



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO - DFAL

VITÓRIA SHIÉVILA DOS SANTOS GONÇALVES

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS
ENDOFÍTICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto, Sergipe

Janeiro, 2019

VITÓRIA SHIÉVILA DOS SANTOS GONÇALVES

BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do diploma de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva.

Coorientador(a): Prof. Dr. James Almada da Silva.

Lagarto, Sergipe

Janeiro, 2019

VITÓRIA SHIÉVILA DOS SANTOS GONÇALVES

BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe Campus de Lagarto, como requisito para obtenção do diploma de bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva.

Coorientador(a): Prof. Dr. James Almada da Silva.

Aprovado em: 29 / 01 /2019

Natália Nogueira Saraiva

Orientador (a)

Prof. (a) Dr. (a) Natália Nogueira Saraiva

(EXAMINADOR 1)

Prof. Dr. Rodrigo Almeida Simões

Ana Carolina Viana Simões

(EXAMINADORA 2)

Profa. Ma. Ana Carolina Viana Simões

Aos meus amados pais Raimundo e Socorro, por todo cuidado, dedicação e incentivo para realização deste sonho.

A minha querida irmã Jacqueline por todo amor, amizade e companheirismo durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Railson, Esaú e Júnior por sempre cuidarem de mim com tanto amor e carinho.

As minhas joias mais preciosas, meus sobrinhos Raul, João Pedro, Raimundo Neto, Pedro Miguel e minhas sobrinhas Maria Isabelly e Clara Ísis.

Ao meu amor mais puro, meu afilhado José Lucas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a força para chegar ao final.

A Nossa Senhora Aparecida e São José, por toda proteção e intercessão nos momentos em que mais precisei.

A minha orientadora Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva, por estar comigo desde o início desta jornada, por ter me acolhido com tanto amor não somente em seu grupo de pesquisa, mas também em sua vida e em seu ciclo de amigos, obrigada por todo cuidado, compreensão, conselhos, ensinamentos, e principalmente pela sua amizade.

Aos meus pais, Raimundo e Socorro. Vocês são meus maiores incentivadores, a minha base e minha força diária. Nunca terei como agradecer por tudo que fizeram/fazem por mim, amo vocês!

A minha irmã Jacqueline, pela cumplicidade, amor e incentivo que sempre me deu.

Aos meus irmãos Railson, Esaú e Júnior, por todo apoio e incentivo durante esta caminhada.

Aos meus sobrinhos Raul, João Pedro, Raimundo Neto, Pedro Miguel, minhas sobrinhas Maria Isabelly e Clara Ísis e meu afilhado José Lucas, por toda alegria que me proporcionam, por serem meu refúgio durante os momentos de angústia e por despertarem em mim o amor mais puro e real que alguém é capaz de sentir.

Aos meus avós Francisco, Lourdinha, José e Mariana que desde pequena me guiaram para o caminho do bem e hoje me protegem como anjos da guarda. As minhas tias em especial Aparecida, Zilma, Margarida, Nenzinha, tio Beto (*in memoriam*), meus primos Felipe (*in memoriam*), Tiago, Monalisa, Jhonatas e Cícero, que sempre estiveram junto comigo, vibrando nos momentos de vitória e apoiando nos momentos de derrota, e a toda minha família, obrigada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. James Almada da Silva por todo apoio, considerações e por ter cedido o substrato tornando possível o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos mestres, pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. Rodrigo Almeida Simões, Profa. Dra. Tamires Cardoso Lima de Carvalho e Profa. Ma. Ana Carolina Viana Simões pelas contribuições e auxílio em meu trabalho.

A Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, ao Prof. Me. Akenaton Onassis Cardoso Viana Gomes, e a todo pessoal do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica

(LABS), Laboratório de Micologia e do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agricultura (BIOAGRI) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela colaboração e fornecimento das cepas fúngicas.

Aos meus amigos e companheiros de toda a vida Hítalo, Walison, Jéssica, Imaculada, Carol, Gilwagner, Daniele, Melina e Myrela pela compreensão nos momentos de ausência e pelos momentos de alegria durante esta longa jornada.

Aos amigos de graduação do Grupo de Pesquisa em Plantas Medicinais e Fitoterápicos (GPPMF) Laranda, Kananda, Bruna, Júlio, Jessica, Betina, e especialmente a Profa. Dra. Adriana Gibara Guimarães, por todo aprendizado, carinho e dedicação.

A minha grande amiga Jessica (Carci) por toda ajuda, paciência, apoio e contribuições nesta etapa final.

Aos amigos do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Natália Nogueira, Lucas, Júlia, Reinan, Raissa e Diego, que compartilharam toda esta trajetória comigo, obrigada por toda ajuda.

Aos demais amigos feitos durante a graduação Giovanna, Bianca, Mariana, Jaline, Ary e Alencar obrigada pelo apoio, amizade e carinho ao longo do curso.

Aos técnicos de laboratório por toda ajuda na realização deste trabalho.

A minha melhor amiga, que hoje é meu anjo eterno e olha por mim lá do céu, Natiane, aonde você estiver sei que está vibrando junto comigo, obrigada por todos os conselhos, amor, carinho e por continuar sendo meu alicerce mesmo estando presente apenas em coração.

A todos que colaboraram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

*“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho.
Quando se sonha junto é o começo da realidade”
(Miguel de Cervantes Saavedra)*

RESUMO

BIOTRANSFORMAÇÃO DE GINGERÓIS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Biotransformação é um processo que envolve conversões químicas catalisadas por enzimas. Os fungos endofíticos são microrganismos capazes de produzir enzimas e metabólitos de grande interesse biotecnológico, por isso são bastante empregados nesses processos. O *Zingiber officinale* apresenta composto fenólicos com importantes atividades farmacológicas comprovadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de biotransformação dos fungos endofíticos *Curvularia asianensis* e *Hawksworthiomyces* sp. isolados da planta *Humirianthera ampla* frente à gingeróis isolados do *Zingiber officinale*. As cepas fúngicas passaram por um processo de identificação e seus materiais genéticos foram extraídos, amplificados, sequenciados e analisados por um estudo filogenético. Posteriormente, foram testadas algumas condições de crescimento deles em placas de Petri, onde avaliou-se o meio de crescimento, temperatura e incidência de luminosidade. Nas biotransformações foram realizados dois experimentos em sequência, onde alguns parâmetros foram testados: substrato (fração enriquecida com gingeróis e o 6-gingerol isolado); diferentes meios de cultivo líquidos (batata dextrose - BD, sabouraud dextrose - SBD e extrato de carne e peptona - MEP) e dias diferentes de experimento (7, 8, 9, 10 e 14 dias). Foram utilizados em todos os experimentos 25 µL de cada substrato dissolvido no co-solvente dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 4% e partição líquido-líquido com 1 mL de acetato de etila para a finalização dos procedimentos. Os extratos obtidos das biotransformações foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Os fungos foram identificados como *Curvularia asianensis* e *Hawksworthiomyces* sp., sendo este último uma provável nova espécie do gênero. Para o fungo *C. asianensis* foi observado em CCDA a formação de compostos mais polares do que os da fração enriquecida em todos os meios líquido testados, enquanto que com o isolado 6-gingerol em meio SBD a mesma mudança foi evidenciada a partir do 7º dia de experimento. Já para o *Hawksworthiomyces* sp. em seu perfil cromatográfico foi observado a formação de compostos mais polares do que os da fração enriquecida apenas meios líquidos SBD e BD, enquanto que com o isolado 6-gingerol o mesmo resultado foi evidenciado em meio SBD apenas no 8º dia de experimento. Este trabalho possui caráter inédito já que não há trabalhos na literatura sobre o isolamento e identificação dos fungos endofíticos da *H. ampla*, nem a utilização deles em processos de biotransformação.

Palavras chaves: Biocatálise; *Curvularia asianensis*; *Hawksworthiomyces* sp.; *Humirianthera ampla*; *Zingiber officinale*;

ABSTRACT

BIOTRANSFORMATION OF GINGERIALS BY ENDOFITIC FUNGI

Biotransformation is a process that involves chemical conversions catalyzed by enzymes. Endophytic fungi are microorganisms capable of producing enzymes and metabolites of great biotechnological interest, so they are quite employed in these processes. *Zingiber officinale* presents phenolic compounds with important proven pharmacological activities. In this way, the objective of this work was to evaluate the biotransformation potential of the endophytic fungi *Curvularia asianensis* and *Hawksworthiomyces* sp. isolated from the *Humirianthera ampla* plant in front of the isolated gingerols of *Zingiber officinale*. The fungal strains underwent an identification process and their genetic material was extracted, amplified, sequenced and analyzed by a phylogenetic study. Subsequently, some growth conditions were tested in Petri dishes, where the growth medium, temperature and incidence of luminosity were evaluated. In the biotransformations two experiments were carried out in sequence, where some parameters were tested: substrate (fraction enriched with gingerols and 6-gingerol alone); different liquid culture media (dextrose potato - BD, sabouraud dextrose - SBD and meat and peptone extract - MEP) and different days of experiment (7, 8, 9, 10 and 14 days). 25 μ L of each substrate dissolved in the solvent was used in the co-solvent dimethylsulfoxide (DMSO) at 4% concentration and liquid-liquid partition with 1 mL of ethyl acetate for completion of the procedures. The extracts obtained from the biotransformations were analyzed by analytical thin layer chromatography (ADCC). The fungi were identified as *Curvularia asianensis* and *Hawksworthiomyces* sp., the latter being a probable new species of the genus. For the *C. asianensis* fungus, the formation of more polar compounds than those of the enriched fraction in all the liquid media tested was observed in ADCC, whereas with the 6-gingerol isolate in SBD the same change was evidenced from the 7th day of experiment. Already for *Hawksworthiomyces* sp. in its chromatographic profile the formation of more polar compounds than those of the enriched fraction was observed only liquid media SBD and BD, whereas with the 6-gingerol isolate the same result was evidenced in SBD medium only on the 8th day of experiment. This work has an unprecedented character since there are no papers in the literature about isolation and identification of the endophytic fungi from *H. ampla* nor the use of them in biotransformation processes.

Keywords: Biocatalysis; *Curvularia asianensis*; *Hawksworthiomyces* sp.; *Humirianthera ampla*; *Zingiber officinale*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da penicilina (1). Fonte: Próprio autor. 16
- Figura 2:** Estrutura química da ergotamina (2). Fonte: Próprio autor. 17
- Figura 3:** Estrutura química da ciclosporina (3). Fonte: Próprio autor. 18
- Figura 4:** Conversão química do enantiômero D (-) ácido tartárico (4) em L (+) ácido tartárico (5) pelo *Penicillium glaucum*. Fonte: Próprio autor. 19
- Figura 5:** Biotransformação da (R)-carvona (6) em neodihidrocarveol (7) por células em crescimento de *T. harzianum*. Fonte: Próprio autor. 20
- Figura 6:** Algumas espécies do gênero novo *Hawksworthiomyces* sp. nov. cultivadas por 14 dias à 30° C no escuro. A: *Hawksworthiomyces taylorii* sp. nov.; B: *Hawksworthiomyces hibbettii* sp. nov.; C: *Hawksworthiomyces crousii* sp. nov.. Adaptado por Gonçalves, 2019. (DE BEER et al., 2016b). 22
- Figura 7:** Espécies do gênero *Curvularia* sp. crescidos em meios semissólidos em placas de Petri. A: *C. geniculata*; B: *C. maculans*; C: *C. lunata*. Fonte: Manamgoda et al., 2012; Pandey, 2014. 23
- Figura 8:** A - Aparência típica microscópica de conídios de células múltiplas do fungo *Curvularia geniculata*; B - Germinação simpodial do fungo *Curvularia lunata* (MCKENZIE, 2013). 23
- Figura 9:** Modificação estrutural da cortexolona (8) em hidrocortisona (9) após o processo de biotransformação pelos fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia lunata*. Fonte: Próprio autor. 24
- Figura 10:** Estruturas químicas do 6-gingerol (10) e 10-gingerol (11). Fonte: Próprio autor. 25
- Figura 11:** Ilustração das etapas do procedimento de biotransformação. Fonte: Próprio autor. ... 30
- Figura 12:** Ilustração do procedimento de biotransformação em dias diferentes para cada fungo. Fonte: Próprio autor. 31
- Figura 13:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará. 33
- Figura 14:** Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará. 34
- Figura 15:** Cultivo em placa de Petri do fungo *C. asianensis* em duas condições. A: Após 7 dias de incubação em estufa à 32°C, em meio SBA, sem exposição à luz; B: Após 7 dias de incubação entre 25-30°C, em meio SBA, com exposição a luz. Fonte: Próprio autor. 35
- Figura 16:** Cultivo em placa de Petri do fungo *Hawksworthiomyces* sp. em duas condições. A: Após 14 dias de incubação em estufa à 32°C, em meio SBA, sem exposição à luz; B: Após 14 dias de incubação entre 25-30°C, em meio SBA, com exposição a luz. Fonte: Próprio autor. 35

- Figura 17:** CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* após 7 dias de contato com o substrato. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (1:1). Legenda: M: Meio líquido (SBD); MS: Meio mais substrato (SBD); MF: Meio mais fungo (SBD); SBD: Sabourad Dextrose; MEP: Extrato de Carne e Peptona; BD: Batata Dextrose. Fonte: Próprio autor..... 37
- Figura 18:** Biorredução seletiva de duas cetonas monoterpênicas (12) em seus norbornanóis correspondentes (*E*-álcool (13) e (*Z*)-álcool (14) por *Curvularia lunata*. Fonte: Próprio autor. . 38
- Figura 19:** Hidroxilação do ácido abiético (15) por *Curvularia* sp..... 39
- Figura 20:** CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. após 7 dias de contato com o substrato. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (1:1). Legenda: M: Meio líquido (SBD); MS: Meio mais substrato (SBD); MF: Meio mais fungo (SBD); SBD: Sabourad Dextrose; MEP: Extrato de Carne e Peptona; BD: Batata Dextrose. Fonte: Próprio autor. 39
- Figura 21:** CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* variando os dias de experimento. Revelador: Vanilina. Eluente: A: Hex:AcOEt (3:7). B: AcOEt:Hex (1:1). A: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* nos 7° e 14° dias; B: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* nos 8°, 9° e 10° dias. Legenda: M: Meio; MS: Meio mais o 6-gingerol; MF: Meio mais o fungo; 7, 8, 9, 10, 14: Quantidade de dias de experimento de biotransformação. Fonte: Próprio autor..... 41
- Figura 22:** CCDA dos extratos dos experimentos da biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. variando os dias de experimento. Revelador: Vanilina. Eluente: A: Hex:AcOEt (1:1); B: AcOEt:Hex (3:7). A: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. do 7° e 14° dias; B: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. do 8°, 9° e 10° dias. Legenda: M: Meio; MS: Meio mais o 6-gingerol; MF: Meio mais o fungo; 7, 8, 9, 10, 14: Quantidade de dias de experimento de biotransformação. Fonte: Próprio autor..... 42
- Figura 23:** Reação de biotransformação do 6-gingerol (10) por *R. stolonifer* tendo como produto o composto 6- gingerdiol (18). Fonte: Próprio autor..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Isolados utilizados na filogenia do fungo <i>Curvularia asianensis</i>	32
Tabela 2: Isolados utilizados na filogenia do fungo <i>Hawksworthiomyces</i> sp..	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

BD – Meio líquido Batata Dextrose

BDA – Meio semissólido Ágar Batata Dextrose

BIOAGRI - Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agricultura

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica

CTAB - *Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EtOH - Etanol

HClO₄ – Ácido Perclórico

Hex - Hexano

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

LABS - Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica

LPNBio – Laboratório de Produtos Naturais Bioativos

MeOH - Metanol

MEP – Meio líquido *Meat Extract and Peptone*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SBA – Meio semissólido Ágar Sabourad

SBD – Meio líquido Sabouraud Dextrose

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Fungos endofíticos	16
2.2	Biotransformação utilizando fungos	18
2.3	O gênero <i>Hawksworthiomyces</i> sp.	21
2.4	O gênero <i>Curvularia</i> sp.	22
2.5	Gengibre: <i>Zingiber officinale</i>	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Obtenção dos substratos utilizados nos experimentos de biotransformação	27
4.2	Obtenção, isolamento e preservação dos microrganismos	27
4.3	Extração do DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética de endófitos isolados de <i>Humirianthera ampla</i>	27
4.4	Cultivo dos fungos endofíticos	28
4.5	Preparo dos meios de cultura para o experimento de biotransformação	29
4.6	Biotransformação em meios de cultura diferentes com o extrato enriquecido com gingeróis	29
4.7	Biotransformação em diferentes dias de crescimento com o substrato 6-gingerol isolado	30
4.8	Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	Identificação molecular das cepas fúngicas	32
5.2	Crescimento das cepas fúngicas em diferentes condições de cultivo	34
5.3	Experimento de biotransformação utilizando a fração enriquecida com gingeróis	36
5.4	Análise em CCDA dos experimentos de biotransformação utilizando a fração enriquecida com gingeróis	36
5.5	Análise em CCDA dos experimentos de biotransformação utilizando o substrato 6-gingerol em dias diferentes	40
6	CONCLUSÃO.....	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Por séculos, a natureza tem sido uma imensa fonte de produtos naturais que possuem a capacidade de mudar e conservar a vida. O Brasil, por ser o detentor de uma imensa diversidade de espécies vegetais, animais e de microrganismos, torna-se um campo promissor para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos bioativos (GUO, 2017; SEABROOKS; HU, 2017).

Nesse contexto, os fungos são capazes de sintetizar metabólitos potencialmente bioativos, tornando-os um grupo significativamente favorável para o descobrimento e criação de novos fármacos (SYNYTSYA et al., 2016). Estes microrganismos podem receber classificação taxonômica como Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Fungos imperfeitos, além destas, ainda podem ser didaticamente classificados em endofíticos, epifíticos, patogênicos e micorrizas (CienTIC, 2004).

O termo endofítico vem sendo usado desde o século XIX, sendo empregado para classificar fungos que vivem dentro das plantas. Em 1986, Barry designou estudos de diferenciação dos fungos, classificando os fitopatógenos como os que causam doenças em plantas, e mais tarde o termo epifítico serviu para classificar aqueles fungos que vivem na superfície delas (BORGES, 2008).

Os endofíticos representam uma rica fonte de novos produtos naturais com propriedades bioativas. Eles colonizam um habitat ecológico praticamente inexplorado e seus metabólitos secundários são particularmente ativos, possivelmente devido a interações metabólicas com seu hospedeiro (KUSARI et al., 2012).

Esses microrganismos também podem ser utilizados como reagentes em transformações químicas com substâncias orgânicas, o que é denominado de biotransformação. Eles apresentam características fundamentais para sua utilização nesses processos, tais como: elevada regio-, enantio- e esteroeletividade, condições reacionais brandas, aplicação a diversos tipos de substratos, ecologicamente correto (química verde) e baixos custos operacionais. Essas características favorecem uma alternativa biotecnológica para a obtenção de novos compostos ativos, em especial quando as modificações estruturais desejadas não podem ser efetuadas utilizando-se métodos sintéticos clássicos (TAKAHASHI et al., 2017).

As cepas endofíticas utilizadas neste trabalho foram *Curvularia asianensis* e *Hawksworthiomyces* sp. isoladas da *Humirianthera ampla*, uma planta pertencente à família das Icacinaceas, de pequeno porte, que tem como centro de dispersão a Amazônia brasileira. Caracteriza-se por possuir uma raiz tuberosa bastante desenvolvida e rica em fécula. Conhecida popularmente como mairá, surucuína ou surucucuína tem suas raízes usadas por índios e seringueiros da região como medicamento antiofídico (MARQUES, 2007; STRAUCH et al., 2012). Atualmente não se tem nenhum estudo com microrganismos isolados desta planta.

Mudanças estruturais estão sendo cada vez mais estudadas em substratos orgânicos com potencial bioativo para desenvolver medicamentos mais efetivos, menos tóxicos e ecologicamente corretos. Neste contexto, para a realização desta pesquisa foram utilizados como substrato gingeróis isolados do rizoma *Zingiber officinale*, conhecido popularmente como gengibre. Trabalhos experimentais demonstraram que os efeitos farmacológicos do gengibre são advindos dos compostos fenólicos gingeróis (BERNAD et al., 2015; RODRIGUES, 2017). Até então nunca foi estudado o potencial biocatalítico de espécies fúngicas isoladas da *H. ampla* frente a gingeróis, o que torna inédito o caráter desta pesquisa.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biocatalítico dos fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *H. ampla* frente aos gingeróis obtidos do *Zingiber officinale*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior da planta, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais, como folhas, ramos e raízes, podendo ocupar espaços inter e intracelulares (PAMPHILE et al., 2017). Estes microrganismos, na grande maioria das vezes, não causam efeitos nocivos a sua planta hospedeira. No entanto, alguns deles após um longo período podem provocar sintomas de doenças, sugerindo assim, que eles são uma forma latente de um patógeno. Assim, a natureza da associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros é diversa e varia de parasitismo a simbiótico (FERNANDES et al., 2015).

Esses microrganismos são uma excelente fonte para a exploração de metabólitos secundários. O isolamento e a utilização desses metabólitos nos bioensaios são uma alternativa na busca por produtos naturais bioativos para controle biológico e produção de produtos farmacêuticos (PAMPHILE et al., 2017).

Fármacos importantes de uso clínico em várias patologias foram obtidos de fungos, como o antibiótico penicilina (1) (FIGURA 1) descoberto em 1928 pelo cientista Alexander Fleming. Ele observou que o crescimento das bactérias de seu estudo foi afetado pelo crescimento de um fungo na mesma placa (*Penicillium chrysogenum*). Desse evento foi descoberto o primeiro antibiótico considerado uma das descobertas científicas mais importantes do século XX (BRITANNICA ACADEMIC, 2016).

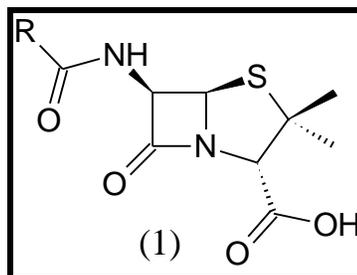


Figura 1: Estrutura química da penicilina (1). **Fonte:** Próprio autor.

Outra descoberta medicinal oriunda dos fungos foi a ergotamina (2) (FIGURA 2), um alcaloide extraído da cepa *Claviceps purpurea*, um parasita que ataca o centeio. Devido seu poder vasoconstritor, ele tem sido utilizado para tratar enxaquecas e induzir contrações uterina no momento do parto, além de ser utilizado para diminuir hemorragias uterinas pós-parto (ZERMEÑO, 2004).

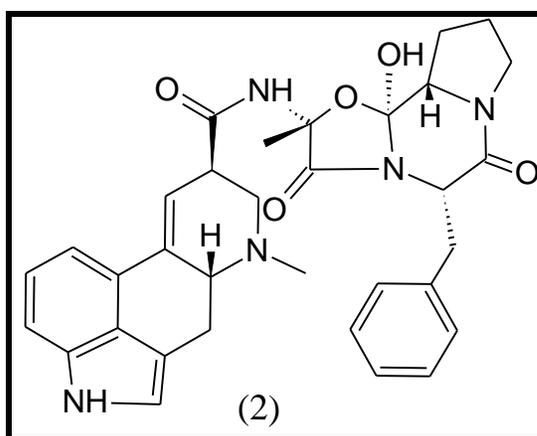


Figura 2: Estrutura química da ergotamina (2). **Fonte:** Próprio autor.

A ciclosporina (3) (FIGURA 3 p. 18) é uma droga imunossupressora, também isolada de uma cepa fúngica presente no solo (*Tolypocladium inflatum*), este medicamento pertence à classe dos inibidores de calcineurina, suprimindo as reações imunológicas que causam rejeição de órgãos transplantados. Ela foi lançada no mercado em 1979, possibilitando o retorno às atividades de transplante anteriormente abandonadas pela não efetividade cirúrgica (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

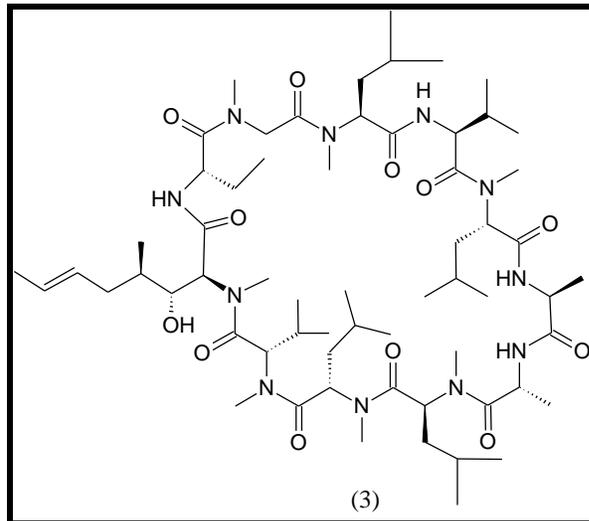


Figura 3: Estrutura química da ciclosporina (3). **Fonte:** Próprio autor.

É notável que o ambiente afeta diretamente o metabolismo microbiano, a depender das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade dos nutrientes os fungos tornam-se capazes de ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de vários componentes, sejam estes nocivos ou não (PETIT et al., 2009). Assim, eles podem produzir e liberar enzimas extracelulares, que degradam essas substâncias antes de serem internalizadas por suas células e utilizá-las como fonte de energia. Esta produção enzimática favorece a utilização destes microrganismos em procedimentos de biotransformação, uma vez que suas enzimas são quimicamente seletivas tornando-se capazes de biotransformar uma grande variedade de substratos (ŠNAJDR et al., 2011).

2.2 Biotransformação utilizando fungos

Biotransformações e/ou biocatálise são conversões químicas catalisadas por enzimas. Esses métodos são uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou por resolução de racematos (MISCHIATTI, 2016).

A utilização de microrganismos para promover reações químicas ocorre há mais de seis mil anos, desde o início da conversão do açúcar em álcool para produção de cervejas e vinhos, mas considera-se que o primeiro relato científico de biotransformação seja datado no final do século XIX, quando Louis Pasteur resolveu uma mistura racêmica de ácido tartárico (FIGURA 4,

p. 19) utilizando *Penicillium glaucum*. O microrganismo adicionado à mistura racêmica degradou somente um enantiômero D (-) ácido tartárico (4), deixando o outro intacto L (+) ácido tartárico (5), favorecendo o processo de fermentação alcoólica das bebidas (TURNER, 1998).

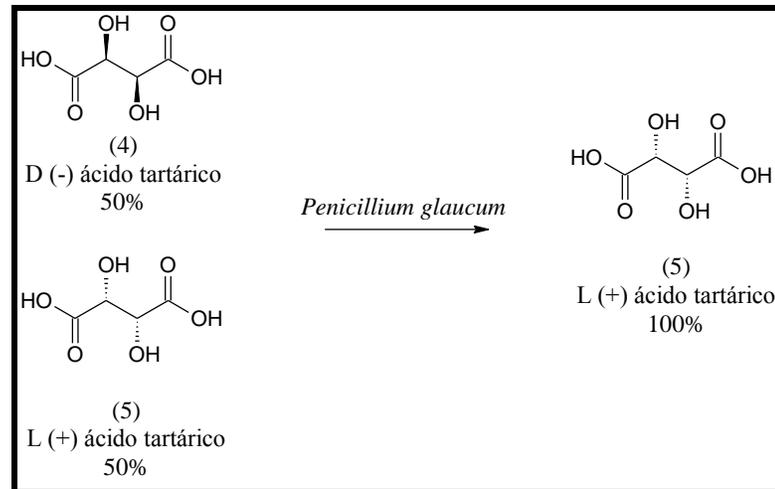


Figura 4: Conversão química do enantiômero D (-) ácido tartárico (4) em L (+) ácido tartárico (5) pelo *Penicillium glaucum*. **Fonte:** Próprio autor.

Dentre as reações químicas que os fungos podem desempenhar em processos de biotransformação estão: reações de hidroxilação, hidrólise, metilação, glicolisação, oxidação, acetilação e redução. Um estudo químico realizado por Saraiva (2009) demonstrou o potencial do fungo *Trichoderma harzianum* ao biotransformar o monoterpeneo (*R*)-carvona (6) (FIGURA 5, p. 20), que gerou o neodihidrocarveol (7) produto de biotransformação. O neodihidrocarveol é um dos principais produtos da redução enzimática da (*R*)-carvona.

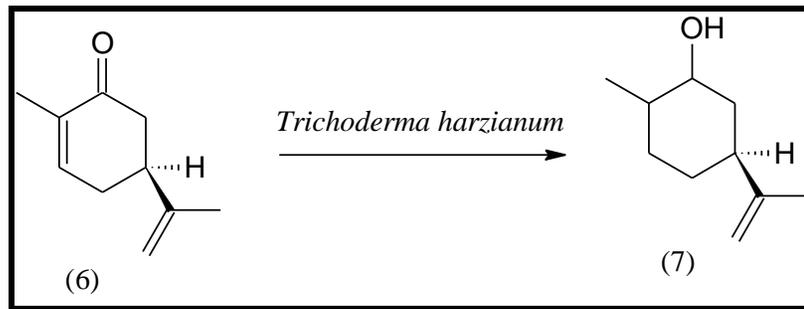


Figura 5: Biotransformação da (*R*)-carvona (6) em neodihidrocarveol (7) por células em crescimento de *T. harzianum*. **Fonte:** Próprio autor.

Nos processos de biotransformação, o procedimento mais utilizado é realizado com células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados. Plantas, protozoários e insetos também podem ser utilizados além de enzimas puras, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essa última é bastante onerosa, uma vez que, além da enzima, é necessário o uso de um ou mais cofatores para que ela seja ativa, por este motivo, está sendo cada vez mais preferível trabalhar com as enzimas provenientes dos microrganismos (FABER, 2011).

A seletividade apresentada pelos biocatalisadores naturais, o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas como substratos para as reações, o baixo custo, as condições amenas e ecologicamente corretas conferem aos fungos algumas características fundamentais para sua utilização. Nos últimos anos, a biocatálise têm explorado conhecimentos de áreas como a biologia molecular com o intuito de desenvolver biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos, passíveis de serem utilizados pela indústria a um custo mais acessível (FABER, 2011).

As principais vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica são: (A) catálises eficientes, sendo o processo da reação mais rápido quando comparado a catálise química e as enzimas podem ser efetivas mesmo em baixas concentrações molares; (B) reações sob condições suaves, numa faixa de temperatura entre 20-40°C e pH neutro (em torno de 7,0), minimizando reações indesejadas, tais como rearranjos e reações laterais; (C) ação catalítica sobre um grande número de substratos em locais de difícil acesso por meio sintético; (D) química verde, devido ao uso reduzido de solventes e reagentes, bem como na menor produção de resíduos nocivos para a saúde e para o ambiente, tornando-se um importante aliado em favor das questões ambientais; (E)

seletividades (quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade) e (F) baixo custo operacional (MISCHIATTI, 2016; TAKAHASHI et al., 2017).

A principal desvantagem dos sistemas de transformações microbianas é a imprevisibilidade do processo. A fim de maximizar as chances de se obter um produto particular ou de obtenção de grande variação de produtos, é frequentemente necessário utilizar uma ampla variedade de microrganismos na triagem inicial (MISCHIATTI, 2016).

2.3 O gênero *Hawksworthiomyces* sp.

O gênero *Hawksworthiomyces* sp. foi recentemente descrito por De Beer et al. (2016b), mas o primeiro relato de uma espécie deste gênero se deu em 2008 quando Meyer et al. descreveu pela primeira vez a espécie *H. lignivorus* (Ascomycota: Contos de Ophiostoma) a partir de *Eucalyptus* sp. em decomposição na África do Sul.

Entretanto, esta espécie foi descrita como pertencente do gênero *Sporothrix* que, sob o sistema de nomenclatura dupla, acomodava morfos assexuados miceliais de *Ophiostomatales* (DE BEER; DOUNG; WINGFIELD, 2016a). No entanto, sequências de DNA de múltiplos genes e estudos filogenéticos mostraram que esta espécie era distinta de todas as outras espécies que residem em *Sporothrix* como redefinidas por De Beer et al. (2016b), e de outros gêneros de *Ophiostomatales*.

De Beer et al. (2016b), descreveram o novo gênero *Hawksworthiomyces*, para acomodar *H. lignivorus* juntamente com outras quatro espécies recém-descritas, *H. crousii*, *H. hibbettii*, *H. sequentia* e *H. taylorii*. Todas as espécies de *Hawksworthiomyces* foram isoladas de madeira em decomposição ou ambientes associados a materiais vegetais degradado. Um estudo de inoculação conduzido por De Beer et al. (2016b) também sugeriram que o *H. lignivorus* é capaz de degradar componentes lignocelulósicos da madeira.

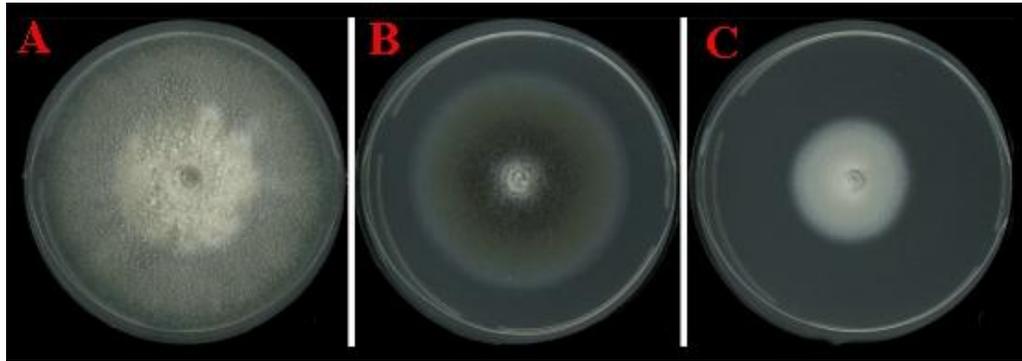


Figura 6: Algumas espécies do gênero novo *Hawksworthiomyces* sp. nov. cultivadas por 14 dias à 30° C no escuro. **A:** *Hawksworthiomyces taylorii* sp. nov.; **B:** *Hawksworthiomyces hibbettii* sp. nov.; **C:** *Hawksworthiomyces crousii* sp. nov.. Adaptado por Gonçalves, 2019. (DE BEER et al., 2016b).

Poucos são os estudos feitos com o gênero *Hawksworthiomyces* sp., por isso é escasso o conhecimento acerca das características de espécies deste gênero. Também não foram encontrados trabalhos que utilizassem espécies do gênero *Hawksworthiomyces* em quaisquer procedimentos de biotransformação.

2.4 O gênero *Curvularia* sp.

O gênero *Curvularia* é classificado taxonomicamente em Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Euascomycetes; Ordem: Pleosporales; Família: Pleosporaceae; Gênero: *Curvularia* (SUN et al., 2003). O gênero *Curvularia* constitui um grupo de microrganismos de ampla ocorrência visto a frequência com que são observados espécimes do gênero e elevado número de espécies que são normalmente identificadas (MOURÃO et al, 2017).

O gênero *Curvularia* é composto por cerca de 119 espécies, diferenciando-se pela morfologia dos conídios, número de septos e morfologia da colônia. Em consequência da enorme variabilidade morfológica observada nas espécies pertencentes a esse gênero, ele foi dividido em três grupos (FIGURA 7, p. 23): “geniculata” (FIGURA 7A, p. 23), com a espécie-tipo *C. geniculata*, o grupo “maculans” (FIGURA 7B, p. 23), com a espécie-tipo *C. maculans* e o grupo “lunata” (FIGURA 7C, p. 23), representado por *C. lunata*, que se diferenciam pela forma dos conídios e número de septos (HOSOKAWA; TANAKA; TSUDA, 2003).



Figura 7: Espécies do gênero *Curvularia* sp. crescidos em meios semissólidos em placas de Petri. **A:** *C. geniculata*; **B:** *C. maculans*; **C:** *C. lunata*. **Fonte:** Manamgoda et al., 2012. Pandey, 2014.

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 (FIGURA 8) (MOURÃO et al, 2017).

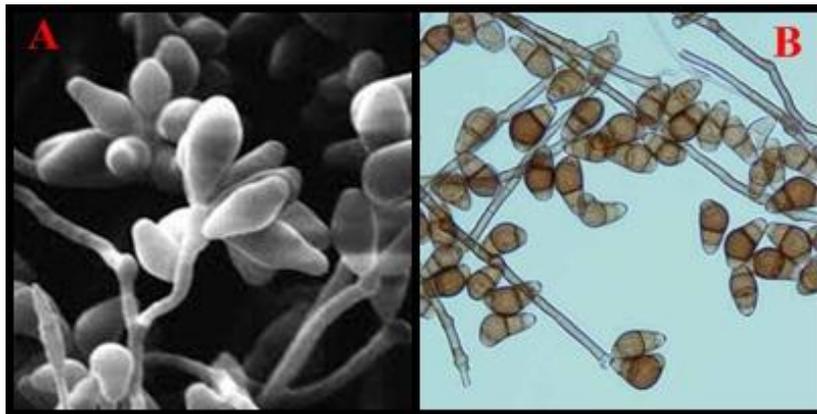


Figura 8: **A** - Aparência típica microscópica de conídios de células múltiplas do fungo *Curvularia geniculata*; **B** - Germinação simpodial do fungo *Curvularia lunata* (MCKENZIE, 2013).

De modo geral, os fungos do gênero *Curvularia* são saprófitos do solo, amplamente espalhados pelo mundo e encontrados normalmente em ambientes poluídos. Além disso, espécies de *Curvularia* tem sido isolado de diversas partes de vegetais sendo considerados endofíticos. Estes microrganismos podem ter seu potencial direcionado para a produção de metabólitos secundários visando a inibição de agentes patogênicos, anti-helmínticos e inseticidas de grande

importância agrícola. É crescente o número de relatos na literatura a respeito dos metabólitos produzidos pelas espécies do gênero *Curvularia* e que são de grande interesse industrial e biotecnológico (MACIEL, 2010).

Em 2012, estudos realizados no nordeste da Tailândia por Manamgoda e colaboradores levaram a identificação de uma nova espécie deste gênero, o *C. asianensis*, que foi isolado de folhas de *Saccharum canário* (cana de açúcar) e grãos de *Oryza sativa* (arroz).

Até o momento não existem relatos de experimentos de biotransformação utilizando o *C. asianensis*, porém alguns estudos de biotransformação utilizando outras espécies do gênero *Curvularia* sp. foram encontrados, como exemplo o experimento de Vezina em 1987 biostransformando esteroides (FIGURA 9). Sabe-se que uma hidroxila β na posição do carbono 11 dos esteroides é essencial para sua atividade biológica. A introdução desta hidroxila via biotransformação foi descrita primeiramente em 1953 usando os fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia lunata* (FIGURA 9). A cortisona (8) foi 11 β -hidroxilada produzindo hidrocortisona (9) com 60-70% de rendimento usando o *C. lunata* (VEZINA, 1987).

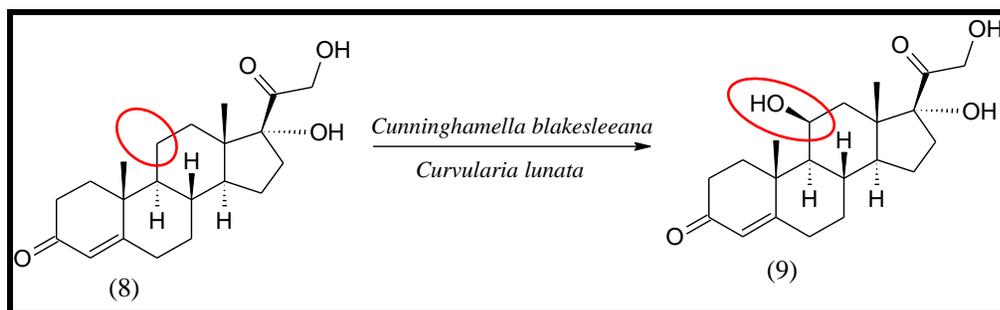


Figura 9: Modificação estrutural da cortisona (8) em hidrocortisona (9) após o processo de biotransformação pelos fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia lunata*. **Fonte:** Próprio autor.

Embora existam estudos de biotransformação com espécies do gênero *Curvularia* sp., não há relatos na literatura sobre o uso destes em procedimentos de biotransformação com substratos orgânicos extraídos do *Zingiber officinale* (gengibre).

2.5 Gengibre: *Zingiber officinale*

A família Zingiberaceae que apresenta distribuição em áreas tropicais e semitropicais, é composta por cerca de 50 gêneros e 1.100 espécies, onde encontra-se o gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), um rizoma popularmente utilizado como terapia alternativa para tratamento de enfermidades. Ele é originário de florestas tropicais do Sudoeste da Ásia e, atualmente, é cultivado em diversos países do mundo, dentre eles o Brasil (RODRIGUES, 2017).

Nas últimas duas décadas aumentaram-se de forma considerável os relatos científicos apontando ações benéficas advindas do *Z. officinale*. (ARYAEIAN; TAVAKKOLI, 2015). De forma geral, evidencia-se atividades anti-inflamatória, hipoglicêmica, antioxidante, antiulcerosa, antiemética, ansiolítica, antipirética e antitumoral (RODRIGUES, 2017).

Recentemente, elevou-se o número de trabalhos experimentais demonstrando que os efeitos farmacológicos do gengibre são advindos dos compostos fenólicos gingeróis (BERNAD et al., 2015). Em especial, o 6-gingerol (10) e o 10-gingerol (11) (FIGURA 10) são considerados como moléculas com grande potencial farmacológico e responsável pelas ações benéficas e terapêuticas dessa espécie (FUNK et al., 2009; CHAKRABORTY et al., 2012). Desta forma o isolamento e estudo destes constituintes podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico melhor dos já existentes no mercado.

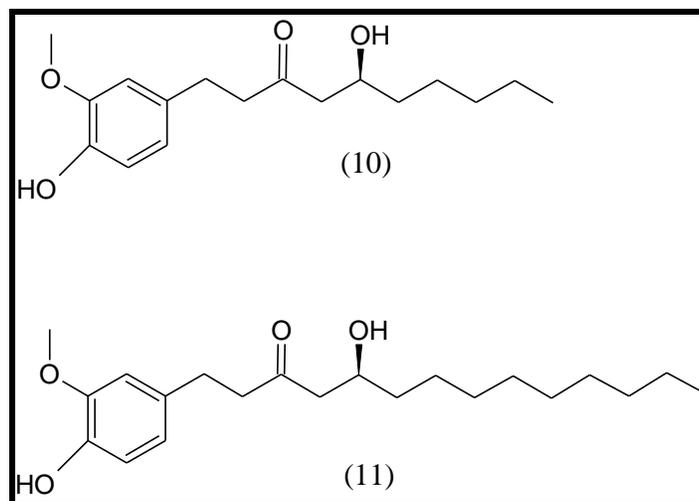


Figura 10: Estruturas químicas do 6-gingerol (10) e 10-gingerol (11). **Fonte:** Próprio autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial biocatalítico dos fungos endofíticos *Curvularia asianensis* e *Hawksworthiomyces* sp. isolados da planta *Humirianthera ampla* frente a gingeróis isolados de *Zingiber officinale*.

3.2 Específicos

- Identificar os fungos endofíticos isolados de *H. ampla*;
- Analisar a influência do meio de cultivo, temperatura e luminosidade no crescimento das cepas fúngicas;
- Avaliar a condição mais apropriada de biotransformação frente a gingeróis, variando meios de cultivo e dias de crescimento;
- Analisar os extratos obtidos da biotransformação frente a gingeróis por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos substratos utilizados nos experimentos de biotransformação

Os dois substratos (fração enriquecida com gingeróis e isolado 6-gingerol) encontravam-se disponíveis em laboratório para o uso. Ambos foram obtidos e isolados por integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos (LPNBio), sob orientação do professor Dr. James Almada da Silva, responsável pelo laboratório.

4.2 Obtenção, isolamento e preservação dos microrganismos

As cepas fúngicas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de uma parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde foi isolado do rizoma da *Humirianthera ampla* os endófitos. Após isolamento, os fungos seguiram para análise filogenética onde foram identificados (item 4.3). Em seguida, as cepas foram incubadas em meio de cultura semissólido Ágar Batata Dextrose (BDA) por 7 dias, posteriormente foram preservados em óleo mineral (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1993). As culturas fúngicas preservadas através dessa metodologia foram transportadas até o Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal de Sergipe – Campus Lagarto (LPNBio) onde foi feita uma matriz para seguimento das próximas etapas deste trabalho.

4.3 Extração do DNA, amplificação, sequenciamento e análise filogenética de endófitos isolados de *Humirianthera ampla*

Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Micologia e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Agricultura (BIOAGRI), do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Os isolados monospóricos e os isolados obtidos a partir das hifas foram cultivados em meio líquido Batata Dextrose (BD) até que a biomassa produzida fosse suficiente para a extração do DNA, pelo método CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) (MURRAY; THOMPSON, 1980).

A amplificação dos fragmentos do DNA da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA foi realizado de acordo com White et al. (1990) e Kuninaga et al. (1997), com modificações. A concentração final do DNA obtido foi ajustada para 10 a 20 ng.µL⁻¹ em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que também continham: tampão 1X; iniciadores ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990) a 0,5 µM cada; MgCl₂ a 1,5 mM; dNTPs a 0,2 mM cada; Taq DNA polimerase a 0,05 U. µL⁻¹; e água ultra pura, resultando em um volume final de 50 µL.

Os produtos da PCR foram sequenciados utilizando-se os iniciadores ITS4 e ITS5 na empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Os eletroferogramas gerados foram analisados no programa BioEdit e as sequências foram comparadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Sequências com identidade superior a 90% foram obtidas do *GenBank* e utilizadas para a geração de alinhamentos múltiplos. A análise filogenética dos alinhamentos foi realizada pelo método de agrupamento de vizinhos, seguido de análise de *bootstrap* com 1.000 repetições.

4.4 Cultivo dos fungos endofíticos

Os fungos previamente codificados como B1-1E1 (UFCM 0500) e B4-2N (UFCM 0533), foram cultivados em placas de Petri contendo os meios semissólidos Ágar Batata Dextrose (BDA) e Ágar Sabourad (SBA), obtidos da seguinte forma: em um béquer foram adicionadas as proporções equivalentes para 500 mL de cada meio - BDA: 100g de batata *in natura*, 10g de dextrose e 10g de ágar nutriente; SBA: 32,5g do meio sintético (KASVI®). Após homogeneização, os meios foram autoclavados por 15 minutos à 121 °C e vertidos em placas de Petri estéreis.

Foram testadas duas condições de crescimento para ambos os microrganismos, na primeira condição os fungos foram expostos ao crescimento em estufas à 32°C sem incidência de luminosidade, enquanto na segunda condição, os fungos foram submetidos ao crescimento com exposição a luminosidade em temperatura ambiente (25°C-30°C).

4.5 Preparo dos meios de cultura para o experimento de biotransformação

Foram utilizados nos experimentos de biotransformação três diferentes meios líquidos: Batata Dextrose (BD), Sabouraud Dextrose (SBD) e Extrato de Carne e Peptona (MEP), onde os fungos foram cultivados. Os meios de cultura líquidos BD, SBD e MEP foram obtidos da seguinte forma: em um béquer foram adicionadas as proporções equivalentes para 100 mL cada meio - BD: 20 g de batata pré cozida *in natura* e 2 g de dextrose; SBD: 6,5 g do meio sintético (KASVI®); MEP: 2,8 g do meio sintético (KASVI®). Após homogeneização, os meios foram autoclavados por 15 minutos à 121°C.

4.6 Biotransformação em meios de cultura diferentes com o extrato enriquecido com gingeróis

Foram adicionados em tubos de polipropileno tipo *ependorf* de 5,0 mL, 1,4 mL de cada meio de cultura (MEP, SBD e BD). Após autoclavados, foram adicionados discos de aproximadamente 6 mm dos fungos B4-2N e B1-1E1. Os fungos B1-1E1 e B4-2N foram deixados em crescimento sob agitação (120 rpm) em temperatura ambiente (25-30°C) por 7 e 14 dias, respectivamente.

Após esse período, foram inseridos 25 µL do extrato enriquecido com gingeróis dissolvido no co-solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 4% à cultura fúngica, onde permaneceu em agitação por mais 7 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e para cada fungo foi realizado experimentos controles: controle do meio líquido (M); controle do meio de cultura com crescimento fúngico (MF) e um controle do meio de cultura apenas com o substrato (MS). Após os sete dias de agitação os experimentos foram finalizados através de uma partição líquido-líquido utilizando 1 mL de acetato de etila (FIGURA 11, p. 30), posteriormente os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

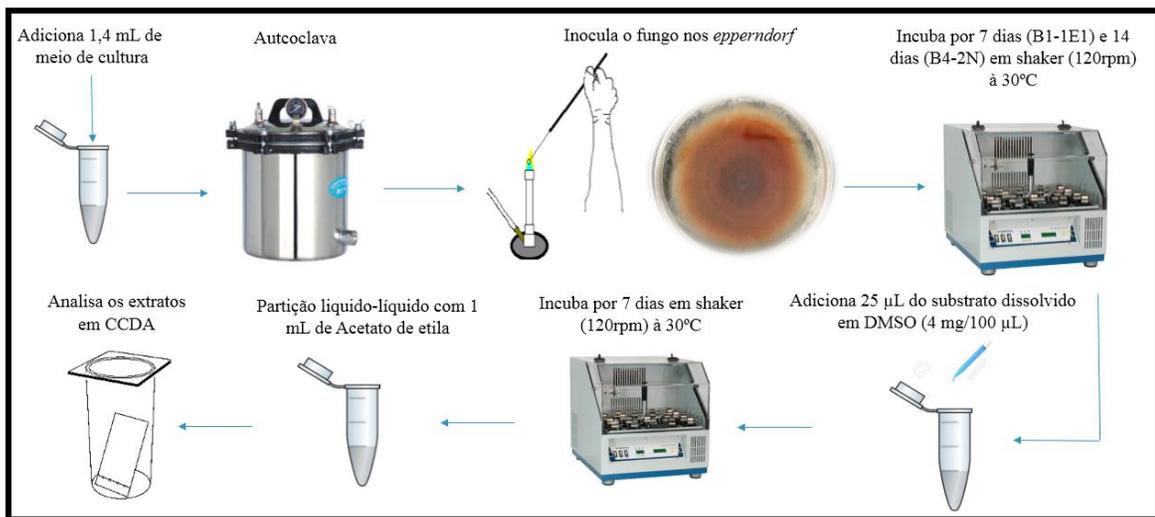


Figura 11: Ilustração das etapas do procedimento de biotransformação. **Fonte:** Próprio autor.

4.7 Biotransformação em diferentes dias de crescimento com o substrato 6-gingerol isolado

Para o meio de cultura que foi constatado a biotransformação no experimento do item 4.6 (p.29), foi realizado o experimento novamente com o substrato 6-gingerol isolado, variando os dias de crescimento em que o fungo permanece em contato com o substrato. Foram adicionados em tubos de polipropileno tipo *eppendorf* de 5,0 mL, 1,4 mL do meio líquido determinado pelo item 4.6 (p.29). Após autoclavar, foram adicionados discos de aproximadamente 6 mm dos fungos B1-1E1 e B4-2N. O fungo B1-1E1 foi deixado em crescimento sob agitação (120 rpm) em temperatura ambiente (25-30°C) por 7 dias e o fungo B4-2N por 14 dias nas mesmas condições. Após esse período, foram adicionados 25 µL do substrato 6-gingerol dissolvido no co-solvente DMSO (4%) à cultura fúngica do B1-1E1 e B4-2N, ambos deixados sob agitação (120 rpm) em temperatura ambiente (25-30°C) por mais 14 dias.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada dia de experimento e foram feitos controles como descrito no item 4.6 (p. 29). Após o 7°, 8°, 9°, 10° e 14° dias de agitação em contato com o substrato, os experimentos foram finalizados através de uma partição líquido-líquido utilizando 1 mL de acetato de etila. Os controles foram retirados nos 7° e 14° dias de experimento e submetidos às mesmas condições dos experimentos de biotransformação (FIGURA 12, p. 31). Posteriormente os extratos foram analisados por CCDA.

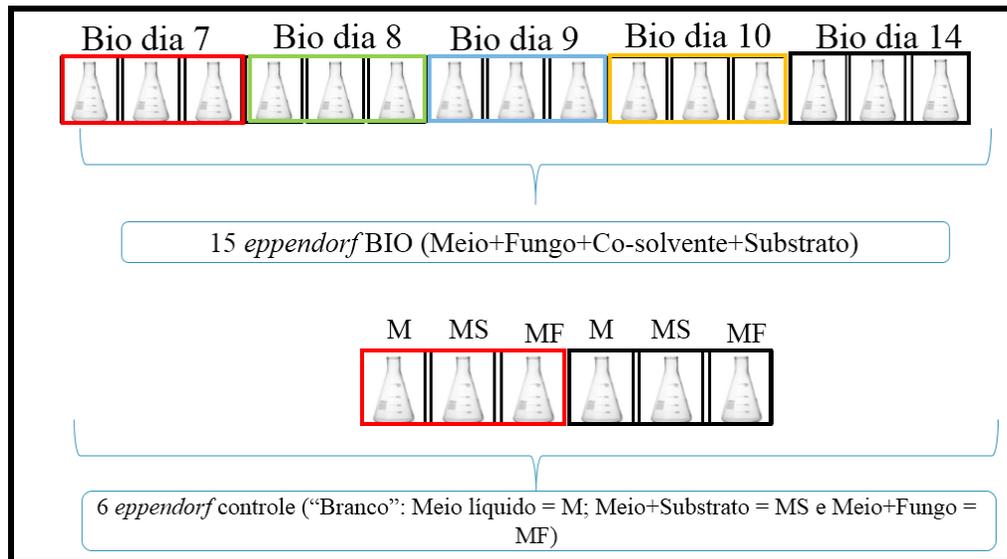


Figura 12: Ilustração do procedimento de biotransformação em dias diferentes para cada fungo. **Fonte:** Próprio autor

4.8 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Os extratos obtidos dos experimentos da biotransformação foram analisados por CCDA e foi realizado sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – Merck (espessura de 0,2 mm). A revelação do perfil cromatográfico nas placas analíticas foram realizadas através da exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e imersas em solução de vanilina em $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$ (Ácido Perclórico/Etanol).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular das cepas fúngicas

Nas buscas no *GenBank*, NCBI, a sequência de ITS do isolado B1-1E1 (UFCM 0500) apresentou 100% de identidade com *Curvularia asianensis* (Código *GenBank*: MH368105) (FIGURA 13, p. 33). Depois foi submetido a análise filogenética para determinação da relação com as espécies do gênero (TABELA 1) observadas nas buscas do *GenBank*, NCBI.

Tabela 1: Isolados utilizados na filogenia do fungo *Curvularia asianensis*.

Espécie	Isolado	ITS	Referência
<i>Curvularia asianensis</i>	MFLUCC 10-0717	JX256441	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia asianensis</i>	MFLUCC 10-0711	JX256424	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia geniculata</i>	CBS 187.50	KJ909781	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia affinis</i>	CBS 154.34	KJ909780	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia heteropogonicola</i>	BRIP 14579	KJ415548	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia uncinata</i>	CBS 221.52	HG779024	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia coicis</i>	CBS 192.29	JN192373	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia</i> sp.	MFLUCC 10-0709	JX256442	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia heteropogonis</i>	CBS 284.91	JN192379	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia ischaemi</i>	ICMP 6172	JX256428	Manamgoda et al. 2015
<i>Curvularia gladiolii</i>	ICMP 6160	JX256426	Manamgoda et al. 2015

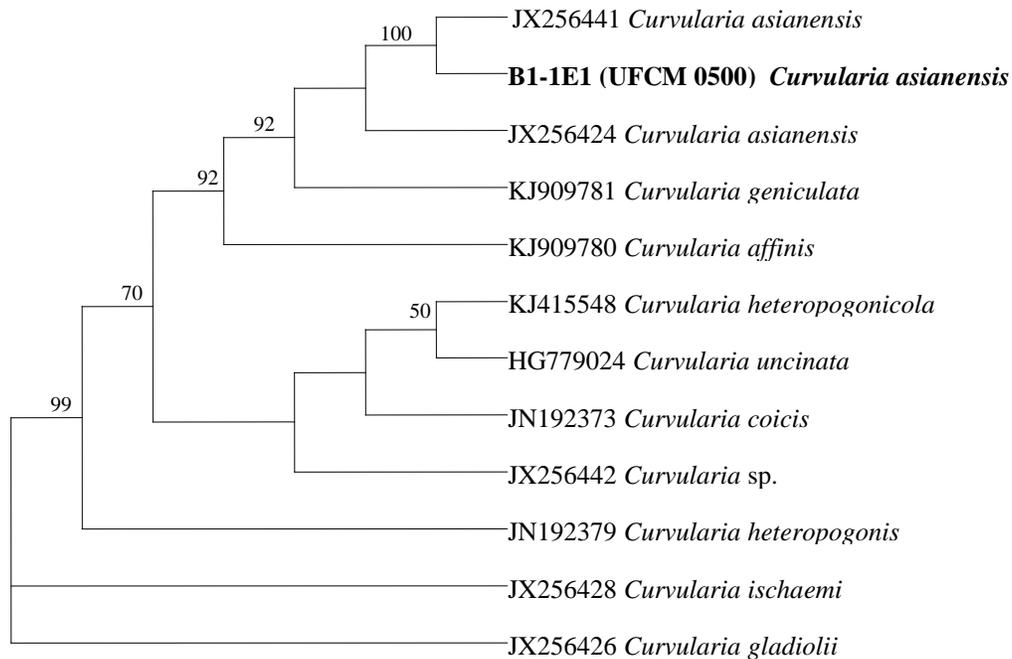


Figura 13: Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará.

Enquanto na busca no *GenBank*, NCBI, para o isolado B4-2N (UFCM 0533) a sequência de ITS mostrou 94% de identidade com *Hawksworthiomyces crousii* (Código *GenBank*: KX396551) (FIGURA 14, p. 34). Ele agrupou próximo a *Hawksworthiomyces crousii*, mas não se pode afirmar que se trata dessa espécie devido ao baixo percentual de identidade nas buscas no *GenBank*, o que indica uma grande possibilidade de ser uma espécie nova desse gênero.

Tabela 2: Isolados utilizados na filogenia do fungo *Hawksworthiomyces* sp..

Espécie	Isolado	ITS	Referência
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	CMW 29127	KX590832	de Beer et al. 2016a
<i>Sporothrix mexicana</i>	CMW 29129	KX590841	de Beer et al. 2016a
<i>Sporothrix cabralii</i>	CMW 38098	KT362256	de Beer et al. 2016a
<i>Hawksworthiomyces lignivorus</i>	CMW 18600	EF127890	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces taylorii</i>	CMW 20741	KX396549	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	MOTU_LB5959	KT197432	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	INBio_4506°	KM242324	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	INBio_4506N	KM242323	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	INBio_4515N	KM242369	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces</i> sp.	YL200c18P	FJ362131	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces hibbettii</i>	CMW 37663	KX396550	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces sequentia</i>	nik62104a_03C_19	HQ611296	de Beer et al. 2016b
<i>Hawksworthiomyces crousii</i>	CMW 37531	KX396551	de Beer et al. 2016b

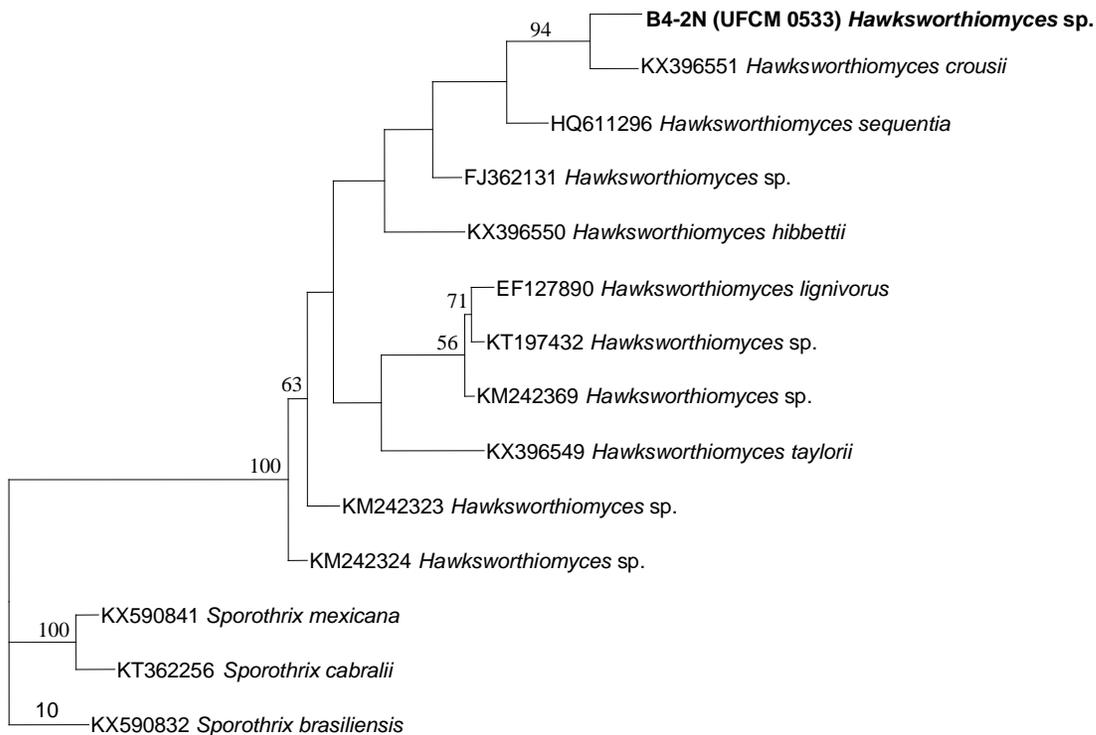


Figura 14: Árvore filogenética de agrupamento de vizinhos para a região ITS do rDNA. Valores de *bootstrap* ($\geq 50\%$) para 1000 repetições são mostrados nos nós. UFCM - Coleção Micológica da Universidade Federal do Ceará.

5.2 Crescimento das cepas fúngicas em diferentes condições de cultivo

Ambos os fungos cresceram bem nos meios de cultura semissólidos Ágar Sabourad (SBA) e Ágar Batata Dextrose (BDA). O fungo *C. asianensis* (FIGURA 15, p. 35) apresentou crescimento mais rápido, em torno de 7 dias, para ocupar mais da metade da placa de Petri, enquanto o fungo *Hawksworthiomyces* sp. apresentou crescimento mais lento (FIGURA 16, p. 35), em torno de 14 dias. Ao variar as condições de temperatura e luminosidade, notou-se que ambos os fungos cresceram melhor em temperatura ambiente (25-30°C) e com incidência de luminosidade, enquanto na estufa (32°C) sem incidência de luminosidade o crescimento das cepas fúngicas ficaram mais lento.

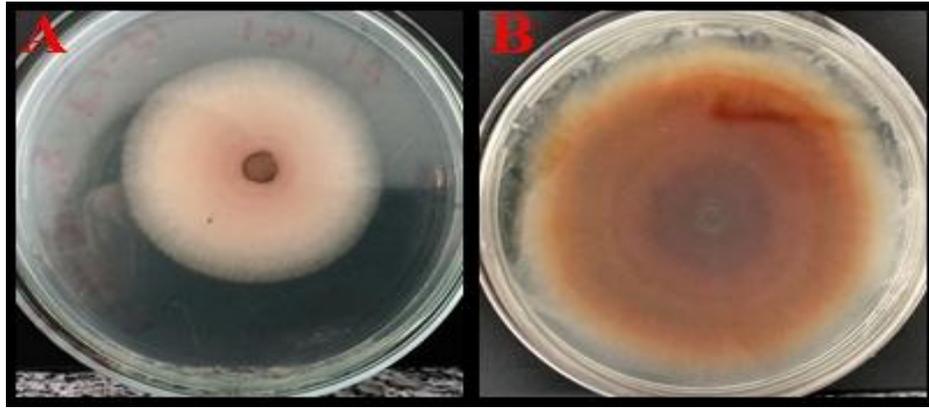


Figura 15: Cultivo em placa de Petri do fungo *C. asianensis* em duas condições. **A:** Após 7 dias de incubação em estufa à 32°C, em meio SBA, sem exposição à luz; **B:** Após 7 dias de incubação entre 25-30°C, em meio SBA, com exposição a luz. **Fonte:** Próprio autor.

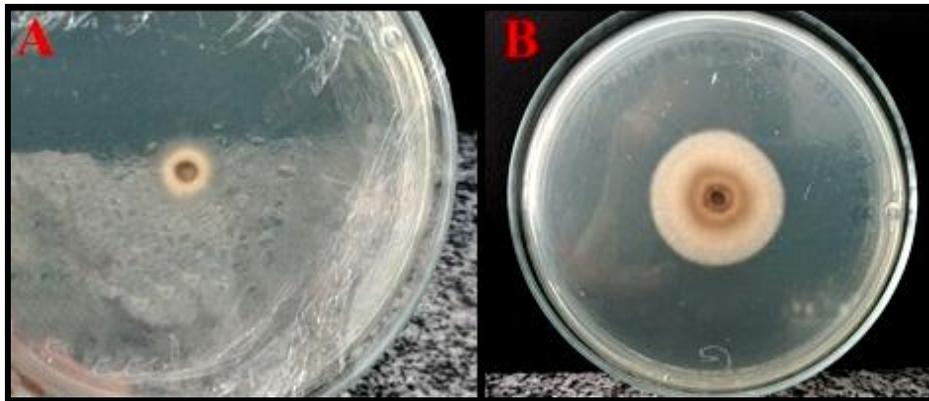


Figura 16: Cultivo em placa de Petri do fungo *Hawksworthiomyces* sp. em duas condições. **A:** Após 14 dias de incubação em estufa à 32°C, em meio SBA, sem exposição à luz; **B:** Após 14 dias de incubação entre 25-30°C, em meio SBA, com exposição a luz. **Fonte:** Próprio autor.

Sabe-se que ambos os meios são próprios para o cultivo de fungos (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2007) embora existam diferenças em suas composições. O meio SBA apresenta carboidratos e proteínas, enquanto o meio BDA é rico apenas em carboidrato. Mesmo com esta diferença não houve mudança no crescimento e morfologia dos endófitos.

Segundo Kania (2004) e Kimati et al., (2005), no meio de cultura BDA, o fungo do gênero *Curvularia* sp., cresce rápido à 25°C formando colônias circulares de aspecto cotonoso e com coloração que varia de branca a cinza rosado, tornando-se marrom oliva ou preta com o tempo. Por serem saprófitos do solo os fungos desse gênero estão acostumados a crescerem em ambientes com luminosidade (MACIEL, 2010) e se multiplicarem em temperaturas amenas,

como foi evidenciado por Manamgoda et al., em 2015 ao descobrir novas espécies deste gênero no nordeste da Tailândia.

Estudos realizados por de Beer et al. (2016b) constataram que algumas espécies do gênero *Hawksworthiomyces* sp. cresceram em placa após 14 dias (FIGURA 6, p. 22) à 30°C, corroborando com os achados desta pesquisa. Entretanto, no mesmo estudo eles observaram que as espécies de fungos que foram analisados deste gênero cresciam melhor sem luminosidade, diferente dos resultados desta pesquisa. Como não foi possível identificar a espécie a que pertence a cepa em estudo, essa diferença na condição da luminosidade pode corroborar que ela seja uma espécie nova do gênero *Hawksworthiomyces* sp.

5.3 Experimento de biotransformação utilizando a fração enriquecida com gingeróis

Entre os três meios de cultivo líquido testados (SBD, BD e MEP), ambos os fungos cresceram melhor nos meios de cultura líquido SBD e BD. A partir dos resultados obtidos no item 5.2 (p.34) os fungos foram submetidos ao crescimento em temperatura entre 25-30°C, com incidência de luminosidade e sob agitação, sendo este último utilizado para aumentar a superfície de contato entre o fungo e os nutrientes disponíveis no meio de cultivo.

O menor crescimento fúngico no meio MEP pode ser explicado pela composição rica em nitrogênio, aminoácidos e vitaminas, apresentando baixas concentrações de carboidratos e pH $7,0 \pm 0,2$, tornando-se desfavorável para o crescimento fúngico. Apesar do meio MEP não ser adequado para o crescimento fúngico, resolvemos testá-lo em nossos experimentos para criar um ambiente hostil para as cepas, permitindo uma possível utilização do substrato como nutriente e biotransformá-lo.

5.4 Análise em CCDA dos experimentos de biotransformação utilizando a fração enriquecida com gingeróis

Quando resolveu-se utilizar a técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), a pretensão era analisar qualitativamente o perfil cromatográfico por meio da comparação do perfil de eluição das substâncias contidas nos extratos dos experimentos de

biotransformação em relação aos experimentos controles. Essa análise teve caráter qualitativo, visto que não se teve cuidado de aplicar a mesma quantidade de extratos nas placas cromatográficas. Nos experimentos utilizando o fungo *C. asianensis* o eluente utilizado na análise em CCDA foi uma mistura de Hex/AcOEt na proporção 1:1, essa proporção foi determinada em testes com eluentes de polaridades diferentes até chegar ao ponto onde pudesse observar a mistura de gingeróis utilizada como substrato e seus prováveis produtos de biotransformação.

Nas biotransformações desse fungo foram observadas mudanças nos perfis cromatográficos a partir da comparação dos extratos obtidos dos controles (M: meio de cultura; MS: meio de cultura e substrato e MF: meio de cultura com o fungo) e os dos experimentos das biotransformações (nos três meios diferentes) (FIGURA 17). É importante salientar, que embora o meio líquido MEP não seja ideal para crescimento fúngico, o *C. asianensis* conseguiu crescer e reproduzir os mesmos resultados observados nas biotransformações nos outros meios de cultivo (BD e SBD).

O surgimento de manchas na parte inferior e o desaparecimento de manchas mais apolares, referentes aos gingeróis, foi observado em todos os cromatogramas dos extratos obtidos dos experimentos de biotransformação dos três meios testados, assim obtendo, possivelmente, substâncias mais polares do que os gingeróis presentes na fração enriquecida.

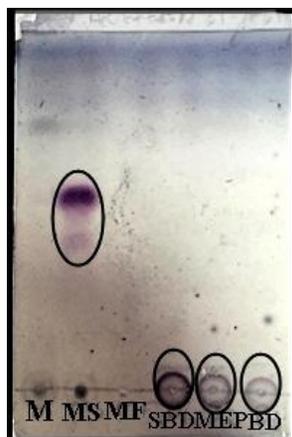


Figura 17: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* após 7 dias de contato com o substrato. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (1:1). **Legenda:** M: Meio líquido (SBD); MS: Meio mais substrato (SBD); MF: Meio mais fungo (SBD); SBD: Sabourad Dextrose; MEP: Extrato de Carne e Peptona; BD: Batata Dextrose. **Fonte:** Próprio autor.

Não existe na literatura nenhum estudo que se tenha utilizado o fungo *Curvularia asianensis* em procedimentos de biotransformação. Em contrapartida, experimentos de biotransformação utilizando outras espécies do gênero revelam o potencial biocatalítico destes endófitos, como exemplo o estudo da biorredução seletiva de duas cetonas monoterpênicas (\pm) 2-ciano-norbornan-7-ona e (\pm) 2-p-nitrofenil-norbornan-7-ona (12) por *Curvularia lunata*, esse microrganismo foi capaz de reduzir as cetonas (FIGURA 18) nos respectivos norbornanóis (*E*)-álcool (13) e (*Z*)-álcool (14) (ARRUDA et al, 2006).

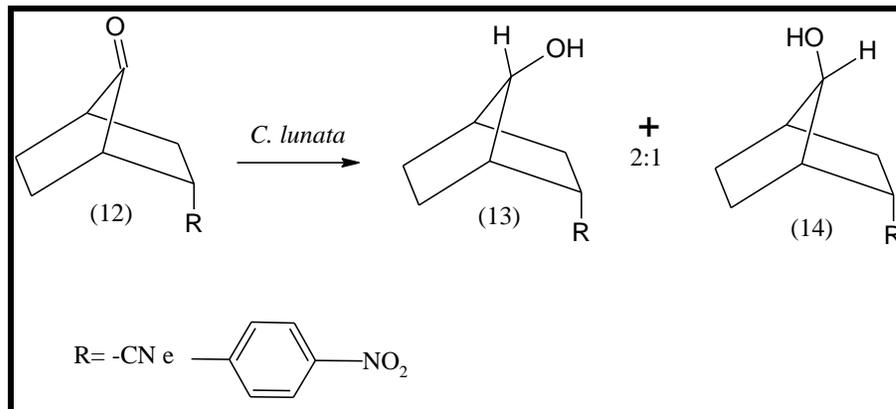


Figura 18: Biorredução seletiva de duas cetonas monoterpênicas (12) em seus norbornanóis correspondentes (*E*)-álcool (13) e (*Z*)-álcool (14) por *Curvularia lunata*. **Fonte:** Próprio autor.

Como dito anteriormente nesse trabalho (item 2.4, p. 22), o fungo *Curvularia lunata* foi capaz de hidroxilar o esteroide cortexolona (8), produzindo a hidro cortisona (9) (FIGURA 9, p. 24). Tal fato destaca o potencial de fungos do gênero *Curvularia* em processos biocatalíticos de adição quimiosseletiva de grupamentos hidroxila.

Assim também foi observado, em um teste preliminar de biotransformação do ácido abiético (15) por *Curvularia* sp. a hidroxilação da metila da cadeia isopropílica das estruturas (16) e (17) em 30 dias de ensaio (FIGURA 19, p. 39) (DE SOUZA, 2008). Estes resultados evidenciaram que *Curvularia* sp apresenta um potencial para produzir metabólitos hidroxilados, o que provavelmente tenha ocorrido com os gingeróis utilizados nesta pesquisa, justificando a formação de produtos mais polares.

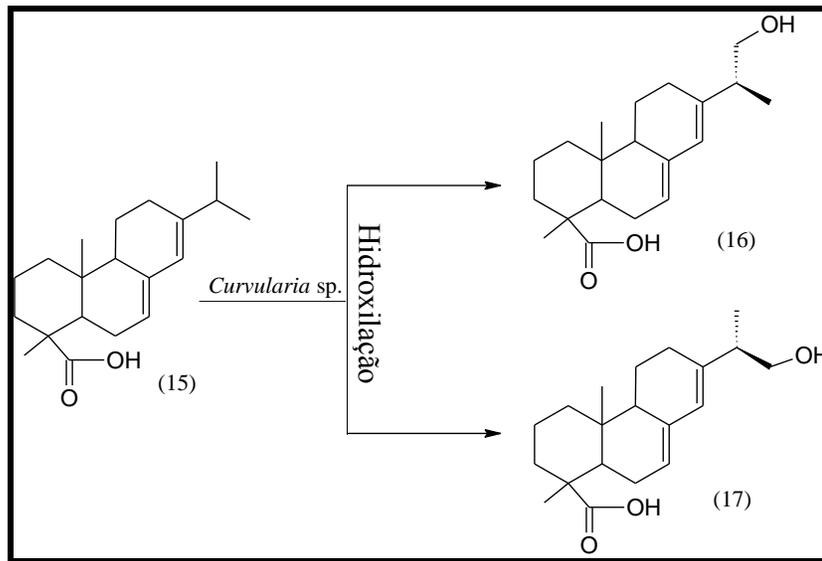


Figura 19: Hidroxição do ácido abiético (15) por *Curvularia* sp..

Para o fungo *Hawksworthiomyces* sp. foi observada em CCDA a biotransformação da fração enriquecida com gingeróis nos meios de cultura SBD e BD (FIGURA 20), enquanto que no meio MEP não foi observado esta mudança, sugerindo que este endófito prefere meios mais seletivos para fungos e ricos em carboidratos em sua composição para biostranformação destes substratos. Além do desaparecimento dos compostos mais apolares nos meios SBD e BD houve a formação de substâncias mais polares do que os gingeróis presentes na fração enriquecida.

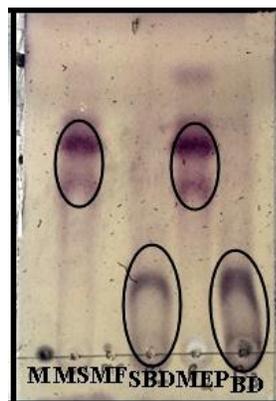


Figura 20: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. após 7 dias de contato com o substrato. Revelador: Vanilina. Eluente: Hex:AcOEt (1:1). **Legenda:** M: Meio líquido (SBD); MS: Meio mais substrato (SBD); MF: Meio mais fungo (SBD); SBD: Sabourad Dextrose; MEP: Extrato de Carne e Peptona; BD: Batata Dextrose. **Fonte:** Próprio autor.

O intuito de se utilizar como substrato uma fração enriquecida com gingeróis foi verificar se os fungos seriam capazes de realizar transformações em algum deles, diminuindo gastos e tempo no isolamento dos gingeróis. Assim, após esse *screening* inicial, foi possível selecionar as duas cepas e os meios onde foram observadas mudança do perfil cromatográfico dos extratos dos experimentos de biotransformação em relação aos dos extratos dos controles.

Na etapa seguinte da pesquisa (item 5.5) foi testado a biotransformação em dias diferentes com o substrato 6-gingerol isolado do rizoma *Zingiber officinale*. Foi utilizado esse gingerol, pois por ser o composto fenólico majoritário da fração enriquecida, já o possuíamos isolado no laboratório.

5.5 Análise em CCDA dos experimentos de biotransformação utilizando o substrato 6-gingerol em dias diferentes

A partir dos estudos anteriores, resolveu-se utilizar o meio SBD para realização do experimento de biotransformação para ambos os fungos com o substrato isolado 6-gingerol, já que não foi observado mudanças significativas entre os cromatogramas dos experimentos realizados nos outros meios. Esta etapa da pesquisa constituiu-se em dias diferentes de experimento (7º, 8º, 9º, 10º e 14º dias) para saber se o tempo de contato entre o fungo e o substrato influenciaria no processo de biotransformação gerando novos produtos.

Para análise dos resultados dos experimentos dos dois fungos, foram utilizadas duas proporções de eluentes com diferentes polaridades, a primeira foi uma mistura de Hex/AcOEt na proporção 1:1 e a segunda AcOEt/Hex 7:3, esse ajuste foi necessário para obter uma melhor resolução da análise (FIGURA 21) e (FIGURA 22, p. 42).

Notou-se, a partir da comparação entre os perfis cromatográficos dos controles com os dos experimentos das biotransformações, manchas na parte inferior de ambas as placas do fungo *C. asianensis*, em todos os dias de experimento, sugerindo produtos de biotransformação mais polares do que o 6-gingerol. Foi observado também a ausência do substrato na corrida cromatográfica nas triplicatas dos 9º, 10º e 14º dias de experimento. Devido ao método cromatográfico não ser tão sensível, não podemos afirmar que o substrato foi totalmente biotransformado, necessitando de técnicas mais sensíveis para se confirmar o fato.

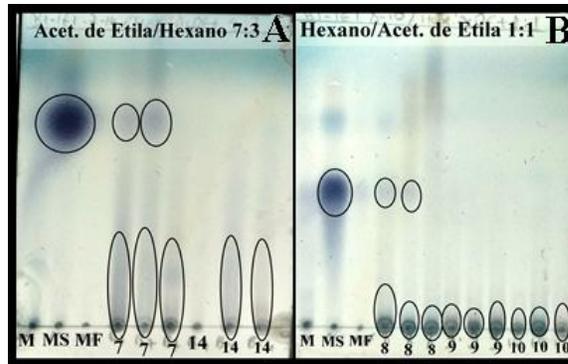


Figura 21: CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* variando os dias de experimento. Revelador: Vanilina. Eluente: **A:** Hex:AcOEt (3:7). **B:** AcOEt:Hex (1:1). **A:** CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* nos 7º e 14º dias; **B:** CCDA dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *C. asianensis* nos 8º, 9º e 10º dias. **Legenda:** M: Meio; MS: Meio mais o 6-gingerol; MF: Meio mais o fungo; 7, 8, 9, 10, 14: Quantidade de dias de experimento de biotransformação. **Fonte:** Próprio autor.

Na CCDA dos experimentos do fungo *Hawksworthiomyces* sp., ao comparar os extratos obtidos das biotransformações com os dos controles, observou-se mudanças no perfil cromatográfico, evidenciadas por manchas na parte inferior da placa em uma das três replicatas do 8º dia de experimento, o resultado permaneceu na triplicata do 9º e 14º dia de experimento e em duas replicatas do 10º de experimento (FIGURA 22, p. 42). Assim como os prováveis produtos gerados observados nos cromatogramas do fungo *C. asianensis*, as manchas apresentadas no perfil cromatográfico do fungo *Hawksworthiomyces* sp. são de produtos mais polares do que o 6-gingerol.

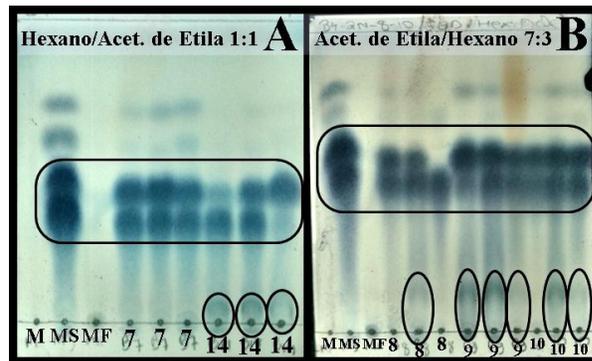


Figura 22: CCDAs dos extratos dos experimentos da biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. variando os dias de experimento. Revelador: Vanilina. Eluente: **A:** Hex:AcOEt (1:1); **B:** AcOEt:Hex (3:7). **A:** CCDAs dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. do 7º e 14º dias; **B:** CCDAs dos extratos dos experimentos de biotransformação do fungo *Hawksworthiomyces* sp. do 8º, 9º e 10º dias. **Legenda:** M: Meio; MS: Meio mais o 6-gingerol; MF: Meio mais o fungo; 7, 8, 9, 10, 14: Quantidade de dias de experimento de biotransformação. **Fonte:** Próprio autor.

Um fator importante que foi observado nesta CCDAs foi a presença de mais de uma substância no controle do meio mais substrato (MS), isso pode ser explicado pelo fato do 6-gingerol ser afetado pelas mudanças do meio em que está inserido, sofrendo desidratação e sendo convertido em outros componentes, como os shogaols (JOLAD, et al., 2004).

É importante salientar, que os resultados obtidos para a cepa utilizando a fração enriquecida como substrato (item 5.4, p. 36) não se reproduziu nesse experimento, onde não se observou possíveis produtos biotransformados mais polares já no sétimo dia. Isso pode ser justificado pelo fato de não se ter trabalhado com soluções de esporos, possibilitando saber a quantidade de microrganismo inoculada em cada experimento da biotransformação. Infelizmente, os endófitos em estudo não produzem, por conta disso não foi possível obter uma solução de esporos. Esta mesma explicação serve para justificar as diferenças de resultados encontrada entre as triplicatas do 8º e 10º do experimento de biotransformação do *Hawksworthiomyces* sp.

Como na literatura não existe ainda nenhum estudo de biotransformação com fungos do gênero *Hawksworthiomyces* sp. não se pôde corroborar os resultados obtidos nesta pesquisa. Entretanto, alguns experimentos de biotransformação já foram realizados com o substrato 6-gingerol transformando-o em um composto mais polar, como foi observado na redução da carbonila (C-3) do 6-gingerol (10) no estudo desenvolvido por Paiva (2014). Esta mudança estrutural (FIGURA 23, p. 43) provocada pelo *Rhizopus stolonifer* produzindo o 6-gingerdiol (18).

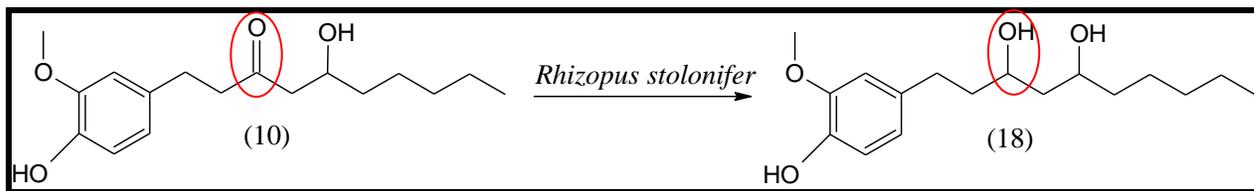


Figura 23: Reação de biotransformação do 6-gingerol (10) por *R. stolonifer* tendo como produto o composto 6-gingerdiol (18). **Fonte:** Próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os fungos codificados como B1-1E1 (UFCM 0500) e B4-2N (UFCM 0533) foram identificados por biologia molecular como *Curvularia asianensis* e *Hawksworthiomyces* sp. nov., respectivamente. Ambos os fungos cresceram bem nos meios de cultura sólidos SBA e BDA, em temperatura ambiente (25°C-30°C) e com incidência de luminosidade.

A partir das CCDA dos experimentos de biotransformação utilizando a fração enriquecida com gingeróis foi observando a formação de compostos mais polares e o desaparecimento dos componentes do substrato em todos os meios testados para o fungo *C. asianensis*. e apenas nos meios BD e SBD para o fungo *Hawksworthiomyces* sp..

Com a realização dos estudos da biotransformação em diferentes dias de crescimento com o substrato isolado 6-gingerol, verificou-se nas CCDA das biotransformações do experimento com o fungo *C. asianensis* que a partir do sétimo dia de reação já haviam produtos de biotransformação mais polares do que o 6-gingerol. Enquanto com o fungo *Hawksworthiomyces* sp. este mesmo resultado foi observado a partir do oitavo dia de reação.

Nestes estudos iniciais, a partir das análises em CCDA, os dois microrganismos mostraram-se promissores na biotransformação frente a gingeróis, transformando-os provavelmente em produtos mais polares. Assim, esta pesquisa apresenta caráter inédito, pelo fato do fungo *C. asianensis* ter sido recentemente descoberto e o endófito *Hawksworthiomyces* sp. corresponder a uma provável nova espécie, além de não se ter estudos sobre biotransformações de gingeróis com espécies de fungos destes dois gêneros.

Visando a necessidade de sempre buscar produtos inovadores que, preferencialmente, apresentem atividades biológicas benéficas, e levando em consideração a química verde, considera-se essencialmente importante que as investigações futuras desse trabalho sejam voltadas para o isolamento e identificação dos produtos biotransformados, bem como uma melhor análise destes possíveis produtos com técnicas cromatográficas mais eficientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, A. L. A. et al. π -Face selectivity from Bioreductions of 2-endo- substituted norbornan-7-ones by *Beauveria densa* and *Curvularia lunata*. **Rev. Eletrônica de Farmácia**, v.3, p 1-6, 2006.

ARYAEIAN, N.; TAVAKKOLI, H. Ginger and its Effects on Inflammatory Diseases. **Advances in food technology and nutritional sciences**, v.1, p.-97-100, 2015.

BERNARD, M. et al. Differential Inhibition of T Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis by [6]-gingerol, [8]-Gingerol, and [10]-gingerol. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 1707–1713, 2015.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008. 350f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRITANNICA, Encyclopaedia."antibiotic."BritannicaAcadem ic. Encyclopædia Britannica Inc., 2016. Acesso em 28 de agosto de 2018. Disponível em: <<http://academic-ebbritannica.ez35.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/27751/antibiotic>>.

CHAKRABORTY, D. et la. [6]-gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 34–43, 2012.

DE BEER, Z. W. et al. *Hawksworthiomyces* gen. nov.(Ophiostomatales), illustrates the urgency for a decision on how to name novel taxa known only from environmental nucleic acid sequences (ENAS). **Fungal Biology**, v. 120, n. 11, p. 1323-1340, 2016b.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and Ophiostoma: solution to a problematic relationship. **Studies in mycology**, v. 83, p. 165-191, 2016a.

DE SOUZA, D. D. **Bioidroxilação de substratos orgânicos utilizando o fungo endofítico *Curvularia* sp.** 2008. 81f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. Araraquara, 2008.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ S. Descoberta microbiológica de medicamentos: 80 anos de progresso. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5 – 16, 2009.

FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**, 6a. ed., Springer: New York, 2011.

FERNANDES, E. G. et al. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**. v. 181, p. 84-92, 2015.

FUNK, J.L. et al. Comparative Effects of Two Gingerol-Containing *Zingiber officinale* Extracts on Experimental. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 403-407, 2009.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 7, p. 119-136, 2017.

HOSOKAWA, M.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Conidium morphology of *Curvularia geniculata* and allied species. **Mycoscience**. v. 44, p. 227-237, 2003.

JAPANESE. **PHARMACOPOEIA**. Society of Japanese Pharmacopoeia. Amended Chapters. The Minister of Health, Labor, and Welfare. v. 35, n. 1, 2007

JARETT, L.; SONNENWIRTH, A. C. Gradwohl's and parasitic infections, 7th ed. **American Public Health Association**, Washington, D.C. 1980.

JOLAD, S. D. et al. Gengibre fresco cultivado organicamente (*Zingiber officinale*): Composição e efeitos na produção de PGE2 induzida por LPS. **Fitoquímica**. v. 65, p. 1937-1954, 2004.

KANIA C. E. **Isolamento e identificação de fungos isolados do café (*caffea arabica* L.) produzido por sistema orgânico e convencional da variedade iapar.** 2004. 59f. Monografia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo. Agronômica Ceres. v. 2. 2005.

KUNINAGA, S. et al. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**. v. 32, p. 237-243, 1997.

KUSARI, S. et al. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**. v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

MACIEL, C. do C. S. **Produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante por *Curvularia luneta* (UFPEDA885), usando óleo diesel como substrato**. 2010. 142f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em biologia de fungos. Recife, 2010.

MANAMGODA, D. S. et al. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* Complex. **Fungal diversity**, v. 51, n. 1, p. 131-144, 2012a.

MANAMGODA, D. S. et al. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. **Phytotaxa**, v. 212, n. 3, p. 175-198, 2015.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; HYDE, K. D. **Dois novas espécies de *Curvularia* do norte da Tailândia**. **Sydowia**. v.64, p. 255-266, 2012b.

MARQUES, R. de A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaceae)**. 2007. 132f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza. 2007.

MATOS, I. L. de. **Biotransformação de derivados de flavonoides empregando fungos derivados de ambiente marinho**. 2018. 215f. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos. São Carlos-SP, 2018.

MCKENZIE, E. *Curvularia luneta*. Figura. 2013. Acesso em: 18 de janeiro de 2019. Disponível em: <PaDIL - <http://www.padil.gov.au>>.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária, 1993.

MISCHIATTI, K. L. **Biotransformação e avaliação das atividades leishmanicida e anti-inflamatória de alcaloides quinolínicos e derivados.** 2016. 81f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba. 2016.

MOURÃO, D. de S. C. et al. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. Agente causal da mancha foliar do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo.** v.16, n.1 p. 1-12, 2017.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, V. 8, n. 19, p. 4321 – 4325, 1980.

PAIVA, J. R. de. **Estudo do potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* na biotransformação de produtos naturais.** 2014. 73f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza. 2014.

PAMPFILE, J. A. et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ.** v. 53, n. 1, p. 113-119, 2017.

PANDEY, S. et al. First report of *Curvularia malucans* causing severe leaf necrosis of *Curculigo orchoides* in India. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v. 4, n. 2, p. 176-178, 2014.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.

RODRIGUES, F. A. de P. **[6]-Gingerol e [10]-gingerol modulam as alterações renais promovidas por modelo polimicrobiano de septicemia em ratos.** 2017. 162f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza. 2017.

CientIC: Classificação dos Fungos., 2004. Acesso em: 18 de janeiro de 2019. Disponível em: <https://www.cientic.com/tema_fungo_img3.html>.

SARAIVA, N. N. **Estudo químico do fungo antagonista *Trichoderma harzianum*.** 2009. 127f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza. 2009.

SEABROOKS, L.; HU, L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 4, p. 409-426, 2017.

ŠNAJDR, J. et al. Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, n. 1, p. 80-90, 2011.

STRAUCH, M. A. et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, p. 50-58, 2012.

SUN, G. et al. Species separation in *Curvularia "geniculata"* group inferred from Brnl gene sequences. **Mycoscience**. v. 44, p. 239-244, 2003.

SYNYTSYA, A. et al. Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 7, p. 257–261, 2016.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TURNER, M. K. **Em Perspectives in Biotransformations; Rehm, H.-J.; Reed G.** 1ª ed., cap. 1. Wiley-Verlag: Weinheim, 1998.

VEZINA, C. Biotransformation. In: Basic Biotechnology. Bu`lock, J. and Kriistiansen, B. (eds). **Academic Press**, v. 1, p.463-482, 1987.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR Protocols** eds. Orlando, Florida: Academic Press. p. 315–322, 1990.

ZERMEÑO, F. Ergotamina. **Arch Neurocien**. México. v. 9, n. 3, 2004.