinais alargados na região de hidrogênios aromáticos. Nos meios ME e YED foi possível observar estes sinais apenas no extrato bruto filtrado, enquanto que o YE produziu o composto referente aos sinais tanto no extrato bruto filtrado quanto no micélio. Dessa forma, o YE seria o meio de cultura mais indicado para cultivo em larga escala objetivando o isolamento deste composto.

Os extratos BDM e RDM apresentaram sinais característicos da 11- α -metoxicurvularina, uma lactona macrocíclica. Como sugerimos anteriormente, as curvularinas e seus derivados podem ser utilizados como marcadores taxonômicos para este gênero de microrganismo.

A grande quantidade de material graxo produzido pelo fungo prejudicou uma análise mais aprofundada tanto dos cromatogramas obtidos via CLAE-DAD quanto dos espectros de RMN de ^1H dos extratos. Por tanto um pré-tratamento dos extratos se faz necessário para eliminar os interferentes.

4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTOS

4.7.1 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica (AChE)

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa de grande impacto sócio-econômico que atinge cerca de 1,5% da população em idade entre 65 a 69 anos, 21% entre 85-86 e 39% da população acima de 90 anos (BOLZANI et al, 2004) afetando cerca de 15 milhões de pessoas no mundo. Essa doença é caracterizada por alterações nas funções cognitivas, como a aprendizagem e da memória, assim como as mudanças de comportamento (BARBOSA et al, 2006). A DA está associada à redução de alguns neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina (BRYNE, 1998), tornando-se os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) a principal forma de tratamento da doença de Alzheimer. A diversidade estrutural dos inibidores AChE conhecidos e a possibilidade de explorar diferentes modos de ação têm estimulado o estudo químico de plantas e microrganismos, a fim de proporcionar novos compostos com atividade anticolinesterásica (BOLZANI et al, 2004).

Utilizando o ensaio em CCD com o reagente de Ellman (RHEE et al., 2001) para os extratos brutos na concentração de 1 mg/mL foi possível detectar o desenvolvimento de algumas manchas de inibição em todas os extratos brutos miceliais, indicando que todas possuíam algum grau de atividade anticolinesterásica, como mostra a Figura 47. Porém os extratos cultivados em extrato de malte e meio czapeck enriquecido com extrato de levedura apresentaram maior halo de inibição, representando maior capacidade de inibição da atividade da enzima. As substâncias que apresentaram halo de inibição possuíam o mesmo R_f indicando se tratar do mesmo composto que foi produzido em todos os meios de cultivo.

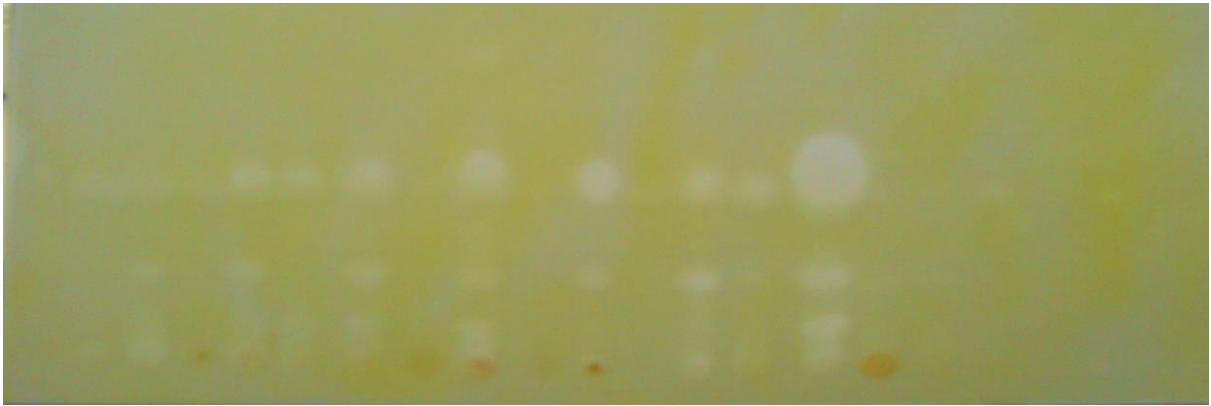


Figura 47 Ensaio em CCD pelo método de Ellman modificado por Rhee (RHEE et al, 2001) para os extratos brutos obtidos do cultivo do fungo *Curvularia lunata*.; 1: 0,1 mM de eserina (padrão); 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 correspondem aos extratos do filtrado, respectivamente; extrato de levedura, extrato de levedura e dextrose, farinha de arroz, czapeck, extrato de malte e dextrose, batata e dextrose e meio extrato de malte; 3, 5, 7, 9, 11, 13, e 15 correspondem respectivamente aos meios miceliais.

A literatura mostra que alguns fungos de espécies como *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de produzir compostos com potencial inibição contra a AChE, como é o caso de isocumarinas meroterpenoides. O fungo fitopatogenico *Nectria galligena*, também produziu meroterpenoides inibidores da enzima acetilcolinesterase (HOUGHTON *et al*, 2005). Porém na literatura não há nenhum relato de metabólitos produzidos por *Curvularia* com atividade anticolinesterásica.

4.7.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

As infecções microbianas representam um problema de saúde mundial que elevam os gastos na saúde pública e contribuem para o aumento da taxa de mortalidade, sendo a crescente resistência dos microrganismos patogênicos às substâncias antimicrobianas conhecidas umas das principais causas do agravamento destas infecções (TORTORA e t al, 2005). Esta resistência surge a partir do uso indiscriminado de antibióticos que aumentam o desenvolvimento de linhagens resistentes frente aos microrganismos patogênicos (DUARTE, 2006).

A investigação da atividade antibacteriana e antifúngica de produtos naturais tem sido objetivo de diversos trabalhos. A atividade antimicrobiana destes compostos é avaliada através da capacidade dos mesmos em inibir o crescimento do microrganismo-teste e a menor quantidade da substância em estudo necessária para inibição é conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Frente a isso, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária.

A Tabela 07 apresenta os resultados para a avaliação da atividade antimicrobiana para extratos fúngicos obtidos do *Curvularia lunata*.

Tabela 07. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir do fungo *Curvularia lunata*

Extratos	Microrganismos								
	<i>M. lut</i>	<i>S. aur</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>P. aer</i>	<i>S. typ</i>	<i>A. nig</i>	<i>C. clad</i>	<i>C. alb</i>
BDF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	200
BDM	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	100
MEF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
MEM	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
YEDM	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
YEDF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
YEM	100	25	12,5	>200	>200	>200	>200	>200	>200
YEF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
CZM	>200	>200	100	>200	>200	>200	>200	>200	>200
CZF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
MEDF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
MEDM	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
RDM	200	200	25	>200	>200	>200	>200	>200	>200
RDF	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Controle (+)	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	12,5	12,5	12,5

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 08, verificou-se que os extratos BDF e BDM, cultivados em meio de batata e dextrose, apresentaram atividade fungistática contra o *Candida albicans*, nas concentrações de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Chomcheon et al (2010) estudando o fungo *Curvularia geniculata* isolou cinco novos policetideos-peptideos, os curvularideos A-E, dentre eles o curvularideo B (**41**, Figura 48) exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans* e também demonstrou atividade sinérgica com a droga fluconazole.

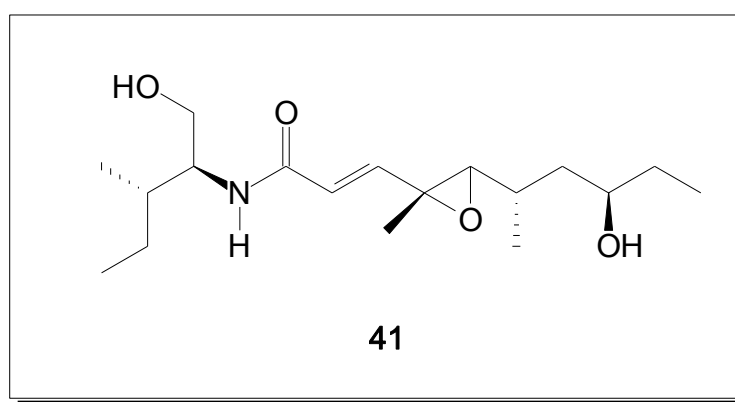


Figura 48 Estrutura do curvularideo B

O extrato micelial, obtido do cultivo em extrato de levedura, YEM, apresentou atividade bacteriostática contra três bactérias Gram-positivas nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *Micrococcus luteus*, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente *Staphylococcus aureus* e de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *Bacillus subtilis*. O extrato micelial cultivado em meio czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, CZM, também apresentou atividade bacteriostática frente à *Bacillus subtilis* numa concentração igual a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além destas, o extrato micelial cultivado em arroz e dextrose, RDM, apresentou atividade bacteriostática contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* nas concentrações de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A literatura reporta o isolamento de metabólitos com atividade antibacteriana, como por exemplo, o composto 4-epiradicinol (**42**, Figura 49) isolado por Varma et al (2006) inibiu o crescimento de *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella choleraesuis* e *Bacillus subtilis*. Jadulco et al (2002) relata a atividade da lunatina (**43**), isolada de *Curvularia lunata*, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

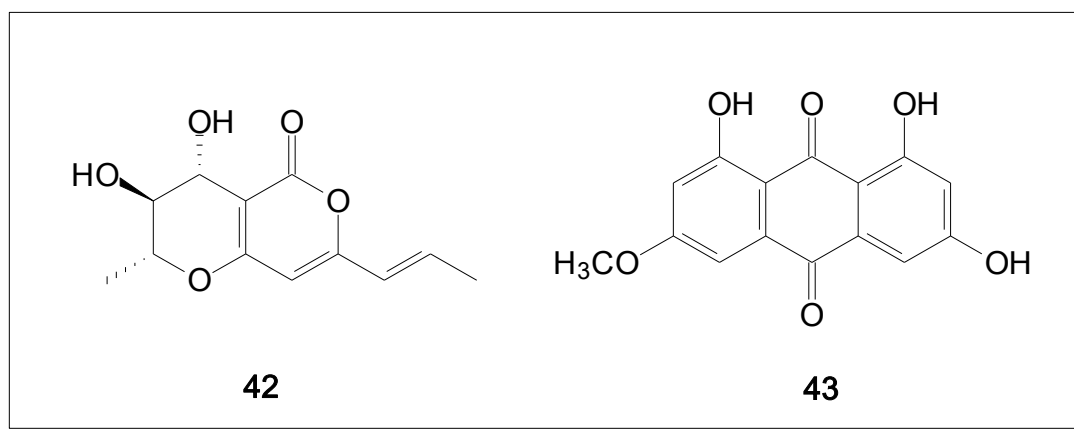


Figura 49 Estruturas do 4-epiradicinol (42) e da lunatina (43).

Busi et al, 2009, relata o isolamento da 11- α -metoxicurvularina (**39**, Figura 16) que apresenta atividade contra bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sphericus* e gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* e ainda atividade antifúngica contra *Aspergillus Níger* e *Candida albicans*.

Não foi observada atividade antimicrobiana para os demais extratos nas concentrações testadas.

4.7.3 Avaliação da Atividade Larvicida

Nas concentrações testadas, nenhum dos extratos avaliados foi capaz de causar a morte das larvas do 3° estágio do *A. aegyptii*.

4.8 ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO DE *Curvularia lunata* CULTIVADO EM EXTRATO DE MALTE

O meio de cultura extrato de malte foi selecionado para cultivo em larga escala com base nos resultados da avaliação da atividade anticolinesterásica, por apresentar o maior halo de inibição. Os dados de CLAE-DAD e RMN de ^1H não estavam disponíveis no momento.

Estudos iniciais do fracionamento cromatográfico para obtenção dos metabólitos conduziram a duas frações, a saber, CL-MEM-5.5.17.2 e CL-MEM-5.5.17.3 oriundas de uma cromatografia em camada delgada preparativa. A CL-MEM-5.5.17.3 mostrou um conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H integrando para um hidrogênio e outro conjunto de sinais com integração para dois hidrogênios, sugerindo uma mistura de duas substâncias na proporção de 1:2. A fração CL-MEM-5.5.17.2, por sua vez, contém uma mistura de pelo menos três substâncias.

4.8.1 Análise da Fração CL-MEM-5.5.17.3

Uma análise preliminar da fração CL-MEM-5.5.17.3 (4.9 mg) por CCD usando como fase móvel diclorometano/acetato de etila (85:15), detectou uma mancha única com valor de r_f de 0.3. O espectro de RMN de ^1H (300 MHz) revelou sinais por toda a região do espectro acompanhados pelos sinais de substâncias de natureza graxa. Por conter uma pequena quantidade de massa optamos por obter os dados espectroscópicos antes de dar prosseguimento ao procedimento de purificação da mesma, etapa esta que ainda não foi realizada até o momento. A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) foi observado que não existe coerência entre a integração de sinais, sugerindo uma mistura, sendo os sinais de maior intensidade referentes a um acilglicerídeo. A análise dos dados de RMN uni e bidimensionais confirmou a presença de um monoacilglicerídeo, bem como uma perilequinona inédita, em uma proporção 2:1, respectivamente.

Cada um dos cinco hidrogênios ligados ao carbono do glicerol foi atribuído como segue: um dublo dubleto em δ_H 4,16 ($J_{AA'} = 11,5$ Hz, $J_{A'B} = 6,0$ Hz) e outro em δ_H 4,22 ($J_{AA'} = 11,5$ Hz, $J_{A'B} = 4,5$ Hz) são correspondentes aos hidrogênios conectados ao carbono em δ_C 65,4 (sn-1) que contêm a cadeia do ácido graxo (JIE e LAM, 1995). O sinal em δ_H 3,95 corresponde ao deslocamento químico de H_B ligado ao carbono em δ_C 70,5 (sn-2), enquanto que os outros dois dublo dubletos em δ_H 3,61 ($J_{AA'} = 11,5$ Hz, $J_{A'B} = 5,4$ Hz) e δ_H 3,70 ($J_{AA'} = 11,5$ Hz, $J_{A'B} = 4,0$ Hz) são correspondentes aos hidrogênios conectados ao carbono em δ_C 63,5 (sn-3). As correlações do tipo J^3 observadas no HMBC dos hidrogênios em δ_H 4,16 e 4,22 com o carbono carbonílico em δ_C 174,4, bem como as correlações J^2 dos hidrogênios metilênicos alfa-carbonílicos em δ_H 2,35 e 2,37 com esta carbonila corroboram com a presença deste monoacilglicerídeo (Figura 50).

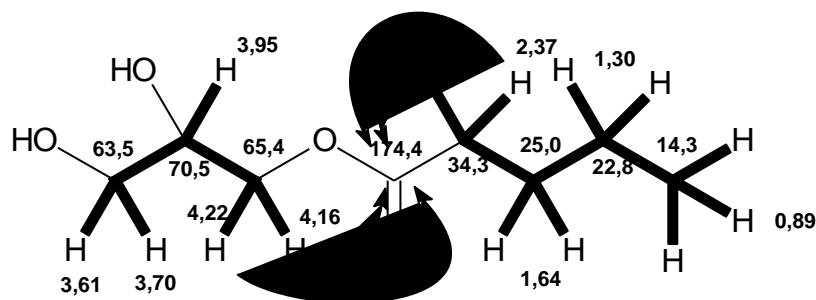



Figura 50 Estrutura e Correlações observadas nos espectros de 1H - 1H COSY (—) e 1H - ^{13}C HMBC () do monoacilglicerídeo

4.8.1.1 Elucidação estrutural da substância CL-01

A determinação estrutural da substância CL-01, que foi isolada do extrato bruto micelial do fungo *Curvularia lunata* cultivado em extrato de malte, foi feita através da análise dos espectros de RMN uni e bidimensional como RMN de 1H , RMN de ^{13}C , DEPT, HMBC, COSY, e HSQC, bem como por análise de espectrometria de massas utilizando como fonte de ionização *Eletrospray* (ESI-EM), Figuras 51 a 63.

O espectro de RMN de 1H apresentou quatro sinais de dubletos em δ_H 7.84* (H-7), 7.85* (H-6), 7.11 (H-8) e 7.04 (H-5), com integrações correspondentes a um átomo de hidrogênio cada e constantes de acoplamento

no valor de 9.0 Hz, indicando a presença de hidrogênios aromáticos acoplado em orto, condizente com o sistema de spins AX de hidrogênios aromáticos.

O espectro de RMN de ^1H apresentou também dois singletos desblindados em δ_H 12.46 e em δ_H 12.42, que são característicos de grupos hidroxilas fortemente quelados, com integração para um hidrogênio cada. Apresentou ainda dois duplos dubletos; um em δ_H 3.40 ($J = 17,0$ e $2,0$ Hz) e outro em δ_H 2.90 ($J = 16,0$ e $12,0$ Hz), com integrações correspondentes a um hidrogênio cada, característicos de um grupo metilênico. Exibiu também, um singlete em δ_H 3.46, integrando para três hidrogênios, correspondente a um grupo metoxílico, um multiplete em δ_H 3.18, integrando para dois hidrogênios, um multiplete em δ_H 4.70, com integração correspondente a dois hidrogênios, bem como, um dubleto em δ_H 3.57 ($J = 9,0$ Hz) com integração correspondente a um hidrogênio.

A análise geral do espectro de RMN de ^{13}C , concomitantemente com a análise do espectro DEPT 135° , evidenciou uma duplicidade de sinais e indicou a presença de oito átomos de carbono aromáticos não hidrogenados, sendo dois deles ligados a átomos de oxigênio (δ_C 162.5 e 161,9) e quatro carbonos aromáticos hidrogenados ou olefínico (δ_C 132.7, 132.6, 119.9 e 117.8). Além destes, o espectro apresentou ainda sinais correspondentes a dois grupos aril-carbonílicos (δ_C 202.6 e 202.5), dois carbonos oximetínicos (δ_C 79.4; e 66.0), um carbono quaternário (δ_C 71.3); um carbono metoxílico (δ_C 55.7), dois carbonos alifáticos (δ_C 48.1 e 37.0) e um carbono metínico (δ_C 47.9).

A análise conjunta dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e dos mapas de contornos HSQC e COSY permitiu atribuir os hidrogênios aos seus respectivos carbonos e inferir a presença de dois anéis aromáticos com o padrão de 1, 2, 3, 4 - tetrassubstituído. O hidrogênio H-5 em δ_H 7.04 acopla com hidrogênio H-6 em δ_H 7.85*, enquanto que o H-7 em δ_H 7.84* acopla com o hidrogênio H-8 em δ_H 7.11. Foi possível deduzir também que um dos substituintes de cada anel é um grupo hidroxílico que participa de ligação de hidrogênio com um grupo aril-carbonílico.

A confirmação das posições destes grupos se deu através das correlações observadas no espectro de HMBC, onde observa-se as correlações

entre o H-5 com os carbonos em δ_C 123.8, 162.5 e 117.5 e H-6 correlaciona-se com os carbonos δ_C 123.8 e 136.6. No outro anel o H-7 apresenta correlação com os carbonos δ_C 123.9, 165.6 e 161.9 e H-8 possui correlações com δ_C 114.2, 123.9 e 161.9. O hidrogênio em δ_H 12.46 correlaciona com os carbonos δ_C 117.8 e 162.5 ao passo que o hidrogênio em δ_H 12.42 correlaciona com δ_C 114.2, 119.9 e 161.9 (Figura 64).

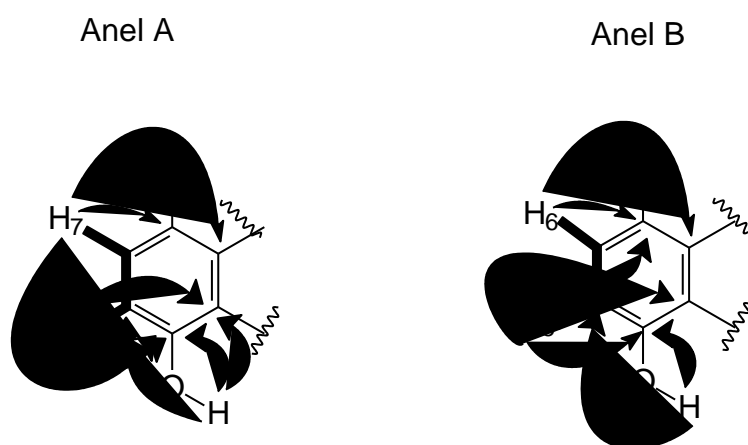



Figura 60. Correlações observadas nos espectros de ^1H - ^1H COSY (—) e ^1H - ^{13}C HMBC () da substância CL-01

Os valores de deslocamento para os átomos de carbono das duas carbonilas sugerem a presença de cetonas α,β -insaturadas (δ_C 202.6 e 202.5), porém a ausência de carbonos hibridizados em sp^2 além dos pertencentes aos anéis aromáticos exclui essa possibilidade, indicando que as carbonilas estejam diretamente ligadas aos anéis aromáticos. Os valores de deslocamento em δ_H 12,46 e em δ_H 12,42, no espectro de RMN de ^1H , inerente a presença de hidroxilas queladas ligadas ao anel aromático corrobora com essa afirmação (Figura 64).

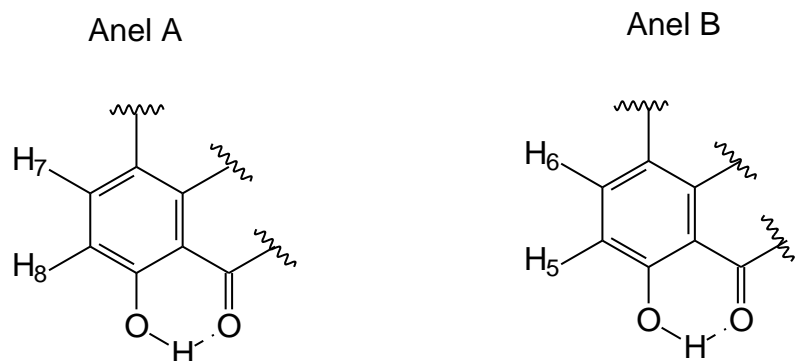


Figura 64. Proposta de estruturas parciais para os anéis A e B atribuídas para a substância CL-01

O espectro de HSQC mostrou que o carbono em δ_C 48.1 apresentava correlação com dois hidrogênios, em δ_H 3.18 e 2.90, enquanto que o carbono em δ_C 37.0 correlacionava-se com os hidrogênios em δ_H 3.18 e 3.40, sugerindo a presença de dois grupos metilênicos com hidrogênios diastereotópicos. É possível observar também no HSQC que o multiplete em δ_H 4.69 integrando para dois hidrogênios está correlacionado com os carbonos em δ_C 79.4 e 66.0. As correlações observadas no espectro de HMBC, onde os hidrogênios em δ_H 3.18 apresentam correlações com os carbonos em δ_C 202.6, 202.5, 66.0 e 79.4 e com δ_C 117.5 e 114.2, e o hidrogênio em δ_H 2.90 apresenta correlação com δ_C 202.6 e 66.0 e o hidrogênio δ_H 3.40 correlaciona-se com δ_C 202.5, permitem atribuir os grupos conectados ao grupo aril-carbonílico (Figura 65).

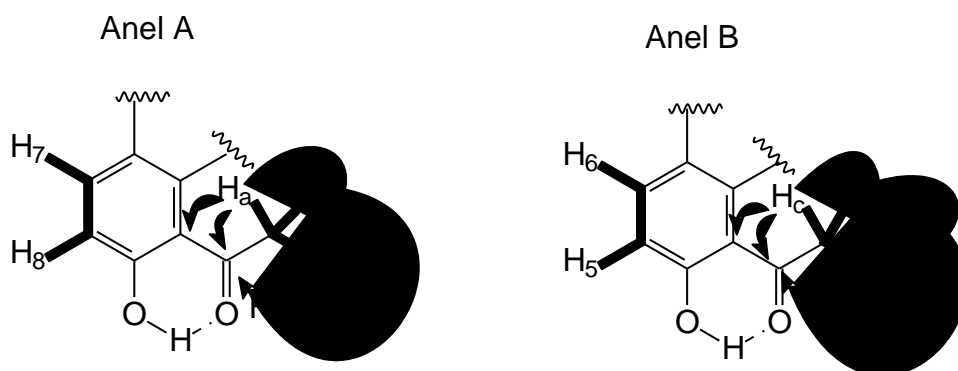


Figura 65. Estruturas parciais A e B e correlações ^1H - ^1H COSY (—) e ^1H - ^{13}C HMBC (\curvearrowright) da substância CL-01.

A presença de um único singlete em δ_H 3,46, integrando para três hidrogênios característicos de um grupo metoxílico, correlacionando no HMBC com o carbono em δ_C 79,4, sugere a presença de um grupo hidroxílico ligado ao carbono oxigenado em δ_C 66,0. De diante do exposto até agora podemos propor quatro estruturas parciais mostradas na Figura 66.

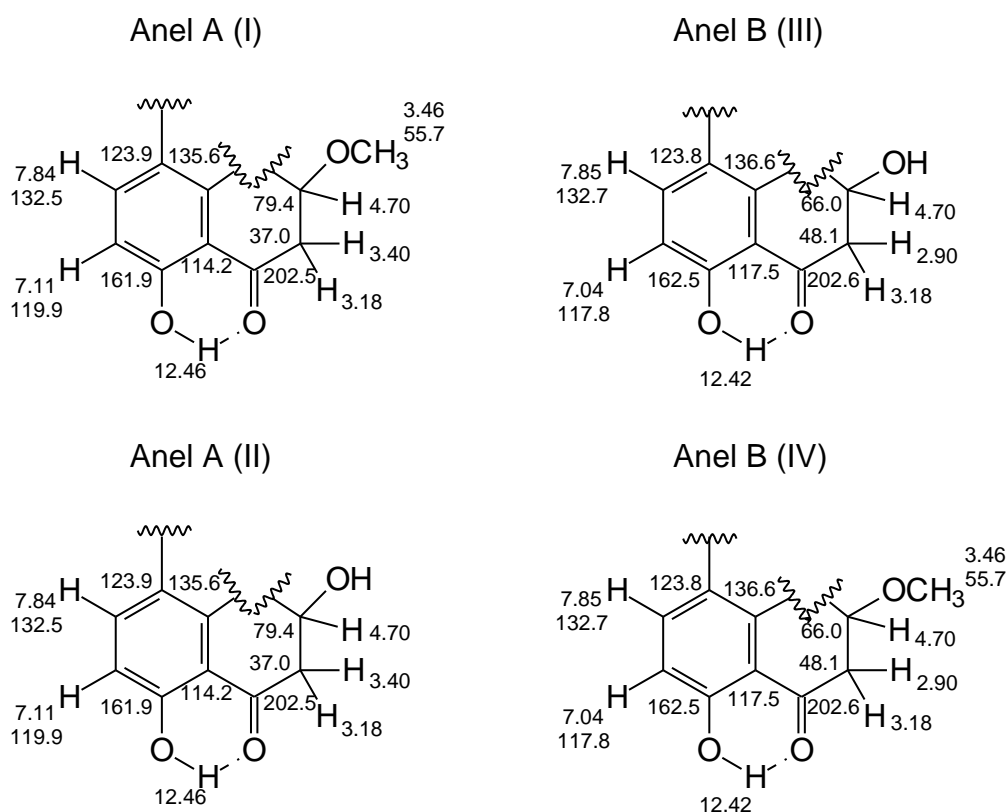


Figura 66. Estruturas parciais I, II, III e IV para substância CL-01.

Portanto, restavam atribuir os sinais em δ_H 3,57 correlacionado no HSQC com o carbono metínico em δ_C 47,9 e o carbono quaternário oxigenado em δ_C 71,3, que foram atribuídos conforme as estruturas parciais V e VI (Figura 67)

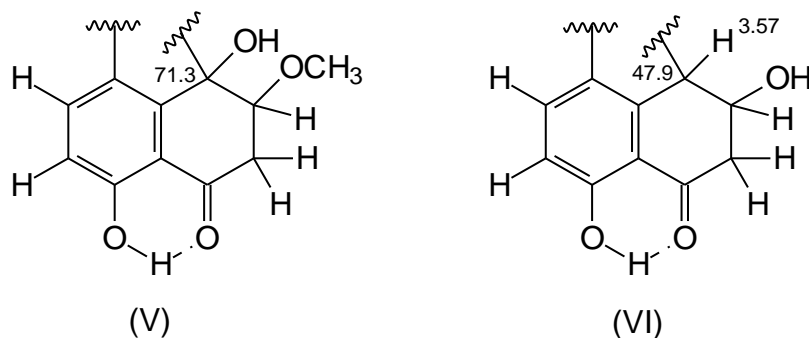


Figura 67. Estruturas parciais V e VI para a substância CL-01

A análise do espectro de massa de alta resolução obtido no modo ESI-EM (+) apresentou o íon *quasi*-molecular $[M + H]$ em 383.1122, que juntamente com os dados de RMN permitiram estabelecer para a substância CL-01 a fórmula molecular $C_{21}H_{18}O_7$. Dessa forma, todos os sinais correspondentes nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C foram devidamente atribuídos, o que nos leva a propor a união dos anéis A e B. Restando duas possibilidades de conexão entre eles, VII e VIII (Figura 68).

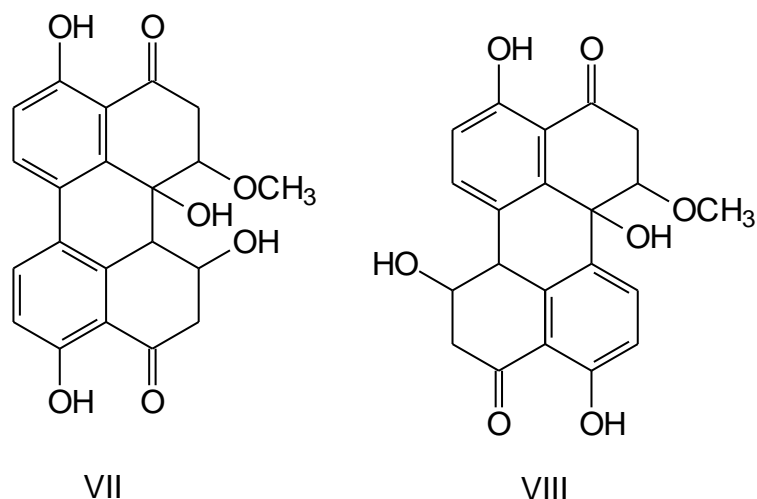


Figura 68. Possíveis estruturas para a substância CL-01

Com base na correlação observada no HMBC entre o hidrogênio em δ_H 3.57 e o carbono em δ_C 71.3, foi possível eliminar a estrutura VIII e, portanto, determinar a estrutura VII como a correta (Figura 69).

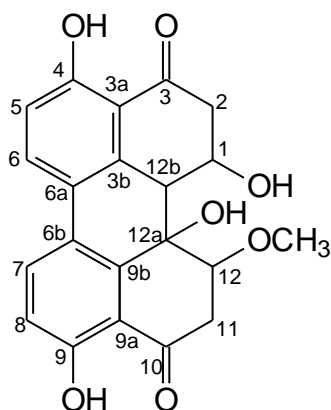


Figura 69. Estrutura da substância CL-01

A magnitude das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-1 e H-2_b ($J = 12.0$ Hz) sugere uma relação *trans* para estes dois hidrogênios e que a conformação do anel assumira posição meia-cadeira preferida, com o grupo hidroxílico numa posição equatorial. O pequeno valor para a constante de acoplamento entre H-12 e H-11_b ($J = 2.0$ Hz) é indicativo que estes dois hidrogênios relação *cis*. Portanto a estereoquímica relativa proposta para a substância CL-01 é a mostrada na Figura 70, a seguir.

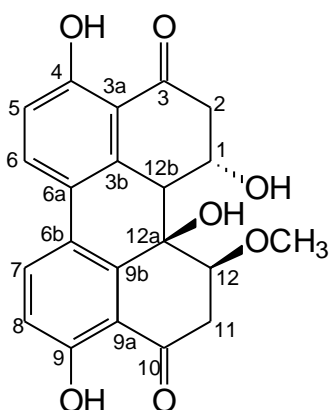


Figura 70. Estereoquímica relativa proposta para a substância CL-01.

Kronh et al. (2006) investigando extratos de cultura do fungo endofítico *Monodictys fluctuata* relatou o isolamento do stemfritriol (Figura 71). A análise comparativa dos dados de RMN da substância CL-01 com os dados do stemphytriol revela que a diferença está na presença do grupo metoxílico em C-12 na CL-01, portanto, nomeamos CL-01 como 12-metil-stemfritriol.

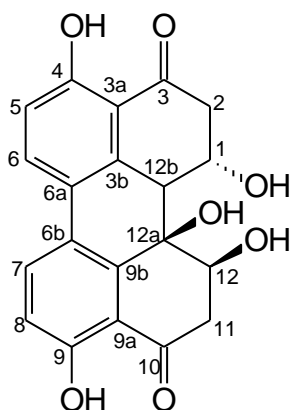


Figura 71. Stemfritriol isolado a partir de culturas do fungo *Monodictys fluctuata*

Uma busca na literatura não encontrou nenhuma substância com estrutura similar a 12-metil-stemfitriol, tratando-se de uma substância inédita.

Tabela 08. Deslocamentos químicos, multiplicidade e integração no espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3] e deslocamentos de RMN de ^{13}C [75MHz, CDCl_3] da 12-metoxi-stemfitriol

Posição	RMN de ^1H (ppm)	RMN de ^{13}C (ppm)	gHMBC
	12.46 (s, 1H)	-	117.8, 162.5
	12.42 (s, 1H)	-	114.2, 119.9, 161.9
10	-	202.6	
3	-	202.5	
4	-	162.5	
9	-	161.9	
3b	-	136.5	
9b	-	135.5	
5	7.85 (d, 1H, 9.0)	132.7	123.8, 136.6
7	7.84 (d, 1H, 9.0)	132.5	123.9, 165.6, 161.9
6b	-	123.9	
6a	-	123.7	
8	7.11 (d, 1H, 9.0)	119.9	114.2, 123.9, 161.9
6	7.04 (d, 1H, 9.0)	117.8	123.8, 162.5, 117.5
3a	-	117.5	
3b	-	114.3	
12	4.70 (m, 2H)	79.4	71.3
12a	-	71.3	
1	4.70 (m, 2H)	66.0	
	3.46 (s, 3H)	55.7	
2	3.18 (m, 2H)	48.1	202.6, 117.5, 66.0
	2.90 (dd, 1H, 16.0; 12.0)		66.0, 202.6
12b	3.57 (d, 1H, 9.0)	47.9	71.3, 66.0
11	3.18 (m, 2H)	37.0	202.5; 114.2, 79.4
	3.40 (dd, 1H, 17.0; 2.0)		202.5

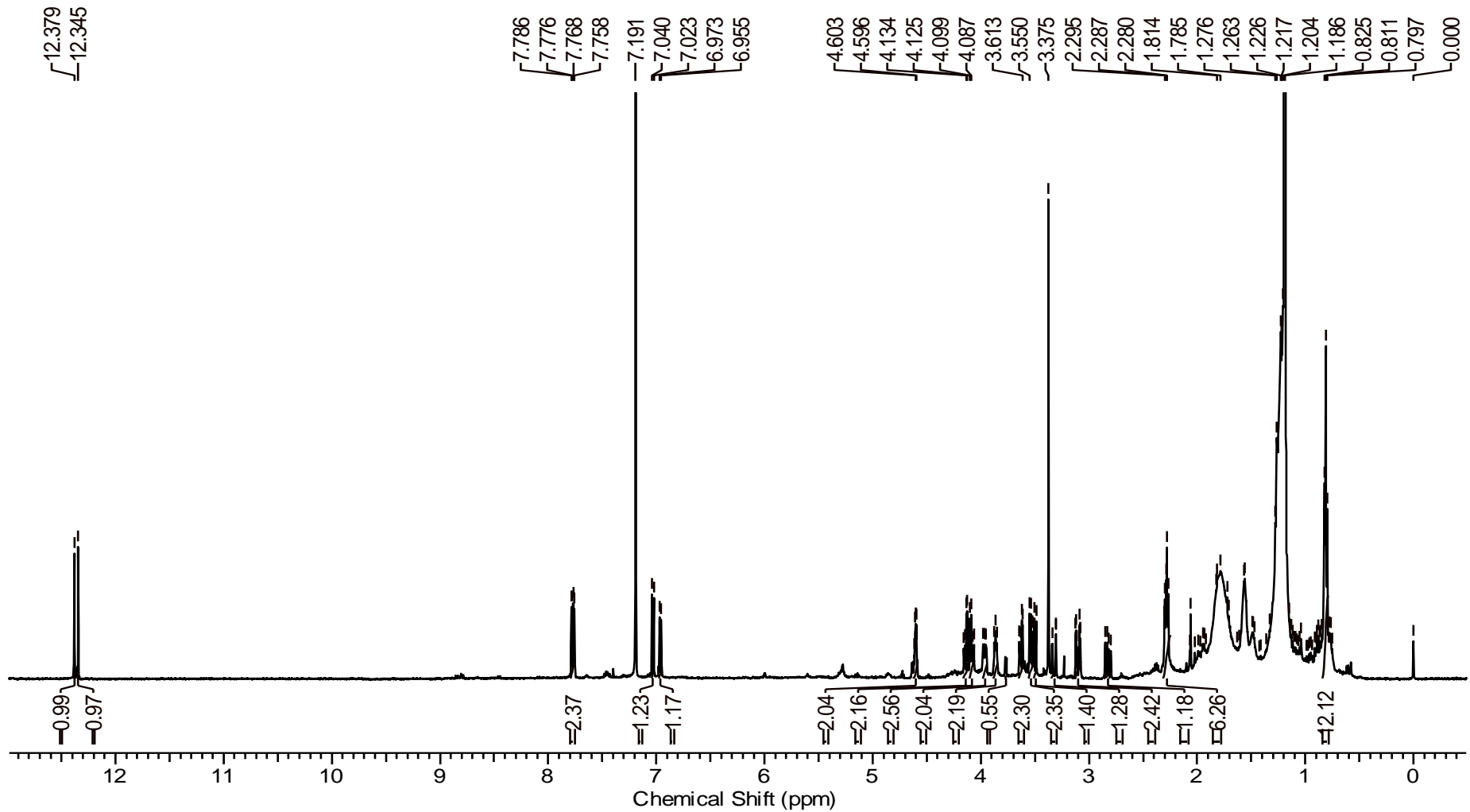


Figura 51 Espectro de RMN de 1H [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da fração CL-01

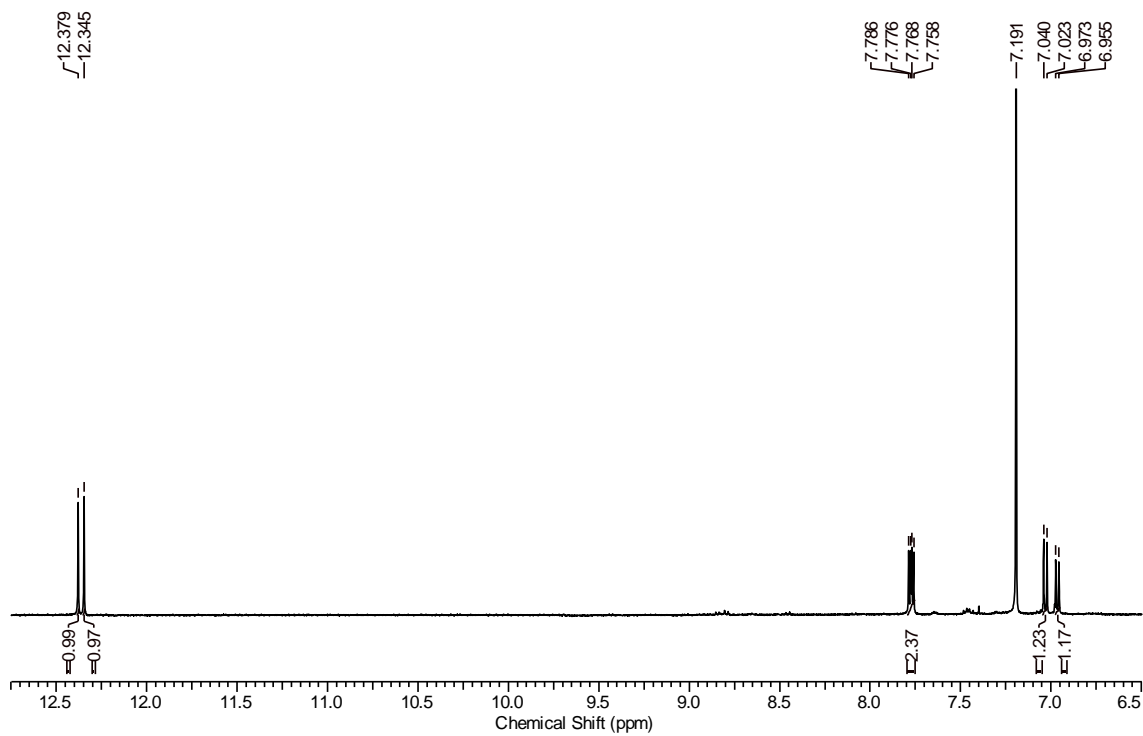


Figura 52 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 6,5 e 13,0 ppm.

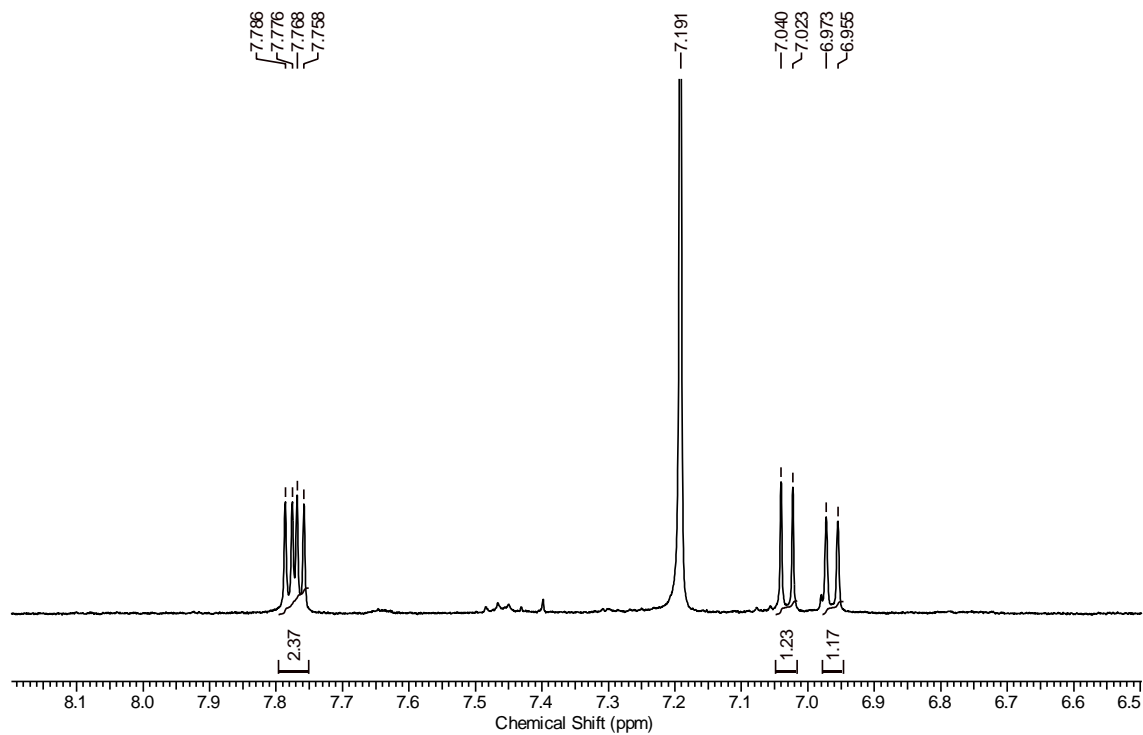


Figura 53 Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 6,5 e 8,5 ppm

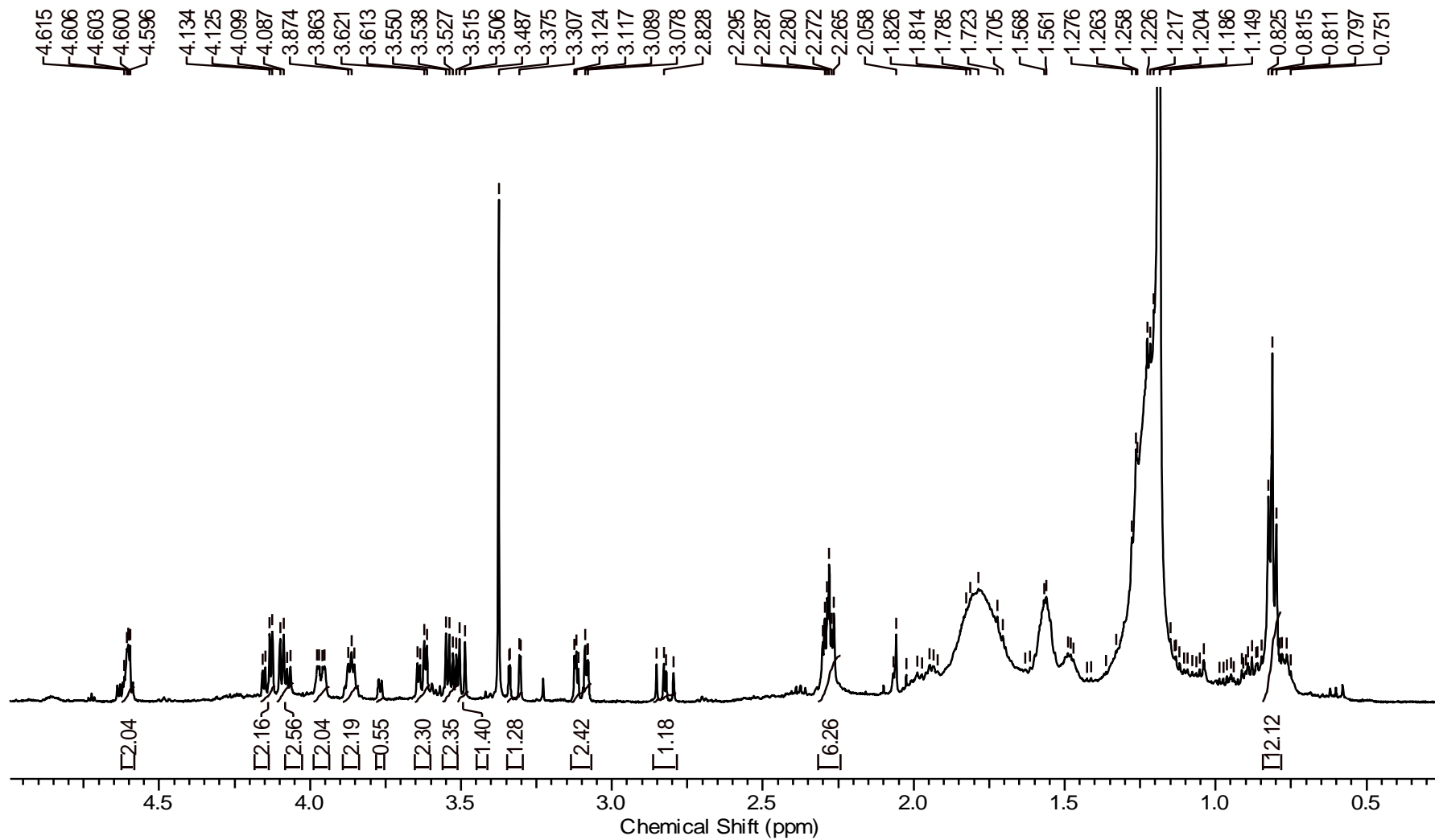


Figura 54 . Espectro de RMN de 1H [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 0,4 e 5,0 ppm

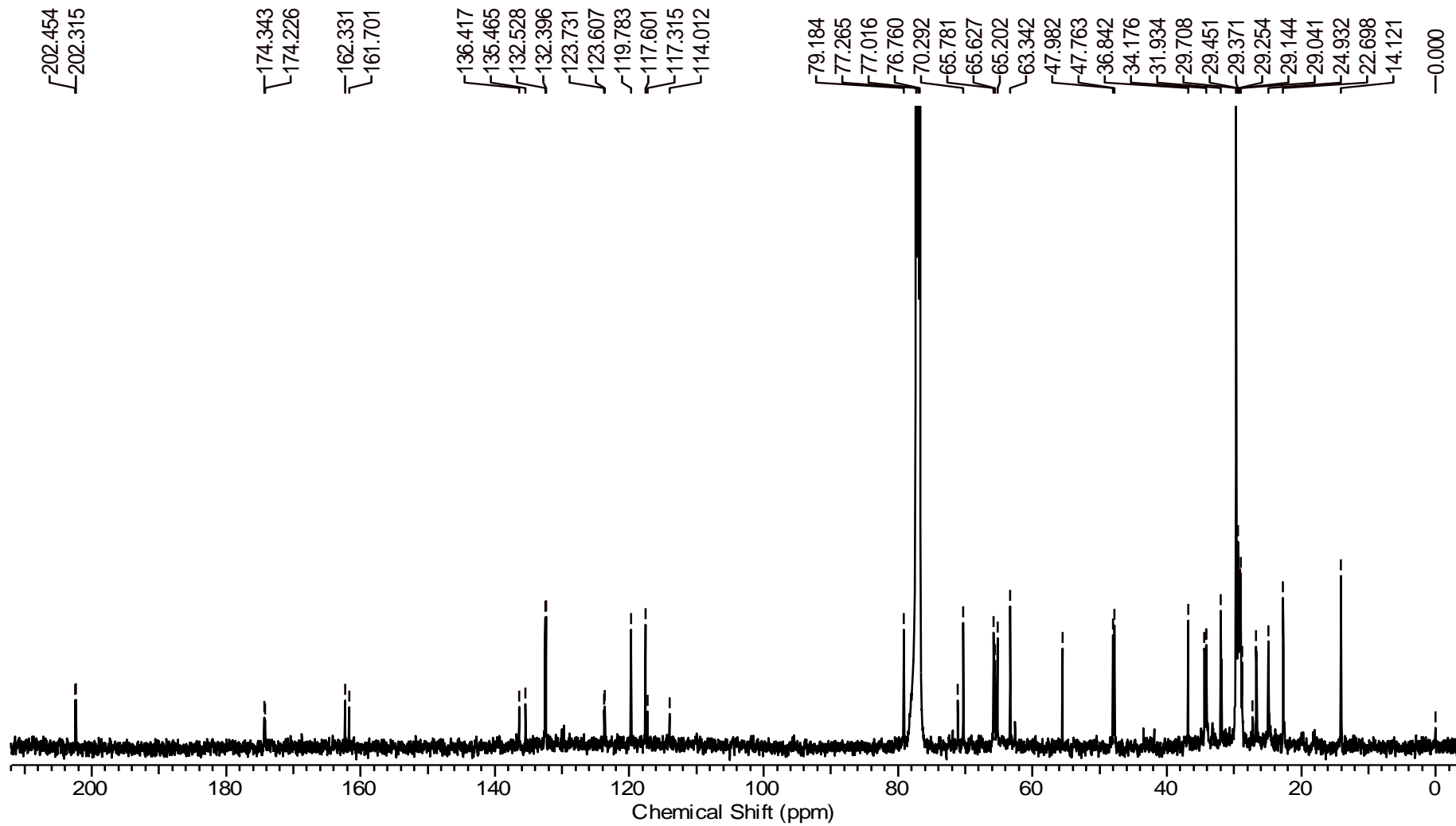


Figura 55 Espectro de RMN de ¹³C [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da fração CL-01

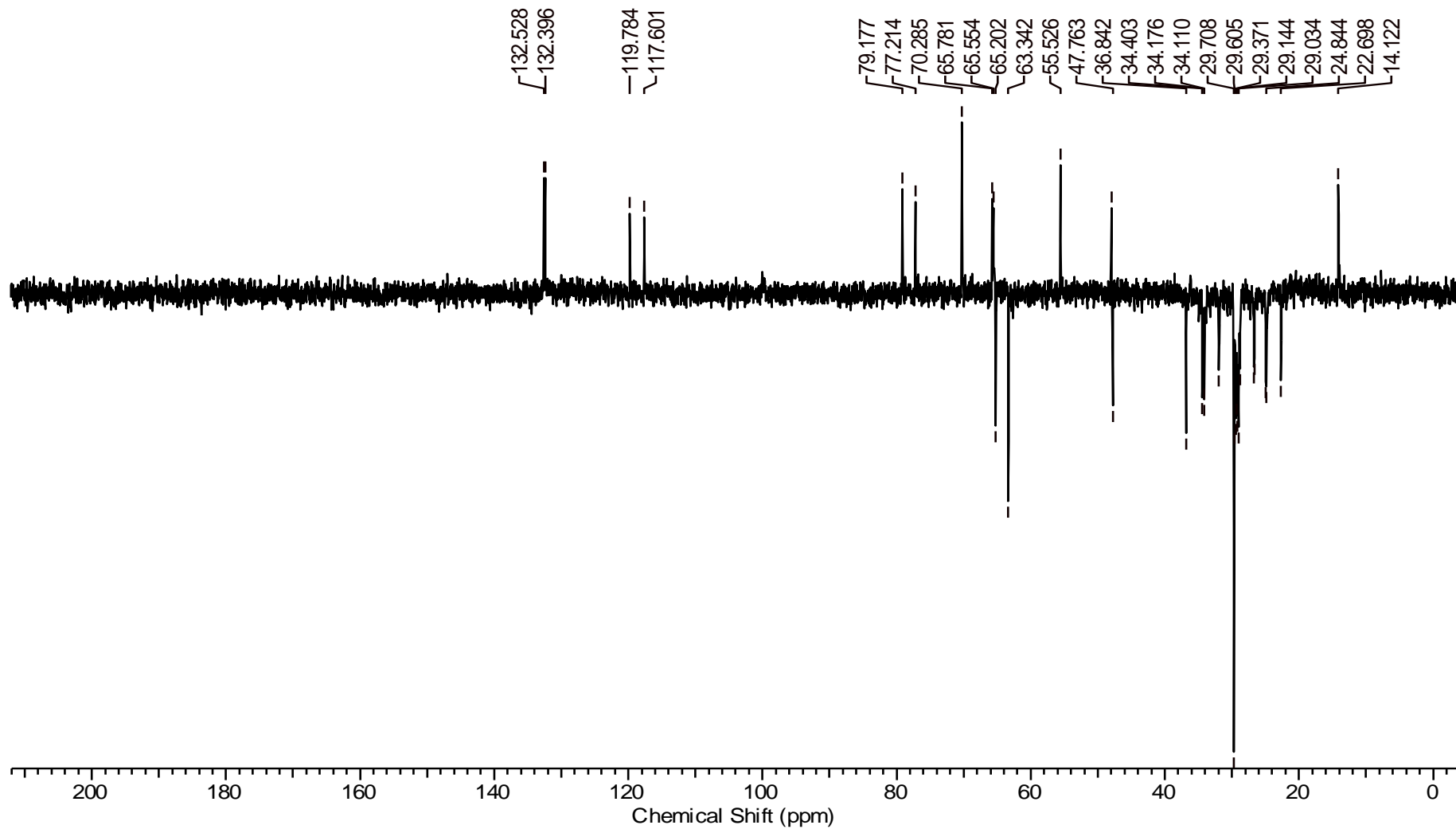


Figura 56 Espectro de DEPT 135° [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da fração CL-01

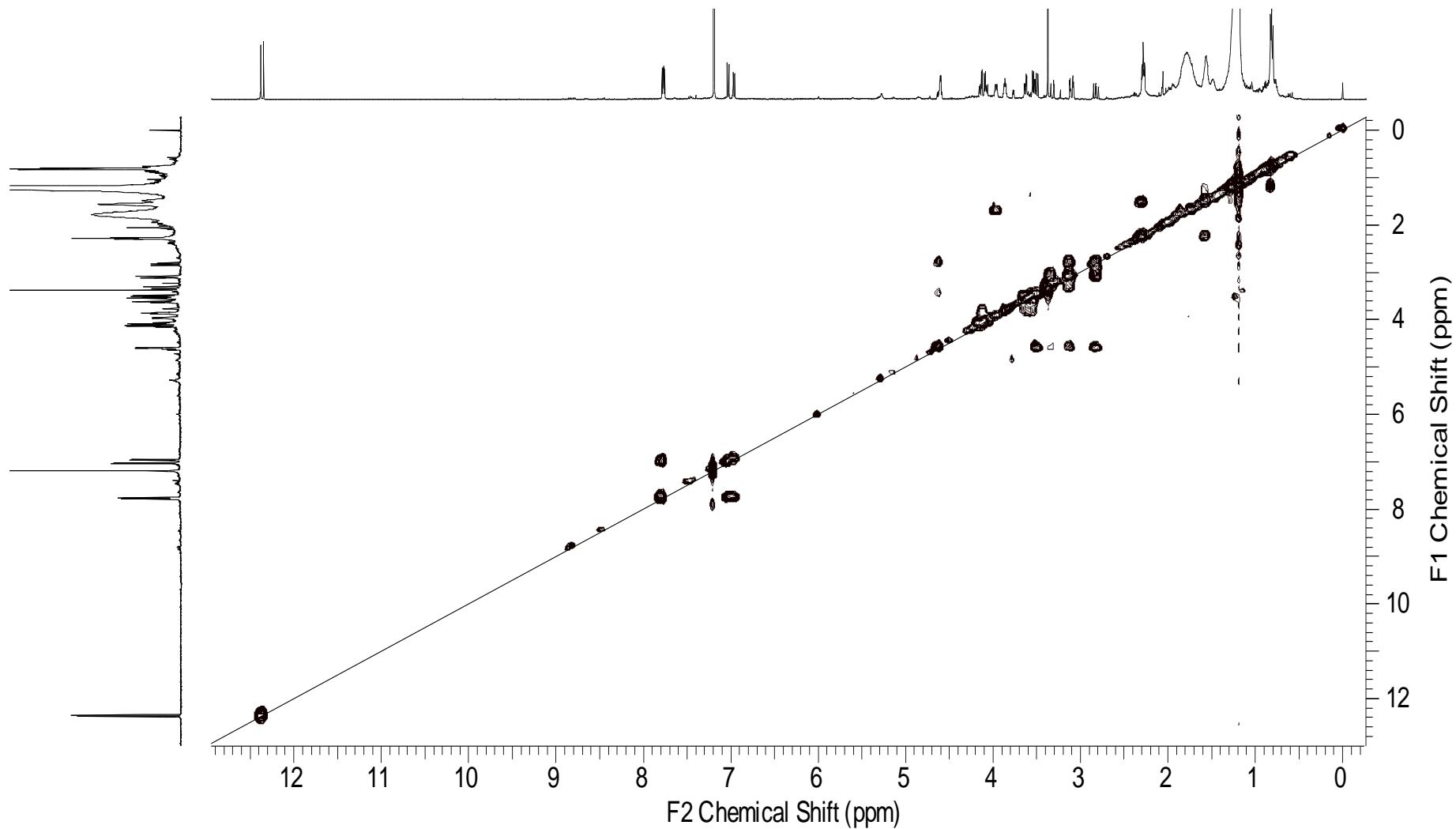


Figura 57 . Espectro de 1H-1H gCOSY [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01

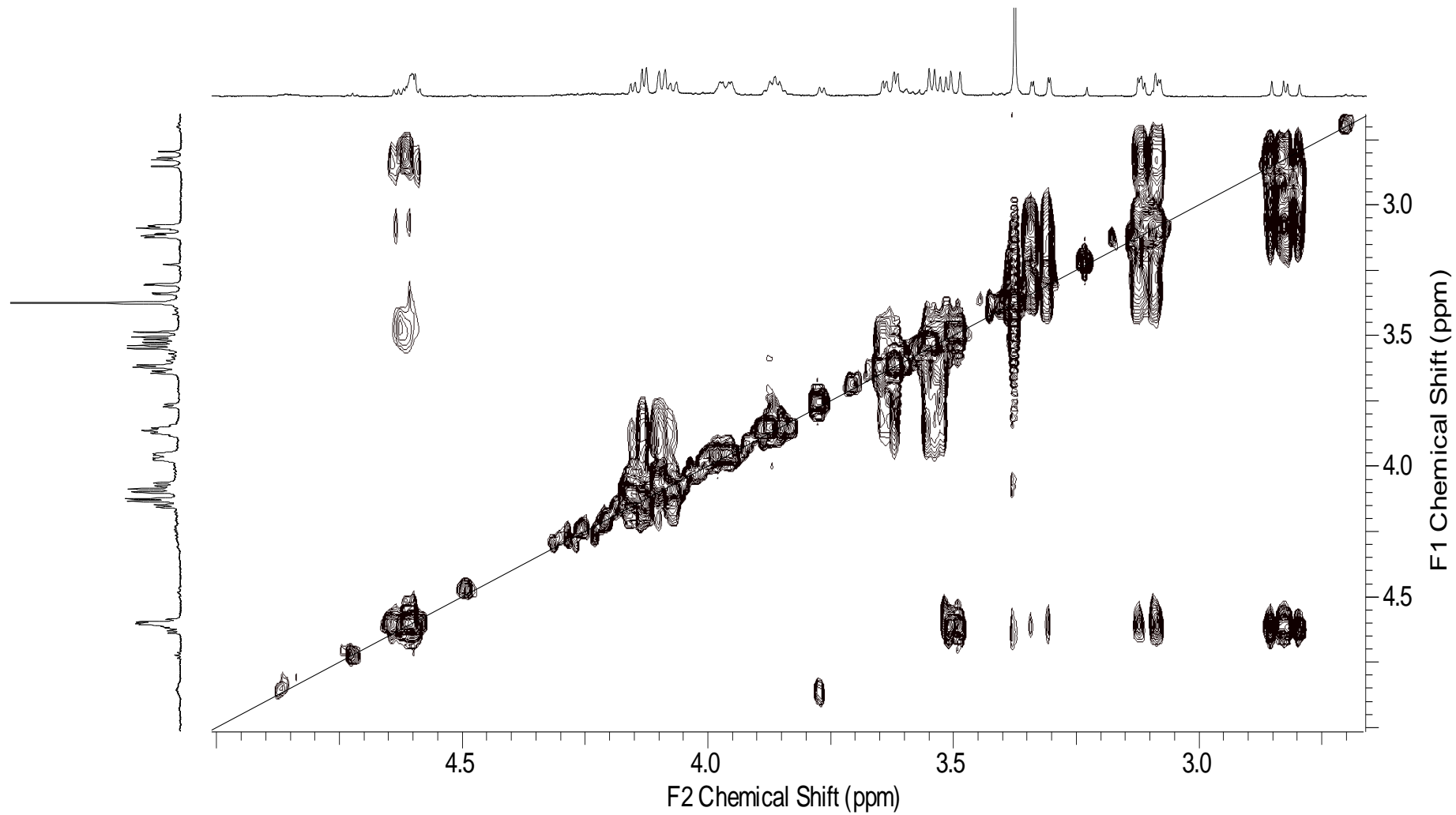


Figura 58 Espectro de ¹H-¹H gCOSY [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 2,2 e 5,0 ppm

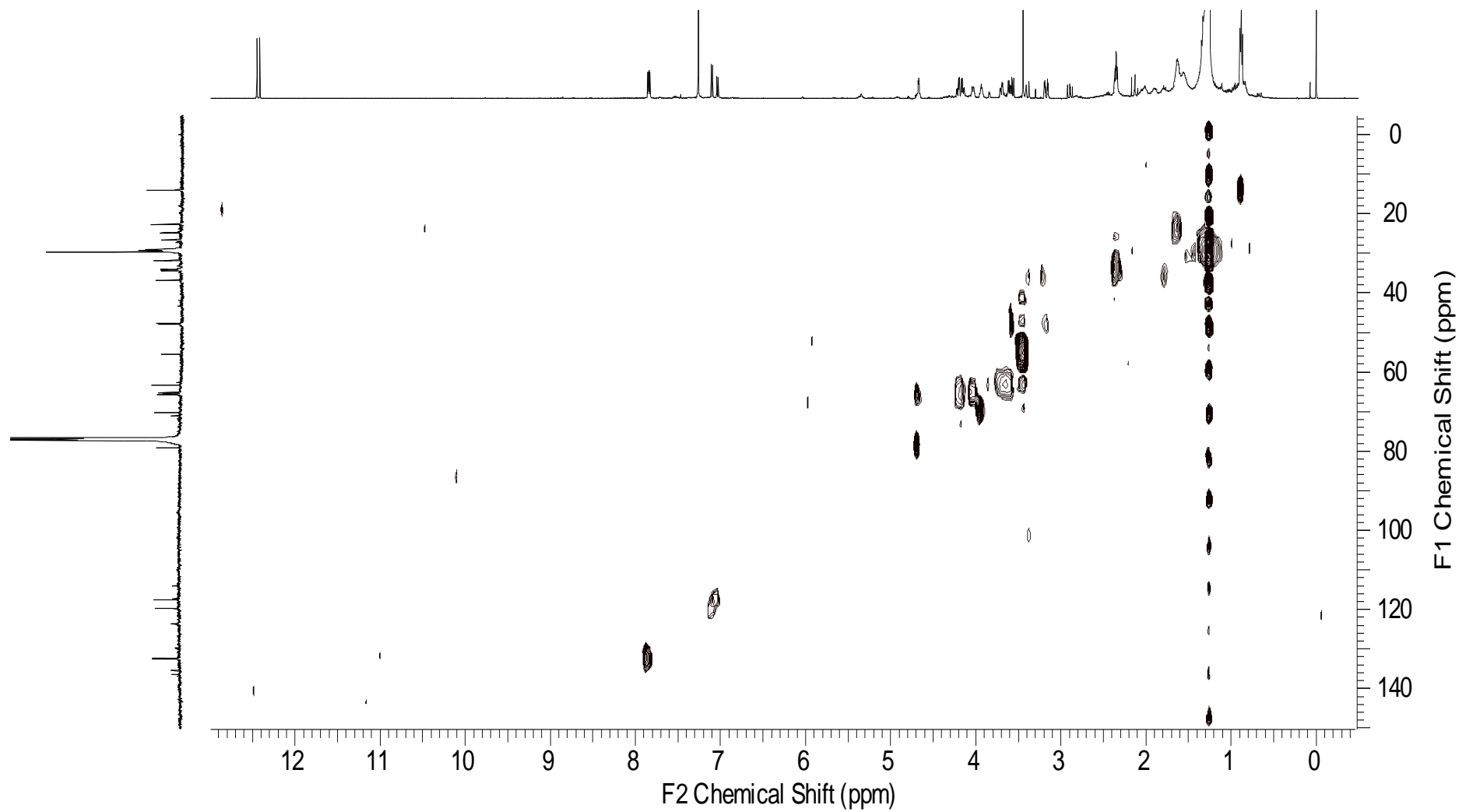


Figura 59 Espectro de gHSQC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01

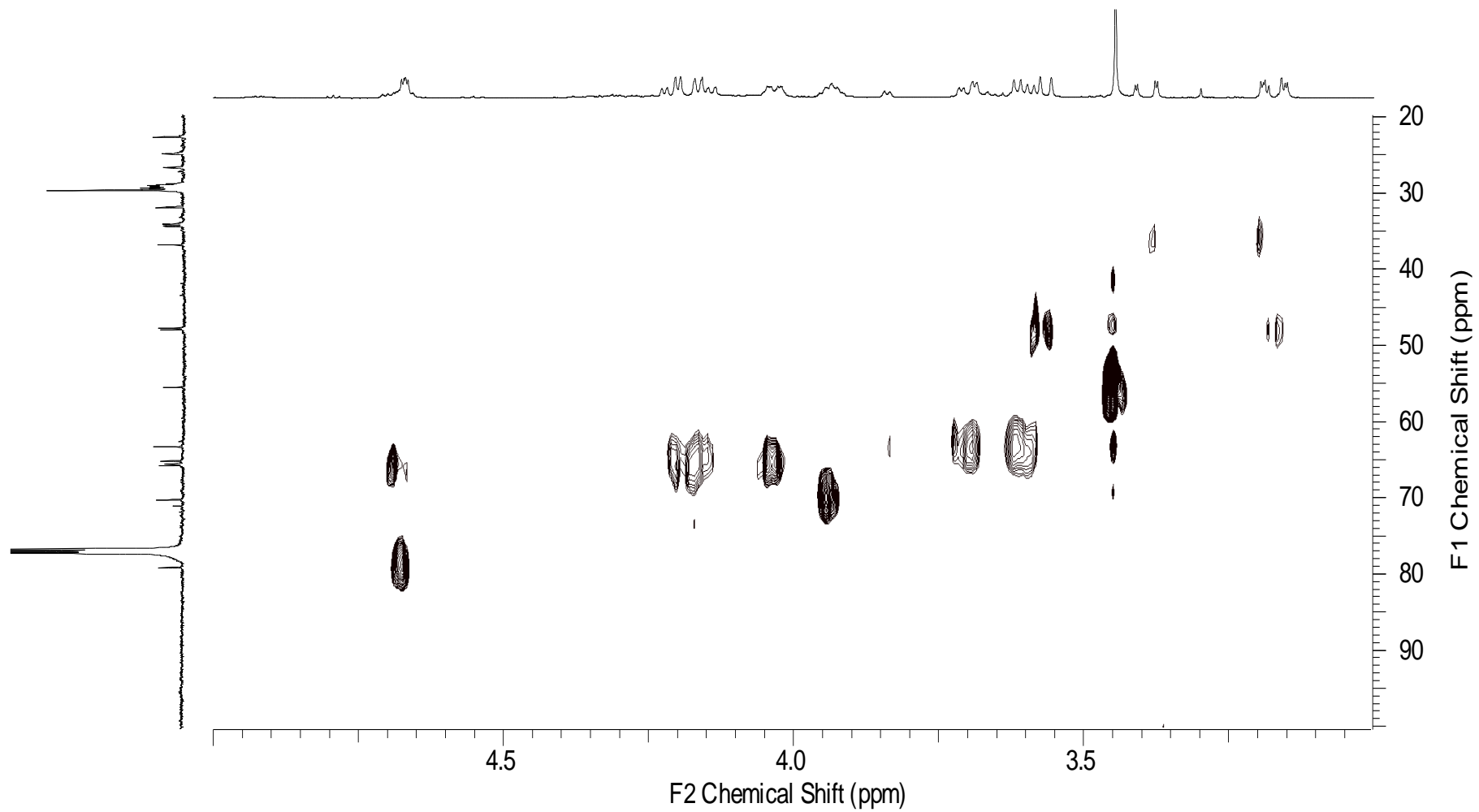


Figura 60 . Espectro de gHSQC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 2,0 e 5,0 ppm x 20 e 100 ppm

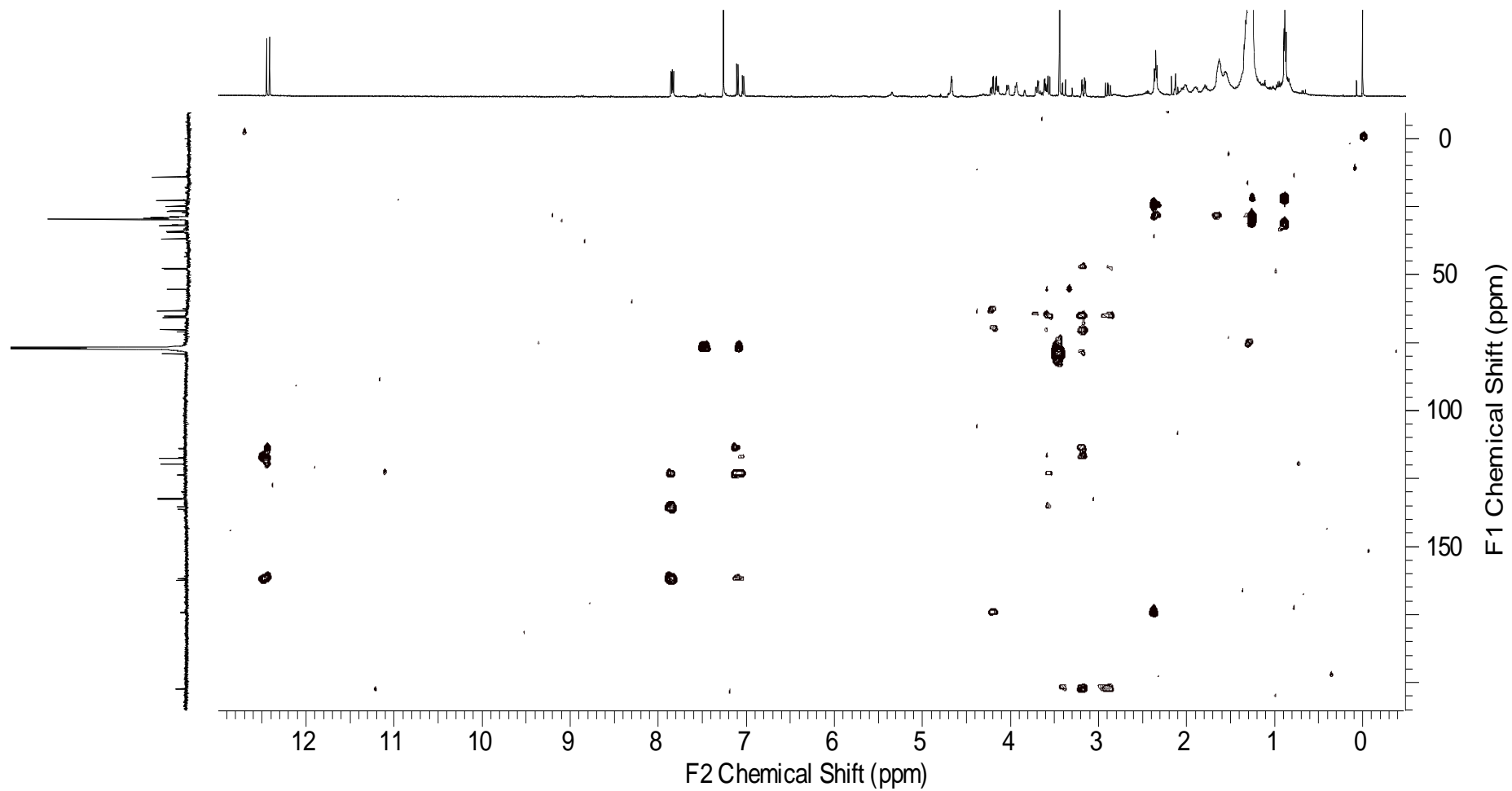


Figura 61 Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01

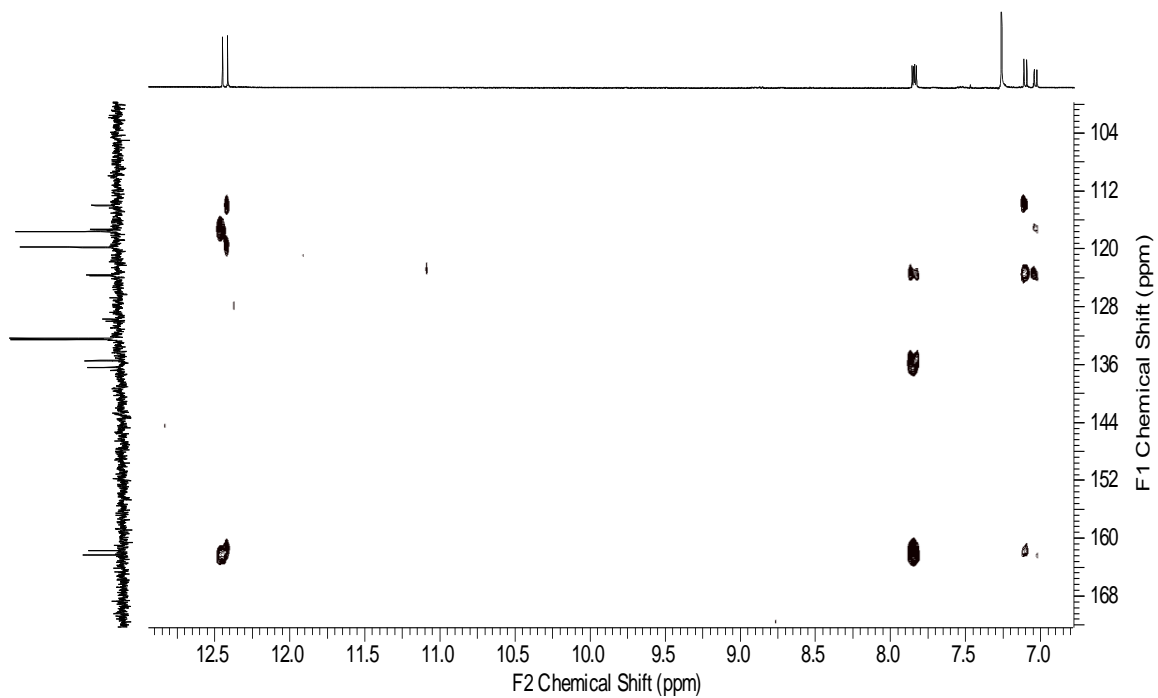


Figura 62 Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da substância CL-01, região entre 6,5 e 13 ppm x 100 e 172 ppm

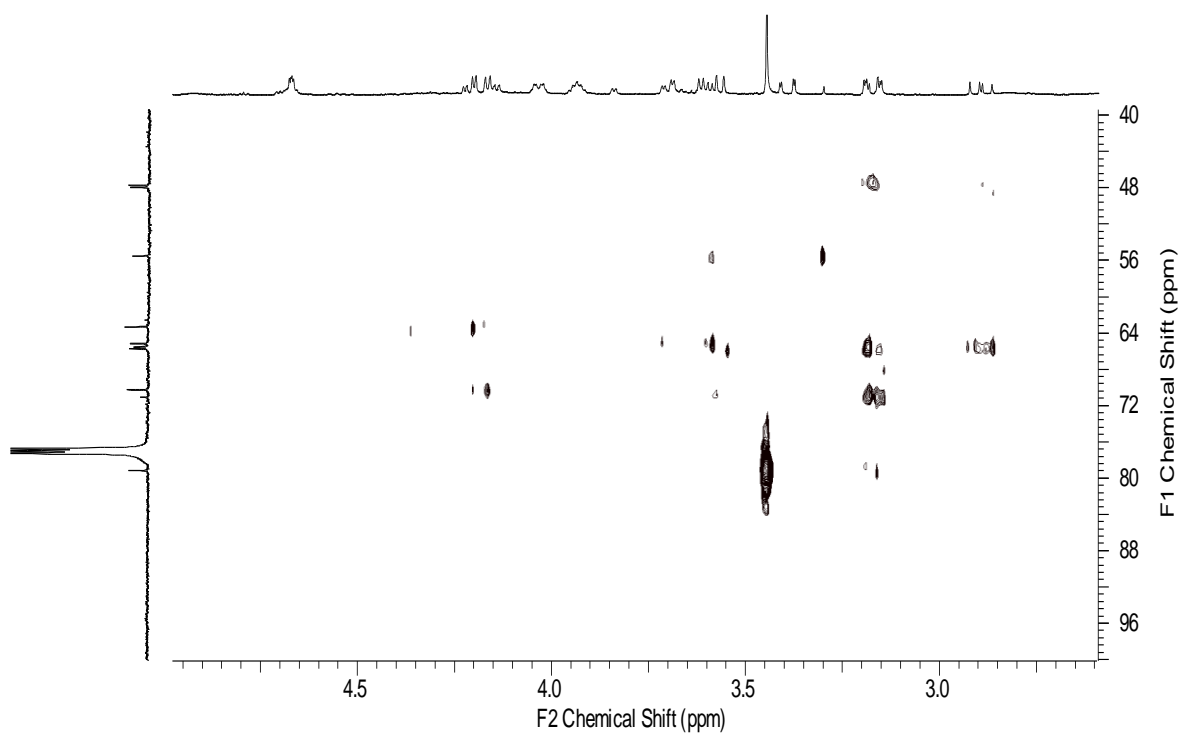


Figura 63 . Espectro de gHMBC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] da fração CL-01, região entre 2,2 e 5,0 ppm x 40,0 e 100 ppm

4.8.2 Análise da Fração CL-MEM-5.5.17.2

A análise preliminar da fração CL-MEM-5.5.17.2 (2.8 mg) por CCD usando como fase móvel diclorometano/acetato de etila (85:15), detectou uma mancha majoritária com valor de r_f de 0.2 e uma outra mancha com r_f de 0.4. O espectro de RMN de ^1H (300 MHz) revelou sinais por toda a região do espectro acompanhados pelos sinais de substâncias de natureza graxa. Assim como na CL-MEM-5.5.17.3, optamos por obter os dados espectroscópicos antes de dar prosseguimento ao procedimento de purificação da mesma, devido a pequena quantidade de massa. A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) foi observado que esta fração contém uma mistura de pelo menos três substâncias na proporção de 16:4:1, com base nos valores de integração, sendo os sinais de maior intensidade referentes a um acilglicerídeo. A análise dos dados de RMN uni e bidimensionais confirmou a presença de um monoacilglicerídeo, bem como uma mistura de duas perilequinonas já descritas na literatura, o dihidroalterperilenol e o alterperilenol, na proporção 4:1, respectivamente.

4.8.2.1 Identificação estrutural das substâncias CL-02 e CL-03

A identificação estrutural da mistura das substâncias CL-02 e CL-03 foram realizadas através da análise dos dados espectrométricos (Figura 72a) e através de comparação dos dados RMN de ^1H e ^{13}C descritos na literatura (OKUNO et al., 1986; HRADIL et al., 1989; ZHANG et al., 2012).

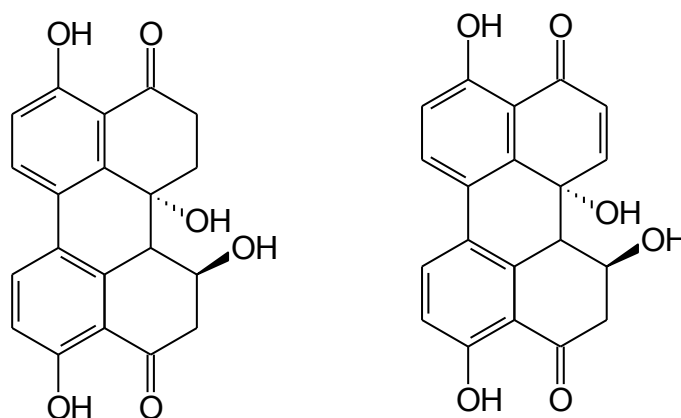
O espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de quatro sinais em δ_H 12.71(s), 12.43 (s), 12.36 (s,) e 12.35 (s,); característicos de grupos hidroxilas fortemente quelados, com integração para um hidrogênio cada. No espectro de RMN de ^1H foi possível observar a presença de três multipletos em δ_H 4.79 (1H) e 4.04 (1H), e 3.94, um dubleto em 3.21 (9.2Hz), um duplo duplo dubleto em δ_H 3.04, dois duplos dubletos em δ_H 3.18 e 2.85, um duplo triplete em δ_H 2.73, um triplo dubleto em δ_H 2.47 e dois multipletos em δ_H 1.81 e 1.79. Além destes sinais, foi possível observar a presença de dez dubletos δ_H 7.92 (1H, 8.7 Hz), 7.86 (1H, 8.7Hz), 7.84 (1H, 8.9 Hz), 7.83 (1H, 8.7 Hz), 7.80 (1H, 10Hz), 7.12 (8.7 Hz), 7.11

(8.9 Hz), 7.06 (8.7 Hz), 7.05 (8.7 Hz) e 6.43 (10Hz) característico a hidrogênios aromáticos, demonstrando o mesmo padrão de substituição observado no espectro de RMN de ^1H da substância 12-metil-stemfitriol (CL-01), isolada da fração anterior..

A análise do espectro de RMN de ^{13}C , indicou a presença de sete átomos de carbono aromáticos não hidrogenados, sendo dois deles ligados a átomos de oxigênio (δ_{C} 162.3 e 161,0) e quatro carbonos aromáticos hidrogenados em δ_{C} 132.7, 132.5, 119.5 e 117.6. Além destes, o espectro apresentou sinais correspondentes a dois grupos aril-carbônicos (δ_{C} 205.5 e 202.0), dois carbonos oximetínicos (δ_{C} 69.2; e 65.1), dois carbonos metínicos (δ_{C} 51.9 e 47.7) e dois carbonos alifáticos (δ_{C} 34.5 e 34.0).

Através da comparação dos dados de RMN obtidos para CL-01, isolada na fração anterior, e os descritos para esta fração, foi concluído que se tratava de uma mistura de outras duas perilenoquinonas com padrão semelhante a CL-01, nomeadas CL-02 e CL-03, pois os sinais encontravam-se duplicados.

Com os dados descritos na literatura (OKUNO et al., 1986; HRADIL et al., 1989; ZHANG et al., 2012), (Tabelas 09 e 10), foi possível corroborar a identificação das duas perilenoquinonas, como a dihidroalterperilenol (CL-02) e o alterperilenol (CL-03), Figura 77.



dihidroalterperilenol

alterperilenol

Figura 77. Estruturas químicas do dihidroalterperilenol e alterperilenol.

Tabela 09. Deslocamentos químicos, multiplicidade e constante de acoplamento no espectro de RMN de ^1H e deslocamentos de RMN de ^{13}C do dihidroalterperilenol

Posição	Dihidroalterperilenol*		CI-02**	
	δ_H (multi., J Hz)	δ_c	δ_H multi. (J Hz)	δ_c
1	2.30 (m)	34.8	2.47 (td, 15.0 e 15.5)	34.5
	2.58 (m)		3.04 (ddd, 15.5 e 2.8)	
2	3.02 (m)	33.5	2.73 (dt, 15.5 e 5.5)	34.0
	2.96 (m)		3.20 (m)	
3	-	206.0	-	205.0
3a	-	113.8	-	113.8
3b	-	138.4	-	135.4
4	-	161.0	-	162.3
5	7.04 (d, 8.8)	117.8	7.05 (d, 8.7)	117.6
6	8.06 (d, 8.8)	132.9	7.86 (d, 8.7)	132.6
6a	-	123.5	-	122.7
6b	-	124.8	-	124.1
7	8.01 (d, 8.7)	132.5	7.84 (d, 8.9)	132.4
8	6.94 (d, 8.7)	115.5	7.11 (d, 8.9)	119.5
9	-	160.4	-	162.0
9a		116.5	-	-
9b		140.7	-	143.8
10	-	204.2	-	202.0
11	2.96 (dd, 16.0, 15.9)	47.5	3.11 (dd)	47.7
	2.86 (dd, 16.0 e 15.9)		2.94 (dd, 11.9 e 15.9)	
12	4.50 (m)	64.7	4.79 (m)	65.1
12a	3.07 (dd, 7.2)	51.4		51.9
12b	-	68.0		69.2
1-OH		-		-
4-OH	12.72	-	12.71	-
9-OH	12.31	-	12.35	-
12-OH	5.38	-	-	-
12b-OH	5.28	-	-	-

*ZHANG et al., 2012 (espectro realizado em $\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz, TMS) ** [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

Tabela 10. Deslocamentos químicos, multiplicidade e constante de acoplamento no espectro de RMN de ^1H e deslocamentos de RMN de ^{13}C do alterperilenol

Posição	Alterperilenol*		CL-03**
	δ_H (multi., J Hz)	δ_C	δ_H multi. (J Hz)
1	7.88 (d, 10.4)	153.5	7.80 (d, 10.4)
2	6.34 (d, 10.4)	137.7	6.43 (d, 10.4)
3	-	190.6	-
3a	-	115.8	-
3b	-	140.3	-
4	-	160.9	-
5	7.05 (d, 8.7)	117.4	7.12 (d, 8.7)
6	8.07 (d, 8.7)	132.1	7.92 (d, 8.7)
6a	-	124.1	-
6b	-	125.4	-
7	8.02 (d, 8.7)	131.8	7.83 (d, 8.7)
8	6.95 (d, 8.7)	116.7	7.06 (d, 8.7)
9	-	160.2	-
9a	-	112.6	-
9b	-	137.7	-
10	-	203.9	-
11	2.86 (dd, 16.0 e 11.5) 2.91 (dd 16.0 e 5.5)	47.3	2.85 (dd, 13.0 e 11.8) 3.18 (dd, 14.4 e 4.8)
12	4.49 (m)	64.5	4.04 (m)
12a	3.09 (d, 9.4)	50.7	3.21 (d, 9.7)
12b	-	65.8	-
1-OH	-	-	-
4-OH	12.46	-	12.44
9-OH	12.38	-	12.36
12-OH	5.71	-	-
12b-OH	5.75	-	-

*ZHANG et al., 2012 (espectro realizado em DMSO- d_6 , 600 MHz, TMS) **[500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

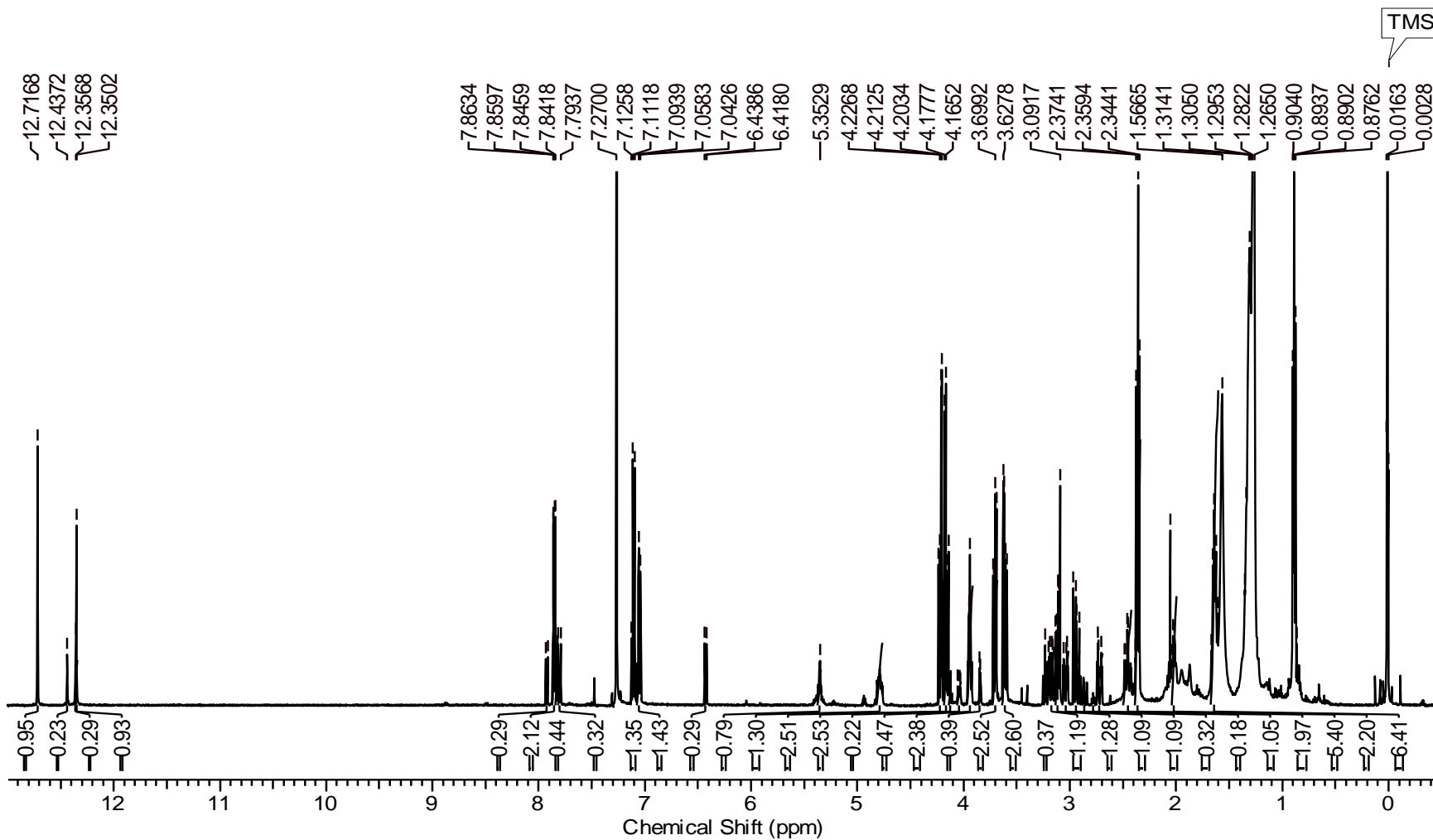


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03

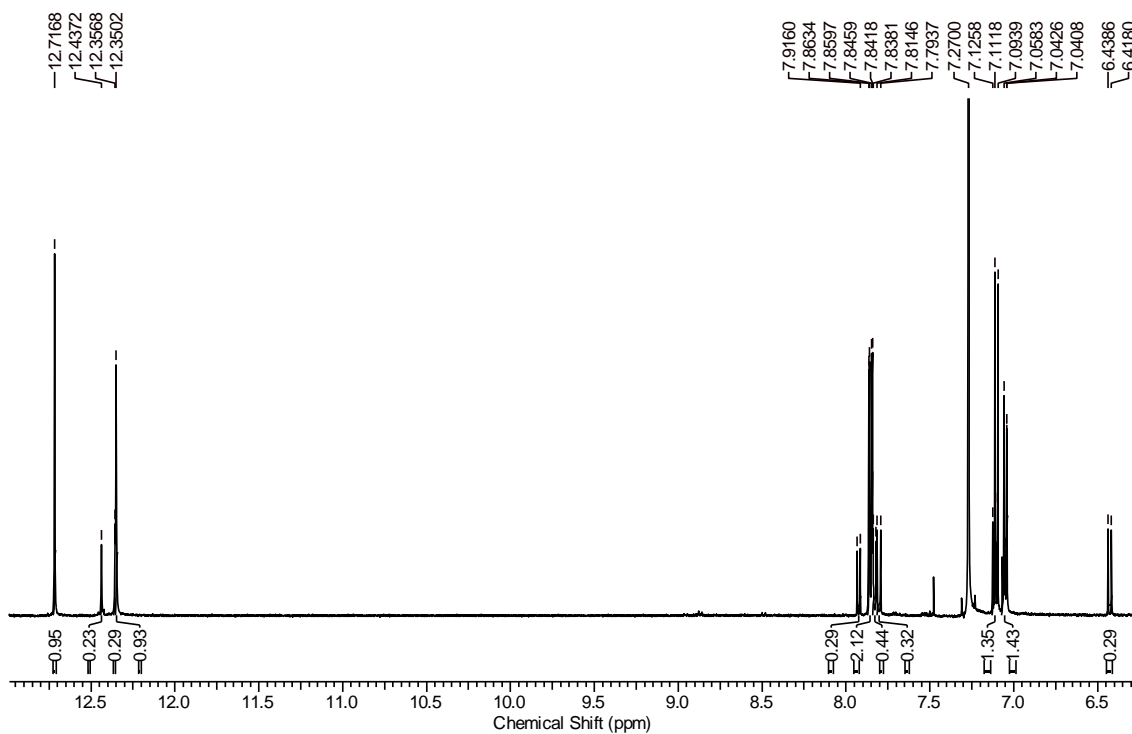


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03, região entre 6,5 e 13,0 ppm.

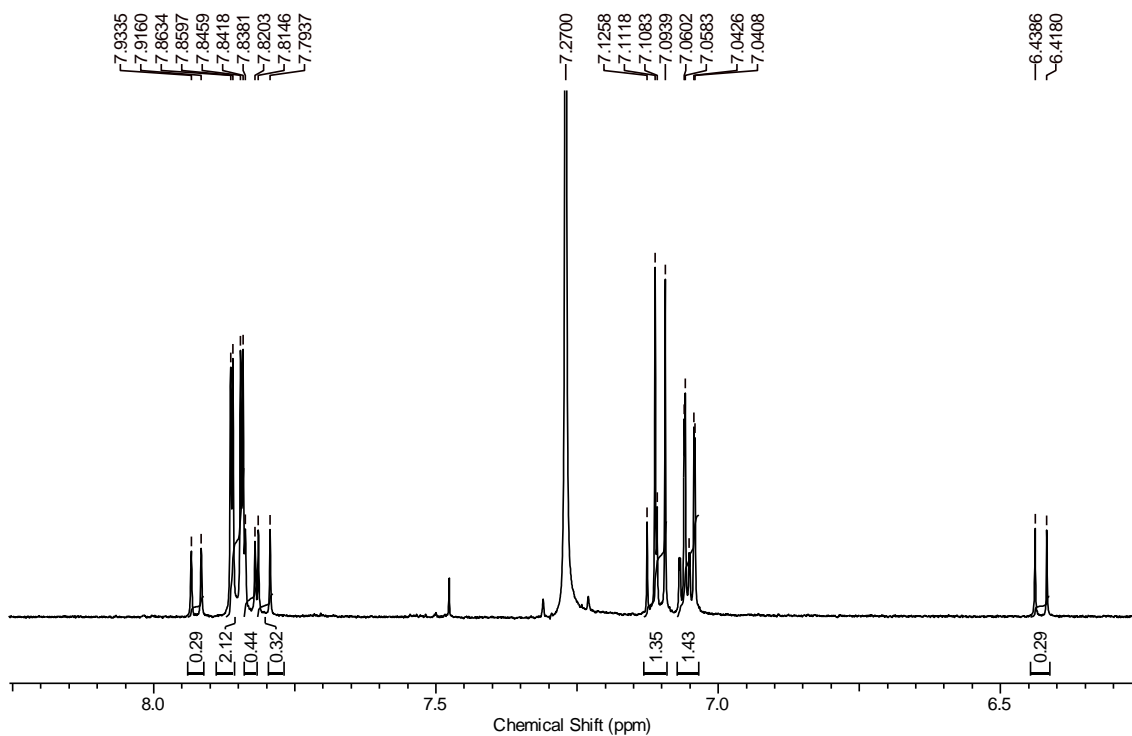


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e e CL-03, região entre 6,5 e 8,5 ppm

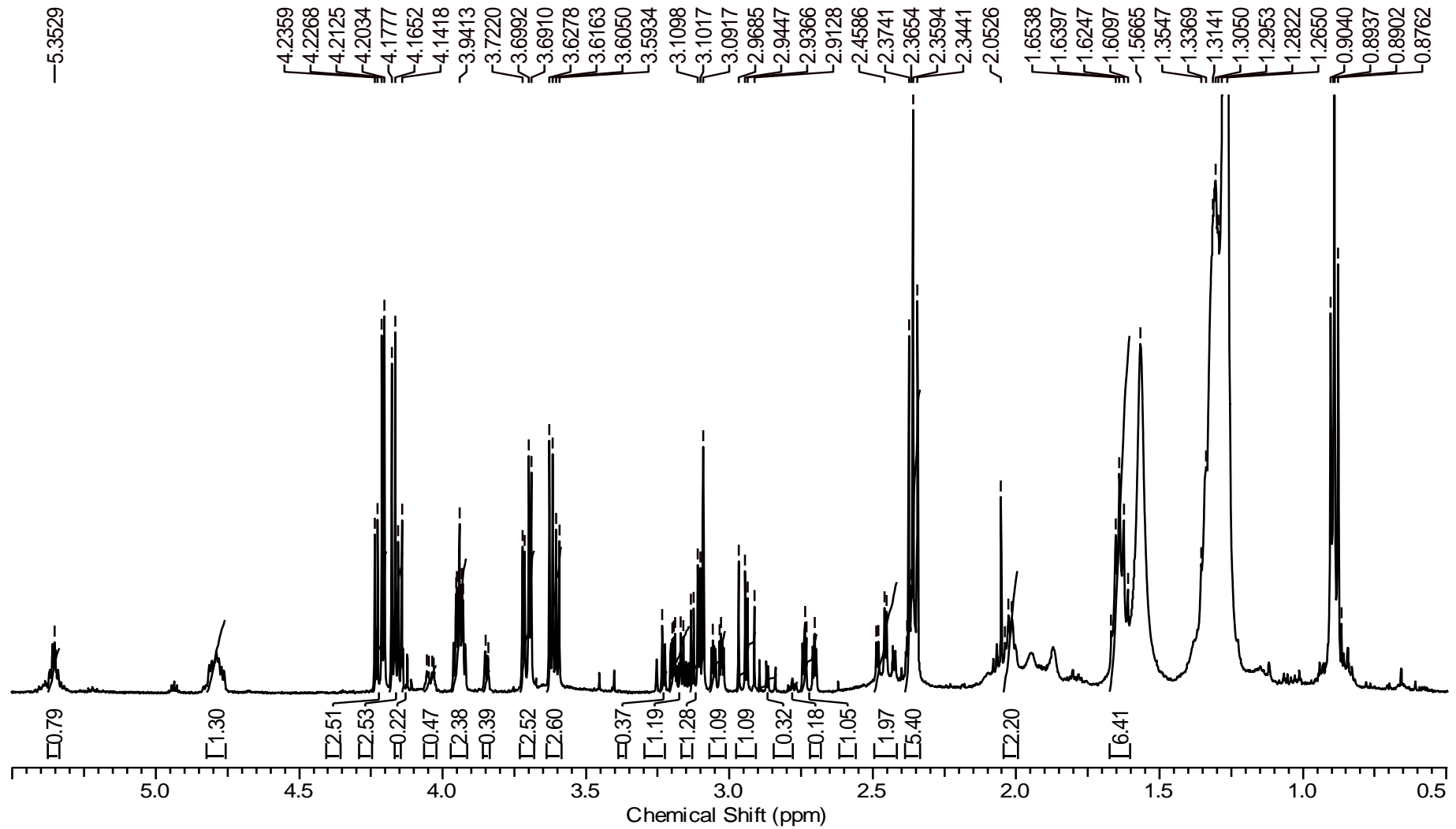


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03, região entre 0,5 e 6,0 ppm

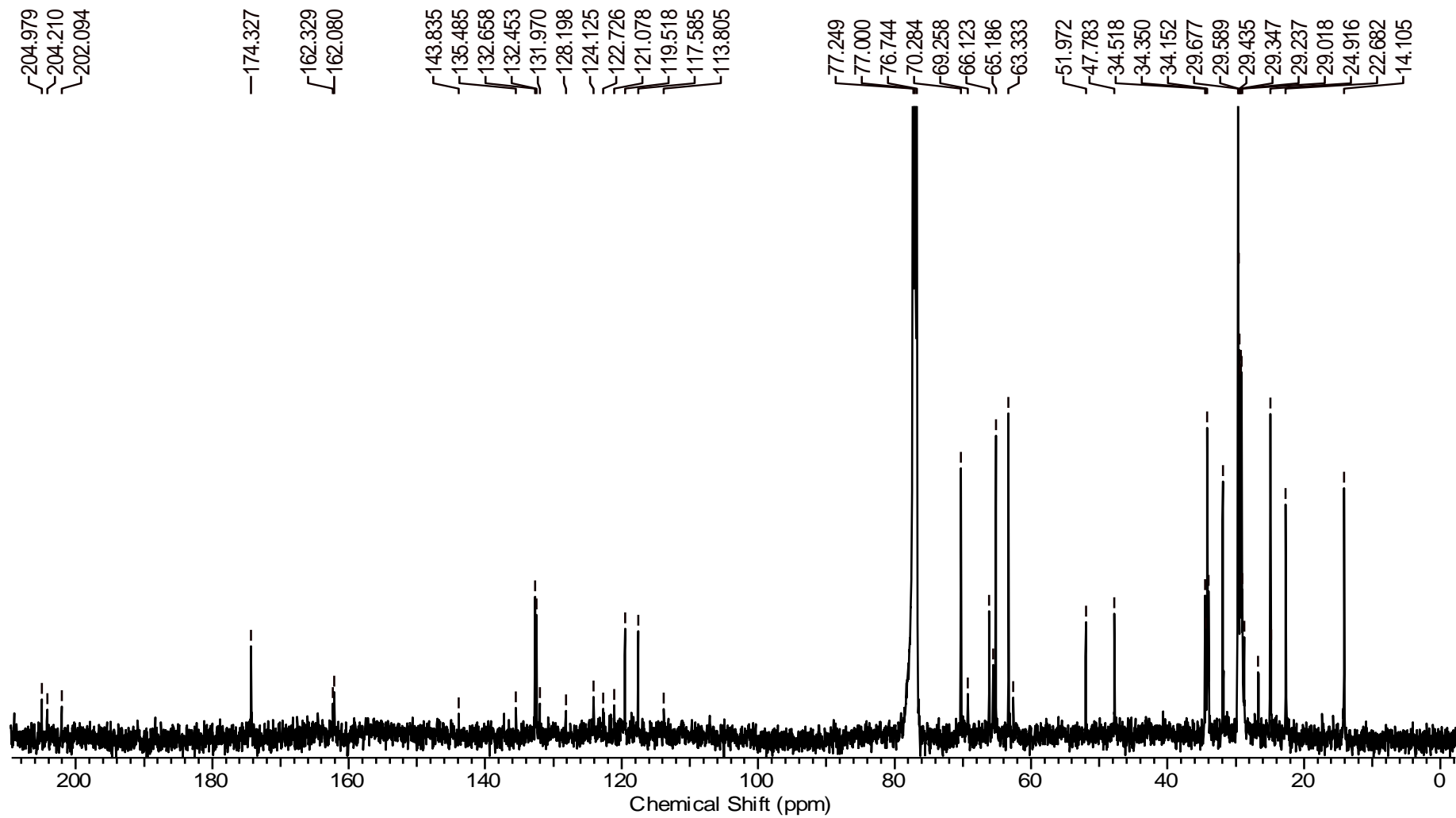


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração CL-02 e CL-03

4.5.3 Perilenoquinonas

As perilenoquinonas são pigmentos de cor escura e compreendem uma classe de compostos naturais caracterizados por um sistema pentacíclico oxidado. Substâncias dessa classe têm sido isoladas como toxinas fotoativadas a partir de diversas fontes, como fungos dos gêneros de *Alternaria*, *Bulgaria*, *Cercospora*, e *Daldinia* (DAUB et al., 2005; LI et al., 2005; FANG et al., 2012; MULROONEY et al., 2009; MULROONEY et al., 2012), pulgões e recentemente isolados também a partir de plantas (MULROONEY et al, 2012). Membros da família das perilenoquinonas se dividem em três classes, exemplificadas na Figura 79: A) C₂₀, compostos sem carbonos substituintes; B) compostos com carbonos substituintes e C) isolados a partir de pulgões. Das três classes, a predominante é a B, cujo representante é a cercosporina, uma fototoxina (DAUB et al., 2005).

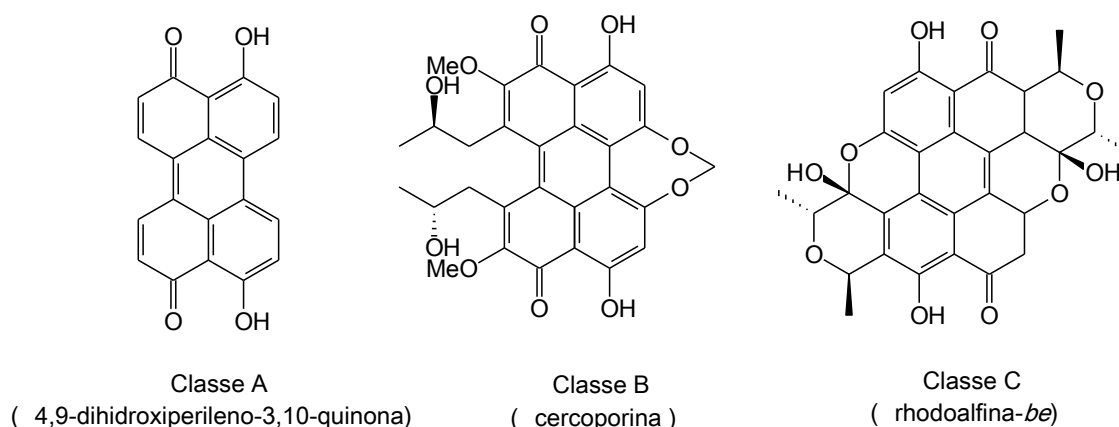


Figura 78. Estruturas representativas das classes de perilenoquinonas

Estas estruturas têm sido extensivamente estudadas devido à suas atividades biológicas interessantes e induzidas pela luz, por exemplo, como agentes anticancerígenos, fototoxinas, antibacteriana (ARNONI e NASINI, 1986; DAUB et al., 2005; MULROONEY et al, 2012) .

As perilenoquinonas parecem ter origem policetílica. O primeiro passo poderia ser a formação do precursor pentacetídeodecanoil-CoA (**B2**) a partir de acetil-CoA (**B1**), o qual deve passar por ciclização (via **B3** e **B4**) para produzir o

intermediário 1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno (**B5**, THN). Este intermediário por uma reação dependente da oxidação do NADPH a NADP⁺ e da ação da tetrahidroxinaftaleno-redutase forma o composto scitalona (**B6**). Nas próximas etapas ocorre a desidratação de **B6** pela ação da enzima scitalonadesidratase com formação de 1,3,8-trihidroxinaftaleno (**B7**), seguida pela redução pela enzima trihidroxinaftaleno-redutase dependente de NADPH para formar vermelona (**B8**), o qual é convertido a 1,8-dihidroxinaftaleno (**B9**, DNH) pela enzima scitalonadesidratase (BELL e WHELLER, 1986).

Etapas seguintes levam a dimerização do 1,8-DNH formando o 1.1' binaftol (**B10**) (BELL e WHELLER, 1986), o qual é oxidado formando a 4,9-dihidroxiperileno-3,10-quinona (**B11**), que figura como o derivado perilenoquinônico menos substituído. A partir da hidratação da 4,9-dihidroxiperileno-3,10-quinona formaria-se o stemfitriol (**B12**), que sofre uma O-metilação pela ação da S-adenosil-metionina (SAM), dando origem então a substância 12-metil-stemfitriol (**H-1**).

A proposta biossintética para a 12-metil-stemfitriol está apresentada na Figura 79.

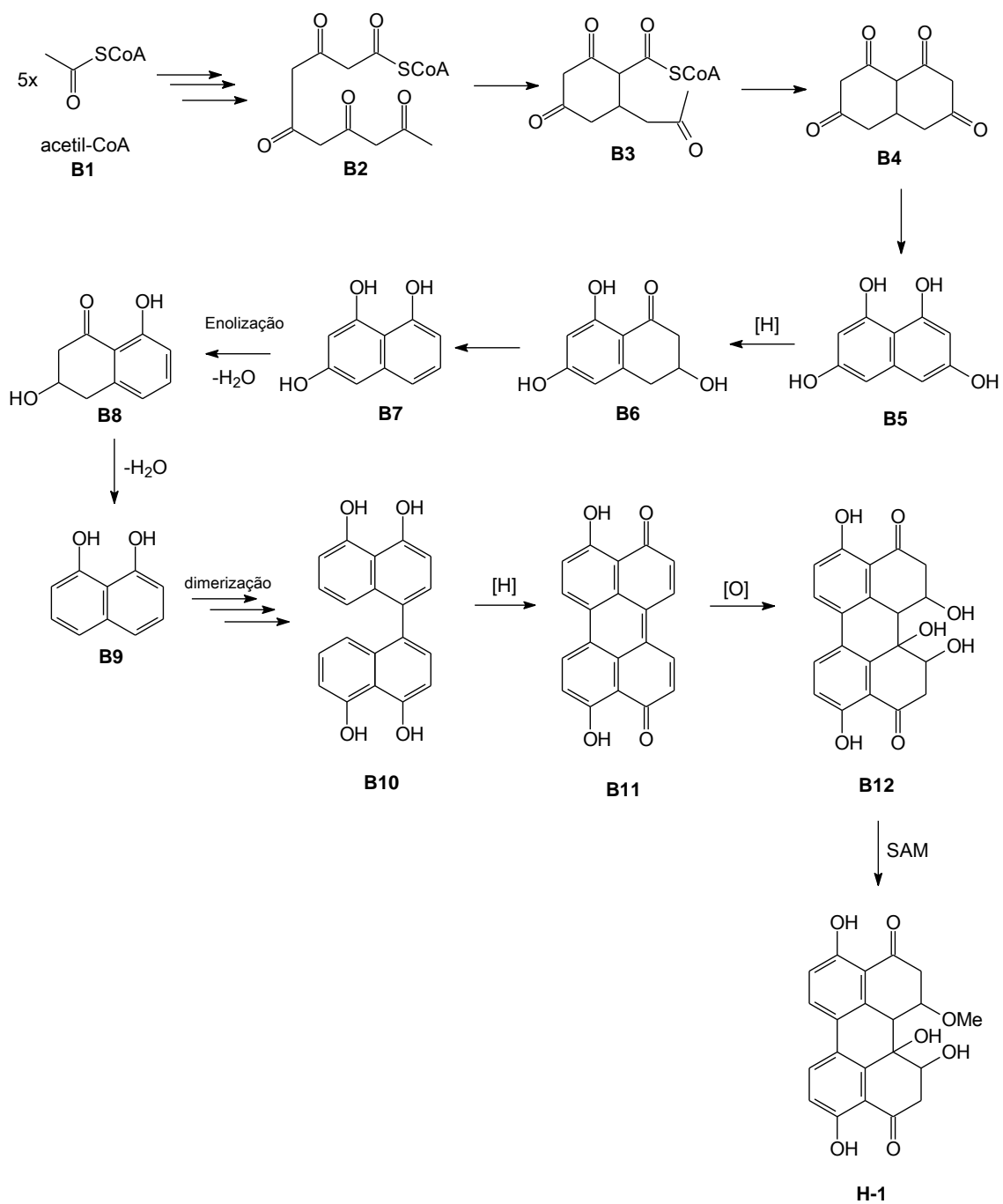


Figura 79. Proposta biossintética da formação da 12-metil-stemfritriol

Considerações Finais

O presente trabalho descreve uma revisão da história taxonômica do complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* e os metabólitos produzidos por fungos pertencentes a estes três gêneros que foram reportados na literatura até o presente momento. Descreve também uma avaliação da atividade biológica e perfil químico dos extratos do fungo *Curvularia lunata* cultivados em diferentes meios de cultura, bem como o isolamento e identificação de metabólitos produzidos pelo fungo quando cultivado em larga escala em meio de extrato de malte.

O levantamento bibliográfico a cerca do complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolus* mostra que do ponto de vista químico pouco se foi relatado na literatura a cerca dos gêneros pertencentes a este complexo. Com base no perfil químico e da diversidade estrutural dos compostos produzidos por *Curvularia* e *Bipolaris* é possível sugerir que os mesmos permaneçam segregados em gêneros diferentes, enquanto que as espécies do gênero *Cochliobolus* sejam rearranjadas conforme características morfológicas e genéticas dentro destes dois gêneros. Com base na descrição dos metabólitos reportados na literatura podemos inferir ainda, que as lactonas macrocíclicas (grupo das curvularinas) possam ser utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Curvularia*, enquanto que os sesqui e sesterterpenoides (cochlioquinonas e ofiobolinas, respectivamente) sirvam para caracterizar fungos do gênero *Bipolaris*. Estes dados contribuem para desfazer a confusão taxonômica envolvendo o complexo.

Do estudo químico dos extratos é possível concluir que o microrganismo se desenvolveu bem e com produção de metabólitos secundários em todos os meios de cultura testados. Ficou evidente a influência da fonte de carbono no perfil dos compostos produzidos nos diferentes meios de cultura analisados. Observou-se um maior rendimento relativo de extrato para o cultivo em extrato de malte, seguido por batata e dextrose. Da análise dos cromatogramas via

CLAE-DAD e espectros de RMN de ^1H constatamos que os meios de cultura Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, seguido por extrato de batata e dextrose e extrato de malte apresentaram maior produção de metabólitos secundários, dentre todos os meios de cultivo. Os meios de cultura extrato de malte, extrato de levedura e extrato de levedura e dextrose apresentaram em seus espectros de RMN de ^1H a presença de sinais alargados pouco comuns na região dos hidrogênios pertencentes a anéis aromáticos (δ_{H} 6.5 a 8.0 ppm). Ainda com base na análise dos espectros de RMN de ^1H dos extratos foi possível detectar a presença de sinais característicos de uma lactona macrocíclica, a saber, a 11- α -metoxicurvularina, nos extratos brutos miceliais oriundos do cultivo em batata e dextrose e farinha de arroz.

A avaliação da atividade biológica mostra que o microrganismo produziu substâncias com potencial biológico. Com relação à atividade anticolinesterásica todos os extratos brutos oriundos do micélio apresentaram um grau de inibição da atividade da enzima. Destes, os extratos cultivados em extrato de malte e meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura apresentaram maior halo de inibição. A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que os extratos brutos filtrado e micelial oriundos do cultivo em batata e dextrose, apresentaram atividade fungistática contra *Candida albicans* e extrato bruto micelial do cultivo em extrato de levedura, apresentou atividade bacteriostática contra três bactérias Gram-positivas, a saber, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e contra *Bacillus subtilis*. O extrato micelial cultivado em meio Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, também apresentou atividade bacteriostática frente à *Bacillus subtilis*. Além destas, o extrato bruto micelial cultivado em arroz e dextrose, RDM, apresentou atividade bacteriostática contra *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Nenhum dos extratos testados apresentaram atividade frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

O cultivo em larga escala no meio de cultura extrato de malte foi iniciado. Sendo até aqui identificados quatro substâncias, dentre elas três foram identificadas como os derivados perilênicos 12-metil-stemfitral, dihidroalterperilenol e alterperilenol, sendo a 12-metil-stemfitriol inédita na

literatura. As outras duas substâncias já descritas na literatura foram encontradas pela primeira vez no gênero *Curvularia*.

Estes dados ilustram a versatilidade dos fungos, pois dependendo da condição de cultivo o metabolismo secundário pode ser completamente alterado. Dessa forma, a determinação das condições de cultivo ideais é de fundamental importância para um estudo em química de produtos naturais microbianos.

Referências

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, W. R.; ARFMANN, H. A.; **Hidroxy-(methylbutenyl)-benzoic acid and derivates from *Curvularia fallax***. *Phytochemistry*, 29 (8), 2641-2644, 1990.

ABRAHAM, W. R.; MEYER, F.; ABATE, D.; **Curvupallides, A New Class of Alkaloids from the Fungus *Curvularia pallescens***. *Tetrahedron*, 51(17), 4947-4952, 1995.

AGRIOS, G. N.; ***Plant Patology***. 3 Ed. New York: Academic Press, 40, 1988.

AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M.; **Phytoalexins in defense against pathogens**. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73-90, 2012.

ALAM, M.; SATTAR, A.; CHAUDHURY, P. K.; JANARDHANAM, K. K.; HUSAIN, A.; **Isolation, purification and characterization of a phytotoxin produced by *Curvularia andropogonis***. *Plant Science*, 123, 47-55, 1996.

ALCORN, J. L.; **Generic concepts of *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum***. *Mycotaxon*, 17,1-86, 1983.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, JohnWiley & Sons. 869 p, 1996.

ALLMAN, C. P. G.; STERYN, P. S.; **7-*epi*- Brefeldin A, a Co-metabolite of Brefeldin A in *Curvularia lunata***. *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS.*, 2387-2390, 1982.

ARUNPANICHLERT, J.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TADPETCH, K.; PHONGPAICHIT, S.; TOWATANA, N. H.; SUPAPHON, O.; SAKAYAROJ, J.; **A dimeric chromanone and a phthalide: Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64**. *Phytochemistry Letters*, 5, 604–608, 2012.

AU, T. K.; CHICK, W. S. H.; LEUNG, P.C.; **The biology of ophiobolins.** *Life Sciences*, 67, 733-742, 2000.

BANSKOTA, A.H.; MCALPINE, J. B.; SØRENSEN, D.; IBRAHIM, A.; AOUIDATE, M., PIRAEI; M.; ALARCO, A. M.; FARNET, C. M.; ZAZOPOULOS, E.; **Genomic analysis lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class.** *Journal of Antibiotics*, 59, 533–542, 2006

BARBOSA A. M.; SOUZA, C. G. M.; DEKKER, R. F. H.; FONSECA, R.C.; FERREIRA, D. T.; **Phytotoxin Produced by *Bipolaris euphorbiae* in-vitro is Effective Against the Weed *Euphorbia heterophylla*.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45 (2), 233-240, 2002.

BELL, A.A.; WELEER, M. H.; **Biosynthesis and Function of Fungal Melanins,** *Ann. Rev. Phytopathol.* 1986. 24:411-51

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S.; **Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences.** *Mycologia* 91, 964–977, 1999.

BERDY, J.; **Bioactive Microbial Metabolites.** *The Journal of antibiotics*, 58 (1), 1-26, 2005.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J.; **Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting.** *Journal of Chromatography A*, 2013.

BOEDIJN, K. B.; **Über einige phragmosporen Dematiazen.** *Bull Jard Bot Buitenzorg*, 13, 120–134, 1933.

BOLZANI, V. DA S.; JR, C. V.; BARREIRO, E. J.; **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química Nova*, 29 (2), 326-337, 2006.

BORGES, W. DE S.; **Estudos de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformação.** *Tese de Doutorado*, USP, 2008.

BUSI, S.; PEDDICOTLA, P.; UPADYAYULA, S. M.; YENAMANDRA, V. **Secondary Metabolites of *Curvularia oryzae* MTCC 2605.** *Rec. Nat. Prod.* 3(4), 204-208, 2009.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVEZ, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L.; **Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae).** *PLoS Negl Trop Dis*, 2 (12), E348, 2008.

CARTER, E.; BOUDREAUX, C.; **Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient.** *J. Clin. Microbiol.* 42, 5419-5423, 2004.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; AREE, T.; SRIUBOLMAS, N.; MAHIDOL, C.; KITTAKOOP, S.; NGAMROJANAVANICH, N.; RUCHIRAWAT, S.; **Curvularides A–E: Antifungal Hybrid Peptide–Polyketides from the Endophytic Fungus *Curvularia geniculata*.** *Chemistry a European Journal*, 16, 11178-11185, 2010.

CLAY, K.; SCHARLD, C.; Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte **symbiosis with grasses.** *American Naturalist*, 160, S99-S127, 2002.

COLE, R. J.; SCHWEIKERT, M. A.; **Handbook of Secondary Fungal Metabolites.** *Academic Press*, 2003.

CORTES, J.; VIDAL, M.; **Beyond taxanes: the next generation of microtubule-targeting agents.** *Breast Cancer Res. Treat.*, 133, 821- 830, 2012.

COX, M. P.; EATON, C. J.; SCOTT, D. B.; **Exploring molecular signaling in plant-fungal symbioses using high throughput RNA sequencing.** *Plant Signaling & Behavior*, 5 (11), 1356-1358, 2010.

CUNHA, A. P.; **Farmacognosia e Fitoquímica.** 2ª Edição Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2009.

DAI, J.; KROHN, K.; FLÖRKE, U.; PESCIPELLI, G.; KERTI, G.; PAPP, T.; KÖVÉR, K. E.; BÉNYEI, A. C.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KURTÁN, T.; **Curvularin-Type Metabolites from the Fungus *Curvularia* sp. Isolated from a Marine Alga.** *Eur. J. Org. Chem*, 6928–6937, 2010.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R.; **Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants.** *FEMS Microbiology Letters*, 252, 197–206, 2005

DENDULURI, N.; LEE, J. J.; WALSH, J.; BERMAN, A. W.; VATAS, U.; CHOW, C. K.; STEINBERG, S. M.; COX, M. C.; LOW, J. A.; SWAIN, S. M.; **Phase II trial of ixabepilone, an epothilone B analog, given daily for three days every three weeks, in metastatic breast cancer.** *Invest. New Drugs*, 25, 63–67, 2007.

DUVIC, M.; TALPUR, R.; NI, X.; ZHANG, C.; HAZARIKA, P.; KELLY, C.; **Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL).** *Blood*, 109, 31–39, 2007.

ENGSTROM, K.; BRISHAMMAR, S.; SVENSSON, C.; BENGTSSON, M.; ANDERSSON, R.; **Anthraquinones from some *Drechslera* species and *Bipolaris sorokiniana*.** *Mycol. Res*, 97 (3), 381-384, 1993.

FEOFILOVA, E. P.; **The Kingdom Fungi: Heterogeneity of Physiological and Biochemical Properties and Relationships with Plants, Animals, and Prokaryotes (Review).** *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37 (2), 124–137, 2001.

FOTAKIS, C.; KOKKOTOU, K.; ZOUMPOULAKIS, P., ZERVOU, M.; **NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview.** *Food Research International*, 2013.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U.; **The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi.** *Mycological Research*, 112, 231-240, 2008.

FURTADO, M.; LIMA, A.; **Espécies do gênero *Curvularia* (fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo verde.** *Portugaliae Acta Biol.* 22, 145-156, 2207.

GALLO, M. B.C; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T., **Natural products from endophitic fungi.** In Saikia, R.; *Microbial Biotechnology*, 139-168, 2008.

GALM, U.; SHEN, B.; **Natural Product Drug Discovery: The Times Have Never Been Better.** *Chemistry & Biology*, 14, 1098-1104, 2007.

GANESEN, A.; **The impact of natural products upon modern drug discovery.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 306-317, 2008.

GEHLOT, P.; ATTITALLA, I. H.; SALLEH, B.; **Anamorphic fungi: an overview.** *Middle East J Sci Res*, 6, 201-208, 2010.

GHISALBERTI, E. L.; ROWLAND, K. Y.; **6-Chlorodehydrocurvularin, a new metabolite from *Cochliobolus spicifer*.** *Journal of Natural Products*, 56 (12), 2175-2177, 1993.

GLOER, J. B.; **The chemistry of fungal antagonism and defense.** *Canadian Journal of Botany*, 73, S1265-S1274, 1995.

GOH, K. T.; HYDE, K. D.; LEE, K. L. D.; **Generic distinction in Helminthosporium complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene.** *Fungal Divers*, 1, 85-107, 1998.

GREVE, H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; KONIG, G.M.; **Ten-Membered Lactones from the Marine-Derived Fungus *Curvularia* sp.** *Journal of Natural Product*, 71, 1651-1653, 2008.

GUIMARAES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T.; **Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*.** *FEMS Immunol Med Microbiol*.52(1), 134-44, 2007.

HAECKEL, E., **Generelle Morphologie Der Organismen**, *Reimer*, 2, 205–206, 1866.

HANSEN, M.E.; ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J. **Automated and unbiased classification of chemical profiles from fungi using high performance liquid chromatography.** *Journal of Microbiological Methods*, 61, 295 - 304, 2005.

HARVEY, A. L.; **Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery?** *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 196-198, 1999.

HARVEY, A. L.; **Natural products in drug discovery.** *Drug Discovery Today*, 13 (19/20), 894-901, 2008.

HAWKSWORTH, D. L.; **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited.** *Mycological Research*, 105, 1422-1431, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A. et al.; **The Amsterdam declaration on fungal nomenclature.** *IMA Fungus*, 2, 105-112, 2011

HIGGS, R. E.; ZAHN, J. A.; GYGI, J. D.; HILTON, M.D.; **Rapid Method To Estimate the Presence of Secondary Metabolites in Microbial Extracts.** *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 371-376, 2001.

HOBSON, D. K.; EDWARDS, R. L.; WALES, D. S.; **Cynodontin: a Secondary Metabolite and Dyestuff Intermediate.** *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 70, 343-348, 1997.

HONDA, Y.; UEKI, M.; OKADA, G.; ONOSE, R.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K.; OSADA, H.; **Isolation, and Biological Properties of a New Cell Cycle Inhibitor, Curvularol, Isolated from Curvularia sp. RK97-F166.** *The Journal of Antibiotics*, 54 (1), 10-16, 2001.

HOSOKAWA, M., TANAKA, C. & TSUDA, M. (2003). **Conidium morphology of Curvularia geniculata and allied species.** *Mycoscience* 44: 227-237.

HURYN, D. M.; WIPF, P.; **Natural product chemistry and anticancer drug discovery.** *Cancer Drug Design and Discovery*, Cap. 5, 107-130, 2008.

HYDE K.D.; ALCORN, J. L.; **Some disease-associated microorganisms on plants of Cape York Peninsula and Torres Strait Islands.** *Australas Pl Pathol* 22, 73–83, 1993.

ITO, S.; **On some new ascigerous stages of species Helminthosporium parasitic on cereals.** *Proc Imp Acad (Japan) Suppl*, 6, 352-355, 1930.

JADULCO, R.; BRAUERS, G.; EDRADA, R. A.; EBEL, R.; WRAY, V.; PROKSCH, P.; **New Metabolites from Sponge-Derived Fungi Curvularia lunata and Cladosporium herbarum.** *Journal of Natural Product*, 65, 730-733, 2002.

JIANG, S. J.; QIANG, S.; ZHU, Y. Z.; DONG, Y. F.; **Isolation and phytotoxicity of a metabolite from Curvularia aeragrostidis and characterisation of its modes of action.** *Ann Appl Biol*, 152, 103–111, 2008.

JUNG, H. J.; LEE, H. B.; LIM, C. H.; KIM, C. J.; KWON, H. J.; **Cochlioquinone A1, a New Anti-Angiogenic Agent from Bipolaris zeicola.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 4743–4747, 2003.

KIM, J.C.; CHOI, G. J.; KIM, H. T.; KIM, H. J., CHO, K. Y.; **Pathogenicity and Pyrenocine Production of *Curvularia inaequalis* isolated from Zoysia Grass.** *Plant Disease*, 84 (6), 684-688, 2000.

KULANTHAIVEL, P.; KREUZMAN, A. J.; STREGE, M. A.; BELVO, M. D.; SMITKA, T. A.; CLEMENS, M.; SWARTLING, J. R.; MINTON, K. L.; ZHENG, F.; ANGLETON, E. L.; **Novel lipoglycopeptides as inhibitors of bacterial signal peptidase I.** *Journal of Biol. Chem.* 279, 36250–36258, 2004.

LAM, K. S.; **New aspects of natural products in drug discovery.** *Trends in Microbiology*, 15 (6), 279-289, 2007.

LARSEN, T. O.; SMEDSGAARDS, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C.; **Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery.** *Natural Products Report*, 22, 672-695, 2005.

LEE, S.C.; NI, M.; LI, W.; SHETRZ, C.; HEITMAN, J.; **The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (2), 298-340, 2010.

LEONARD, K.J.; SUGGS, E. G.; **Setosphaeria prolata, the ascigerous state of Exserohilum prolatum.** *Mycologia*, 66, 197-281, 1974.

LI, E.; CLARK, A. M.; ROTELLA, D. P.; HUFORD, C. D.; **Microbial Metabolites of Ophiobolin A and Antimicrobial Evaluation of Ophiobolins.** *Journal of Natural Products*, 58 (1), 74-81, 1995.

LIM, C. H.; MIYAGAWA, H., TSURUSHIMA, T.; Ueno, T.; Sato, M.; **Cochlioquinol: a new cochlioquinone derivative produced by the plant**

pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60 (4), 724-725, 1996.

LUTTRELL, E. S.; **Taxonomic criteria in *Helminthosporium*.** *Mycologia*, 55, 643–674, 1963.

MABADEJE, S. A.; JEFFERSON, W. E.; WANDER, J. D.; **Characterization of 1,4,5,8-Tetrahydroxy-2-methylantraquinone(Cynodontin), a Photoinduced Pigment of *Curvularia pallescens*.** *Experimental Mycology*, 2, 359-365, 1978.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; SHIVAS, R. J.; TAN, Y. P.; HYDE, K. D.; **A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex.** *Fungal Diversity*, 56, 131–144, 2012.

MARIANI, R.; **Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. Part 3: chemical derivatization.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3748-3752, 2005.

MOBIUS, N.; HERTWEECK, C.; **Fungal phytotoxins as mediators of virulence.** *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 390-398, 2009.

MIYAGAWA, H.; NAGAI, S.; TSURUSHIMA, T.; SATO, M.; UENO, T.; FUKAMI, H.; **Phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris bicolor* EI-1.** *Bioschi. Biothec. Biochem.*, 58 (6), 1143-1145, 1994.

MULROONEY, C. A.; O'BRIEN, E. M.; MORGAN, B. J.; **Perylenequinones: Isolation, Synthesis, and Biological Activity.** *Eur. J. Org. Chem.* 3887–3904, 2012.

NAKAJIMA, H.; ISHIDA, T.; OTSUKA, Y.; HAMASAKI, T.; ICHINOE, M.; **Phytotoxins and related metabolites produced by *Bipolaris coicis*, the pathogen of Job's tears.** *Phytochemistry*, 45 (1), 41-45, 1997.

NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; KIMURA, Y.; MAETA, S.; KIMURA, Y.; **A plant growth regulator produced by the fungus *Cochliobolus spicifer*.** *Phytochemistry*, 29 (6), 1739-1743, 1990.

NAKAJIMA, H.; KIMURA, Y.; HAMASAKI, T.; **Spiciferinone, an azaphilone phytotoxin produced by the fungus *Cochliobolus spicifer*.** *Phytochemistry*, 31 (1), 105-107, 1992.

NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; NAKAMURA, S.; FUJIMOTO, H.; FUKUYAMA, K.; **Cochliospicin A: A New Metabolite Related to Spiciferinone, a Phytotoxin of the Fungus *Cochliobolus spicifer*.** *J. Nat. Prod.*, 60, 414-416, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; **The influence of natural products upon drug discovery.** *Natural Products Report*, 17, 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; **Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002.** *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years.** *Journal of Natural Products*, 70, 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; **Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010.** *Journal of Natural Products*, 75, 311-335, 2012.

NICHOLSON, B.; LLOYD, G.K.; MILLER, B.R.; PALLADINO, M.A.; KISO, Y.; HAYASHI, Y.; NEUTEBOOM, S.T.C.; **NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent.** *Anticancer Drugs*, 17, 25-31, 2006.

NIHASHI, Y.; LIM, C. H.; TANAKA, C.; MIYAGAWA, H.; UENO, T.; **Phytotoxic sesterterpene, 11- Epiterpestacin, from *Bipolaris sorokiniana* NSDR-011.** *Bioschi. Biothechnol. Biochem.*, 66 (3), 685-688, 2002.

NISIKADO, Y.; **Studies on Helminthosporium diseases of gramineae in Japan.** Sp. Rep.Ohara Inst. Agric.Res. 4, 1–384 (in Japanese). English translation in Ber Ohara Inst Landw Forsch 4, 111–126, 1928.

NUKINA, M.; MARUMO, S.; **Lunatoic acid A and B, aversion factor and its related metabolite of *Cochliobolus lunata*.***Tetrahedron Letters*, 30, 2603 - 2606, 1977.

NUKINA, M.; MARUMO, S.; ***Radicinol, a new metabolite of Cochliobolus lunata, and absolute stereochemistry of radicinin.*** *Tetrahedron Letters*, 37, 3271 - 3272, 1977.

OKAWA, H.; TAMURA, T.; **Studies on the Metabolites of Cochliobolus miyabeanns Part I. Ophiobolosin A and Ophiobolosin B.** *Agr. Biol. Chem.*, 30(3), 285-291, 1966.

OKUNO, T.; NATSUNE, I.; **STRUCTURE OF ANTIFUNGAL AND PHYTOTOXIC PIGMENTS PRODUCED BY ALTERNARIA SPS,** *Tetrahedron Letters*, 24,(50), 5653-5656,1983

SAWAI, K.; PALMER, J. M.; KELLER, N. P.; **Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?***Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 431-436, 2010.

PAYNE, G.; KNOCHE, H. W.; KONO, Y.; DALY, J. M.; **Biological activity of purified host-specific pathotoxin produced by *Bipolaris (Helminthosporium) maydis*, race T.***Physiological Plant Pathology*, 16, 227-239, 1980.

PEARCE, C.; **Biologically active fungal metabolites.** *Advances in Applied Microbiology*, 44, 1-80, 1997.

PENA-RODRIGUEZ, L. M.; CHILTON, W. S.; **3-anhydroophiobolin A and 3-anhydro-6-epi-ophiobolin A, phytotoxic metabolites of the Johnson grass pathogen *Bipolaris sorghicola*.** *Journal of Natural Products*. 52 (5), 1170-1172, 1989.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R.; **ALEXANDER FLEMING (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945).** *Revista da Faculdade de Letras*, 6, 129-151, 2005.

PHUWAPRAISIRISAN, P.; SAWANG, K.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S.; **Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*.** *Tetrahedron Letters*, 48, 5193–5195, 2007.

PUPO, M. T.; GUIMARAES, D. O., FURTADO; N. A. J. C.; BORGES, W. S. **Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds.** In *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Taft. C. A., Ed. Research Signpost, Kerala, 51-78, 2006.

RISHTON, G. M.; **Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues.** *The American Journal of Cardiology*, 101 (10A), 43D-49D, 2008.

ROBINSON, N.; GIBSON, T. M.; ROBINSON, M. I. C.; CAMERON, L.; HYLANDS, P. J.; WILKINSON, D.; **Cochliobolic Acid, a Novel Metabolite Produced by *Cochliobolus lunatus*, Inhibits Binding of TGF- α to the EGF Receptor in a SPA Assay.** *J. Nat. Prod.*, 60, 6-8, 1997.

RONG, I. H.; **An Integrated approach to the taxonomy of some mitosporic fungi of the *Bipolaris* complex.** *Tese de Doutorado*, University of Pretoria, 2001.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J.; **Symbioses of grasses with seedborn fungal endophytes.** *Annual Reviews Plant Biology*, 55, 315-340, 2004.

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

SHAO, C. L.; HU, H. X.; WANG, C. Y.; LIU, K. A.; XU, Y.; WEI, M.Y.; QIAN, P. Y.; GU, Y.C.; ZHENG, C. J.; SHE, Z. J.; LIM, Y. C.; **Potent Antifouling Resorcylic Acid Lactones from the Gorgonian-Derived Fungus Cochliobolus lunatus.** *Journal of Natural Products*, 74, 929-633, 2011.

SHEN, Y.; SUN, J.; CHENG, K.; LIU, C.; **Time-and dose-dependent vascular changes induced by the novel vascular disrupting drug NPI-2358 in a murine cancer model monitored with DCE-MRI.** *U.S. Chinese Journal of Lymphology and Oncology* , 9 (4), 151-153, 2010.

SIVANESAN, A.; **Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs.** *Mycological Papers*, 158, 1-261, 1987.

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. **Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics.** *Journal of Experimental Botany*, 56 (410), 273 - 286, 2005.

STADLER, M.; **Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity.** *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1 (2), 75-133, 2011.

STROBEL, G.; DAYSI, B.; **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 491–502, 2003.

SUGAWARA, F.; STROBEL, G.; FISHER, L. E.; VAN DUYN, G. D.; CLARDY, J.; **Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*.** *Proc. Natl. Acad.*, 82, 8291-8294, 1985.

SUN, G.; OIDE, S.; TANAKA, E.; SHIMIZU, K.; TANAKA, C.; TSUDA, M.; **Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences.** *Mycosciences*, 44, 239-244, 2003.

TAHAT, M. M.; SIJAM, K.; **Mycorrhizal Fungi and Abiotic Environmental Conditions Relationship.** *Research Journal of Environmental Sciences*, 6 (4), 125-133, 2012.

TAYLOR, J. W.; TURNER, E.; TOWNSEND, J. P.; DETTMAN, J. R.; JACOBSON, D.; **Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi.** *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361, 1947–1963, 2006.

TELES, H. L.; SILVA, G.H.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. DA S.; PEREIRA, J. O.; NETO, C. M. C.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R.; **Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae).** *Phytochemistry*, 66, 2363-2367, 2005.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J.; **Modiolide and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Curvularia* sp. PSU-F22.** *Arch Pharm Res*, 34 (5), 709-714, 2011.

UEDA, K.; XIAO, J.; DOKE, N.; NAKATSUKA, S.; **Isolation and Structure of BZR-cotoxin IV Produced by *Bipolaris zeicola* race 3, the Cause of Leaf Spot Disease in Corn.** *Tetrahedron Letters*, 36 (5), 741-744, 1995.

VANDENDRIESSCHE, T.; SCHAFFER, H.; VERLINDEN, B. E.; HUMPFER, E.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; NICOLAI, B. M.; **High-throughput NMR based metabolic profiling of Braeburn apple in relation to internal browning.** *Postharvest Biology and Technology*, 80, 18–24, 2013.

VARMA, G. B.; FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; DEADMAN, M. E.; RAWARI, F. K.; **Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*.** *Phytochemistry*, 67, 1925–1930, 2006.

WALLEY, C.; LI, S.; **Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes.** *Natural Products Report*, 28, 496-510, 2011.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, W.; ZHAO, Y.; SU, W.; **Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. And *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34, 51-57, 2002.

WALTON, J. D.; **HC-Toxin.** *Phytochemistry*, 67, 1406–1413, 2006.

WANG, Q. Z.; GE, H. M.; ZHANG, J.; WU, J. H.; SONG, Y. C.; ZHANG, Y. F.; TAN, R. X.; **Cochliones A–D, four new tetrahydrochromanone derivatives from endophytic *Cochliobolus* sp.** *Journal of Asian Natural Products Research*, 12 (6), 485-491, 2010.

WEIERGANG, I.; WOOD, K. V.; DUNKLE, L. D.; NICHOLSON, R. L.; **In vivo growth and pathotoxin production by the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 273–279, 2004.

WOONG, A. J.; LEE, M. K.; CHOI, S. U.; LEE, C. O.; KIM, B. S.; **Cytotoxic Ophiobolins Produced by *Bipolaris* sp.** *J. Microbiol. Biotechnol*, 8 (4), 406-408, 1998.

WOLPERT, T. J.; MACKO, V.; W. ACKLIN, W.; JAUN, B.; ARIGONI, D.; **Structure of minor host-selective toxins from *Cochliobolus victoriae*.** *Birkhäuser Verlag Basel*, 1298-1299, 1986.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H.; **Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome.** *Org Biomol Chem*, 6, 1895-1897, 2008.

XIAO, J. Z.; TSUDA, M.; DOKE, N. NISHIMURA, S.; **Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*.** *Physiology and Biochemistry*. 81, 58-64, 1991.

YEO, W.; GOH, B. C.; CHAN, A. T.; **Irofulven as first line therapy in recurrent or metastatic gastric cancer: a phase II multicenter study by the Cancer Therapeutics Research Group (CTRG).** *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59, 295–300, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna;** Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Química Nova*, 24, 147, 2008.

ZHANG, S.; LI, Z.; BAI, J.; WANG, Y.; ZHANG, I.; WU, X. **A new perylenequinone from a halotolerant fungus, *Alternaria* sp. M6,** *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(1): 0068-0071, 2012.

ZHOU, J.; MA, Q.; YI, H.; WANG, L.; SONG, H.; YUAN, Y.; **Metabolome Profiling Reveals Metabolic Cooperation between *Bacillus megaterium* and *Ketogulonicigenium vulgare* during Induced Swarm Motility .** *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (19), 7023–7030, 2011.

