

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora
brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp e avaliação da
atividade antibacteriana

UBERLÂNDIA

2019

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp e avaliação da atividade antibacteriana

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F315i
2019 Felisbino, John Kenedy Rodrigues Pereira, 1991-
Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp e avaliação da atividade antibacteriana [recurso eletrônico] / John Kenedy Rodrigues Pereira Felisbino. - 2019.

Orientadora: Raquel Maria Ferreira Sousa.

Coorientador: Alberto de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.349>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Fungos. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Espectrometria de massa. I. Sousa, Raquel Maria Ferreira, 1981- (Orient.). II. Oliveira, Alberto de, 1979- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 299/PPQUI.

DATA: 27/02/2019

DISCENTE: John Kenedy Rodrigues Pereira Felisbino

MATRÍCULA: 11712QMI005

TÍTULO DO TRABALHO: Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium sp* e avaliação da atividade antibacteriana.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

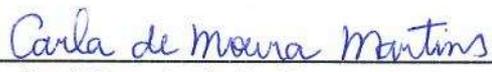
LINHA DE PESQUISA: Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido

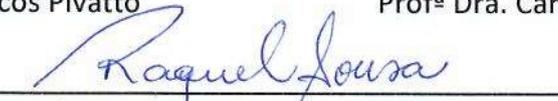
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos

Às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Sala de Reuniões do Instituto de Química da UFU, Bloco 1D, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Marcos Pivatto, Universidade Federal de Uberlândia, Profª Dra. Carla de Moura Martins, Instituto Federal Goiano e Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Marcos Pivatto


Profª Dra. Carla de Moura Martins


Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp e avaliação da atividade antibacteriana

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 27 de fevereiro de 2019

Banca examinadora:

Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa
(Orientadora – UFU)

Prof. Dr. Marcos Pivatto
(Examinador – UFU)

Prof. Dra. Carla de Moura Martins
(Examinadora – Instituto Federal Goiano)

A Deus.

Aos meus pais Edson e Ana Maria.

A minha querida noiva, Laura.

Aos meus irmãos Edna Priscila (In memoriam), Johnathan e Ediane.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ajudar na execução deste trabalho.

À minha professora Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, pela orientação, paciência, ensinamentos e confiança.

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira, pela coorientação e pelos ensinamentos nas aulas de orgânica avançada e na disciplina de estágio à docência.

Aos professores Dr. Bruno Sérgio Vieira e Dra. Ana Carolina Siqueroli e da mestranda Neiliane Silva, UFU de Monte Carmelo, que prepararam os caldos e micélios de fungos utilizados neste trabalho.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, pelos ensinamentos, principalmente nos momentos de desespero.

Ao Prof. Dr. Roberto Chang, que se mostrava humanitário (principalmente nos aniversários), além de nos socorrer nas adversidades do laboratório.

Ao professor Dr. Ricardo R. Soares da Engenharia Química da UFU pela utilização do CG-EM.

Ao professor Carlos Henrique Gomes Martins, UNIFRAN, e seus colaboradores Maria Anita Lemos Vasconcelos Ambrosio e João Matias de Souza, pelos testes biológicos.

Ao Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz, pelos ensinamentos na disciplina de química dos produtos naturais, e pelo apoio extra sala, e extra laboratório.

Ao Magayver do Instituto de Química da UFU, pelas análises de RMN.

Aos amigos do NuPPE: Rafael, Tiara, Marcus, Flávia, Vanessa, Thamires, Marília, Diego, Domingos, Michelle, Mário pelo companheirismo, amizade e ajuda na utilização de todos os softwares necessários para elucidação de substâncias orgânicas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Muñoz, coordenador da Pós-Graduação do Instituto de Química, que desde o início se empenhou na minha chegada e fixação no programa.

Aos meus pais, Edson e Ana Maria, pelo apoio, dedicação e incentivo à minha formação.

Aos meus irmãos por serem meus presentes de vida, e motivo para minha luta por um futuro melhor.

As minhas sobrinhas por me descontraírem em momentos tensos de estudos.

A minha noiva, Laura Ravenna por estar comigo em todo o tempo, e por me motivar a lutar por bons ideais.

À FAPEMIG (APQ01392-14 A.O., APQ02481-14 M.P e APQ02342-18 R.M.F.S, CEX-RED00010-14 Rede Mineira), CAPES e CNPq (449846/2014-8M.P) e pelos incentivos com as bolsas e projetos aprovados.

E por fim, ao Instituto de Química da UFU e ao seu Programa de Pós-Graduação em Química, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dentre os organismos estudados na química dos produtos naturais, os fungos podem ser destacados devido às várias aplicações benéficas ao homem, como a atividade antibacteriana. Os fungos se diferenciam por suas características físicas e pelo tipo de hospedeiro que utiliza para sua sobrevivência. Os fungos estudados neste trabalho foram *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp., que são classificados como entomopatogênicos, e *Cercospora brachiata* que é fitopatogênico. Os danos que estes fungos causam em seus hospedeiros estão relacionados diretamente com os metabólitos produzidos. Com o intuito de conhecer mais sobre estes compostos, este trabalho teve como objetivos identificar, isolar e caracterizar as substâncias presentes nos extratos de caldos de crescimentos e de micélios destes fungos, por meio das técnicas de cromatografia (CC: cromatografia em coluna e CG-EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) e ressonância magnética nuclear (RMN). A atividade antibacteriana dos extratos também foi avaliada. Entre os compostos identificados, destacam-se os ácidos graxos, ésteres e esteroides por estarem associados a várias atividades biológicas. Dentre os ácidos identificados, aqueles que foram identificados em maior concentração nos extratos foram: ácido hexadec-9-enóico, ácido hexadecanóico, ácido oleico, ácido octadecanóico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido docos-13-enóico, ácido esteárico, ácido linoleico e ácido nonadecanóico. Além dos ácidos identificados foram isolados os esteroides ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol e brassicasterol. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Foram encontrados valores de concentração inibitória mínima (CIM) promissores para o extrato em acetato de etila dos micélios de *C. brachiata* contra a bactéria *Actinomyces naeslundii* (CIM = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e do extrato em acetato de etila do caldo de crescimento de *B. bassiana* contra as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (CIM = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos e fitopatogênicos; Metabólitos secundários; Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; CG-MS; Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Among the organisms studied in the chemistry of natural products, fungi can be highlighted due to the various applications beneficial to man, such as antibacterial activity. Fungi differ by their physical characteristics and by the type of host they use for their survival. The fungi studied in this work were *Beauveria bassiana* and *Verticillium* sp., which are classified as entomopathogenic, and *Cercospora brachiata* which is phytopathogenic. The damages that these fungi cause in their hosts are directly related to the metabolites produced. In order to know more about these compounds, the objective of this work was to identify, isolate and characterize the substances present in extracts of broths of growths and mycelia of these fungi, using chromatography techniques (CC: column chromatography and GC-MS: gas chromatography coupled to mass spectrometry) and nuclear magnetic resonance (NMR). The antibacterial activity of the extracts was also evaluated. Among the identified compounds, fatty acids, esters and steroids stand out because they are associated with several biological activities. Among the identified acids, those that were identified in the highest concentrations in the extracts were: hexadec-9-enoic acid, hexadecanoic acid, oleic acid, octadecanoic acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, docos-13-enoic acid, stearic acid, linoleic acid and nonadecanoic acid. In addition to the identified acids, ergoster-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol and brassicasterol steroids were isolated. The antibacterial activity was evaluated by the broth microdilution method. Prominent values of the minimum inhibitory concentration (MIC) were found for the ethyl acetate extract of the mycelia of *C. brachiata* against the *Actinomyces naeslundii* (MIC = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the ethyl acetate extract of the growth broth of *B. bassiana* against the *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* (MIC = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Keywords: Entomopathogenic and phytopathogenic fungi; Secondary metabolites; Gas chromatography coupled to mass spectrometry; GC-MS; Antibacterial activity.

Lista de Figuras

Figura 1:	Compostos presentes no extrato das cascas de pau-pereira: a) geissospermina, b) geissosquizina e c) geissosquizolina.....	17
Figura 2:	Brazilina.....	18
Figura 3:	Compostos isolados do óleo essencial de canela: a) cinamaldeído e b) eugenol.....	19
Figura 4:	Fórmulas estruturais: a) morfina, b) quinina e c) estriquinina.....	19
Figura 5:	Placa de Petri com crescimento das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> cultivada por Fleming e contaminada com <i>Penicillium notatum</i>	20
Figura 6:	Fórmula estrutural da penicilina G.....	21
Figura 7:	Propaganda de penicilina no século XIX.....	22
Figura 8:	<i>Cercospora cf. chenopodii</i> (CPC 10304). A: planta infectada; B: necrose; C-E: conidióforos; F-I: conídios.....	25
Figura 9:	Cercosporiose ou olho-pardo na folha e no fruto do café provocada pelo fungo <i>Cercospora coffeicola</i>	26
Figura 10:	Toxina cercosporina.....	27
Figura 11:	Modo de ação da cercosporina.....	28
Figura 12:	Compostos isolados de fungos do gênero <i>Cercospora</i>	29
Figura 13:	Inseto hospedado por <i>Beauveria bassiana</i>	30
Figura 14:	Conídios e conidióforos do fungo <i>Verticillium</i> sp.....	31
Figura 15:	Compostos isolados do fungo <i>Beauveria bassiana</i>	32
Figura 16:	Compostos isolados dos fungos do gênero <i>Verticillium</i>	33
Figura 17:	Coluna cromatográfica usada para separação de componentes do extrato hexano dos micélios de <i>C. brachiata</i>	35
Figura 18:	Fluxograma de análises dos extratos de <i>Verticillium</i> sp.....	37
Figura 19:	Fluxograma de análises dos extratos de <i>B. bassiana</i>	38
Figura 20:	Fluxograma de análises dos extratos de <i>C. brachiata</i>	39

Figura 21: Fluxograma do fracionamento da fração hexano dos micélios de <i>Cercospora brachiata</i>	43
Figura 22: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração hexano dos micélios do fungo <i>C. brachiata</i>	47
Figura 23: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em AcOEt do caldo de crescimento de <i>Beauveria bassiana</i> : a) pH 7 e b) pH 5.....	50
Figura 24: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em a) hexano e b) AcOEt dos micélios de <i>Beauveria bassiana</i>	51
Figura 25: Compostos identificados nos extratos de <i>B. bassiana</i> . A) e B) correspondem as extrações em AcOEt do caldo de crescimento com pH 7 e 5; C) e D) são extrações dos micélios em hexano e AcOEt, respectivamente. Nos domínios em vermelho estão as moléculas que são comuns em mais de um extrato.....	56
Figura 26: Cromatogramas (CG-EM) do extrato em AcOEt do caldo de crescimento de <i>Verticillium</i> sp.: a) pH 7 e b) pH 5.....	58
Figura 27: Compostos identificados no extrato em AcOEt do caldo de crescimento de <i>Verticillium</i> sp.: E) pH 7 e F) pH 5.....	60
Figura 28: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em AcOEt (pH 5) do caldo de crescimento de <i>Cercospora brachiata</i>	61
Figura 29: Cromatogramas (CG-EM) das frações fração em a) AcOEt e b) em hexano dos micélios de <i>Cercospora brachiata</i>	62
Figura 30: Compostos identificados nos extratos e frações do fungo <i>Cercospora brachiata</i> , G: extrato AcOEt do caldo de crescimento; H e I: frações AcOEt e hexano dos micélios, respectivamente.....	65
Figura 31: Alguns ácidos graxos e ésteres de ácidos comuns nos fungos <i>B. bassiana</i> , <i>Verticillium</i> sp e <i>C. brachiata</i>	67
Figura 32: Núcleo fundamental dos esteroides.....	68
Figura 33: Estrutura do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	70
Figura 34: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do ergosta-	

6,22-dien-3 β , 5 α , 8 α -triol.....	72
Figura 35: Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl ₃) do composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	73
Figura 36: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	74
Figura 37: Estrutura do brassicasterol.....	76
Figura 38: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do brassicasterol	78
Figura 39: Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl ₃) do composto brassicasterol.....	79
Figura 40: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do brassicasterol.....	80
Figura 41: Espectro de massas obtido por CG-EM do composto brassicasterol.....	81
Figura 42: Propostas de fragmentação do brassicasterol.....	82
Figura 43: Espectro de massas obtido por CG-EM do composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	82
Figura 44: Propostas de fragmentação do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	83

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Tempo de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-EM.....	42
Tabela 2:	Massa obtida dos extratos e frações de <i>Verticillium</i> sp, <i>B. bassiana</i> e <i>Cercospora brachiata</i>	46
Tabela 3:	Compostos identificados por CG-EM dos extratos do fungo <i>Beauveria bassiana</i>	52
Tabela 4:	Compostos identificados por CG-EM do fungo <i>Verticillium</i> sp.....	59
Tabela 5:	Compostos identificados por CG-EM do fungo <i>Cercospora brachiata</i>	63
Tabela 6:	Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do Ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol e comparação com a literatura.....	71
Tabela 7:	Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do composto brassicasterol em comparação com a literatura.....	77
Tabela 8:	Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de fungos contra bactérias aeróbicas.....	84
Tabela 9:	Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de fungos contra bactérias anaeróbicas.....	85
Tabela 10:	Atividade antibacteriana dos metabólitos de <i>B. bassiana</i> ..	86

Lista de abreviaturas e siglas

AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-DIC	Cromatógrafo gasoso acoplado a detector por ionização de chama
CG-EM	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL ₅₀	Concentração letal para matar 50% das larvas
DHA	Ácido docosahexanóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPA	Ácido eicosapentanóico
EPO	Óleo de primula
GLA	Ácido gama linoleico
IA	Índice aritmético
IS	Índice de similaridade
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
NuPPeN	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais
PA	Pureza Analítica
PNs	Produtos Naturais
MM	Massa Molecular
MVA	Ácido mevalônico
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV	Ultravioleta

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO	16
1.1	Produtos naturais.....	16
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	<i>Cercospora</i> : breve histórico e metabólitos já isolados.....	24
2.2	Principal metabólito secundário do gênero <i>Cercospora</i> , responsável pela cercosporiose.....	26
2.2.1	Outros metabólitos secundários do gênero <i>Cercospora</i>	28
2.3	<i>Beauveria bassiana</i> e <i>Verticillium</i> sp: fungos entomopatogênicos.....	29
2.3.1	<i>Beauveria bassiana</i>	30
2.3.2	<i>Verticillium</i> sp.....	30
2.3.3	Metabólitos secundários isolados dos fungos dos gêneros <i>Beauveria</i> e <i>Verticillium</i>	31
3.0	OBJETIVO	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4.0	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.1	Materiais.....	35
4.2	Equipamentos.....	36
4.2.1	Liofilizador.....	36
4.2.2	Rotoevaporador.....	36
4.2.3	CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.....	36
4.2.4	RMN: Ressonância Magnética Nuclear.....	36
4.3	Cultivo dos Fungos.....	37
4.3.1	<i>Verticillium</i> sp.....	37
4.3.2	<i>Beauveria bassiana</i>	38
4.3.3	<i>Cercospora brachiata</i>	39
4.4	Extração líquido-líquido.....	40
4.4.1	Extrato do caldo de <i>Verticillium</i> sp e <i>Beauveria bassiana</i>	40
4.4.2	Extrato do caldo de <i>Cercospora brachiata</i>	40

4.4.3	Extrato dos micélios dos fungos <i>B.bassiana</i> e <i>C. brachiata</i>	40
4.5	Prospecção dos compostos presentes nos extratos dos caldos e micélios dos fungos.....	41
4.6	Identificação dos compostos por CG-EM.....	41
4.7	Fracionamento por cromatografia em coluna dos compostos presentes na fração em hexano dos micélios de <i>Cercospora brachiata</i>	42
4.8	Atividade antibacteriana.....	44
4.8.1	Determinação da atividade antibacteriana dos extratos frente às bactérias bucais aeróbias e anaeróbias.....	44
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1	Massas dos caldos e frações.....	46
5.2	Fracionamento cromatográfico.....	47
5.3	Compostos identificados por CG-EM.....	47
5.3.1	CG-EM para os extratos do fungo <i>Beauveria bassiana</i>	49
5.3.2	CG-EM para os extratos do fungo <i>Verticillium</i> sp.....	57
5.3.3	CG-EM para os extratos do fungo <i>Cercospora brachiata</i>	61
5.3.4	Relevância dos ácidos graxos e esteroides.....	66
5.4	Elucidação por RMN das substâncias isoladas da fração hexano dos micélios de <i>C. brachiata</i>	68
5.4.1	Elucidação estrutural do composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	68
5.4.2	Elucidação estrutural do composto brassicasterol.....	75
5.5	Fragmentação por CG-EM dos compostos brassicasterol e ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	81
5.6	Atividade antibacteriana.....	83
6.0	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90
Apêndice 1-	RMN de ¹ H (400 MHz-CDCl ₃) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.....	97
Apêndice 2-	RMN de ¹ H (400 MHz-CDCl ₃) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-A).....	98
Apêndice 3-	RMN de ¹ H (400 MHz-CDCl ₃) para o composto	

	ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-B).....	99
Apêndice 4-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-A)	100
Apêndice 5-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-B).....	101
Apêndice 6-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-C).....	102
Apêndice 7-	RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol.....	103
Apêndice 8-	RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-A).....	104
Apêndice 9-	RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-B).....	105
Apêndice 10-	RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-C).....	106
Apêndice 11-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão-A).....	107
Apêndice 12-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão-B).....	108
Apêndice 13-	DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão-C).....	109

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

Definições mais abrangentes dizem que produtos naturais (PN) são todos os compostos produzidos por seres vivos. Entretanto existem definições mais restritas que dizem que PNs são moléculas pequenas produzidas por seres vivos (PYE et al., 2017). Os PNs geralmente têm atividade biológica que pode ser usada na descoberta ou desenvolvimento de compostos com potencial farmacológico.

Na busca por estes compostos Ezequiel Corrêa dos Santos (1801-1864), um brasileiro e boticário de formação, estudou uma planta que era popularmente utilizada contra febres, conhecida como “pau-pereira” (SANTOS, 2007). Desta planta, isolou um “caldo” de alcaloides, que pelo seu entender tratava-se de uma única substância, e o denominou de “pereirina” (ALMEIDA et al., 2009). Esta substância foi “o primeiro alcaloide isolado no Brasil”.

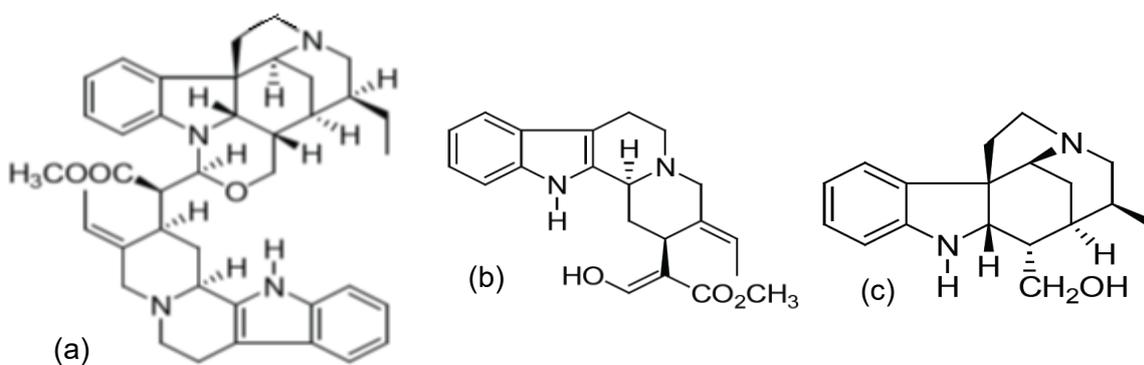
Apesar de Ezequiel afirmar que havia isolado uma única substância, outros pesquisadores investigaram sobre esta proposição, e averiguaram que o extrato continha na verdade mais de um composto. De acordo com Almeida e colaboradores (2009) (FERREIRINHA, 1884 *apud* ALMEIDA et al., 2009), as características demonstradas pelo pó denominado como pereirinha não correspondiam a uma substância pura, já que não possuía aspecto cristalino.

Motivado por estes argumentos, o aluno Daniel Henninger da Faculdade politécnica do Rio de Janeiro, propôs em 1975 um método para isolar a substância bioativa do pau-pereira. Para o aluno, a coloração escura do pó era nada mais que o alcaloide na forma oxidada (ALMEIDA et al., 2009).

Segundo Nina (1883, *apud* ALMEIDA et al., 2009), foram realizados vários estudos sobre a pereirina, na tentativa de isolar o principal componente e submetê a avaliação da atividade biológica. Estes estudos se justificavam pelo fato do composto mencionado ser vendido como medicamento na forma de cloridrato, sendo recomendado pelos médicos para reduzir febre. Entre eles, o médico e pesquisador Domingos Freire foi o primeiro a propor a fórmula molecular da pereirina ($C_7H_{21}NO_{10}$), que mais adiante foi contestada pela experimentação de outros cientistas (NINA, 1883 *apud* ALMEIDA et al., 2009).

Em 1877, o pesquisador Hesse na Alemanha definiu a fórmula molecular da pereirina como $C_{19}H_{24}N_2O$, portanto diferente daquela proposta por Domingos Freire (NINA, 1883 apud ALMEIDA et al., 2009). Além disso, Hesse isolou um outro alcaloide da casca do pau-pereira e que o nomeou de geissospermina. Em 1958, Henry Rapoport e colaboradores isolaram cristais da geissospermina por meio de fracionamento em diferentes pHs do extrato bruto das cascas da planta definiram a fórmula molecular como sendo $C_{40}H_{48}N_4O_3$, que mais tarde, através das técnicas de difração de raios X e RMN, chegou-se a fórmula estrutural mostrada na Figura 1a (RAPOPORT et al., 1958 apud ALMEIDA et al., 2009). A geissospermina é o alcalóide majoritário presente no extrato. Logo, acredita-se que a pereirina, a qual Ezequiel acreditava ser um composto puro, trata-se na verdade de uma mistura dos alcaloides geissosquizina e geissosquizolina. Que possivelmente eram oriundos da clivagem ácida da geissospermina, uma vez que no procedimento realizado havia a presença de ácido sulfúrico (ALMEIDA et al., 2009).

Figura 1: Compostos presentes no extrato das cascas de pau-pereira: a) geissospermina, b) geissosquizina e c) geissosquizolina.



Fonte: Almeida e colaboradores (2009).

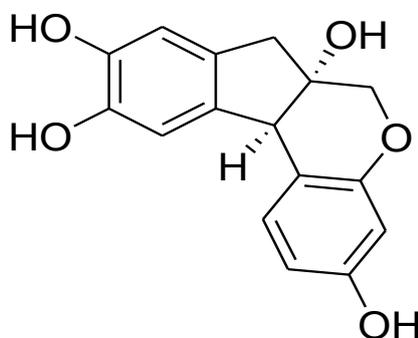
O caso da pereirina foi um entre vários que destacam a flora brasileira como uma fonte de compostos bioativos o que mostra a importância dos estudos com PNs. Em sua tese de doutoramento intitulada “Ervas que curam, da Terra das Ervanárias à produção de plantas medicinais e de conhecimento”, Elsa do Céu faz relatos sobre o uso das plantas medicinais em tempos remotos. Plantas usadas pelos índios, e em trabalhos ritualísticos dos pagãos,

das quais pode se extrair uma gama considerável de conhecimento (MATEUS, 2014).

No Brasil há uma planta cujo nome foi usado para dar nome ao país, o “pau-brasil”. Esta já era conhecido na França e na Itália com os respectivos nomes bressil e bracili desde o século XI (RIZZINI; MORS, 1976). Explorado por muitos anos, ainda no descobrimento do Brasil, começou a busca pelos componentes desta planta, que eram capazes de tingir com uma cor vermelha marcante (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017).

Os índios que povoavam a América Latina na época da colonização possuíam conhecimentos tradicionais, que foram explorados pelos colonizadores, entre estes saberes, permeavam o conhecimento dos tingimentos. Os índios eram capazes de tingir não somente a pele, mas também algodão. Um dos componentes para tingir os tecidos era extraído do pau-brasil, colorindo de vermelho o que se desejava colorir (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017). A molécula responsável pela coloração é conhecida como brazilina (WANG et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2: Brazilina.



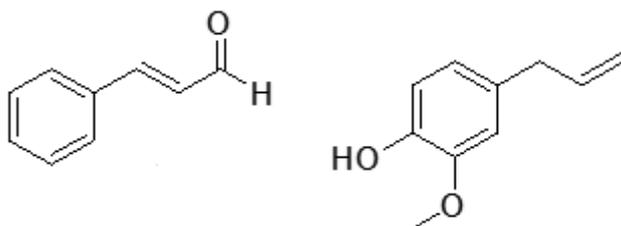
Fonte: Wang e colaboradores (2013).

A exploração do pau-brasil por parte dos colonizadores gerou uma crise botânica dessa espécie, provocando praticamente a sua extinção (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017). Como na época, praticamente não era possível produzir corantes, o meio mais acessível era a extração de fontes naturais.

Neste período de colonização, as plantas usadas como especiarias também eram alvo de interesse pelos colonizadores. Como, por exemplo, a canela que era apreciada pelo seu sabor adicional nos alimentos e por ser um

conservante natural, já que na época muitos alimentos consumidos se encontravam em estado avançado de deterioração (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017). Em 2016, Cardoso, López e Sosa relataram um estudo em que mostraram a composição do óleo essencial da canela. Entre seus principais constituintes estão o cinamaldeído e o eugenol, responsáveis pelo aroma e sabor característico de canela (Figura 3).

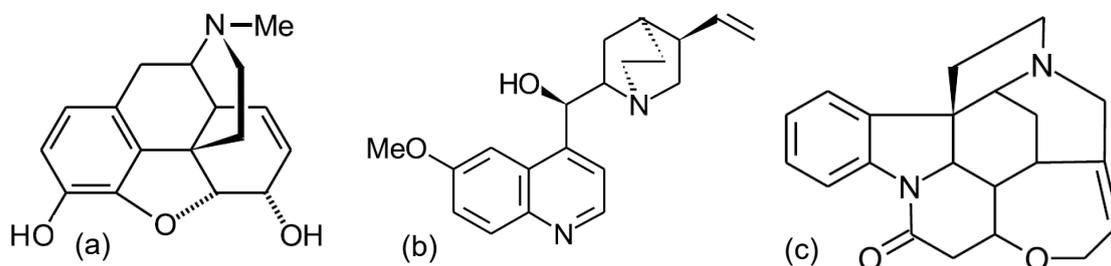
Figura 3: Compostos isolados do óleo essencial de canela: a) cinamaldeído e b) eugenol.



Fonte: o autor.

Os séculos posteriores ao da colonização foram de avanço na química dos PNs. Com destaque ao século XIX, por marcar o início do isolamento dos compostos de origem natural. Entre estas substâncias, se destacaram a morfina, quinina e estriquinina (Figura 4) (PINTO et al., 2002). Apesar de pertencer a mesma classe de alcaloides, as substâncias possuem propriedades biológicas diferentes. Como exemplo a quinina, proveniente da árvore de quina, que curava pessoas com malária (ARANGO, 1949).

Figura 4: Fórmulas estruturais: a) morfina, b) quinina e c) estriquinina.



Fonte: adaptado de Pinto e colaboradores (2002).

O desenvolvimento dos estudos sobre a árvore de quina demonstra que os conhecimentos populares podem ser guias para a ciência. Como no caso

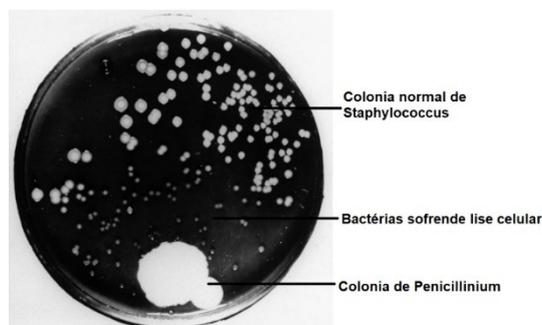
dos índios que observaram que os animais doentes com febres eram curados ao beberem águas nas quais eram mergulhadas cascas de quina. Durante as guerras, um soldado espanhol com malária foi curado ao beber da água de um lago que tinha cascas de quina (ARANGO, 1949).

Assim, com o passar dos anos se fundamentou a química dos PN's. Nela, é possível identificar, isolar e caracterizar compostos (bioativos ou não) produzidos por seres vivos. Nesta perspectiva a química de PN's pode estar tanto relacionada à fitoquímica, como também a outros tipos de organismos, como os fungos e bactérias.

No ano de 1928 no hospital St. Mary, na cidade de Londres, o médico e pesquisador Alexander Fleming fez uma das maiores descobertas para a medicina moderna, descobriu um agente capaz de inibir o crescimento bacteriano denominado de penicilina. Anteriormente a isto, Fleming descobriu em 1922 a lisozima, uma enzima capaz de inibir a ação inflamatória das bactérias (PEREIRA; PITA, 2005).

Pelos relatos da literatura, ao retornar ao seu laboratório de pesquisas após um período de férias, este pesquisador notou que as placas com culturas de bactérias *Staphylococcus aureus* continham algumas alterações interessantes, o que ele chamou de bolores. Estes bolores eram fungos, que haviam se propagado entre as placas das bactérias. Ao invés de descartar suas amostras de pesquisa, Fleming notou que ao redor do bolor, não havia bactérias (PEREIRA; PITA, 2005), o que o levou a concluir que aquele bolor produzia substâncias capazes de inibir a ação das bactérias (Figura 5).

Figura 5: Placa de Petri com crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* cultivada por Fleming e contaminada com *Penicillium notatum*.

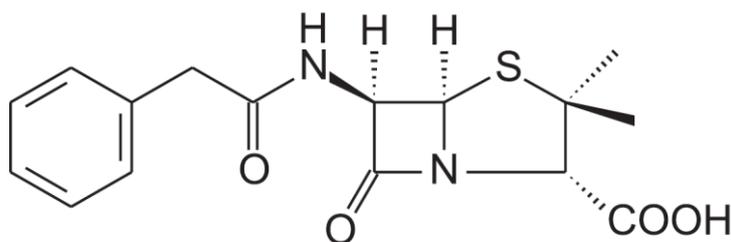


Fonte: adaptada de www.nationalww2museum.org/sites/default/files/2017-07/thanks-to-penicillin-lesson.pdf.

Em sua pesquisa descobriu que o bolor era um fungo denominado de *Penicillium notatum*, e que o mesmo era uma espécie de bolor das mais de 60 possíveis dentro do gênero. Descobriu também, que somente esta era capaz de produzir uma substância que inibia o crescimento da bactéria. À substância denominou de penicilina, e em 1945, Alexander Fleming ganhou o prêmio Nobel de medicina e fisiologia (PEREIRA; PITA, 2005).

Os pesquisadores Howard Florey, Ernst Chain e Norma Heatley, dedicaram ao estudo da penicilina, inclusive estudos que refaziam as metodologias de Fleming. Nestes estudos incluíram a purificação e a elucidação estrutural da substância. Em 1940, na Universidade de Oxford, estes pesquisadores conseguiram isolar e purificar a penicilina G (Figura 6).

Figura 6: Fórmula estrutural da penicilina G.



Fonte: adaptada de Oliveira e colaboradores (2009).

A penicilina se tornou um dos fármacos mais comercializados na época de sua descoberta, por possuir grande potencial contra doenças infecciosas. Foi utilizada pelos soldados na primeira guerra mundial (GRUMACH; FERRARONI, 2006), que eram acometidos por doenças provocadas por bactérias, que se proliferavam em ambientes úmidos, ambiente onde os soldados estavam submetidos. A comercialização da penicilina era divulgada em jornais como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7: Propaganda de penicilina no século XIX.



Fonte: <https://torredbabel.blogspot.com/2011/06/a-importancia-da-penicilina-durante-a-99669.html>.

Para Grumach e Ferraroni (2006), pesquisadoras brasileiras da área médica, a penicilina foi um grande marco na medicina. E não salvou apenas soldados da primeira guerra mundial, mas tem salvado a vida de milhares de pacientes atualmente, inclusive pacientes que contraem doenças sexualmente transmissíveis, como por exemplo a sífilis.

Estudos sobre os metabólitos produzidos por fungos, tem se intensificado nos últimos anos, sendo uma área importante da química de PNs. Os metabólitos secundários produzidos por estes seres podem ser aplicados em diferentes vertentes de pesquisas como agentes bactericidas, fungicidas, inseticidas, etc.

Os fungos podem ser classificados de acordo com o tipo de hospedeiro. Fungos que se hospedam em insetos são denominados de entomopatogênicos, como os fungos *Beauveria bassiana* e *Verticillium sp* (GARCIA, 2004). Enquanto os fungos que usam plantas como hospedeiros são denominados de endofíticos (vivem em simbiose com as plantas) (MUSSI-DIAS et. al, 2012), e fitopatógenos (que causam lesões e morte da planta hospedada) (TREMACOLDI; FILHO, 2006), a exemplo do fungo *Cercospora brachiata*.

Os componentes extraídos destes organismos são denominados de metabólitos primários ou secundários. Segundo Dewick (2009), existe uma gama de substâncias que são comuns em todos os organismos. Estas substâncias são sintetizadas pelos organismos, formando uma matriz de substâncias comuns, que podem ser encontradas em variados sistemas. Por estas condições são denominadas de metabólitos primários.

Contraopondo a notoriedade dos metabólitos primários, existem os metabólitos secundários, que possuem vias específicas de produção nos organismos vivos, promovendo uma distribuição limitada de compostos entre espécies.

Alguns destes metabólitos são produzidos para razões facilmente apreciadas, por exemplo, como substâncias tóxicas que atuam na defesa contra predadores. Podem atuar como atrativos para as mesmas ou outras espécies, ou como agentes corantes para atrair ou avisar outras espécies. Assim é inquestionável que estes compostos desempenham papel vital para o bem-estar do produtor (DEWICK, 2009).

Esta regra natural de produção dos metabólitos também se aplica aos fungos. Aqueles conhecidos como fitopatogênicos apresentam a habilidade em produzir substâncias tóxicas (chamadas de toxinas) que geralmente apresentam baixa massa molecular (< 1000 Da), e podem causar doenças nas plantas ou também nos hospedeiros que dela se alimentam (TRUCKSESS, 2001).

Há por exemplo, estudos que têm demonstrado a utilização do fungo *Beauveria bassiana* no combate aos insetos *Hypothenemus hampei* (broca-do-café) (NEVES; HIROSE, 2005). Outros estudos mostram a utilização do fungo *Verticillium* sp. no controle biológico de nematoides (praga-do-cafeeiro) (ALARCÓN; CARRIÓN, 1994). Neste sentido, os metabólitos secundários presentes no caldo de crescimento destes fungos são tóxicos a essa espécie de inseto, podendo ser uma fonte alternativa aos inseticidas sintéticos.

Alguns fungos também são prejudiciais às plantas por serem necrotróficos, ou seja, por causar morte da planta depois de hospedar na mesma, por meio de necrose. Um dos gêneros de fungos desta classe é o *Cercospora*, que adoecem a planta pela produção de cercosporinas (toxina), que se ativam ao receberem luz (SHARMA et al., 2012, DAUB; HERRERO;

CHUNG, 2013), provocando cercosporiose nas folhas e frutos (NELSON, 2008), impedindo a fotossíntese. Uma das plantas parasitadas por este fungo é o café, que causa redução da produtividade em até 30% (SANTOS et al. 2008; LIMA; POZZA; SANTOS, 2012). Sendo assim, se faz necessário o estudo dos metabólitos secundários que são produzidos pelo fungo e que causam a morte das plantas, para compreender melhor quais metabólitos afetam no sistema de desenvolvimento da planta.

Outra atividade já comprovada dos fungos, é a capacidade de produzir compostos no seu metabolismo secundário capazes de impedir o crescimento de bactérias, denominada de atividade antibacteriana, como mencionado anteriormente sobre o fungo do tipo *Pinicillium notatum*.

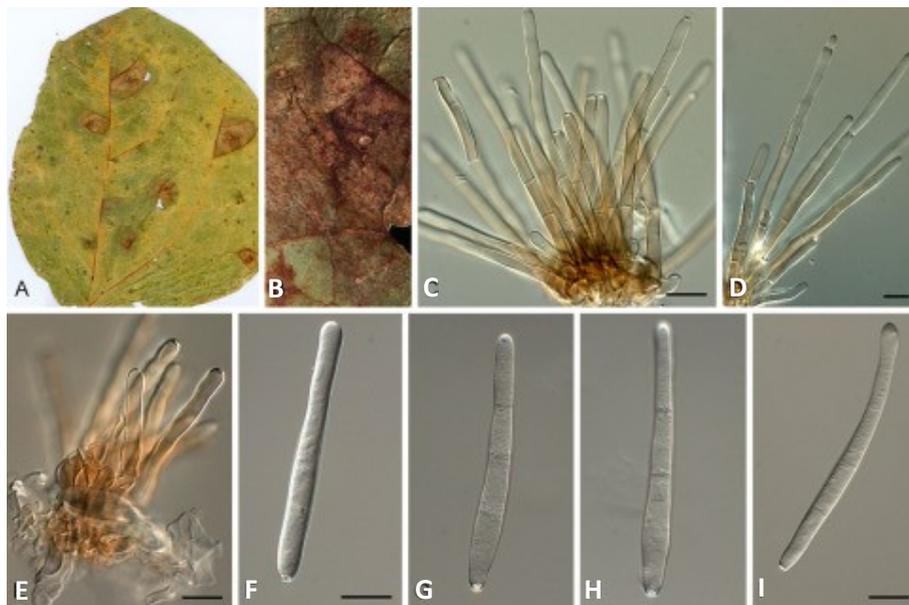
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Cercospora*: breve histórico e metabólitos já isolados

Segundo o site Index Fungorum, existem mais de três mil espécies catalogadas de fungo do gênero *Cercospora* (CROUS; BRAUN, 2003). Estes fungos são estudados diariamente, pois os mesmos estão relacionados a problemas sociais por serem fungos que coexistem nas plantas como seus hospedeiros (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997).

A taxonomia do *Cercospora* em geral segue a seguinte ordem: Reino: fungos, divisão: Ascomycota; classe: Dothideomycetes; ordem: Capnodiales; família: Mycosphaerellaceae; e gênero: *Cercospora*. As várias espécies deste gênero podem ser identificadas pelo formato de seus conídios e conidióforos, que são as estruturas bases dos fungos (WELLES, 1925, CHUPP, 1954, KIM; SHIN, 1999, GROENEWALD et al., 2013) (Figura 8).

Figura 8: *Cercospora cf. chenopodii* (CPC 10304). A: planta infectada; B: necrose; C-E: conidióforos; F-I: conídios.



Fonte: Groenewald e colaboradores (2013).

A resistência deste fungo, fez com que o mesmo se estabelecesse em vários continentes, bem como usassem vários tipos de plantas como hospedeiros (CROUS; BRAUN, 2003, LARTEY; CAESAR-TONTHAT; CAESAR, 2005, BAKHSHI; ARZANLOU; BABAI-AHARI, 2012, GROENEWALD; GROENEWALD; CROUS, 2005), ou seja, está presente em plantas como café, beterraba, milho, acelga, batata yacon, batata-doce, cará, gengibre, inhame, mandioca, mandioquinha-salsa, nabo, rabanete, etc.

Historicamente estes fungos são causadores de sérios problemas, já que ao parasitarem nas plantas são capazes de provocar lesões, denominadas de cercosporiose, mancha-de-olho pardo, mancha-circular, olho-de-pomba ou olho-pardo (Figura 9) (ANDRADE, 2015), e ao se proliferarem reduzem a fotossíntese da planta, prejudicando sua produção e podendo ocasionar sua morte.

Figura 9: Cercosporiose ou olho-pardo na folha e no fruto do café provocada pelo fungo *Cercospora Coffeicola*.



Fonte: https://www.agrolink.com.br/problemas/cercosporiose_1623.html.

Os prejuízos causados por este fungo nas plantas estão relacionados aos seus metabólitos secundários que, por sua vez, são eliminados e depositados sobre as folhas, caule, raízes ou tronco (MARCUIZZO et al., 2015). O estudo químico, portanto, se torna necessário para ser somado ao conhecimento biológico. Enquanto os biólogos sabem explicar as morfologias e as relações de dependência entre hospedeiro e parasita, os químicos podem contribuir estudando as moléculas específicas produzidas por estes fungos.

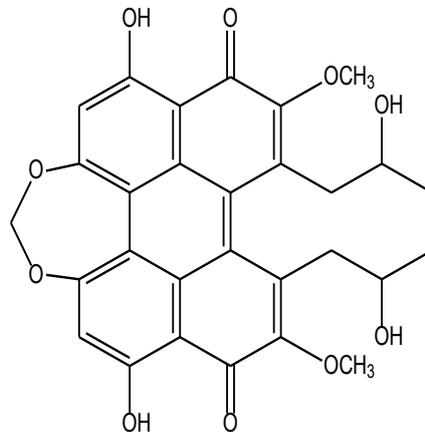
2.2 Principal metabólito secundário do gênero *Cercospora*, responsável pela cercosporiose

Até o momento, o principal metabólito secundário dito como causador da cercosporiose é uma toxina chamada de cercosporina, que auxilia na peroxidação de lipídeos, sensibilizando as paredes celulares das plantas (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005).

Em 2000, Daub e Ehrenshaft, publicaram um estudo elucidando como é possível ocorrer a ativação desta toxina na presença de luz, e quais as consequências ao organismo da planta. Segundo eles, os fungos usam esta

toxina para realizar a patogênese nos hospedeiros. Esta toxina pertence à classe das perilenoquinonas fotoativas, possui cor vermelha (Figura 10) (DAUB; CHUNG, 2007).

Figura 10: Toxina cercosporina.

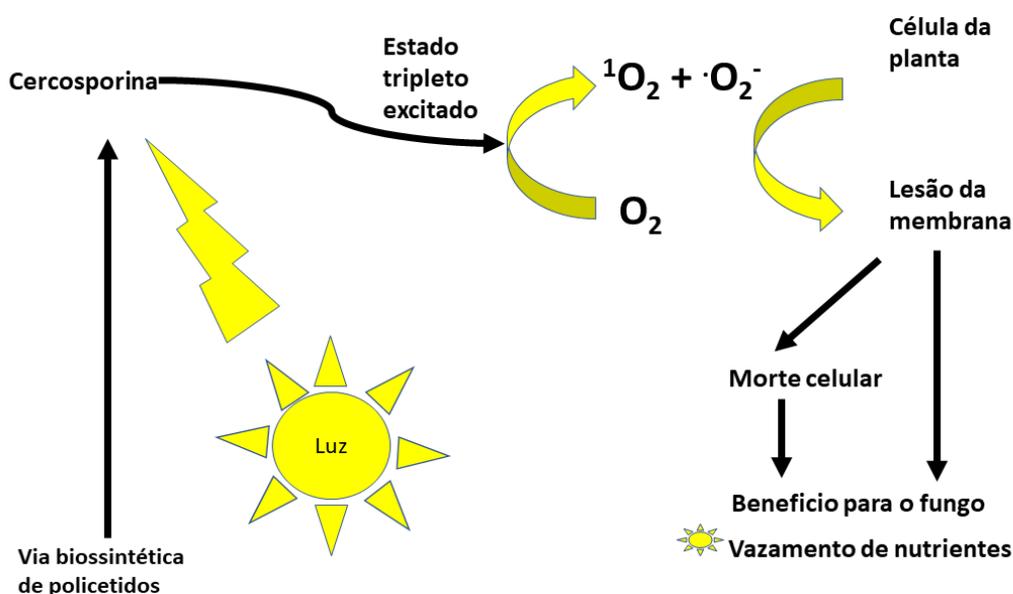


Fonte: o autor.

Como essas toxinas são fotoativadas, elas não são tóxicas sem a ação de luz. Quando recebe luz é convertida para um estado triplo ativado energeticamente. Reagindo com o oxigênio, formando espécies ativas e tóxicas de oxigênio, como oxigênio singlete (1O_2) e superóxido (O_2^-). Essa propriedade classifica a cercosporina como um fotossensibilizador (SPIKES, 1989). A toxicidade dos fotossensibilizadores é devida a danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DAUB; BRIGGS, 1983). Os fotossensibilizadores podem se ligar em diferentes partes das células, por isto podem causar danos em diferentes componentes (VALENZENO; POOLER, 1987).

Para Daub e Chung (2007) o dano causado a membrana celular permite o vazamento de nutrientes para os espaços intercelulares das folhas, permitindo o crescimento de fungos e esporulação (Figura 11), ou seja, cercosporiose.

Figura 11: Modo de ação da cercosporina.

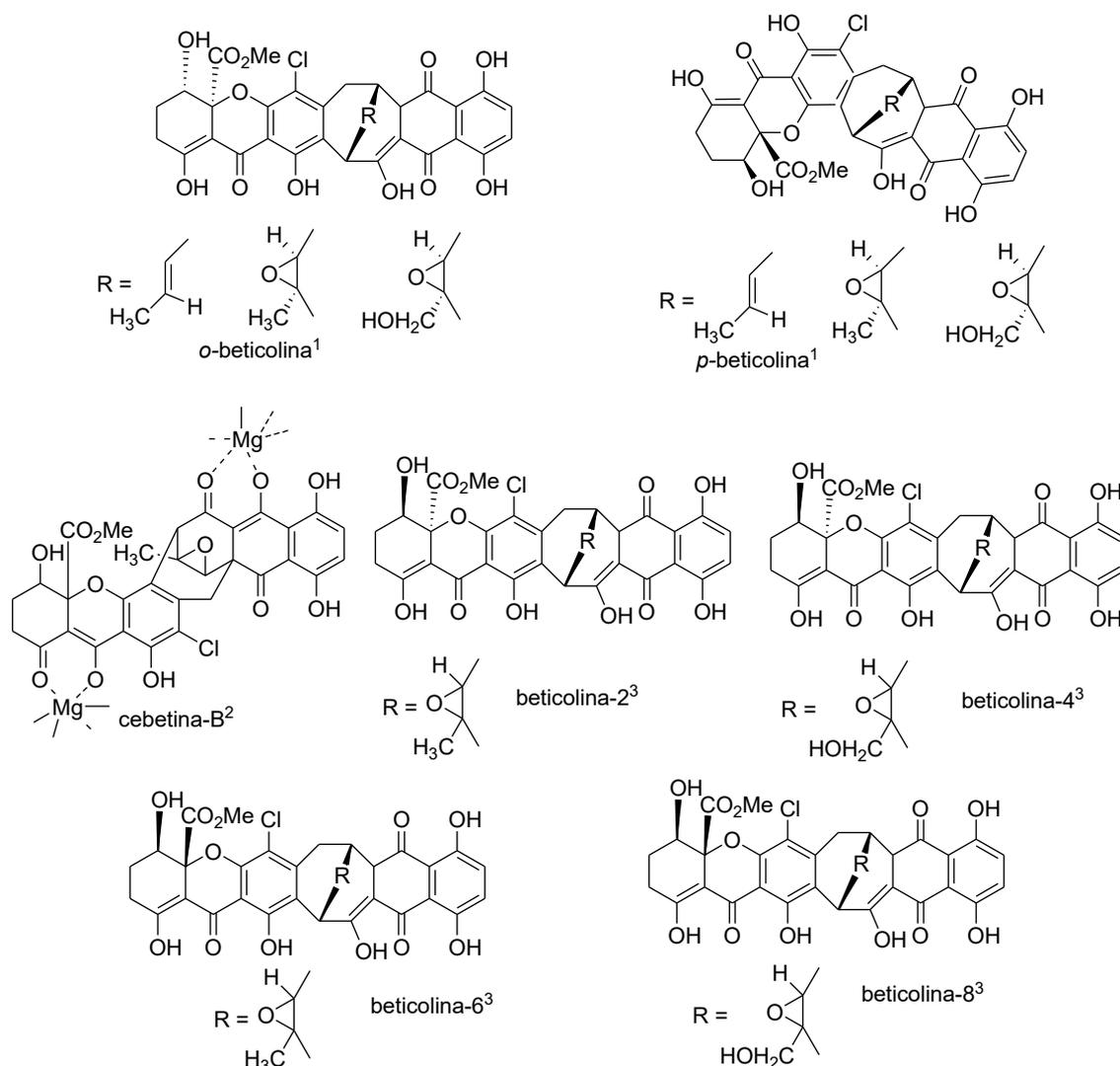


Fonte: adaptado de Daub e Chung (2007).

2.2.1 Outros metabólitos secundários do gênero Cercospora

Para melhor entender a forma de atuação destes fungos, estudos sobre o gênero foram impulsionados, e mais pesquisadores conseguiram extrair, isolar e caracterizar não somente a cercosporina, mas também outras substâncias (Figura 12) produzidas por fungos deste gênero, já que estes organismos têm sido motivo de prejuízo às plantações e lavouras há muitos anos (GODOY; BERGAMIN-FILHO; SALGADO, 1997).

Figura 12: Compostos isolados de fungos do gênero *Cercospora*.



Nota: ¹Goudet et al. (2000); ²Jalal et al. (1992); ³Milat et al. (1993).

Fonte: o autor.

2.3 *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp: fungos entomopatogênicos

Outros fungos que também são alvos de estudo deste projeto são os fungos *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp. já que os mesmos são classificados como entomopatogênicos, ou seja, ao se instalarem em insetos hospedeiros, seus esporos penetram a epiderme do inseto, causando como consequência a morte (ALVES et al., 2008).

2.3.1 *Beauveria bassiana*

A taxonomia para este fungo é: super-reino: Eukaryota; reino: Fungi; divisão: Ascomycota; subdivisão: Pezizomycotina; classe: Sordariomycetes; ordem: Hypocreales; família: Cordycipitaceae; gênero: Beauveria; espécie: *Beauveria bassiana*. Este fungo é utilizado como pesticida microbiológico (MORAES et al., 2015), contra várias espécies de insetos como: *Bemisia tabaci* raça B (mosca-branca), *Cosmopolites sordidus* (moleque-da-bananeira), *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado) e *Dalbulus maidis* (cigarrinha-do-milho).

Seu uso tem sido relatado com eficácia contra a broca do café (ANTIA, POSADA, BUSTILLO, GONZALEZ, 1992), pois ao se hospedar no inseto, é capaz de causar a morte (Figura 13).

Figura 13: Inseto hospedado por *Beauveria bassiana*.

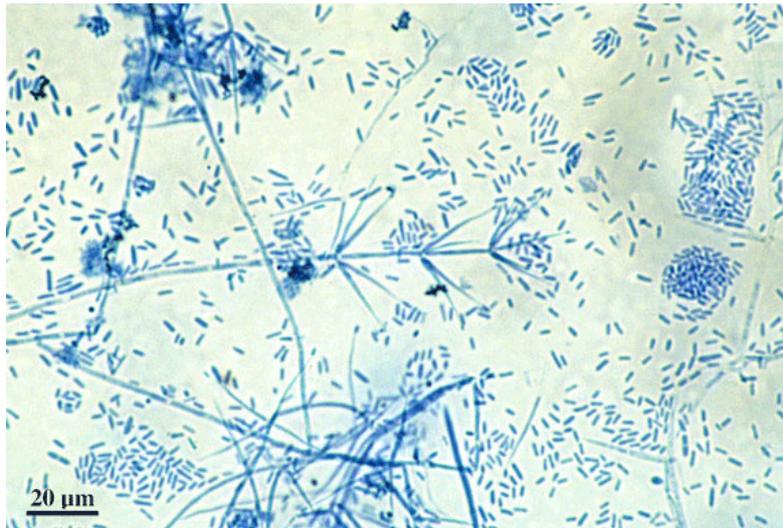


Fonte: <https://www.exportersindia.com/abpl-india/beauveria-bassiana-3574583.htm>.

2.3.2 *Verticillium sp*

Sua taxonomia é: reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Subclasse: Hypocreomycetidae; ordem: Hypocreales; família: Incertae sedis; gênero: Verticillium; espécie: *Verticillium sp*. Este gênero possui conidióforos bem diferenciados e eretos, verticiladamente ramificados na maior parte do seu comprimento, contendo espirais de finas divergentes (Figura 14).

Figura 14: Conídios e conidióforos do fungo *Verticillium* sp.



Fonte: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Verticillium>

Este gênero de fungo tem sido amplamente estudado nos últimos anos, por hospedar em plantas e gerar manchas, e por vezes causar a morte, como no caso das hortaliças brasileiras (REIS; BOITEUX, 2006).

O mesmo é considerado um nematófago, ou seja, pode ser usado no controle de nematoides (praga-do-cafeeiro) (COSTA, 2015), sendo uma fonte biológica alternativa para combater pragas do café.

2.3.3 Metabólitos secundários isolados dos fungos dos gêneros *Beauveria* e *Verticillium*

Algumas substâncias já foram isoladas e caracterizadas dos fungos mencionados nos tópicos anteriores. Para melhor compreensão, estas substâncias foram reunidas na Figura 15 para *Beauveria bassiana* e na Figura 16 para *Verticillium* sp.

3.0 OBJETIVO

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo identificar os metabólitos secundários do extrato do caldo de crescimento dos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp, e dos extratos dos micélios dos fungos *Cercospora brachiata* e *Beauveria bassiana*. E avaliar a atividade antibacteriana dos extratos quanto às bactérias da cavidade bucal humana.

3.2 Objetivos específicos

- Obter extrato em acetato de etila do caldo de crescimento do fungo em diferentes pHs (meio neutro e ácido);
- Avaliar as classes dos componentes químicos através de estudo com reveladores;
- Fracionar o extrato hexânico dos micélios de *C. brachiata* através da extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano e acetato de etila);
- Isolar compostos do extrato com melhor rendimento;
- Identificar os compostos isolados através da análise dos espectros por RMN-¹H e ¹³C e espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antibacteriana contra bactérias da cavidade bucal dos extratos preparados.

4.0 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes solventes de grau analítico: hexano (marca: Neon); acetato de etila (marca: ApliChem Panreac ITW Companies); etanol (marca: Synth); diclorometano (marca: Vetec Química Fina) e etanol (marca: Sigma-Aldrich). Mesmo sendo de grau PA os solventes foram previamente destilados.

Para medir o pH das soluções foi usado papel indicador de pH (marca: Macherey-Nagel). Para filtrações foram usados papéis de filtro qualitativo (marca: Unifil, Diâmetro: 24 cm, velocidade de filtração norma DIN 53137 (s): 20-25). Para análises em CCD, foram usadas cromatoplasacas de alumínio impregnada com sílica-gel (Macherey-Nagel), revelação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vanilina sulfúrica como revelador químico. Enquanto que para análises de cromatografia em coluna da fração hexano dos micélios de *C. brachiata* foram usadas colunas com 1,5; 2,0 e 3,0 cm de diâmetro, com sílica 60G de 40-270 mesh (Figura 17).

Figura 17: Coluna cromatográfica usada para separação de componentes do extrato hexano dos micélios de *C. brachiata*.



Fonte: o autor.

4.2 Equipamentos

4.2.1 Liofilizador

Neste trabalho foi utilizado um liofilizador de bancada da marca Terroni, modelo LS 3000.

4.2.2 Rotoevaporador

Para rotoevaporações foi usado um equipamento da marca IKA, modelo RV 10 basic para o operador rotacional e HB 10 basic para o banho termostático.

4.2.3 CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

Foi utilizado um cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo QP2010, com energia de ionização 70 eV. A análise foi realizada pelo o método proposto por Adams (2007). As condições utilizadas foram: hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹; coluna capilar de sílica fundida com 5% de fenil e 95% de dimetilpolisiloxano como a fase estacionária (marca Sigma-Aldrich, modelo SPB-5, especificações: 30,0 m × 0,25 mm × 0,25 µm); temperatura do injetor de 220 °C, “split” de 1:20; temperatura do forno inicialmente mantida a 60 °C e depois aumentada a uma velocidade de 3 °C min⁻¹ até 246 °C, e mantida durante 24 min; tempo de execução 60 min. O intervalo de *m/z* escaneado foi de 40-650.

4.2.4 RMN: Ressonância Magnética Nuclear

Para as análises de RMN foi utilizado um equipamento da marca Bruker, modelo AscendTM 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 e 100 MHz, para os núcleos de ¹H e ¹³C, respectivamente. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado.

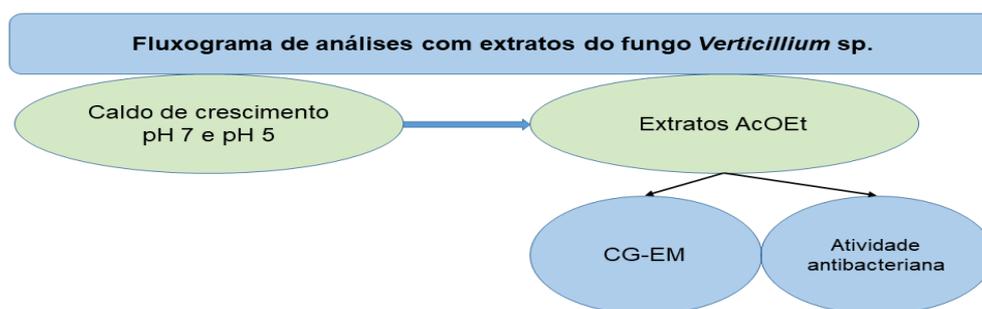
4.3 Cultivo dos Fungos

O crescimento e a obtenção do caldo dos fungos *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp foi realizado no laboratório do Instituto de Genética e Bioquímica localizado na UFU *campus* Monte Carmelo, sob coordenação da Profa. Dra. Ana Carolina Silva Siqueroli. Enquanto que para o fungo *Cercospora brachiata* foi realizado no laboratório do Instituto de Ciências Agrárias, localizado na UFU *campus* Monte Carmelo, pela aluna de mestrado Neiliane A. da Silva, sob coordenação do Prof. Dr. Bruno S. Vieira.

4.3.1 *Verticillium* sp.

O fungo *Verticillium* sp. foi cultivado em frasco erlenmeyer de 1000 mL por 21 dias, sob agitação a 150 rpm a 28°C. O meio líquido (250 mL) onde o fungo foi cultivado era constituído por: 1 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,16 g de NaNO₃; 0,11 g de Na₂HPO₄.7H₂O; 0,11 g de KCl; 0,06 g de MgSO₄.7H₂O e 0,04 g de KH₂PO₄ para o volume de 100 mL de caldo (ALVES, 1998). Após o crescimento, o micélio (conjunto de hifas emaranhadas, parte correspondente a sustentação e absorção de nutrientes) foi separado do meio líquido por centrifugação a 2.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido à filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 µm, obtendo-se assim uma fase líquida, o filtrado fúngico ou caldo de crescimento, que foi posteriormente liofilizado. Para melhor compreensão a Figura 18 possui um fluxograma com as análises realizadas com o fungo *Verticillium* sp.

Figura 18: Fluxograma de análises dos extratos de *Verticillium* sp.

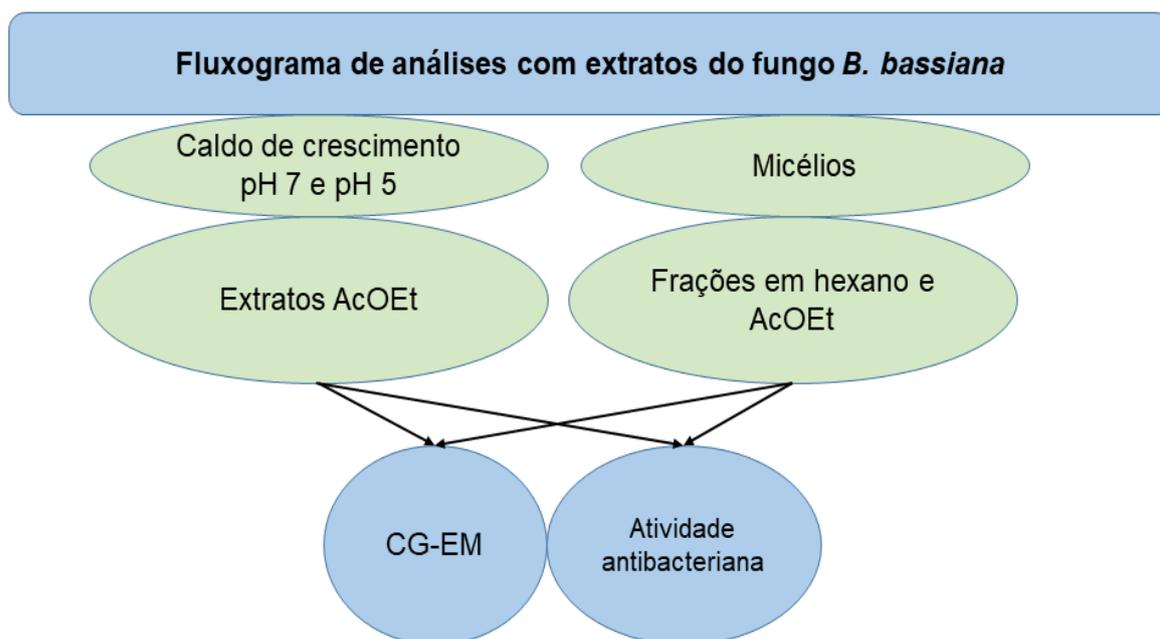


Fonte: o autor.

4.3.2 *Beauveria bassiana*

O fungo *B. bassiana* foi cultivado em frasco erlenmeyer de 1000 mL por 3 dias, agitação a 150 rpm a 28 °C contendo 250 mL de meio líquido constituído por 10 g de glicose e 5 g NaNO₃, sendo interrompidos no terceiro dia através da filtração a vácuo em banho de gelo e centrifugação a 8000 rpm por 20 minutos. Os filtrados foram reunidos obtendo-se o filtrado fúngico ou caldo de crescimento, que foi liofilizado posteriormente. No filtro ficaram retidos os micélios que foram recolhidos em papel de alumínio e medida a massa. Para melhor compreensão a figura 19 possui um fluxograma de análises realizadas com o fungo *B. bassiana*.

Figura 19: Fluxograma de análises dos extratos de *B. bassiana*.



Fonte: o autor.

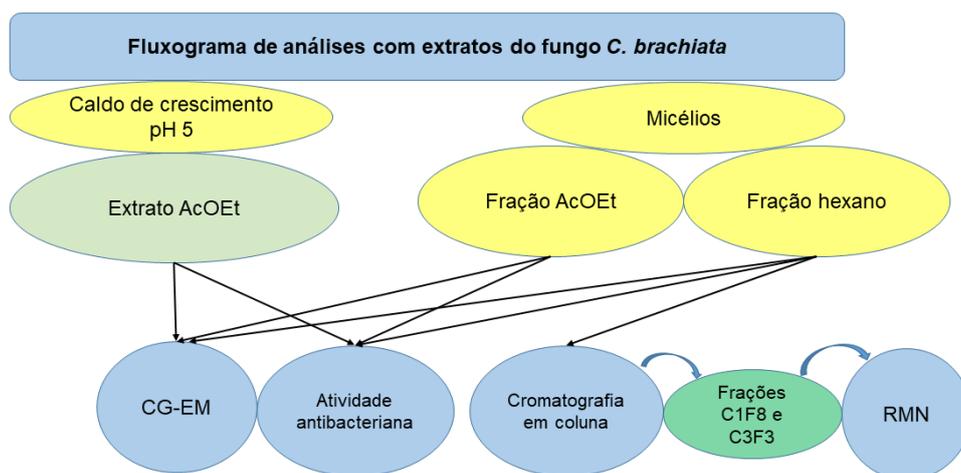
4.3.3 *Cercospora brachiata*

O fungo *Cercospora brachiata* foi isolado e faz parte da Coleção Micológica do LAMIF (Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia) da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Monte Carmelo.

Cercospora brachiata, foi isolado a partir de tecidos infectados de *A. viridis* (planta conhecida como caruru). O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) a 25 °C por sete dias. Discos de micélio de 10 mm de diâmetro, provenientes da periferia de culturas em crescimento ativo, foram assepticamente transferidos para frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura líquido Jenkins-Prior modificado (FARGUES et al., 2001).

Os frascos erlenmeyers foram, em seguida, acondicionados em agitador orbital tipo shaker a 150 rpm, no escuro, a 25 °C durante 21 dias para permitir o crescimento micelial do fungo e a produção de possíveis toxinas (metabólitos) secretadas no meio de cultura líquido. As culturas foram filtradas em dupla gaze, para separação de micélios, e por um disco de papel de filtro qualitativo, usando funil de Buchner, sob pressão reduzida, para eliminação de esporos e obtenção do caldo de crescimento. Para melhor compreensão a figura 20 possui um fluxograma de análises realizadas com o fungo *C. brachiata*.

Figura 20: Fluxograma de análises dos extratos de *C. brachiata*.



Fonte: o autor.

4.4 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi realizado no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto de Química localizado na UFU *campus* Santa Mônica.

4.4.1 Extrato do caldo de *Verticillium* sp e *Beauveria bassiana*

Inicialmente foi feito a liofilização de 2 L do caldo de crescimento, restando 200 mL de caldo. A partir deste caldo foi feito a extração líquido-líquido com acetato de etila, com ajustes de pH. Inicialmente meio neutro (pH 7) e posteriormente meio acidificado com HCl (pH 5). Nos dois valores de pH foi realizada a extração com 200 mL de acetato de etila, repetindo a extração por 3 vezes. As partes foram reunidas e o solvente destilado em rota evaporador. Posteriormente as frações obtidas foram secas na capela em temperatura ambiente e calculada a massa obtida.

4.4.2 Extrato do caldo de *Cercospora brachiata*

A extração a partir do caldo de crescimento foi feita pela extração líquido-líquido. Para 1 L de caldo (pH 5) foram utilizados 200 mL de acetato de etila. A extração foi repetida por 3 vezes (totalizando 5 L de caldo). As partes foram reunidas e roto-evaporadas. Posteriormente a fração obtida foi seca e calculada a massa obtida.

4.4.3 Extrato dos micélios dos fungos *B.bassiana* e *C. brachiata*

Uma massa de 120 g de micélios de *Beauveria bassiana* foi colocada em um bécker de 1 L e macerada usando 600 mL de metanol por 5 dias, à temperatura ambiente. Para a *Cercospora brachiata* foi utilizado o mesmo procedimento, entretanto partiu-se se 174 g de micélios (INTARAUDOM et al., 2016).

Os extratos obtidos foram reunidos e rotaevaporados. O passo seguinte foi adicionar 100 mL de água destilada ao extrato bruto em um balão de

decantação e feita a extração líquido-líquido, usando hexano e acetato de etila, extraído em triplicata com 200 mL de cada solvente. As frações obtidas de cada solvente foram reunidas em balão de fundo redondo, rotaevaporadas, secas em capela a temperatura ambiente, transferidas para frascos de 15 mL e por fim foi calculado o rendimento.

4.5 Prospecção dos compostos presentes nos extratos dos caldos e micélios dos fungos

Inicialmente os extratos dos caldos de crescimento dos três fungos e dos micélios de *B. bassiana* e *C. brachiata* foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e reveladas com solução de vanilina sulfúrica. Todos os extratos foram monitorados pelo perfil cromatográfico obtido por CG-EM. As análises por CG-EM foram realizadas na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.6 Identificação dos compostos por CG-EM

Posterior as análises em CCD foi realizado análises em CG-EM. A identificação foi baseada no índice aritmético (IA) calculado e comparado ao de Adams (2007). O cálculo foi baseado nos tempos de retenção e número de carbonos do padrão de alcanos (Tabela 1). Também foi utilizado o índice de similaridade (IS) obtidos pelo software (LabSolution-GCMS Solution) através da comparação com espectros de massas das bibliotecas Nist27, Nist147, Wiley7, Wiley229 e Shim2205.

Tabela 1: Tempo de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por GC-EM.

Número de carbonos	Tempo de retenção (min)	Número de carbonos	Tempo de retenção (min)
C8	3,17	C19	42,05
C9	4,56	C20	45,34
C10	7,49	C21	48,35
C11	11,30	C22	51,36
C12	15,11	C23	54,14
C13	19,34	C24	56,91
C14	23,56	C25	59,49
C15	27,54	C26	62,06
C16	31,51	C27	65,19
C17	35,13	C28	68,31
C18	38,75	C29	73,35
		C30	78,39

Fonte: o autor.

4.7 Fracionamento por cromatografia em coluna dos compostos presentes na fração em hexano dos micélios de *Cercospora brachiata*

A fração hexano proveniente da extração líquido-líquido, foi submetida a CC (cromatografia em coluna) por ter apresentado maior massa.

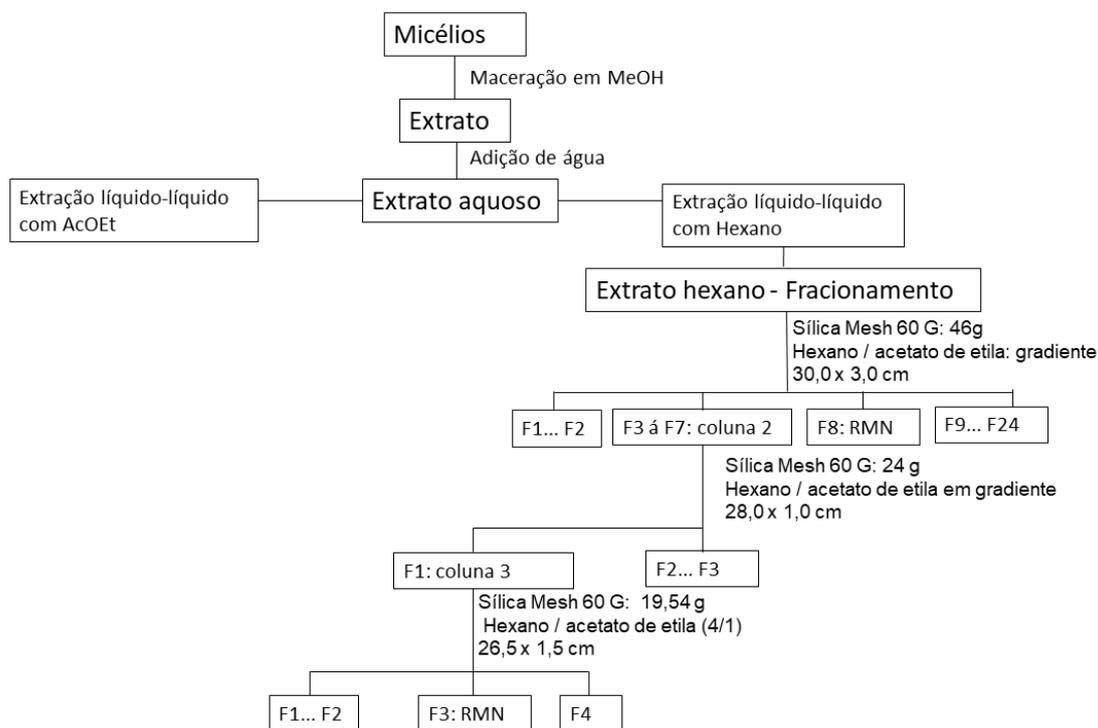
A primeira coluna foi realizada utilizando 600 mg da fração hexano. A coluna foi empacotada em hexano / acetato de etila em proporção 5/1. A coluna foi preparada com 46 g de sílica: 60G de 40-270 mesh, 30 cm de altura de fase estacionária com 3,0 cm de diâmetro. Para a fase móvel foi usado um gradiente de polaridade crescente utilizando hexano / acetato de etila: 5/1; 4/1; 3/1; 3/2; 2/3; 1/4; 0/1 e acetato de etila/ metanol: 4/1; 3/2; 2/3; 1/4; 0/1. Esta coluna resultou em 24 frações. A fração 8 que foi verificada em CCD E CG-M foi selecionada para análise em RMN, por ter característica de composto puro.

As frações 3 a 7 (86 mg) foram avaliadas em CCD com eluente hexano/acetato de etila 4/1 e foram reveladas na câmara de UV e com revelador químico (vanilina sulfúrica), tendo o mesmo perfil cromatográfico, e por isto foram reunidas para fazer a coluna 2, utilizando 24 g de sílica: 60G de

40-270 mesh, com uma altura de 28 cm de fase estacionária e 1,0 cm de diâmetro. A massa de amostra inserida na forma de solução foi de 86 mg, e o eluente (fase móvel) foi em gradiente nas seguintes proporções: hexano / acetato de etila: 4/1; 4/2; 4/3; 0/1 e acetato de etila / metanol: 4/1; 4/2; 4/3; 4/4 e 0/1.

A coluna 2 resultou em 3 frações, e a fração 1 com 23,9 mg de amostra foi utilizada para realizar a coluna 3. A amostra foi aplicada na coluna na forma de solução diluída em hexano / acetato de etila na proporção 4/1. A coluna foi elaborada usando 19 g de sílica: 60G de 40-270 mesh, com uma altura de 26,5 cm de fase estacionária com 1,5 cm de diâmetro. A fase móvel foi a mesma do empacotamento. Desta terceira coluna foram obtidas 4 frações e a fração 3 com 2,5 mg foi avaliada em CCD e CG-EM e por apresentar perfil de composto puro foi analisada em RMN. Para melhor compreensão foi elaborado um fluxograma que mostra o fracionamento cromatográfico (Figura 21).

Figura 21 – Fluxograma do fracionamento da fração hexano dos micélios de *Cercospora brachiata*



Fonte: o autor.

4.8 Atividade antibacteriana

Os ensaios biológicos para verificação da atividade antimicrobiana foram realizados determinando a CIM (concentração inibitória mínima). As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca/SP sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, seguindo o método da microdiluição em caldo contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias.

4.8.1 Determinação da atividade antibacteriana dos extratos/frações frente às bactérias bucais aeróbias e anaeróbias

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e aeróbios (CLSI, 2012b). A análise da atividade antibacteriana foi realizada em microplacas contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra foram adicionados em cada poço, obtendo-se um volume final de 100,0 μL para as bactérias aeróbicas e 200,0 μL para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de 20,0 μL para os testes com bactérias aeróbicas e 40,0 μL para os testes com bactérias anaeróbicas. O inóculo foi preparado e padronizado por comparação com o tubo 0,5 para bactérias na escala McFarland.

As concentrações das amostras testadas frente às bactérias aeróbias e anaeróbias foram de 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 3000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (dicloridrato de clorexidina) foram de 0,115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 59,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Metronidazol foi utilizado como controle positivo no intervalo de concentrações 0,0115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente as cepas *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 2974) para validação do método. Como controle negativo foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração de 5,0 1,0%, v/v). Foram ainda realizados os controles de esterilidade do controle positivo, do meio de cultura e das amostras.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela, a 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionados 30,0 µL do indicador resazurina (0,01% m\v) em cada orifício. Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 h em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 a 10% de H₂, 10% CO₂, 80 a 85% N₂), a 36 °C, sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul resultante após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, enquanto a coloração vermelha indica a presença do crescimento bacteriano.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Massas dos caldos e frações

Para calcular a massa de cada extrato ou fração, após a extração dos caldos e dos micélios, os extratos foram secos a temperatura ambiente, sob fluxo contínuo de ar. Após dois dias em secagem a massa de cada extrato foi medida (Tabela 2).

Tabela 2: Massa obtida dos extratos e frações de *Verticillium* sp, *B. bassiana* e *Cercospora brachiata*.

Fungo	Material	Quantidade	Massa de extrato/fração obtida
<i>Verticillium</i> sp.	Caldo pH 7	2 L	57 mg
<i>Verticillium</i> sp.	Caldo pH 5	2 L	173 mg
<i>B. bassiana</i>	Caldo pH 7	2 L	53 mg
<i>B. bassiana</i>	Caldo pH 5	2 L	506 mg
<i>B. bassiana</i>	Micélios	120 g	Fração hexano: 120 mg Fração AcoEt: 42 mg
<i>C. brachiata</i>	Caldo pH 5	5 L	505 mg
<i>C. brachiata</i>	Micélios	174 g	Fração hexano: 1,33 g Fração AcoEt: 122 mg

Fonte: o autor

As extrações para o caldo em meio ácido (pH 5) mostraram maior rendimento. Este fato está relacionado com a possibilidade da protonação das substâncias que pudessem estar desprotonadas em meio neutro, ou até mesmo com o fato de substâncias como os ácidos carboxílicos que possuem pka elevados, ou seja, são pouco ácidos. Entretanto, o fato do meio ser ácido faz com que estas substâncias se mantenham protonadas (neutras), sendo facilitada a sua extração por outros solventes como acetato de etila ou hexano, já que na forma iônica teria maior afinidade com a água e, dificilmente, seriam extraídas.

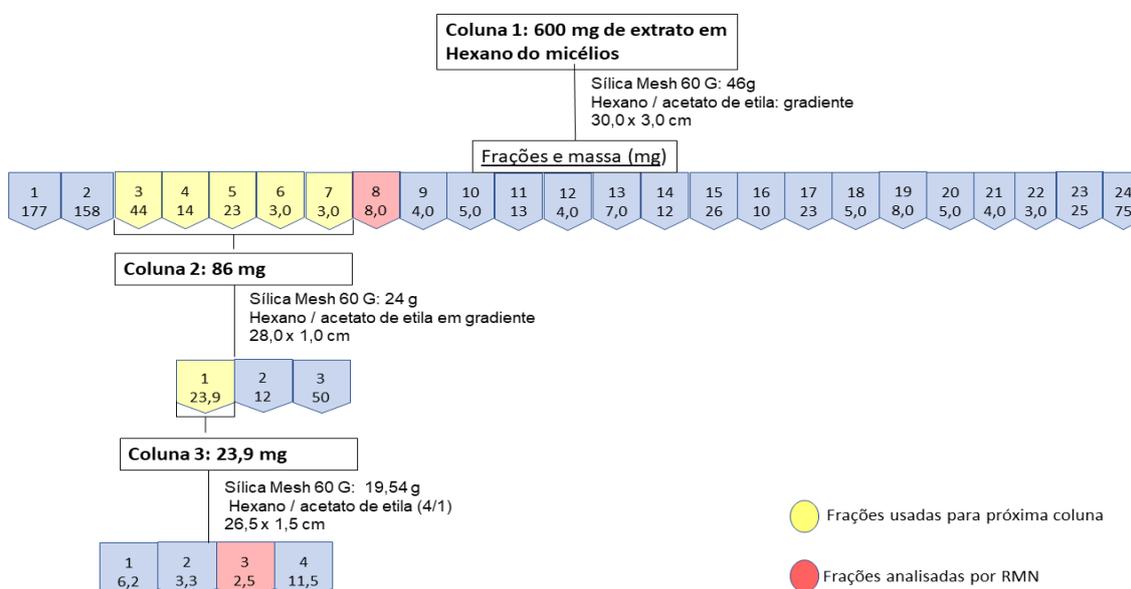
As extrações dos micélios realizadas com hexano resultaram em maior rendimento. Sendo assim, é possível sugerir que exista maior quantidade de

moléculas apolares. Isto será comprovado posteriormente nos tópicos que mostram as moléculas que foram identificadas e isoladas.

5.2 Fracionamento cromatográfico

O extrato em hexano dos micélios de *C. brachiata* apresentou maior massa, e por isto foi escolhido para ser usado em fracionamento por cromatografia em coluna. A fim de resumir os resultados das colunas cromatográficas foi elaborado um fluxograma mostrado na Figura 22.

Figura 22: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração hexano dos micélios do fungo *C. brachiata*.



Fonte: o autor.

As frações C1F8 e C3F3 (Figura 22), foram avaliadas por CCD e por apresentarem aspecto de composto puro foram em seguida analisadas por RMN.

5.3 Compostos identificados por CG-EM

Os métodos para identificação dos compostos por análise em CG-EM dos extratos de caldos e micélios dos fungos analisados neste trabalho estão descritos no item 4.6. Esta técnica é utilizada principalmente para identificar

compostos voláteis apolares e de baixa massa molecular. Para melhor identificação dos compostos são utilizados parâmetros matemáticos, como índice aritmético e similaridade, que permitem correlações entre compostos analisados e compostos já descritos na literatura.

A Equação 1 foi utilizada para calcular o índice aritmético (IA), este índice foi utilizado para fazer as correlações entre o tempo de retenção do composto analisado e dos padrões de alcanos (C8-C30) previamente injetados no equipamento.

$$IA(x) = 100 C(P_z) + 100 \left[\frac{(T_R(x) - T_R(P_z))}{(T_R(P_{z+1}) - T_R(P_z))} \right] \quad \text{Equação 1}$$

Nesta equação, $T_R(X)$ é o tempo de retenção do composto analisado, $T_R(P_z)$ tempo de retenção do alcano com T_R anterior, $T_R(P_{z+1})$ tempo de retenção do alcano com T_R posterior e $C(P_z)$ é o número de carbonos do alcano com T_R anterior ao analisado.

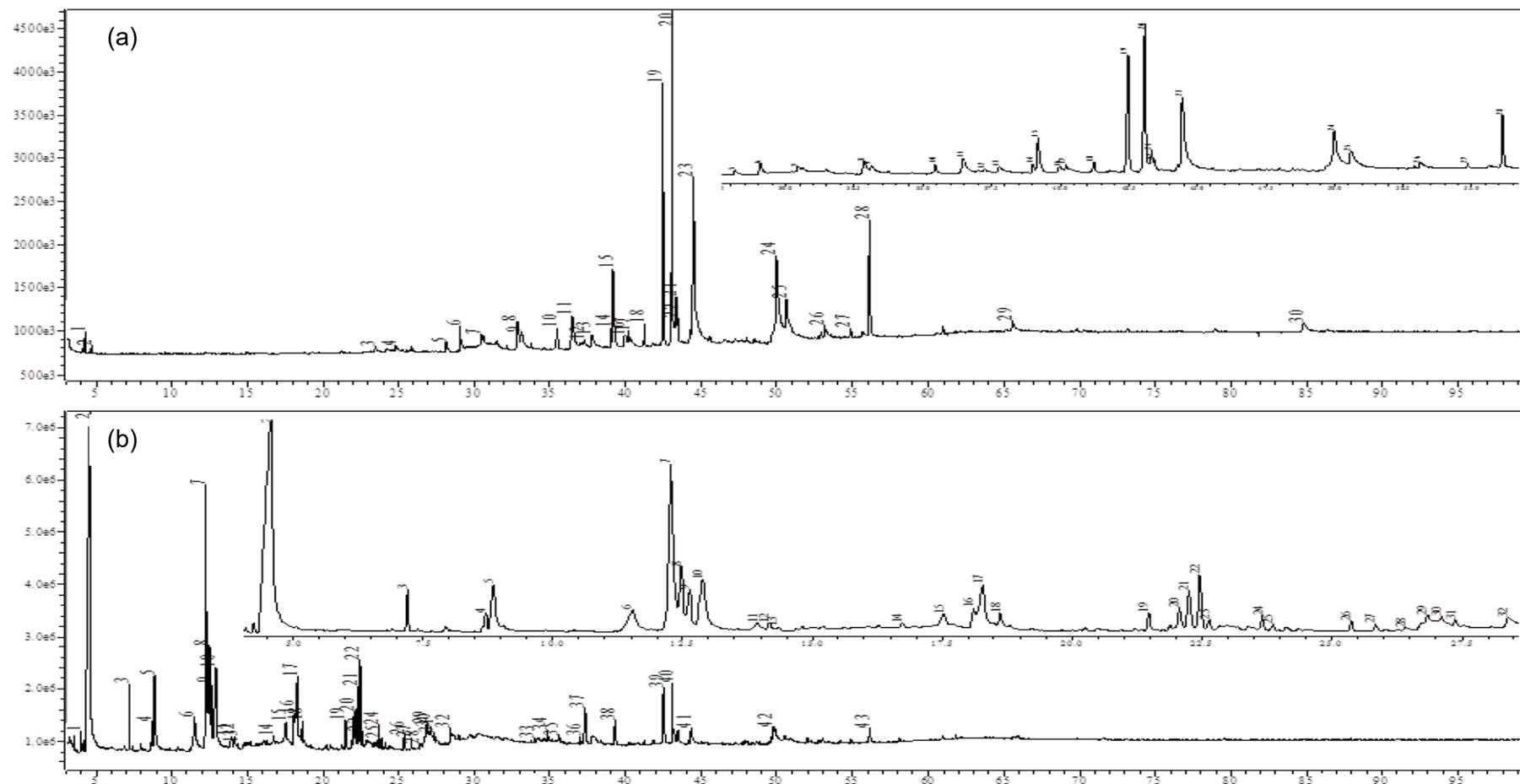
Posterior ao cálculo do IA, o valor encontrado foi comparado com o de compostos isolados e tabelados por Adams (2007) e também foi comparado com a NIST (2018), nas mesmas condições utilizadas para a análise em CG-EM. A comparação entre os índices aritméticos mostra se os tempos de retenções estão próximos, já que um mesmo composto analisado na mesma metodologia não pode apresentar grande variação no tempo de retenção.

Para os índices de similaridades (IS), os valores encontrados são fornecidos pelo software do equipamento, por meio do qual o mesmo faz uma comparação entre os dados do espectro de massas do composto analisado com os dados de compostos presentes nas bibliotecas, analisando os íons moleculares e seus íons fragmentos, provenientes das quebras de ligações realizadas pela ação da energia no equipamento.

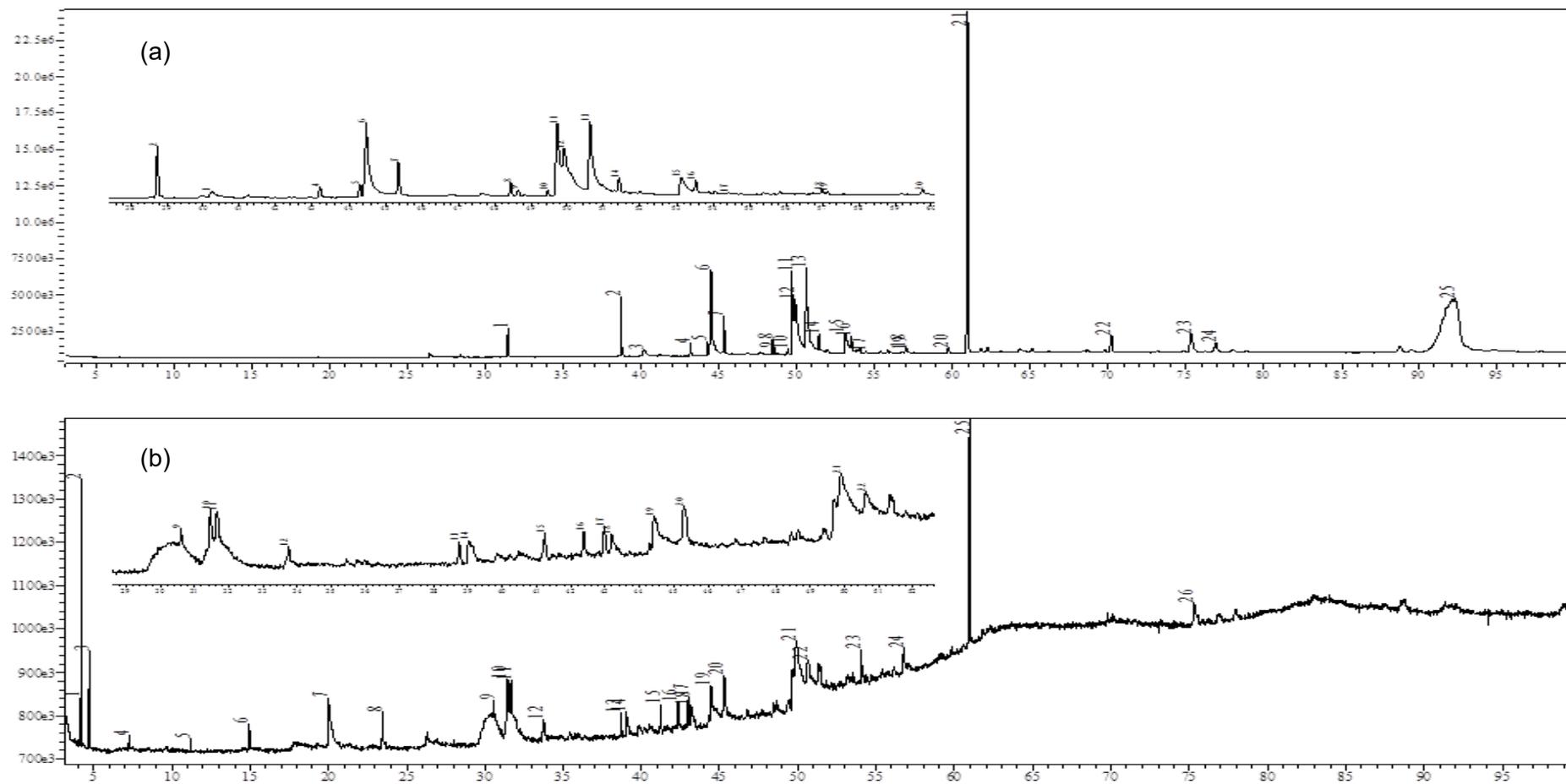
A seguir são apresentados os cromatogramas e as tabelas com os resultados encontrados para cada tipo de extrato fúngico.

5.3.1 CG-EM dos extratos do fungo *Beauveria bassiana*

Após as amostras serem processadas no equipamento de análise cromatográfica, o mesmo gerou os cromatogramas (Figuras 23 e 24) que posteriormente foram analisados. Das investigações realizadas foram identificados vários compostos que serão apresentados posteriormente.

Figura 23: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em AcOEt do caldo de crescimento de *Beauveria bassiana*: a) pH 7 e b) pH 5.

Fonte: o autor.

Figura 24: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em a) hexano e b) AcOEt dos micélios de *Beauveria bassiana*.

Fonte: o autor.

Somadas as análises do software do equipamento foi possível agrupar os compostos identificados não somente para o um único extrato, mas também agrupar em uma tabela os compostos comuns entre extratos diferentes (Tabela 3). Assim, foi possível correlacionar os compostos que são extraídos entre soluções com pHs diferentes, e também com solventes de polaridades diferentes.

Tabela 3: Compostos identificados por CG-EM dos extratos do fungo *Beauveria bassiana*.

(continua)

Composto	Área (%)	Extrato	t _R (min)	AI analisado	AI* literatura	Biblioteca	IS	
1	1,3-Dimetilquinazolina-2,4(1H, 3H)-diona	0,26	a	23,5	1351	-	WILEY229	89
2	4- (2-hidroxietil) fenol	0,41	a	24,8	1431	1432	NIST27	90
3	Acetamida, N-(2-feniletíl)	0,57	a	28,2	1516	1512	WILEY7	90
4	Ácido láurico	1,10	a	30,4	1537	1559	WILEY7	93
5	Ácido oleico	2,33	a	32,8	1636	2130	WILEY229	93
6	Ácido mirístico	2,88	a	36,5	1738	1769	NIST27	92
7	1H-Indole-3-carboxaldeído	1,34 / 2,60	a, d	39,0/39,0	1806	1816	NIST27	94/92
8	1,4-Diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicyclo [4.3.0] nonano	18,50 / 2,48 / 1,72	a, b, d	42,5/42,5/42,9	-	-	WILEY7	92/92/91
9	Ácido palmítico	14,72 / 0,43 / 7,74	a, b, c	44,4/44,3/44,5	1971	1975	NIST27	88/95/96
10	Ácido docos-13-enóico	9,33 / 2,25	a, c	50,0/53,1	2155	-	WILEY7	94/94
11	Ácido esteárico	2,05 / 5,49 / 2,60	a, c, d	50,6/50,6/50,6	2175	2188	WILEY7	94/96/92
12	Ácido hexadec-9-enóico	1,10	a	53,1/49,8	2263	1898	WILEY7	90/92
13	Ergotaman-3', 6', 18-triona, 9,10-di-hidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'- (fenilmetil), (5'α, 10α)	0,34	a, b	54,8/56,1	-	-	NIST27	85/85
14	3-etoxi propanaldeído	0,41	b	4,0	-	-	WILEY229	84
15	Ácido (S) 2-hidróxi propanóico	35,76	b	4,6	-	-	WILEY7	99
16	2-hidroxí-4-metil pentanoato de metila	1,68	b	7,1	-	-	SHIM2205	93

Tabela 3: Compostos identificados por CG-EM dos extratos do fungo *Beauveria bassiana*.

(Continuação)

Composto	Área (%)	Extrato	t _R (min)	AI analisado	AI* literatura	Biblioteca	IS	
17	1-Hidroxi-3-metil butan-2-ona	0,49	b	8,7	-	-	WILEY7	89
18	Ácido 2-hidroxi-3-metil butanóico	3,89	b	8,9	-	-	WILEY7	95
19	Ácido 4-metoxi-4-oxo butanoico	3,32	b	11,5	-	-	NIST27	92
20	3-Metil butan-2-ol	14,01	b	12,3	-	-	SHIM2205	86
21	Ácido benzoico	0,78	b	13,9	-	-	WILEY7	94
22	Benzenoacetato de metila	0,11	b	14,3	-	-	WILEY7	92
23	3-Oxo-4-fenil butironitrilo	1,07	b	17,5	-	-	WILEY7	93
24	2-Metil heptan-4-ol	0,99	b	22,1	-	-	NIST27	88
25	2-Hidroxi-3-fenil propanoato de metila	2,64	b	22,5	-	-	NIST27	94
26	N-acetil L-Leucina	0,23	b	26,4	-	-	NIST27	89
27	2-(4-hidroxifenil) etanoato de metila	0,33	b	27,4	-	-	NIST27	93
28	Ácido 3-fenil-2-hidroxi propanóico	0,87	b	28,4	-	-	NIST27	92
29	(E) Eicos-9-eno	1,25	c	38,7	1752	-	WILEY229	98
30	Palmitato de metila	0,46	c	43,2	1935	1926	WILEY229	96
31	Octadec-1-eno	1,75	c	45,4	2001	-	NIST27	97
32	(Z, Z) octadec-9,12-dienoato de metila	0,69	c	48,5	2103	2092	NIST27	94
33	Oleato de metila	0,31	c	48,6	2054	2085	WILEY7	92
34	Isostearato de metila	0,15	c	49,5	2137	-	WILEY7	94
35	Linoleato de metila	6,60	c	49,7	2145	2163	NIST27	89
36	Docos-1-eno	0,83	c	51,4	2201	2194	NIST27	95
37	Heneicosano	0,10	c	54,4	2309	-	NIST27	94
38	Ergosterol	42,5	c	92,3	-	-	NIST27	89
39	Nonil ciclopropano	1,19	d	14,9	1196	-	WILEY229	91
40	(Z) hexadec-3-eno	2,09	d	23,5	1398	-	NIST27	95

Tabela 3: Compostos identificados por CG-EM dos extratos do fungo *Beauveria bassiana*.

(Conclusão)

Composto		Área (%)	Extrato	t_R (min)	AI analisado	AI* literatura	Biblioteca	IS
41	(<i>E</i>) octadec-5-eno	2,94	d	31,5	1599	-	WILEY229	90
42	(<i>E</i>) eicos-3-eno	1,56	d	38,7	1752	-	WILEY229	94
43	Ftalato de diisobutila	1,20	d	41,2	1874	1871	WILEY7	91
44	Ácido hexadecanóico	5,06	d	44,4	1971	1975	WILEY229	92

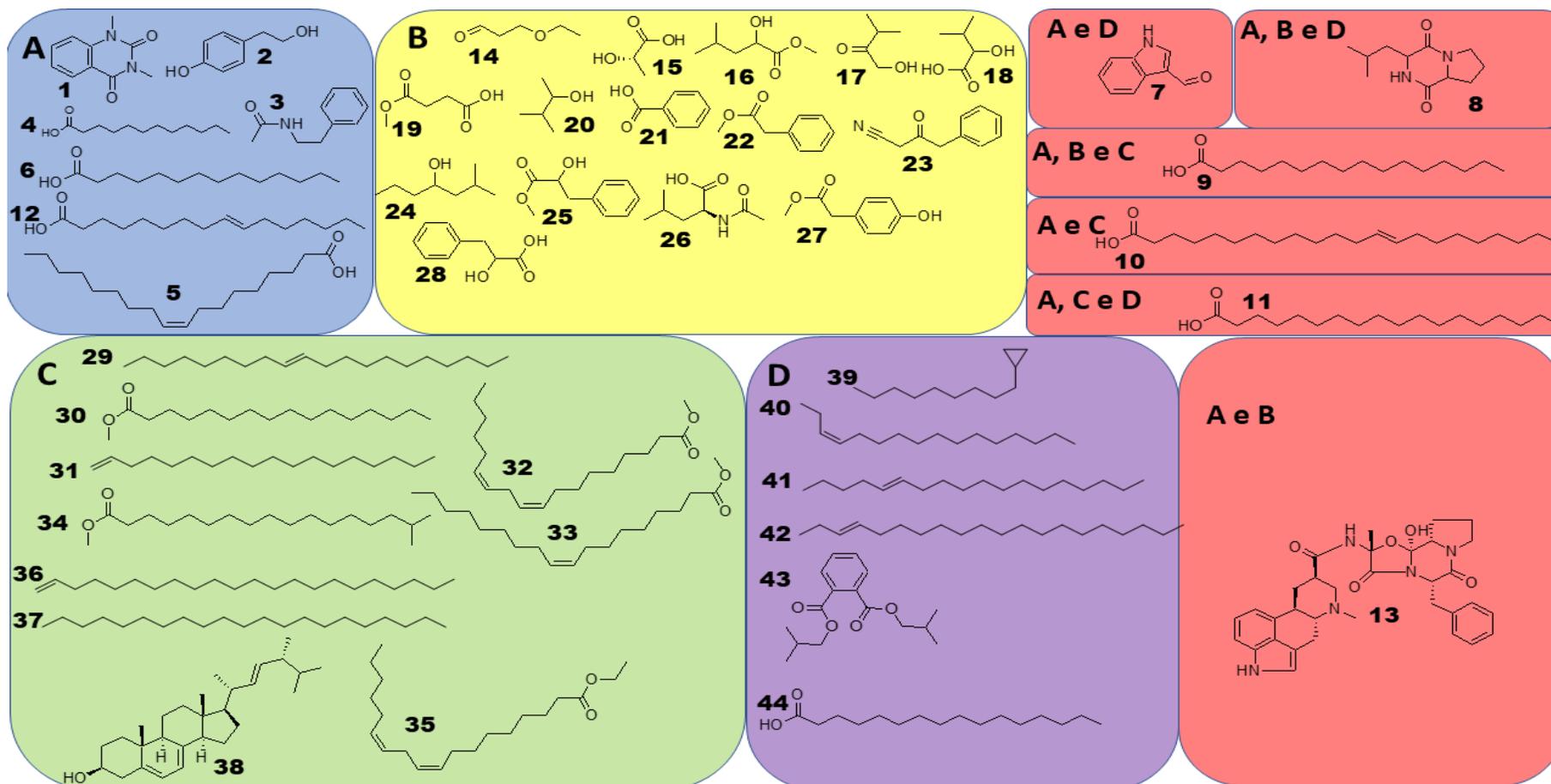
Nota: Área (%): composição percentual do composto; t_R : tempo de retenção, AI: índice aritmético; IS: índice de similaridade; *Adams (2007) ou NIST (2018); Extratos: **a**: extrato AcOEt do caldo de crescimento (pH 7); **b**: extrato AcOEt do caldo de crescimento (pH 5); **c**: extrato em hexano dos micélios; **d**: extrato AcOEt dos micélios.

Fonte: o autor.

Como já mencionado, a cromatografia a gás é útil na identificação de moléculas apolares e voláteis, como por exemplo nos ácidos graxos de cadeia longa. Como exemplo é possível citar: ácido láurico (4), ácido oleico (5), ácido mirístico (6), ácido palmítico (9), ácido docos-13-enóico (10), ácido esteárico (11), ácido hexadec-9-enóico (12) e ácido hexadecanóico (44), que são ácidos graxos de cadeia longa. Pelo fato de se usar metanol nas extrações ou nas transferências de amostras entre frascos, muitos dos ácidos graxos podem sofrer esterificações, e assim os compostos identificados podem estar na forma de ésteres dos respectivos ácidos, como os compostos palmitato de metila (30), oleato de metila (33), isostearato de metila (34) e éster etílico de ácido linoleico (35) (Figura 25).

Na figura abaixo é possível perceber que há substâncias que são comuns nas diferentes extrações, ou seja, há substâncias que podem ser encontradas no caldo de crescimento e também nos micélios do fungo, a exemplo das substâncias 7, 8, 9, 10 e 11.

Figura 25: Compostos identificados nos extratos de *B. bassiana*. A e B correspondem as extrações em AcOEt do caldo de crescimento com pH 7 e 5; C e D são extrações dos micélios em hexano e AcOEt, respectivamente. Nos domínios em vermelho estão as moléculas que são comuns em mais de um extrato.



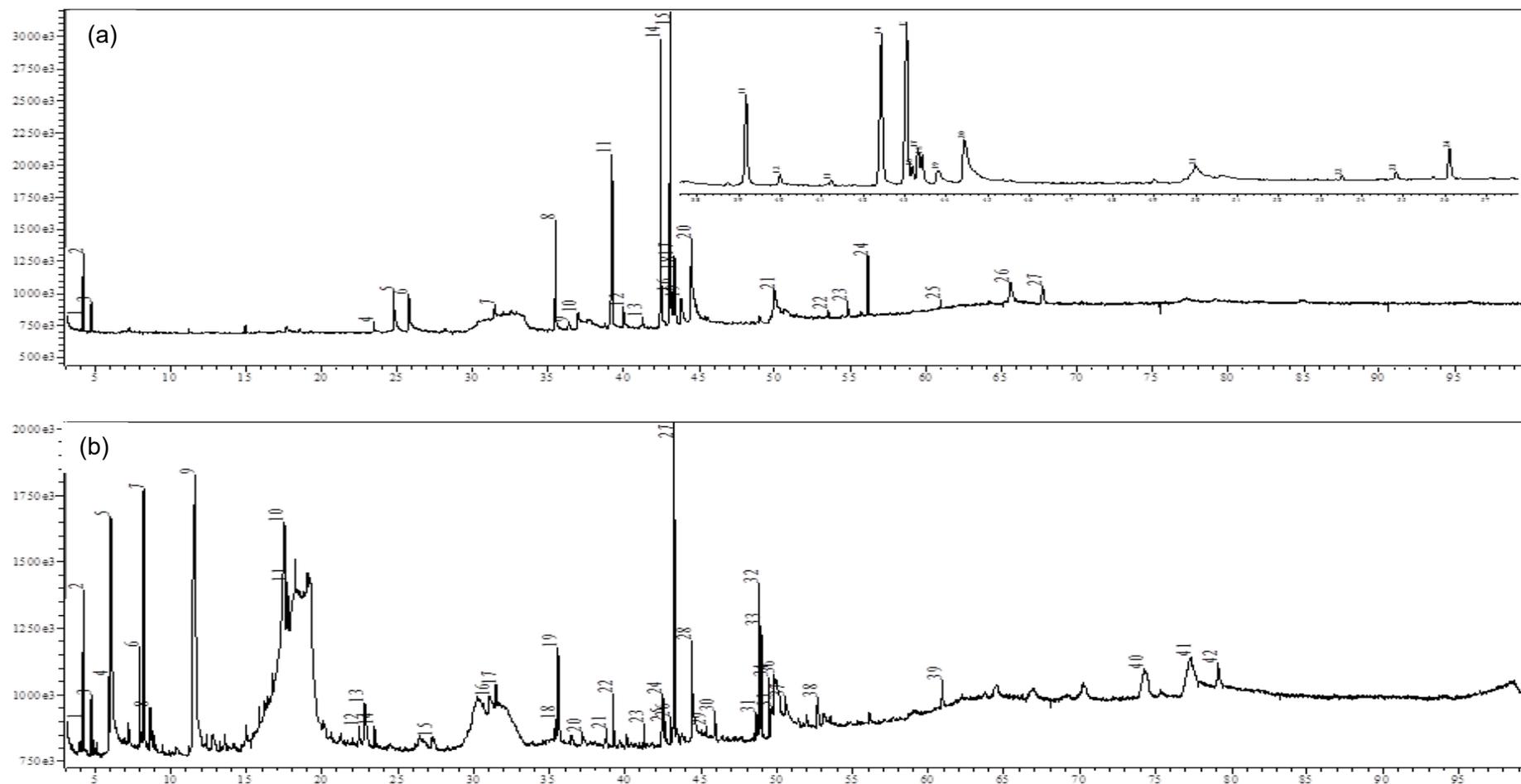
Fonte: o autor.

5.3.2 CG-EM dos extratos do fungo *Verticillium* sp

Os extratos do caldo de crescimento (pH 5 e 7) do fungo *Verticillium* sp também foram avaliados por CG-EM para identificação de substâncias presentes, a análise resultou em um cromatograma que foi analisado (Figura 26).

Depois de analisar os cromatogramas pela comparação dos índices aritméticos e de similaridade foi elaborado uma tabela (Tabela 4) agrupando os compostos encontrados para os extratos do fungo *Verticillium* sp. Os cromatogramas E e F na figura abaixo representam a análise em CG-EM dos extratos em meio neutro e ácido respectivamente. Pelo perfil dos cromatogramas (quantidade de sinais) observa-se que no meio ácido existe uma maior quantidade de compostos voláteis, no entanto, do meio neutro obteve-se uma maior quantidade de compostos identificados.

O composto 61 (4-(2-hidroxi, etil)-fenol), já foi relatado por Intaradom e colaboradores (2016), como isolado de extrato do fungo do gênero *Verticillium*, o que contribui para as análises feitas neste trabalho, pois é possível observar correlações de isolados deste estudo com isolados já publicados do mesmo fungo. Para os extratos destes fungos também houve quantidade significativa de compostos apolares, principalmente os ácidos graxos hexadecanoico (54), octadecanoico (60), hexadec-9-enoico (63) e oleico (64) (Figura 27).

Figura 26: Cromatogramas (CG-EM) do extrato em AcOEt do caldo de crescimento de *Verticillium* sp.: a) pH 7 e b) pH 5.

Fonte: o autor.

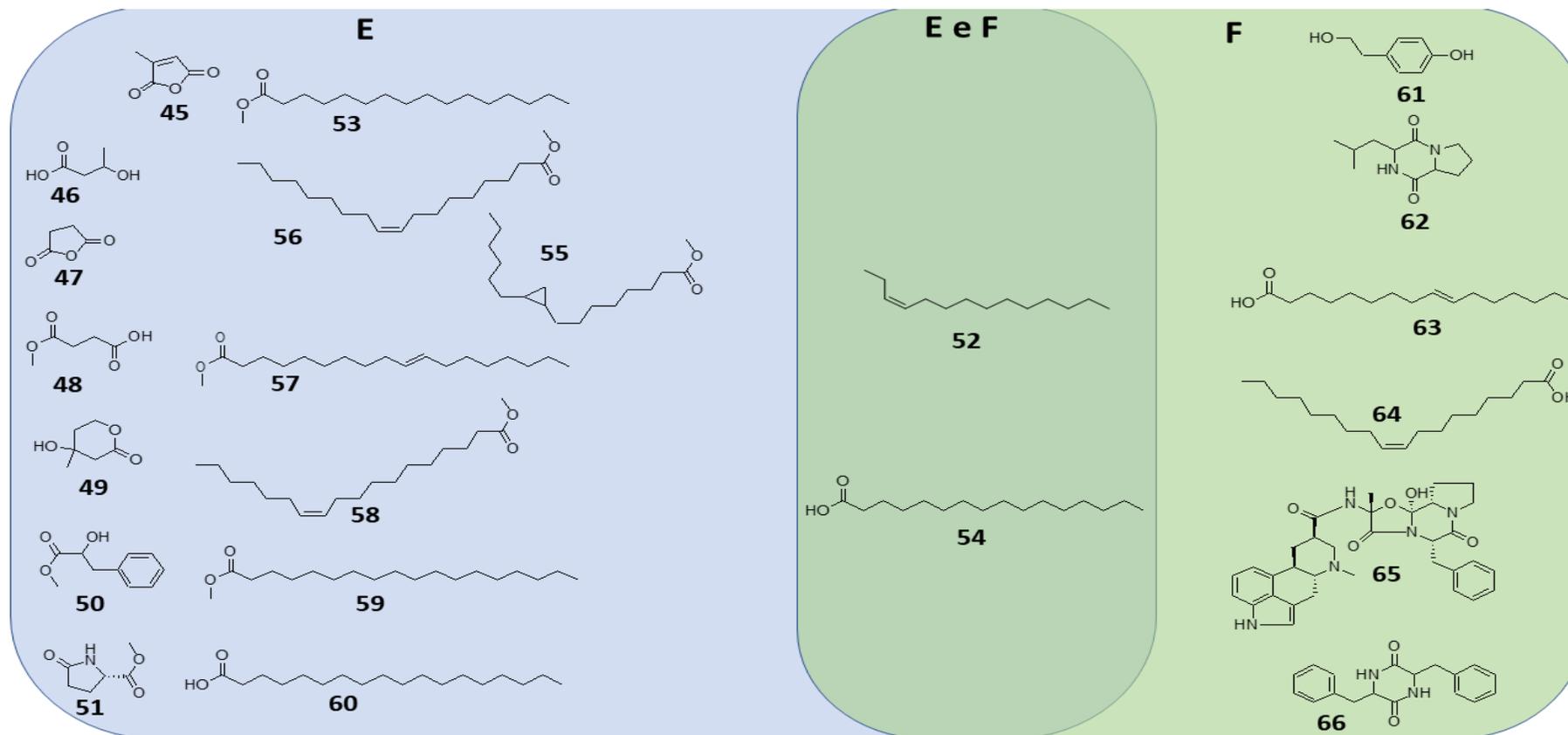
Tabela 4: Compostos identificados por CG-EM dos extratos do fungo *Verticillium* sp.

Composto	Área (%)	Extrato	t _R (min)	AI analisado	AI literatura*	Biblioteca	IS
45 3-Metil-2,5-furandiona	1,50	e	5,8	942	949	NIST27	97
46 Ácido 3-hidroxi butanóico	8,76	e	6,0	951	976	WILEY7	89
47 Dihidro-2,5-furandiona	2,82	e	7,9	1010	1022	WILEY7	97
48 Ácido-4-hidroxi-oxo butanoico	19,30	e	11,6	1092	1106	WILEY7	92
49 Tetrahydro-4-hidroxi-4-metil, 2H-piran-2-ona	1,23	e	17,7	1261	-	WILEY7	95
50 2-Hidroxi-3-fenil, propanoato de metila	0,37	e	22,4	1373	1336	NIST27	90
51 Piroglutamato de metila	1,58	e	22,8	1382	-	WILEY229	95
52 (Z) Tetradec-3-eno	0,36 / 0,50	e, f	23,5/23,6	1397	1394	WILEY229	90/93
53 Hexadecanoato de metila	6,59	e	43,2	1935	1933	WILEY229	95
54 Ácido hexadecanóico	3,47 / 5,36	e, f	44,4/44,4	1971	1975	NIST27	95/95
55 2-hexil ciclopropanoato de metila	0,62	e	45,9	2019	-	NIST27	93
56 (Z) Octadec-9-enoato de metila	0,59	e	48,6	2108	2103	WILEY7	91
57 Octadec-10-enoato de metila	3,70	e	48,8	2116	2110	WILEY7	96
58 (Z) Octadec-11-enoato de metila	2,56	e	48,9	2120	2115	WILEY229	95
59 Octadecanoato de metila	1,36	e	49,4	2137	2135	WILEY7	95
60 Ácido octadecanóico	0,52	e	50,6	2172	2178	WILEY7	89
61 4- (2-hidroxietil) fenol	4,33	f	24,8	1431	1432	NIST27	95
62 1,4-Diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicyclo [4.3.0] nonano	18,70	f	42,4	1910	-	WILEY7	91
63 Ácido hexadec-9-enoico	2,41	f	43,8	1953	1898	WILEY7	94
64 Ácido oleico	1,62	f	50,0	2154	2147	WILEY229	92
65 Ergotaman-3', 6', 18-triona, 9,10-di-hidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'- (fenilmetil) -, (5' α, 10α)	0,80	f	54,8	2324	-	NIST27	86
66 3,6-di(fenilmetil)-2,5-piperazinodiona	1,78	f	67,7	2781	-	WILEY7	91

Nota: Área (%): composição percentual do composto; t_R: tempo de retenção, AI: índice aritmético; IS: índice de similaridade; *Adams (2007) ou NIST (2018); Extratos: e: extrato AcOEt do caldo de crescimento (pH 7); f: extrato AcOEt do caldo de crescimento (pH 5).

Fonte: o autor.

Figura 27: Compostos identificados no extrato em AcOEt do caldo de crescimento de *Verticillium* sp. E: (pH 7), F: (pH 5).



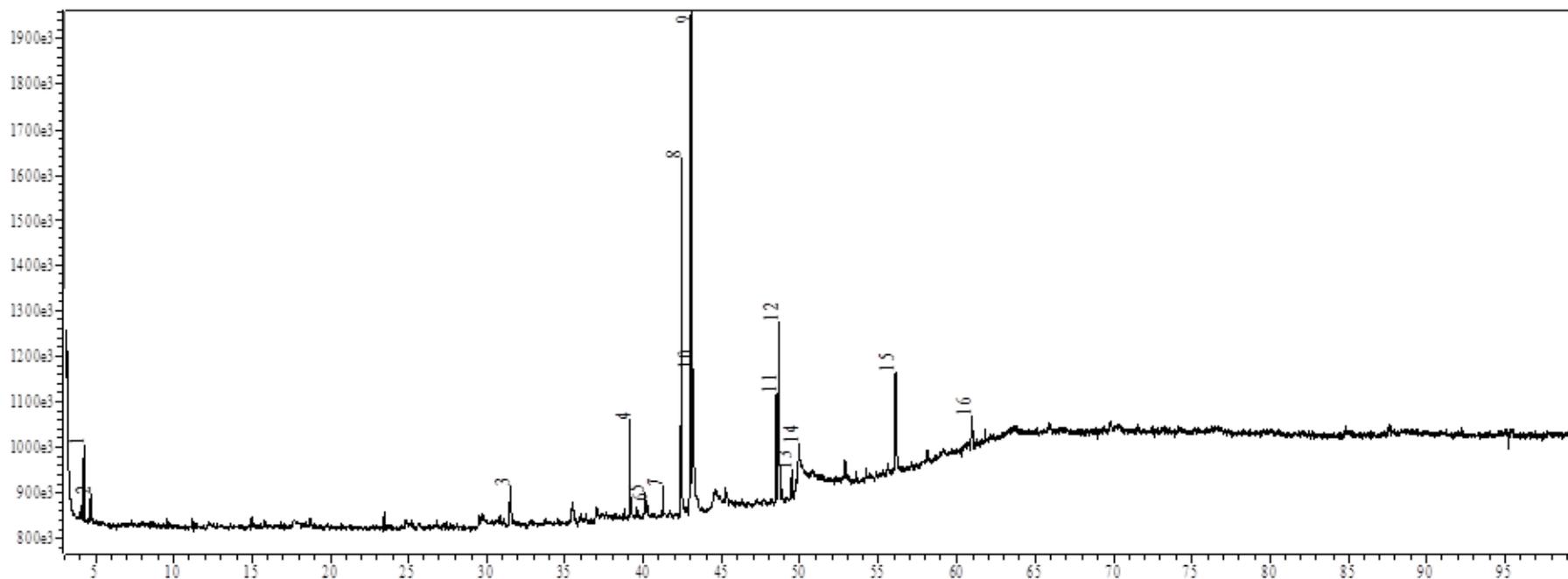
Fonte: o autor.

Destes extratos, os compostos 52 ((Z) tetradec-3-ene) e 54 (ácido hexadecanoico), um alceno e um ácido carboxílico respectivamente, são comuns nos dois métodos de extração.

5.3.3 CG-EM dos extratos do fungo *Cercospora brachiata*

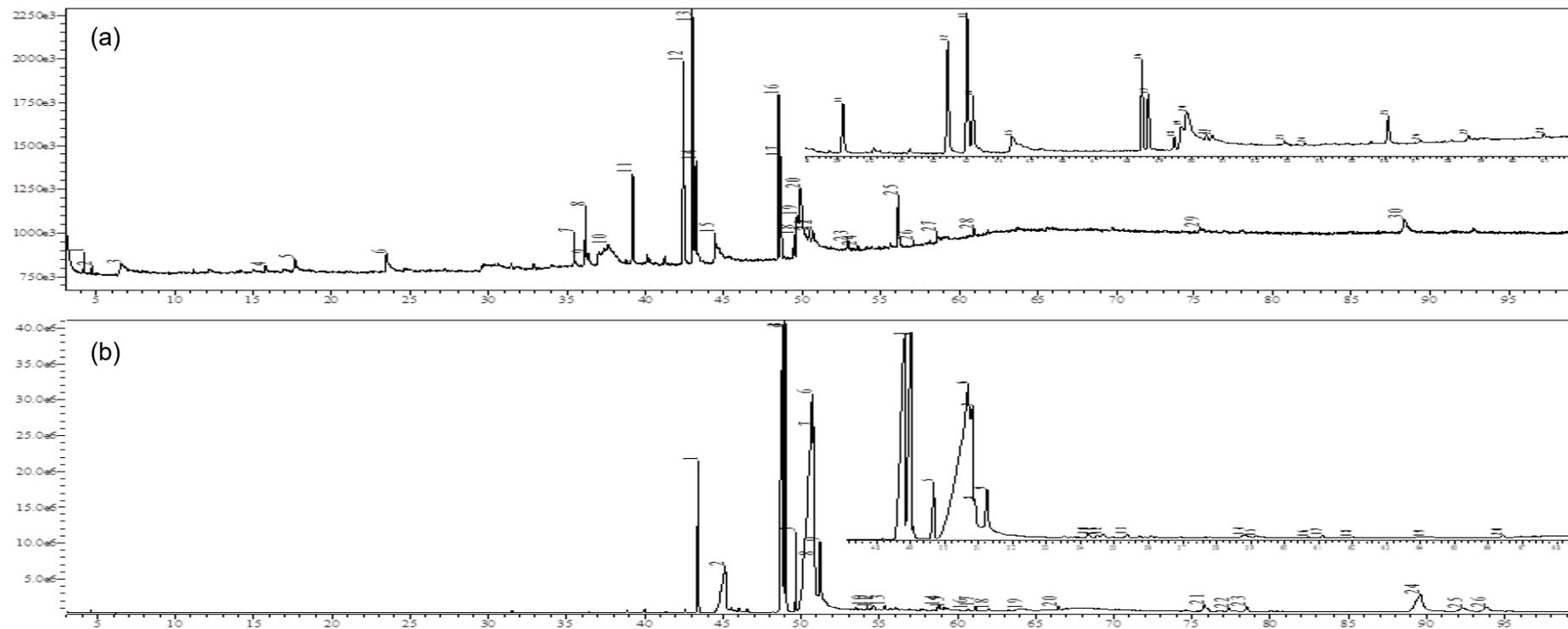
Seguindo a identificação por CG-EM, foram identificados compostos no extrato AcOEt (pH 5) (G) do caldo de crescimento, e das frações acetato de etila (H) e hexano (I) dos micélios do fungo *Cercospora brachiata*. Para prosseguir com as análises foram analisados os cromatogramas de cada extrato (Figuras 28 e 29).

Figura 28: Cromatogramas (CG-EM) dos extratos em AcOEt (pH 5) do caldo de crescimento de *Cercospora brachiata*.



Fonte: o autor.

Figura 29: Cromatogramas (CG-EM) das frações fração em a) AcOEt e b) em hexano dos micélios de *Cercospora brachiata*.



Fonte: o autor.

As substâncias identificadas deste fungo foram reunidas em uma tabela (Tabela 5). E foram diferenciadas pelo tipo de extrato do qual foram identificadas.

Tabela 5: Compostos identificados por CG-EM do fungo *Cercospora brachiata*.

(continua)

Composto	Área (%)	Extrato	t _R (min)	AI analisado	AI* Literatura	Biblioteca	IS
67 1,4-Diaza-2,5-dioxo-3-isobutilbicyclo [4.3.0] nonano	23,31 / 12,71	g/h	42,4/42,4	-	-	WILEY7	92/91
68 Hexadecanoato de metila	5,88	g	43,2	1935	1933	NIST27	93
69 Linoleato de metila	4,95 / 8,09	g/h	48,4/48,5	2101	2092	WILEY7	96/94
70 Octadec-10-enoato de metila	8,44	g	48,6	2108	2110	WILEY229	95
71 Octadecanoato de metila	1,53	g	49,5	2138	2135	WILEY7	90
72 Ergotaman-3', 6', 18-triona, 9,10-di- hidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'- (fenilmetil) -, (5'α, 10α)	6,21 / 3,18	g /h	56,1/56,1	-	-	NIST27	86/87
73 Lactona mevalônica	1,52	h	17,7	1260	-		92
74 Isonicotinamida	1,66	h	23,5	1408	1426	WILEY7	92
75 Cicloalanilleucina	4,61	h	36,2	-	-	WILEY7	92
76 Hexadecanoato de metila	4,12 / 5,88	h/i	43,2/43,5	1935	1926	NIST27	96/96
77 Ácido palmítico	3,12	h	44,4	1971	1975	NIST27	94
78 Oleato de metila	4,92	h	48,7	2111	2103	WILEY7	95
79 Octadecanoato de metila	1,14	h	49,5/49,7	2138	2138	WILEY229	91/96
80 Ácido linoleico	2,61 / 38,13	h/i	49,7/50,7	2145	2132	WILEY7	91/91
81 Ácido oleico	6,85 / 6,26	h/i	49,9/50,8	2151	2141	WILEY7	86/92
82 Linoleato de etila	0,61	h	50,5	2169	2163	NIST27	84
83 Brassicasterol ou estigmasterol	3,45 / 3,58	h/i	88,4/89,6	-	-	WILEY7	75/81
84 Octadeca-9,12-dienoato de metila	19,52	i	48,8	1862	-	WILEY7	97
85 (E) Octadec-9-enoato de metila	12,05	i	49,0	2122	2110	NIST27	96
86 Ácido esteárico	2,05	i	51,2	2196	2188	NIST27	92
87 Hexa-hidro-4,4,7α-trimetil-2- benzofuranona	0,17	i	54,2	2303	2305	WILEY229	80
88 11,14-Eicosadienoato de metila	0,08	i	54,5	2313	-	WILEY7	96

Tabela 5: Compostos identificados por CG-EM do fungo *Cercospora brachiata*.

(conclusão)

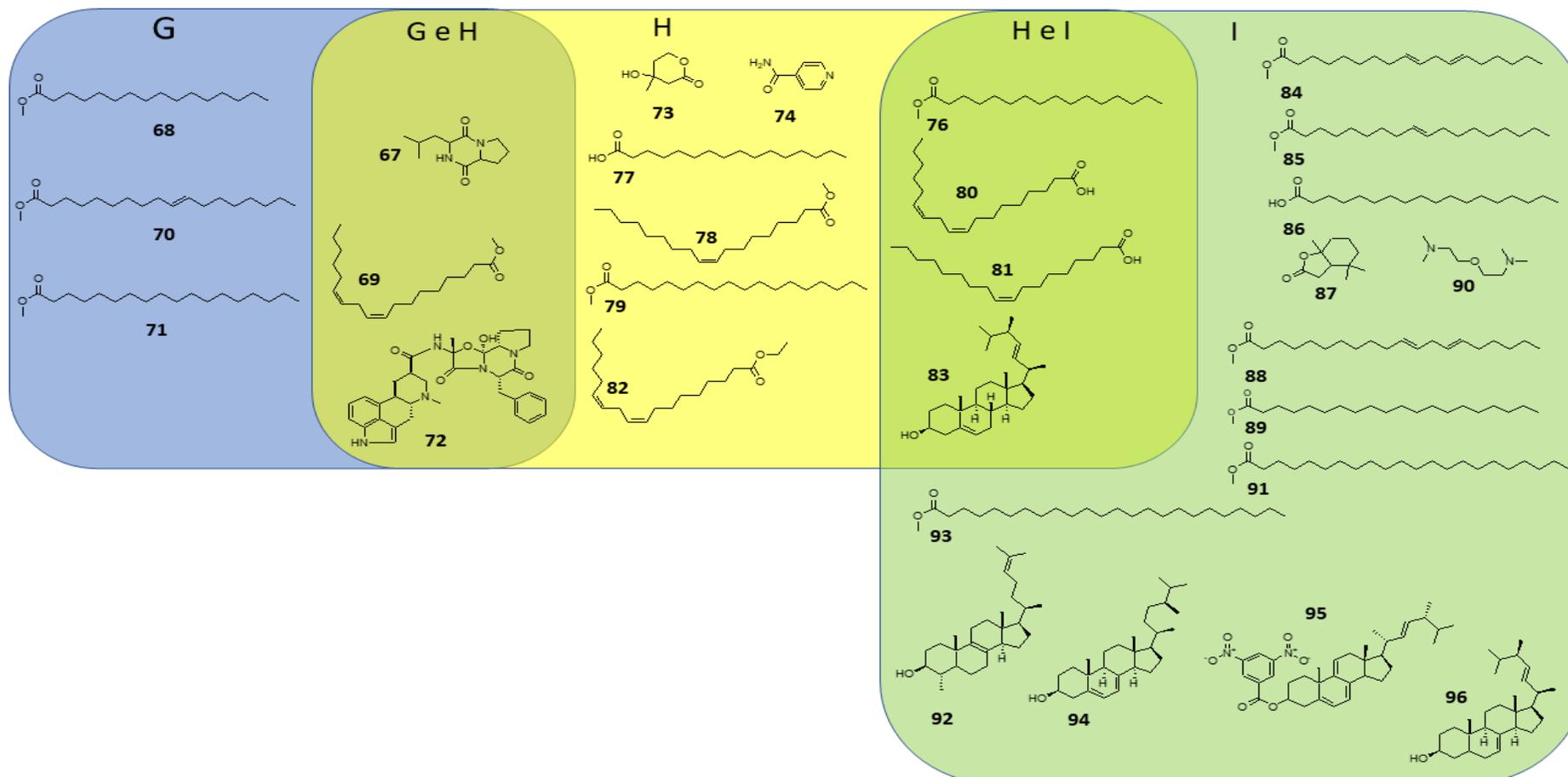
Composto	Área (%)	Extrato	t_R (min)	AI analisado	AI* Literatura	Biblioteca	IS
89 Eicosanoato de metila	0,21	i	55,4	2374	2339	WILEY7	95
90 <i>N, N, N', N'</i> -Tetrametil-2,2'-oxi di(etilamina)	0,30	i	58,8	2475	-	NIST27	92
91 Docosanoato de metila	0,04	i	60,7	2547	2530	NIST27	94
92 4-Metil (3 β , 4 α) colest-8,24-dien-3-ol	0,06	i	61,9	2597	-	WILEY229	78
93 Tetracosanoato de metila	0,16	i	66,4	2739	2731	WILEY7	95
94 (3 β) Ergosta-5,7-dien-3-ol	0,73	i	75,8	2948	-	WILEY7	60
95 (22 <i>E</i>)-ergosta-5,7,9(11), 22-tetraen-3-ilo 3,5-dinitrobenzoato	0,25	i	77,4	2980	-	NIST27	71
96 (3 β , 22 <i>E</i>) Ergosta-7,22-dien-3-ol	0,57	i	93,9	-	-	WILEY229	80

Nota: Área (%): composição percentual do composto; t_R : tempo de retenção, AI: índice aritmético; IS: índice de similaridade; *Adams (2007) ou NIST (2018); Tipos de extrato: **g**: extrato AcOEt (pH 5) do caldo de crescimento; **h**: fração AcOEt dos micélios; **i**: fração hexano dos micélios.

Fonte: o autor.

Em comparação com os fungos anteriores também foram identificados ácidos graxos e são eles ácido palmítico (77), ácido linoleico (80), ácido oleico (81) e ácido esteárico (86), e ésteres de ácidos como os compostos éster metílico do ácido hexadecanóico (68), éster metílico do ácido octadec-10-enoico (69), linoleato de metila (70), éster metílico do ácido octadecanóico (71), hexadecanoato de metila (76), oleato de metila (78), octadecanoato de metila (79), linoleato de etila (82), octadeca-9,12-dienoato de metila (84), (*E*) octadec-9-enoato de metila (85), eicos-11,14-dienoato de metila (88), eicosanoato de metila (89), docosanoato de metila (91) e tetracosanoato de etila (93) (Figura 30). Para este fungo, os compostos não foram somente identificados por CG-EM, mas dois compostos foram isolados e caracterizados e serão discutidos posteriormente.

Figura 30: Compostos identificados nos extratos e frações do fungo *Cercospora brachiata*, G: extrato AcOEt do caldo de crescimento; H e I: frações AcOEt e hexano dos micélios, respectivamente.



Fonte: o autor.

Alguns compostos comuns foram identificados em extratos de fungos diferentes como os ácidos graxos de cadeia longa: Ácidos hexadec-9-enóico (12 e 63); hexadecanóico (44 e 54); oleico (5; 64 e 81); palmítico (9 e 77); esteárico (11 e 86), enquanto que outros ácidos foram identificados em extratos específicos, á exemplo dos ácidos octadecanóico (60); láurico (4), mirístico (6); docos-13-enóico (10) e linoleico (80) (Figura 31), isto indica que os fungos podem ter ácidos graxos específicos para suas funções biológicas.

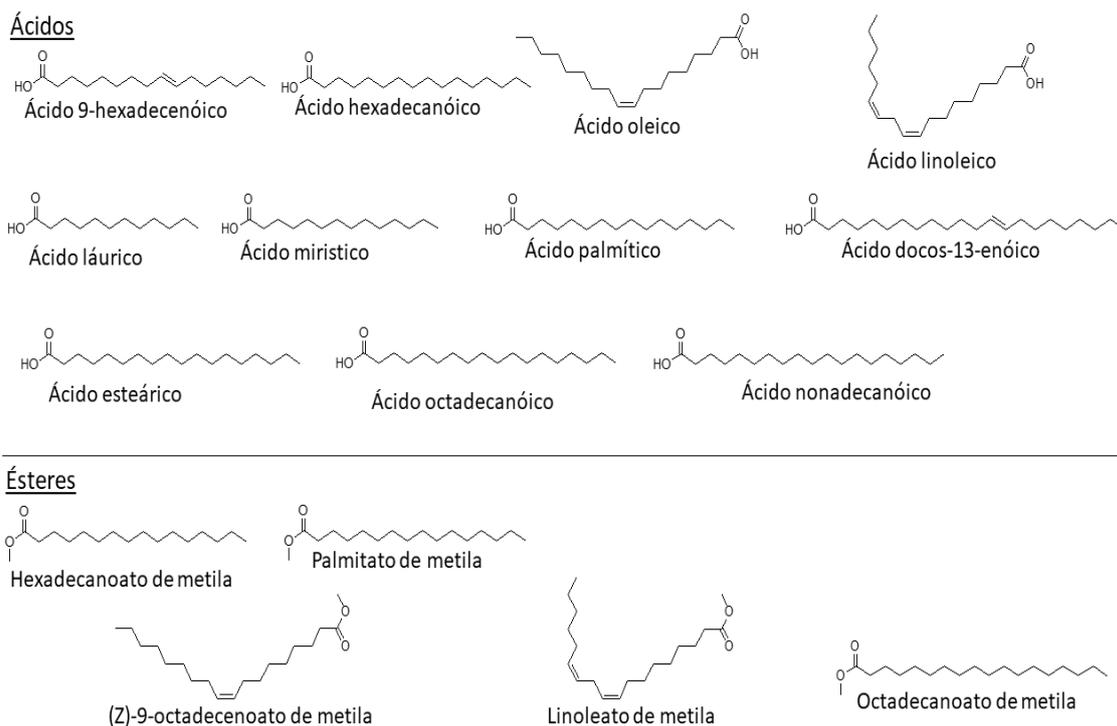
5.3.4 Relevância dos ácidos graxos e esteroides

Segundo Clemente e colaboradores (2007), ácidos graxos de cadeia longa exercem importante papel celular nos sistemas biológicos. Isto ocorre por estas moléculas comporem a constituição das paredes celulares, podendo também ter funções energéticas e sinalizadoras.

Para Kennedy, Reader e Davies (1993), os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa (hidrocarboneto), componentes de muitos lipídios, incluindo glicéridos. Eles são um dos blocos de construção usados na produção de lipídeos complexos, eles têm considerável valor medicinal e nutricional. Por exemplo, ácido gama linolênico (GLA); um ácido graxo ômega-6 na forma de óleo prímula (EPO) tem sido usado para tratar artrite reumática, esclerose múltipla, esquizofrenia e síndrome pré-menstrual. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexanóico (DHA); ambos ácidos graxos ômega-3 têm efeitos fisiológicos em áreas como coração, circulação, inflamação e câncer.

Segundo Blacklock e colaboradores (2010), há uma diversidade na síntese dos ácidos graxos fúngicos e que a identificação dos mesmos por CG-EM pode ser facilitada quando estão esterificados, o que neste trabalho é recorrente, já que algumas extrações ocorreram com o uso de metanol, o que permite em meio levemente ácido ou simplesmente aquoso a esterificação destes ácidos. Há exemplo dos ésteres hexadecanoato de metila; (Z) octadec-9-enoato de metila (oleato de metila); octadecanoato de metila; palmitato de metila; linoleato de metila entre outros, que são ésteres de ácidos identificados nos extratos fúngicos (Figura 31).

Figura 31: Alguns ácidos graxos e ésteres de ácidos comuns nos fungos *B. bassiana*, *Verticillium sp* e *C. brachiata*.



Fonte: o autor.

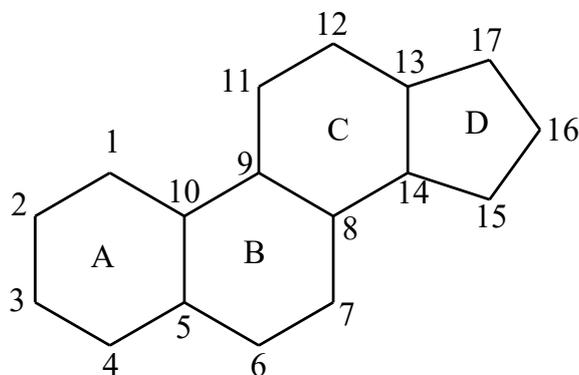
Outros compostos identificados foram os esteroides, que são substâncias presentes em quase todo organismo vivo, seja em plantas, fungos, bactérias ou no próprio homem. De acordo com Dewick (2002), esteróides são triperpenóides modificados e sua biossíntese é proveniente da rota do ácido mevalônico (MVA), que é formado por três moléculas de acetil-CoA.

A estrutura de cadeia carbônica determina a característica apolar a estas moléculas, o que permite sua fácil inserção nas membranas celulares, sendo esta uma das principais utilidades dos esteroides, a constituição da membrana celular (DEWICK, 2002) A estrutura base dos esteroides são 4 anéis condensados (Figura 32).

Segundo Soares (2013), os esteroides atuam em vários mecanismos biológicos, como a regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (mineralocorticoides), função anti-inflamatória, normalização do metabolismo de hidratos de carbono e de proteínas (glicocorticoides), diferenciação sexual e regulação reprodutiva. Os esteroides ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol e

brassicasterol (identificados no CG-EM) foram isolados e caracterizados por RMN.

Figura 32: Núcleo fundamental dos esteroides.



Fonte: o autor 2018.

5.4 Elucidação por RMN das substâncias isoladas da fração hexano dos micélios de *C. brachiata*

Como mencionado no tópico 4.7, sobre as colunas cromatográficas realizadas para a separação de componentes do extrato dos micélios de *Cercospora brachiata*, a C1F8 e a C3F3, foram analisadas em RMN. A partir da análise conjunta dos dados de EM (CG-EM) e da análise das cromatoplasmas, utilizando como revelador químico vanilina sulfúrica, que indica a presença de esteroides, foi possível direcionar a elucidação estrutural dos compostos isolados.

5.4.1 Elucidação estrutural do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol

Pelos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C foram encontrados 28 carbonos como pode ser visto na Figura 34, que é condizente com estruturas das moléculas do tipo ergosta identificadas pelo CG-EM, nos tempos de retenções 75,9 e 93,9 minutos, com os respectivos índices de similaridade 60 e 80 (Tabela 5).

Dos 28 sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C , 3 sinais estavam na região de carbonos carbinólicos com δ 66,8 (C-3), 82,5 (C-5) e 79,8 ppm (C-

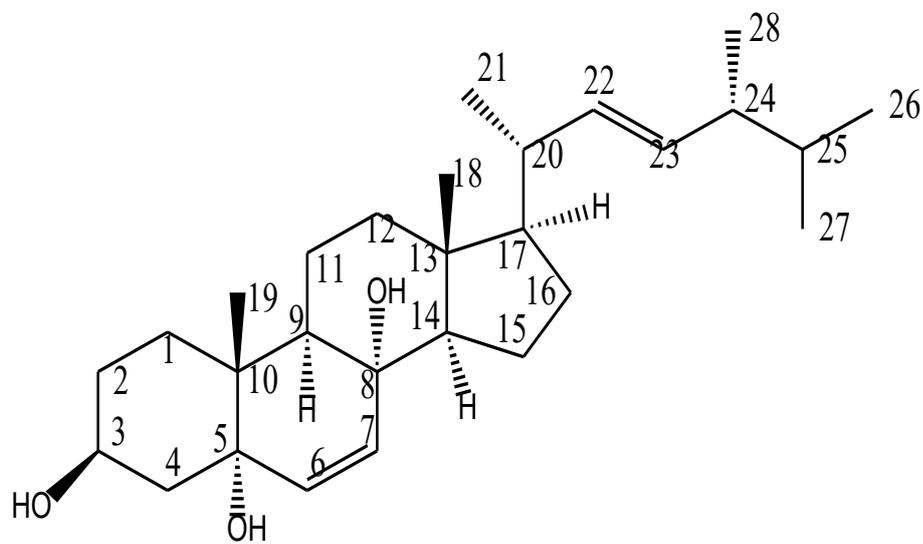
8); 4 sinais de carbonos metínicos (sp^2) em δ 131,1 (C-7), 132,6 (C-22), 135,5 (C-23) e 135,7 ppm (C-6),

Pelo DEPT-135 (Figura 35) foi possível verificar a ausência dos carbonos 10 e 13 que são quaternários, com deslocamentos em δ 37,3 e 44,9 ppm respectivamente, e dos carbonos 5 e 8 que não são quaternários, mas que não possuem hidrogênios, portanto, não aparecem em DEPT-135. Ainda por meio deste experimento foi possível notar a presença de 6 carbonos metílicos (sp^3) em δ 13,2 (C-18), 18,5 (C-21), 17,9 (C-19), 20,3 (C-27), 19,9 (C-26), e 21,2 ppm (C-28).

O DEPT-135 também possibilitou a identificação dos carbonos metilênicos com deslocamentos em δ 21,0 (C-11), 23,7 (C-15), 28,9 (C-16), 30,4 (C-12), 35,0 (C-1), 37,3 (C-4) e 39,7 ppm (C-2), e de carbonos metínicos (sp^3) em δ 33,4 (C-17), 40,1 (C-24), 43,1 (C-20), 51,4 (C-25), 52,0 (C-9) e 56,5 ppm (C-14). Os dados obtidos pelo RMN- ^{13}C foram comparados com os dados de Rivera, Benavides e Rios (2009) (Tabela 6), que comprovaram a estrutura do esteroide ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (Figura 33).

No espectro de RMN- 1H foram observados os sinais dos hidrogênios metínicos em δ 6,5 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H-6) e em δ 6,3 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H-7). Observa-se que ambos possuem dubletos no desdobramento de sinais de acoplamento (Apêndice 2), indicando que o acoplamento é com apenas 1H, e a constante de acoplamento deles também tem valores próximos, o que implica dizer que são correlacionados, como pode ser observado na Figura 36.

Na estrutura também existem outros hidrogênios metínicos em δ 5,1-5,2, (m, 1H, H-22 e H-23). Para estes hidrogênios o acoplamento é diferente de H-6 e H-7, onde se esperaria um duplo-dupletos oriundo do acoplamento entre os hidrogênios vizinhos (um de cada lado), entretanto, devido a frequência do equipamento, não foi possível diferenciar os dois duplo-dupletos. Sendo assim, observa-se um multipletos (Apêndice 2) como mostra a Figura 36.

Figura 33: Estrutura do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Fonte: o autor.

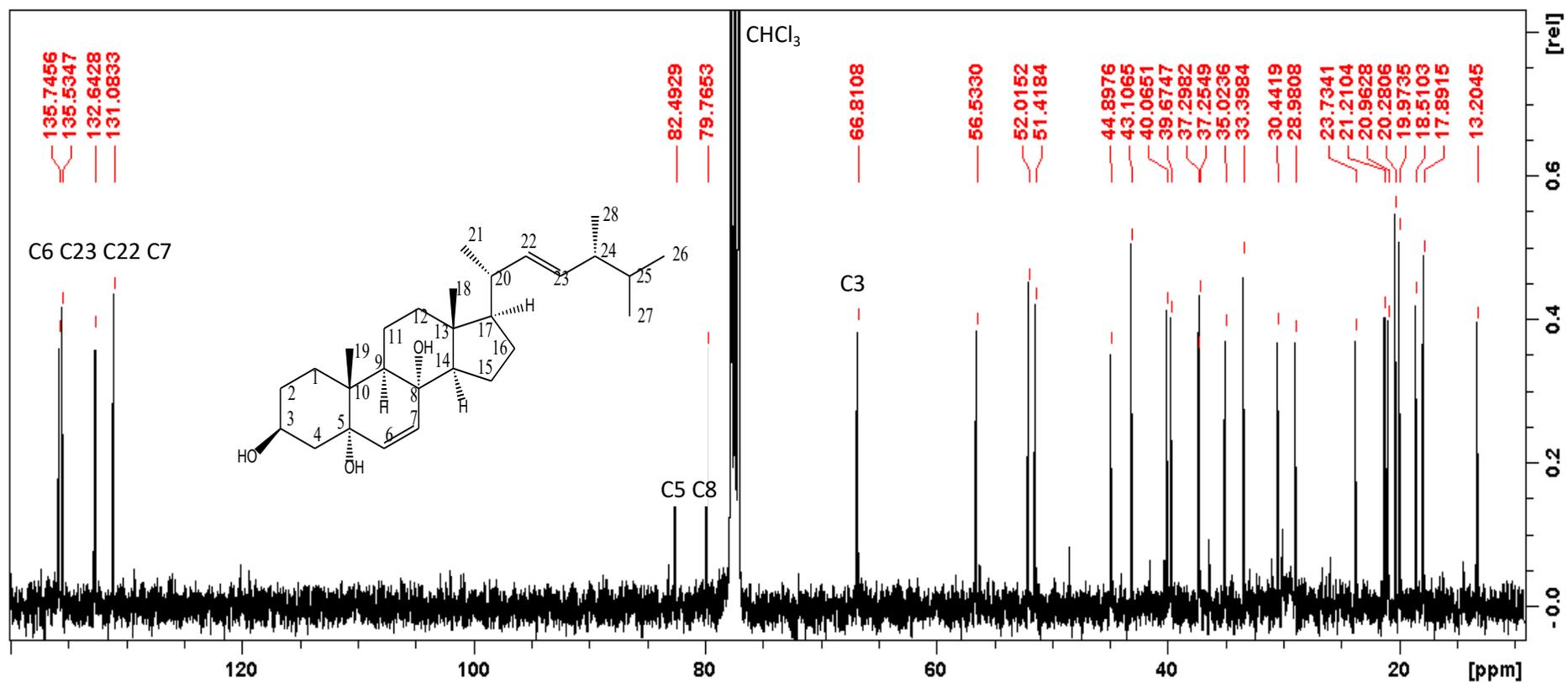
Tabela 6: Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol e comparação com a literatura.

Dados experimentais			Rivera, Benavides e Rios (2009)		
	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (m, integral, J)	RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)	DEPT- 135	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (m, integral, J)	RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)
1	1,20-2,1 (m, 2H)	35,0	CH_2	1,96 (m, 1H α) 1,69 (m, 1H β)	34,7
2	1,20-2,1 (m, 2H)	39,7	CH_2	1,99 (m, 1H β) 1,24 (m, 1H α)	39,2
3		66,8	CH		66,5
4	1,20-2,1 (m, 2H)	37,3*	CH_2	2,11 e 1,92 (m, 2H)	36,9
5	-	82,5	C	-	82,2
6	6,5 (d, 1H, 8,3 Hz)	135,7	CH	6,6 (d, 1H, J = 8,5 Hz)	135,4
7	6,2 (d, 1H, 8,3 Hz)	131,1	CH	6,33 (d, 1H, J = 8,5 Hz)	130,7
8	-	79,8	C	-	79,4
9	1,20-2,1 (m, 1H)	52,0	CH	1,59 (m, 1H)	21,7
10	-	37,3*	C	-	37,0
11	1,20-2,1 (m, 2H)	21,0	CH_2	1,62 (m, 2H)	20,6
12	1,20-2,1 (m, 2H)	30,4	CH_2	1,82 e 1,55 (m, 2H)	30,1
13	-	44,9	C	-	44,6
14	1,20-2,1 (m, 1H)	56,5	CH	1,19 (m, 1H)	56,2
15	1,20-2,1 (m, 2H)	23,7	CH_2	1,22 (m, 2H)	23,4
16	1,20-2,1 (m, 2H)	28,9	CH_2	1,33 (m, 2H)	28,6
17		33,4	CH		33,1
18	0,82 (s, 3H)	13,2	CH_3	0,82 (s, 3H)	12,9
19	0,88 (s, 3H)	17,9	CH_3	0,89 (s, 3H)	18,2
20	1,20-2,1 (m, 1H)	43,1	CH	1,82 (m, 1H)	42,8
21	0,90 (d, 3H, 6,5 Hz)	18,5	CH_3	0,92 (d, 3H, J = 6,3 Hz)	17,6
22	5,1-5,2 (m, 1H)	132,6	CH	5,18 (m, 1H)	132,3
23	5,1-5,2 (m, 1H)	135,5	CH	5,22 (m, 1H)	135,2
24	1,20-2,1 (m, 1H)	40,1	CH	2,02 (m, 1H)	39,7
25	1,20-2,1 (m, 1H)	51,4	CH	1,48 (m, 1H)	51,1
26	0,80-0,84 (m, 3H)	19,9	CH_3	0,85 (d, 3H, 6,6 Hz)	19,9
27	0,80-0,84 (m, 3H)	20,3	CH_3	0,81 (d, 3H, 6,6 Hz)	19,6
28	1,0 (d, 3H, 6,7 Hz)	21,2	CH_3	1,01 (d, 3H, 6,6 Hz)	20,9

Nota: *os deslocamentos podem estar trocados

Fonte: o autor.

Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.



Fonte: o autor.

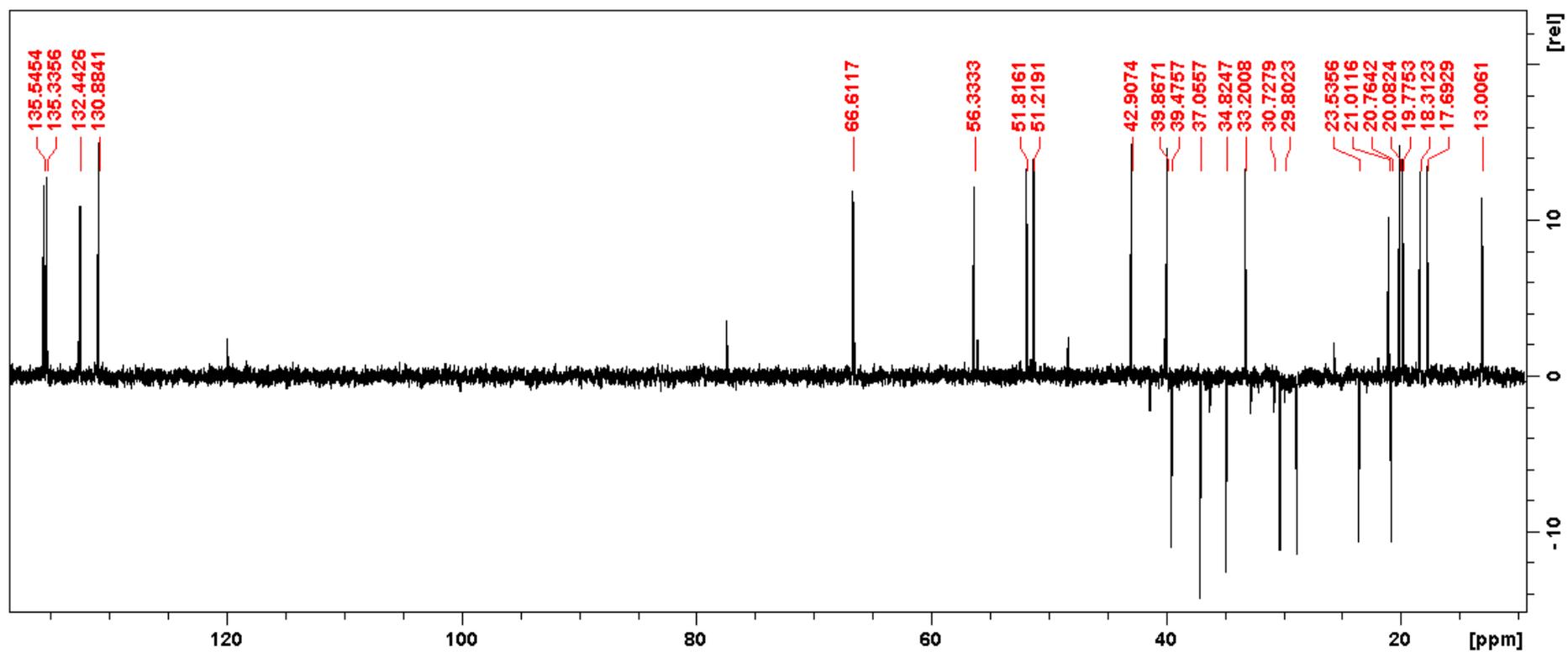
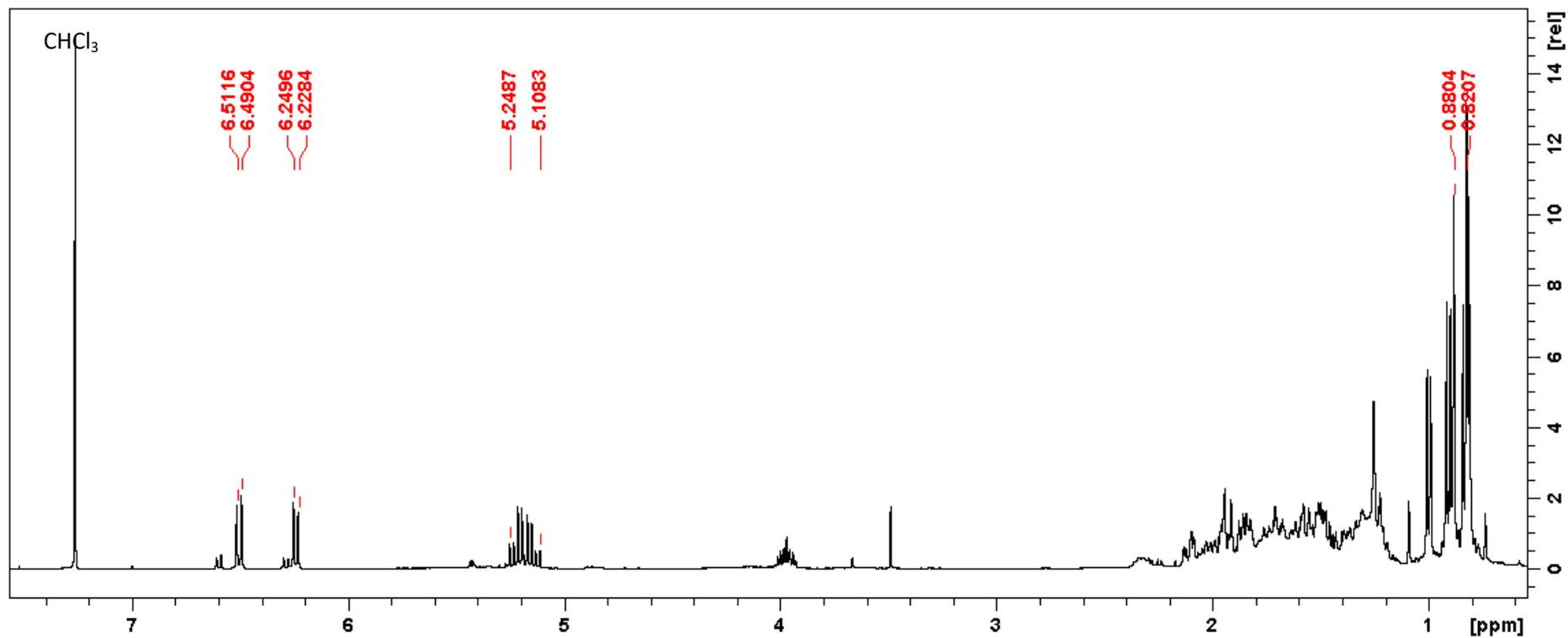
Figura 35: Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl₃) do composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Fonte: o autor.

Os espectros ampliados estão no Apêndice.

5.4.2 Elucidação estrutural do brassicasterol

No espectro de RMN de ^{13}C do composto brassicasterol foram encontrados 28 carbonos (Figura 38), o que condiz com a estrutura da molécula identificada pelo CG-EM, no tempo de retenção 88,4 minutos, com índice de similaridade de 75% (Tabela 5). O composto foi identificado na fração AcOEt dos micélios, no entanto, foi isolada da fração hexano, o que indica que nem todo composto foi extraído pela extração líquido-líquido.

Dos 28 sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C , destacam-se o sinal com deslocamento em δ 72,2 ppm referente ao carbono carbinólico (C-3); 4 sinais de carbonos de alcenos (C=C) em que observa-se um referente ao carbono quaternário (C-5) em 141,1 ppm, e três referentes aos carbonos metínicos em δ 122,1 (C-6), 132,1 (C-22) e 136,2 ppm (C-23).

Com o DEPT-135 (Figura 39) foi possível verificar a ausência dos carbonos 10 e 13 que são quaternários, com deslocamentos em δ 36,9 e 42,6 ppm respectivamente. Ainda por meio deste experimento foi possível identificar a presença de 6 carbonos metílicos (sp^3) em δ 12,4 (C-18), 17,9 (C-21), 19,7 (C-27), 19,9 (C-26), 20,3 (C-28) e 21,3 ppm (C-19).

Também foi possível com o DEPT-135 a identificação dos carbonos metilênicos com deslocamentos em δ 21,4 (C-11), 24,6 (C-16), 28,9 (C-15), 29,4 (C-7), 30,0 (C-1), 37,6 (C-2), 40,0 (C-12) e 42,6 ppm (C-4), e de carbonos metínicos (sp^3) em δ 32,2 (C-8), 33,4 (C-25), 40,5 (C-20), 43,2 (C-24), 50,5 (C-9), 56,4 (C-14) e 57,2 ppm (C-17). Os dados obtidos pelo RMN- ^{13}C foram comparados com os dados de Sun e colaboradores (2014) (Tabela 7), que comprovaram a estrutura do esteroide brassicasterol (Figura 37).

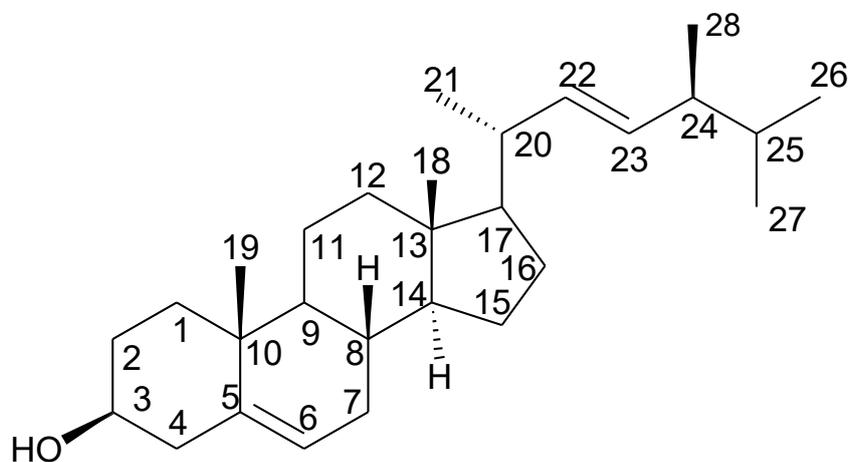
Pelo espectro de RMN- ^1H foi observado o sinal do hidrogênio metínico em δ 5,33-5,35 (m, 1H, H-6) (Apêndice 8). Este hidrogênio faz acoplamento com os hidrogênios do C-7 que possui 2 hidrogênios. Como se trata de um anel, observa-se acoplamento distinto com os hidrogênios vizinhos, devido à frequência do equipamento observa-se um multipeto.

Na estrutura também existem outros hidrogênios metínicos com deslocamento em δ 5,10-5,20 (m, 1H, H-22 e H-23) (Apêndice 8). Para estes hidrogênios o acoplamento foi diferente de H-6 e H-7, pois se esperava um duplo-dupeto oriundo do acoplamento entre os hidrogênios vizinhos (um de

cada lado), entretanto, devido a frequência do equipamento, não foi possível diferenciar os dois duplo-dupletos. Sendo assim, observou um multipletto como mostra a Figura 40.

Outros sinais de hidrogênios no espectro foram identificados e comparados com a literatura, como o hidrogênio metínico do C-3 em δ 3,40-3,50 (m, 1H, H-3) (Apêndice 9), que é um hidrogênio de carbono carbinólico. Há também os hidrogênios metílicos em δ 0,9 (d, 3H, J = 6,8 Hz, H-21), e em δ 0,94 (d, 3H, J = 6,5 Hz, H-26 e H-27) (Apêndice 10) apresentando como dupletos por estarem ao lado de carbonos metínicos.

Figura 37: Estrutura do brassicasterol.

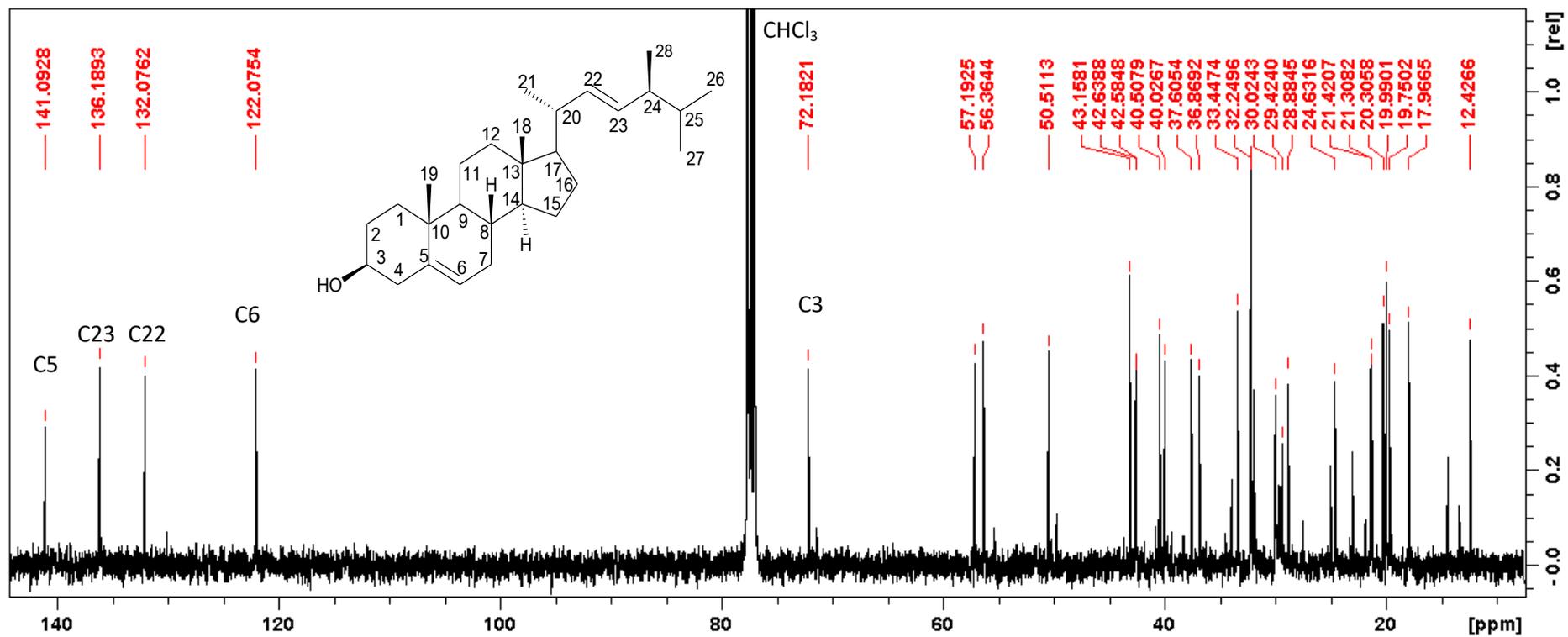


Fonte: o autor.

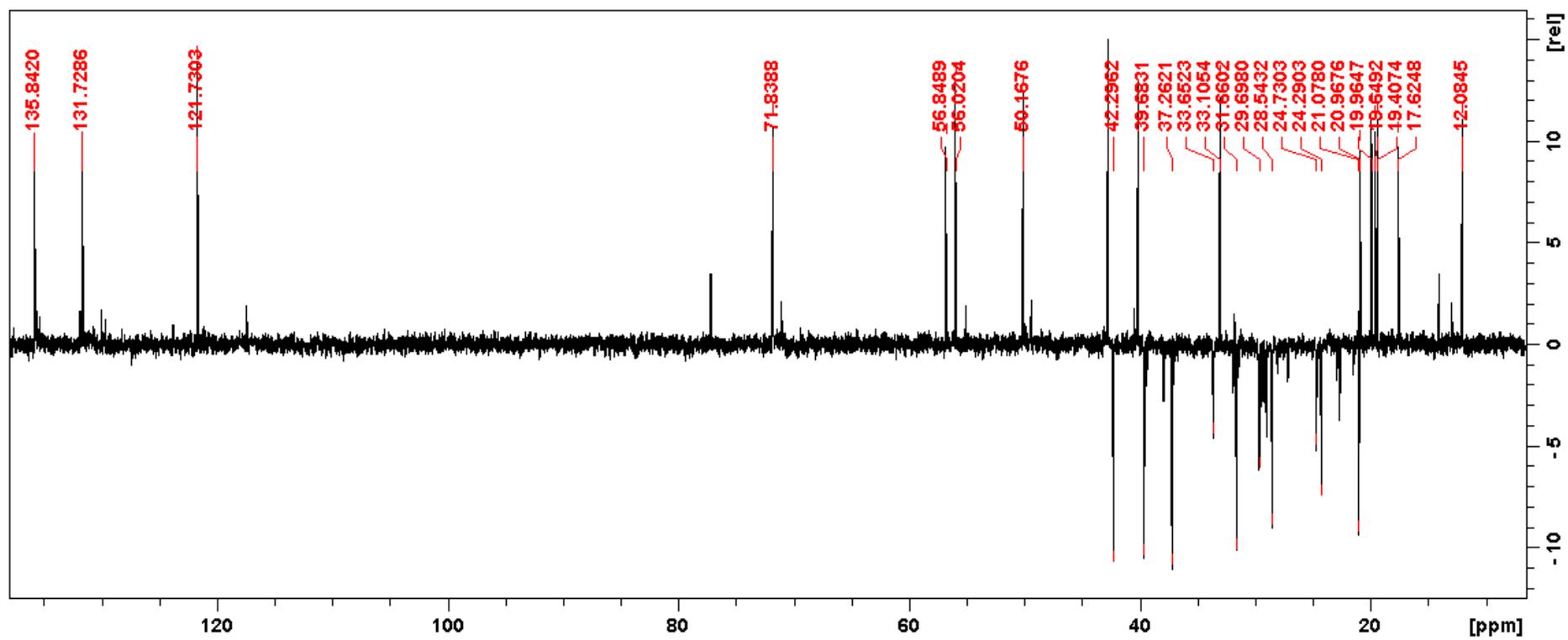
Tabela 7: Atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C no espectro de RMN do brassicasterol em comparação com a literatura.

Nº do c	Dados experimentais			Sun et al. (2014)	
	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (m, integral, J)	RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)	DEPT135	RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (m, integral, J)	RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)
1		30,0	CH_2		31,8
2		37,6	CH_2		37,4
3	3,40-3,50 (m, 1H)	72,2	CH	3,55 (m, 1H)	72,0
4		42,6	CH_2		42,4
5	-	141,1	C	-	140,9
6	5,30-5,40 (m, 1H)	122,1	CH	5,34 (m, 1H)	121,9
7		29,4	CH_2		29,9
8		32,2	CH		32,1
9		50,5	CH		50,3
10	-	36,9	C	-	36,7
11		21,4	CH_2		21,2
12		40,0	CH_2		39,8
13	-	42,6	C	-	42,5
14		56,4	CH		56,2
15		28,9	CH_2		28,7
16		24,6	CH_2		24,4
17		57,2	CH		57,0
18		12,4	CH_3		12,2
19		21,3	CH_3		21,1
20		40,5	CH		40,3
21	0,90 (d, 3H, 6,8 Hz)	17,9	CH_3	0,91 (d, 3H, 6,8 Hz)	17,8
22	5,10-5,20 (m, 1H)	132,1	CH	5,18 (m, 1H)	131,9
23	5,10-5,20 (m, 1H)	136,2	CH		136,0
24		43,2	CH		43,0
25		33,4	CH		33,3
26	0,94 (d, 3H, 6,5 Hz)	19,9	CH_3	0,83 (d, 3H, 6,5 Hz)	19,8
27	0,94 (d, 3H, 6,5 Hz)	19,7	CH_3	0,82 (d, 3H, 6,5 Hz)	19,6
28	0,72 (s, 3H)	20,3	CH_3	0,69 (s, 3H)	20,1

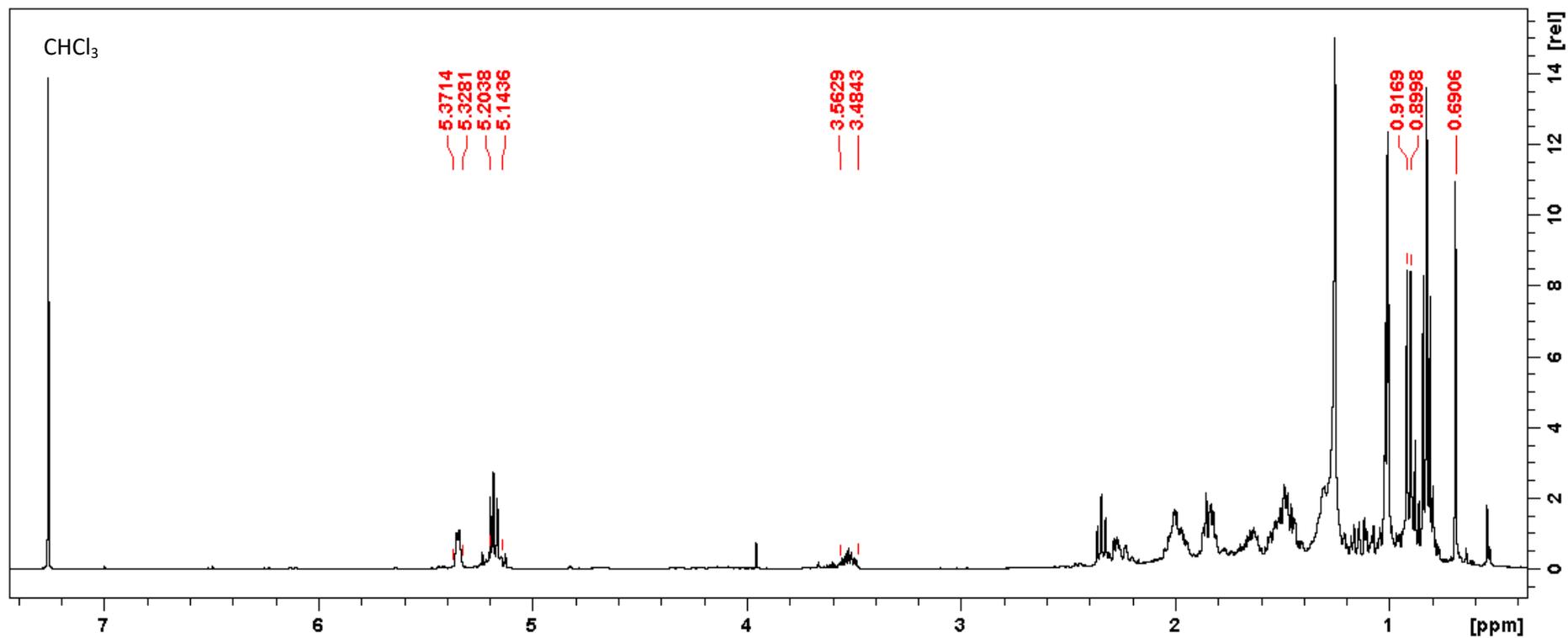
Fonte: o autor.

Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do brassicasterol.

Fonte: o autor.

Figura 39: Espectro de RMN DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do composto brassicasterol.

Fonte: o autor.

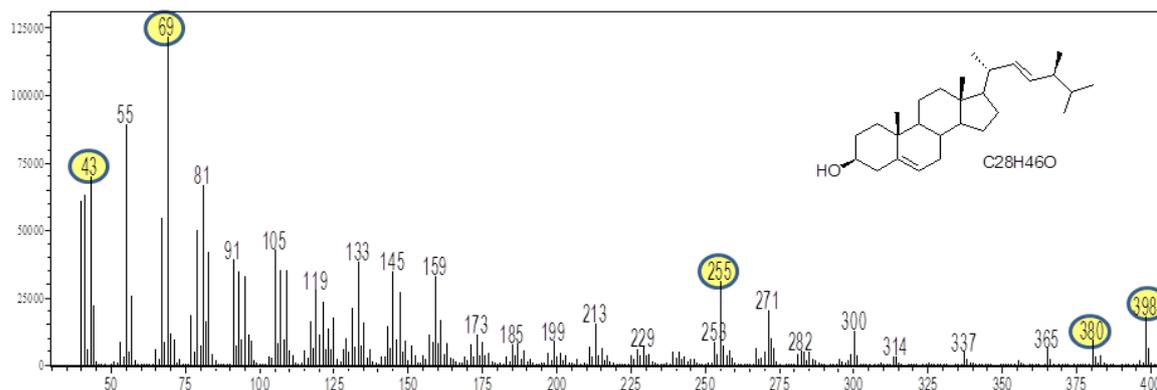
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do brassicasterol.

Fonte: O autor.

5.5 Fragmentação por CG-EM dos compostos brassicasterol e ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol

No espectro de massas do brassicasterol foi possível observar o pico do íon molecular com m/z 398 (Figura 41).

Figura 41: Espectro de massas obtido por CG-EM do composto brassicasterol.

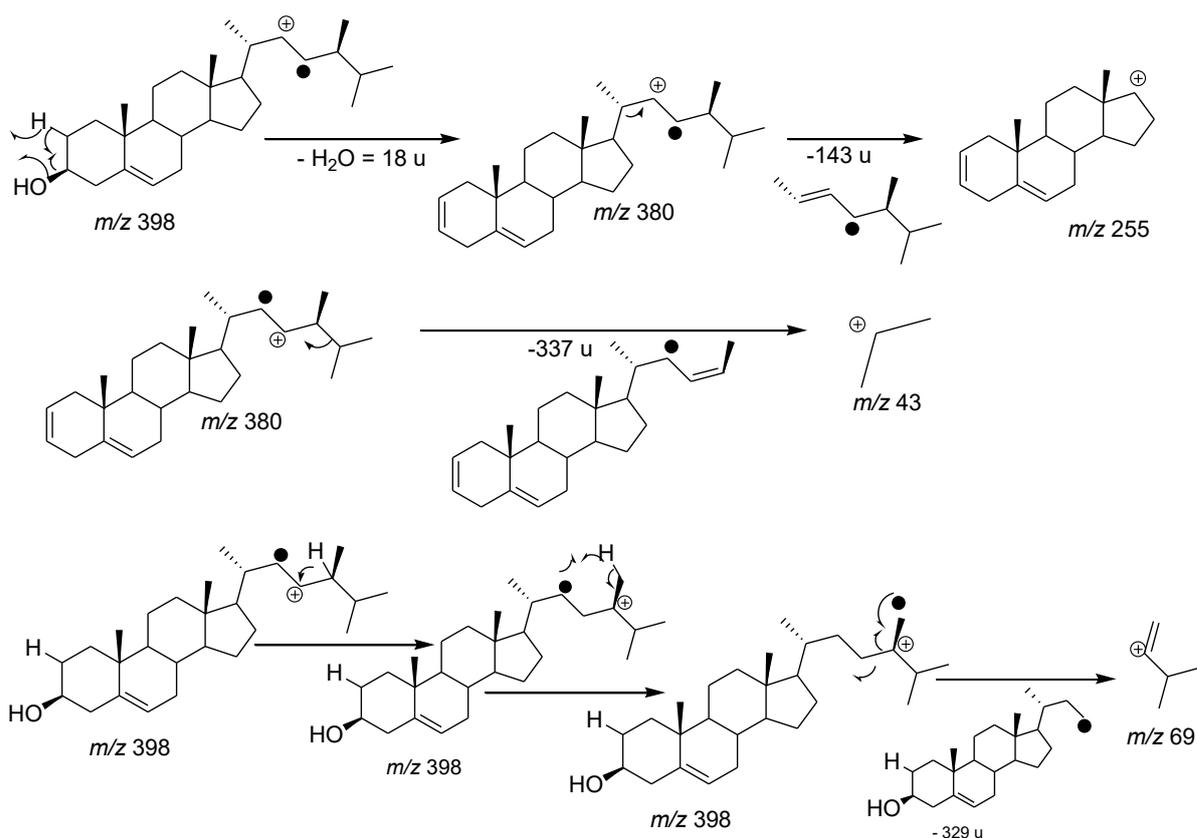


Fonte: o autor.

Tendo o espectro de fragmentação do composto, foi possível comparar os dados dos fragmentos com a estrutura geral da molécula. A massa molecular do composto é 398 u, correspondente a fórmula molecular C₂₈H₄₆O. Como mostra o espectro de massas há alguns íons fragmentos mais intensos, como m/z de 69, 43, 255 e 380.

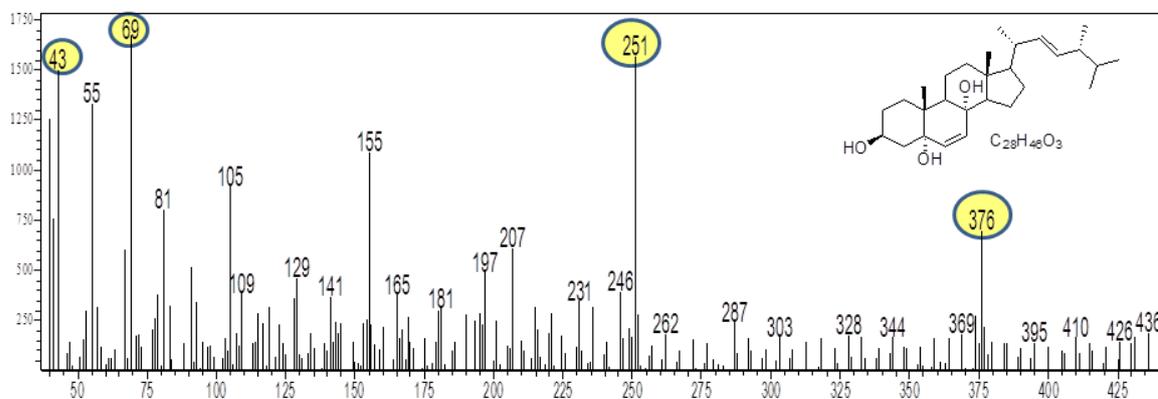
Para melhor compreensão sobre a formação dos íons fragmentos do composto brassicasterol, foi feito uma proposta de fragmentação mostrada na Figura 42.

Figura 42: Propostas de fragmentação do brassicasterol.



Fonte: o autor.

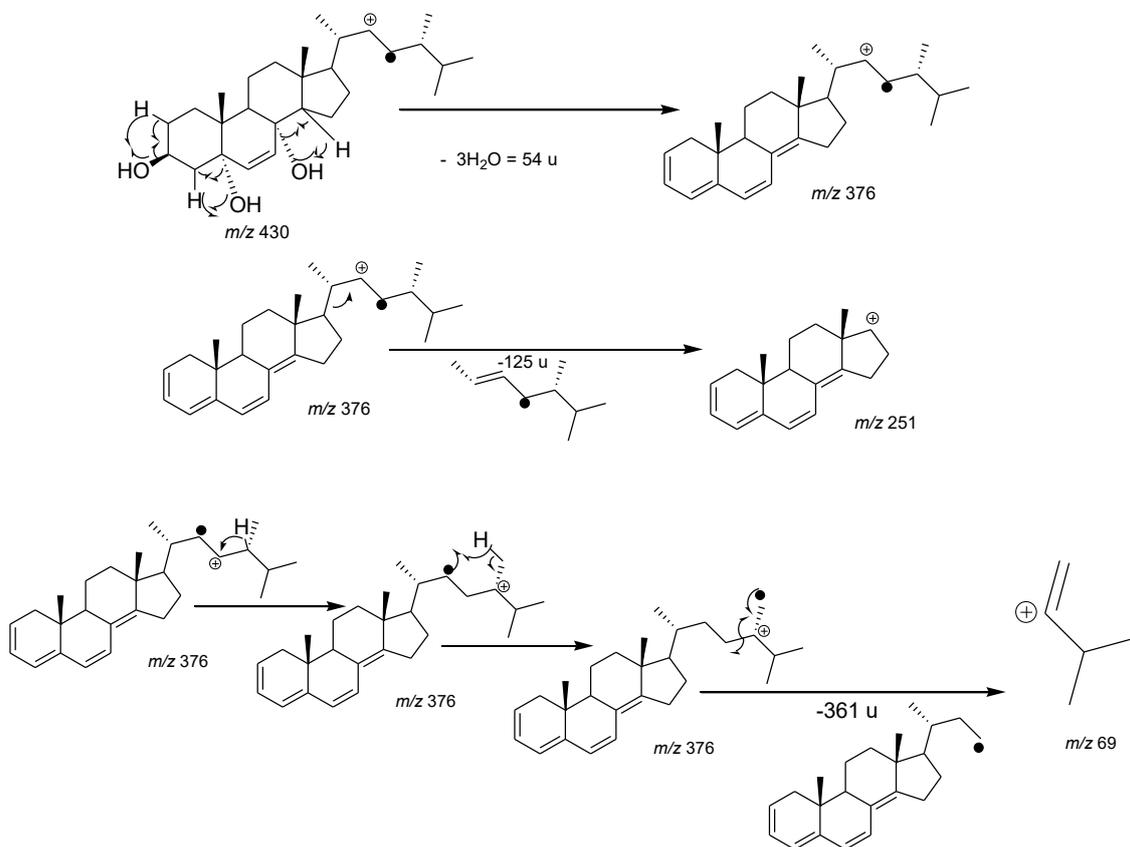
Na Figura 43 se encontra o espectro de massas do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol. Nele estão destacados alguns picos de íon molecular que serão discutidos adiante.

Figura 43: Espectro de massas obtido por CG-EM do composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.

Fonte: o autor.

O íon molecular de m/z 430 não é possível ver no espectro de massas, no entanto, é possível ver o pico de m/z referente aos fragmentos. Na Figura 44 se encontram algumas propostas de fragmentações.

Figura 44: Propostas de fragmentação do ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8, α -triol.



Fonte: o autor.

5.6 Atividade antibacteriana

Os fungos podem produzir metabólitos secundários capazes de inibir a ação de bactérias e até mesmo de outros fungos, como no caso dos extratos e isolados de *Beauveria bassiana* que já foram estudados (SAHAB, 2012, SHIN et al., 2013, PARINE et al., 2010, WANG; XU, 2012, SEM; SHUKLA; SANDHU; 2015), e também de outras espécies de fungos (RANI et al., 2017).

No caso deste trabalho foi feita a análise de atividade antibacteriana que forneceu a concentração mínima inibitória (CIM), ou seja, a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano em 50%. Os resultados para o teste com os extratos dos diferentes fungos, estão inseridos na Tabela 8,

contra bactérias aeróbicas. Os resultados que são considerados com boa atividade contra bactérias, são aqueles cujas concentrações mínimas inibitórias se aproximam de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que concentrações entre 200 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas de atividade moderadas (HOLETZ et al., 2002).

Tabela 8: Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de fungos contra bactérias aeróbicas.

Extratos	Bactérias / Concentração inibitória mínima - $\mu\text{g/mL}$			
	<i>S. mutans</i> ¹ ATCC 25175	<i>S. mitis</i> ¹ ATCC 49456	<i>S. sanguinis</i> ¹ ATCC 10556	<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i> ² ATCC 43717
A	>400	200	400	>400
B	>400	400	200	400
C	>400	>400	>400	>400
D	>400	200	200	>400
E	>400	200	400	>400
F	>400	>400	>400	>400
G	>400	>400	>400	>400
H	>400	200	400	>400
I	>400	>400	>400	>400
Clorexidina	0,922	3,688	0,922	0,460

Nota: ¹gram-positiva; ²gram-negativa; **A** e **B** hexano e acetato de etila dos micélios de *Cercospora brachiata*, respectivamente; **C**: acetato de etila do caldo de crescimento de *Cercospora brachiata*; **D** e **E** acetato de etila meios ácido e neutro do caldo de crescimento de *Beauveria bassiana*, respectivamente; **F** e **G** hexano e acetato de etila dos micélios de *Beauveria bassiana*, respectivamente; **H** e **I**: acetato de etila meio neutro e ácido do caldo de crescimento de *Verticillium* sp, respectivamente.

Fonte: o autor.

Como demonstrado na tabela anterior, os valores encontrados para atividade antibacteriana, são considerados moderados para o extrato hexano dos micélios de *Cercospora brachiata* contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*; para o extrato acetato de etila dos micélios de *Cercospora brachiata* contra *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; para o extrato acetato de etila (meio ácido) do caldo de *Beauveria bassiana* contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*; para o extrato acetato de etila (meio neutro) do caldo de *Beauveria bassiana* contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* e para o extrato acetato de etila (meio neutro) do caldo de *Verticillium* sp contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*.

Os extratos dos fungos também foram testados contra bactérias anaeróbicas, e os resultados estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de fungos contra bactérias anaeróbicas.

Extratos	Bactérias / Concentração inibitória mínima - $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ² ATCC 33277	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ² ATCC 25586	<i>Actinomyces naeslundii</i> ² ATCC19039
A	400	>400	400
B	200	400	100
C	400	>400	200
D	100	100	200
E	200	200	400
F	>400	>400	>400
G	>400	>400	>400
H	200	400	400
I	>400	>400	>400

Nota: ¹gram-positiva; ²gram-negativa; **A e B** hexano e acetato de etila dos micélios de *Cercospora brachiata*, respectivamente; **C**: acetato de etila do caldo de crescimento de *Cercospora brachiata*; **D e E** acetato de etila meios ácido e neutro do caldo de crescimento de *Beauveria bassiana*, respetivamente; **F e G** hexano e acetato de etila dos micélios de *Beauveria bassiana*, respectivamente; **H e I**: acetato de etila meio neutro e ácido do caldo de crescimento de *Verticillium* sp, respectivamente. Controle positivo: Metronidazol para *B.fragilis* ATCC 25285 CIM: 0,3688 $\mu\text{g mL}^{-1}$; *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 CIM: 1,475 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
Fonte: o autor.

Os resultados da Tabela 9 mostraram que os extratos que possuem atividade promissora contra estas bactérias são: extrato acetato de etila dos micélios de *Cercospora brachiata* contra a bactéria *Actinomyces naeslundii* e o extrato acetato de etila (meio ácido) do caldo de *Beauveria bassiana* contra as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Enquanto que os extratos que tiveram atividade moderada foram: extrato hexano dos micélios de *Cercospora brachiata* contra as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*; extrato acetato de etila dos micélios de *Cercospora brachiata* contra *Fusobacterium nucleatum*; extrato acetato de etila do caldo de *Cercospora brachiata* contra *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*; extrato acetato de etila (meio ácido) do caldo de *Beauveria bassiana* contra *Actinomyces naeslundii*; extrato acetato de etila (meio neutro) do caldo de *Beauveria bassiana* contra *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces naeslundii* e o extrato acetato de etila (meio neutro) do caldo de *Verticillium* sp contra as bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces naeslundii*.

Trabalhos já vem relatando a atividade antibacteriana dos metabólitos do fungo *Cercospora sp.* Segundo Hema e colaboradores (2015) observou-se atividade contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, entretanto o resultado foi dado em zona de inibição de halo, apresentando valores de $15,0 \pm 0,3$ mm e $25,0 \pm 0,4$ mm, respectivamente. Isto corrobora, de maneira qualitativa, aos dados obtidos neste trabalho, no qual o extrato acetato de etila dos micélios do fungo *Cercospora brachiata* apresentou atividade contra a bactéria aeróbica *Streptococcus sanguinis*, com CIM igual a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que, contra a bactéria aneróbica *Actinomyces naeslundii*, este mesmo extrato deu uma concentração mínima inibitória de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Comprovando, portanto, a atividade antibacteriana dos metabólitos deste fungo.

Outra fonte de metabólitos antibacterianos testado neste trabalho, foi o extrato do *B. bassiana*. Para comparação da atividade antibacteriana dos fungos *B. bassiana*, foi elaborada a Tabela 10, que contém valores experimentais da literatura de halos de inibição e CIM.

Tabela 10: Atividade antibacteriana dos metabólitos de *B. bassiana*.

(continua)

Bactéria	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)	Referência
<i>Bacillus subtilis</i>	-	18	
<i>Escherichia coli</i>	-	30	Sen et al. (2015)
<i>Salmonella typhi</i>	-	6	
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	-	-	
<i>Micrococcus aureus</i>	1600	9,5	
<i>Streptococcus aureus</i>	1600	28,5	
<i>Bacillus cereus</i>	1600	26,5	Sahab (2012)
(<i>Bacillus subtilis</i>)	1600	18,25	
<i>Escherichia coli</i>	1600	20,75	
<i>Aeromonas sp.</i>	1600	21,25	

Tabela 10: Atividade antibacteriana dos metabólitos de *B. bassiana*.

(conclusão)

Bactéria	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	1000	21	
<i>Bacillus subtilis</i>	1000	24,8	
<i>Bacillus sphaericus</i>	1000	22,8	
<i>Micrococcus luteus</i>	1000	24,3	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	Parine et al. (2010)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1000	17,9	
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1000	11,2	
<i>Escherichia coli</i>	1000	31,2	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	19,6	

Fonte: o autor.

É notório pelos dados que na maioria dos experimentos, é feito a relação da concentração e a zona inibitória, dificultando as relações diretas entre os dados deste trabalho e os da literatura, já que não é possível no caso deste trabalho comparar CIM com área de inibição. No entanto, foram confirmadas as atividades antibacterianas dos extratos deste fungo, principalmente contra as bactérias anaeróbicas *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, com CIM de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as bactérias.

Com os dados obtidos sobre os metabólitos identificados anteriormente, foi possível fazer comparações com as classes de compostos presentes nos extratos e as atividades já mencionadas na literatura, a exemplo dos ácidos graxos que possuem atividade antibacteriana já comprovada.

Segundo Desbois e Smith (2010) os ácidos graxos de cadeia longa geralmente estão associados a açúcares, glicerol ou fosfato, e os mesmos são quebrados por lipases formando os ácidos graxos livres que possuem elevada atividade antibacteriana.

Ácidos graxos como láurico, mirístico, palmítico, sapiênico, cis-8-octadecenóico estão presentes na pele humana em concentração de $10\text{-}15 \mu\text{g cm}^{-2}$. Estes ácidos são usados como metabólitos de defesa do organismo contra agentes microbianos (WILLE; KYDONIEUS 2003; TAKIGAWA et al. 2005).

Para Desbois e Smith (2010), a estrutura dos ácidos graxos relacionada a quantidade de carbono e a presença ou não de insaturações estão relacionadas com o potencial antimicrobiano de cada ácido, no entanto, estas implicações ainda não estão bem fundamentadas.

Ainda sobre estes autores, os mesmos indicam que o principal mecanismo de ação dos ácidos está relacionado ao fato de aderirem as membranas celulares por meios das interações hidrofóbicas e hidrofílicas, causando alterações estruturais nas mesmas, provocando na célula a lise da membrana celular. O que desencadeia processos que podem contribuir para inibição do crescimento ou morte das bactérias, por meio de inibição da atividade enzimática, comprometimento da absorção de nutrientes e geração de produtos de peroxidação tóxica e auto-oxidação.

Outra classe de compostos que não só foram identificados, mas também isolados neste trabalho foram os esteroides. Eles possuem atuação semelhante aos ácidos graxos sobre as membranas celulares, pois aderem as camadas lipídicas das membranas e podem interferir em sua estrutura.

Segundo Savage e colaboradores (2002) os esteroides são antibióticos viáveis no controle bacteriano, e que podem ser associados às unidades catiônicas para aumentar a adesão nas membranas, podendo por meio de cargas polarizar a membrana, com isto a passagem de nutrientes e a lise celular ocorre com mais facilidade.

Para este autor os esteroides são fontes viáveis por responder a experimentos contra bactérias gram-negativas, que possuem mais resistência a antibióticos do que as gram-positivas. Isto ocorre devido a bicamada que contém na parede celular, enquanto que as gram-positivas possui apenas uma camada lipídica, ou seja, esteroides conseguem polarizar as membranas complexas das bactérias gram-negativas, e assim se tornam bactericidas promissores frente a resistência destes organismos. Assim sendo, ácidos graxos e esteroides podem ser os compostos bioativos que dão atividade aos extratos.

6.0 CONCLUSÕES

Os fungos continuam sendo uma fonte promissora para isolamento de substâncias bioativas. Neste trabalho foram identificados metabólitos que possuem atividade biológica já comprovada na literatura, a exemplo dos ácidos graxos, que possuem funções estruturais, por fazerem parte da membrana celular, mas também podem ser usados no combate a doenças como esclerose múltipla, esquizofrenia, etc.

Outros metabólitos secundários identificados e isolados foram os esteroides que possuem função estrutural nas células, assim como os ácidos graxos; no entanto, pela literatura sua atividade biológica está relacionada com atividades anti-inflamatórias, ou seja, possuem atividades estruturais similares, entretanto, suas atividades biológicas são distintas.

Os esteroides ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol e brassicasterol foram isolados por cromatografia em coluna da fração hexano dos micélios de *C. brachiata*, identificados por CG-EM e caracterizados por RMN. Estes compostos ainda não haviam sido relatados na literatura como sendo isolados do fungo de gênero *Cercospora*. Os compostos identificados em CG-EM neste trabalho em sua maioria também não foram relatos na literatura como identificados nas espécies de fungos analisados.

Com relação aos resultados encontrados para atividades antibacterianas, pode se dizer que a atividade é promissora para o extrato em hexano dos micélios de *C. brachiata*, e para o extrato em acetato de etila dos micélios, do caldo de crescimento *C. brachiata* e do caldo de crescimento de *B. bassiana* que deram CIM com valores entre 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas da cavidade bucal humana. Ou seja, os extratos mencionados possuem atividade antibacteriana promissora (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e moderada (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Assim sendo, os extratos destes fungos podem continuar sendo analisados, com a finalidade de encontrar específicos metabólitos bioativos, e mais metabólitos que podem ser classificados como secundários, isto pelo fato de as técnicas de separações cromatográficas permitirem a identificação e o isolamento das substâncias citadas durante o trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABIGAIL, Dulce. **Beauveria bassiana**. [S. l.], 2011. Disponível em: <http://beauveriabassiana.blogspot.com/2011/>. Acesso em: 17 ago. 2018.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. ed. Carol Stream: Allured Bussiness Media, p. 804, 2007.
- ALARCÓN, R.; CARRIÓN, G. The use of *Verticillium lecanii* in coffee plantations as biological control of coffee rust. **Fitopatologia**, v. 29, n. 1, p. 82-85, 1994.
- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600026>.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Química de produtos naturais: Plantas que testemunha histórias. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1117-1153, 2017. <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v9n3a17.pdf>
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, Piracicaba, Cap. 11, p. 289-381, 1998.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S.A.; TAMIA, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios. Ed. **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**, p. 69-110, 2008. ISBN: 978-85-7133-056-6
- ANDRADE, C. L. Estudo comparativo de isolados de *Cercospora coffeicola*: Análises moleculares, bioquímicas e processo infeccioso na interação com cafeeiro. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 122, 2015. http://www.prpg.ufla.br/fitopatologia/wp-content/uploads/2016/07/TESE_Estudo-comparativo-de-isolados-de-Cercospora-coffeicola.pdf
- ANTIA-LONDONO, O. P; POSADA-FIOREZ, F.; BUSTILLO-PERDEY, A. E.; GONZÁLEZ-GARCIA, M. T. Produccion en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. **Cenicafe Avances Tecnicos**, n. 182, p.1-12, 1992. <file:///C:/Users/Raquel/Downloads/AntiaPosadaetal1992ProduccionfincahongoBeauveriabassianacontrolbrocadelcafe.pdf>
- ARANGO, J. J. A critical review of the basic facts in the history of cinchona. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 53, p. 272-311, 1949. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1949.tb00419.x>
- BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. **Plant Pathology and Quarantine**, v. 2, p. 125-130, 2012. Doi: 10.5943/ppq/2/2/5
- BLACKLOCK, B. J.; SCHEFFLER, B. E.; SHEPARD, M. R.; JAYASURIYA, N.; MINTO, R. E. Functional diversity in fungal fatty acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 37, n. 285, p. 28442-28449, 2010. Doi:10.1074/jbc.m110.151498
- CARDOSO-UGARTE, G. A.; LÓPEZ-MALO, A.; SOSA-MORALES, M. E. **Chapter 38 - Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils**. In: PREEDY, V. R. (Ed.). **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. San Diego: Academic Press, 2016. p.339-347. ISBN 978-0-12-416641-7. Doi:10.1016/b978-0-12-416641-7.00038-9

CERCOSPORIOSE Mancha foliar (*Cercospora beticola*). [S. /], 2018. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/cercosporiose_1623.html. Acesso em: 10 set. 2018.

CHUPP, C. A. Monograph of the fungal genus *Cercospora*. **Science**, v. 120, p. 534-535, 1954. DOI: 10.1126/science.120.3118.534-b

CLEMENTE, M.; STOCOCO, C.; MOCELIN, D.; FERNANDES, L. C. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e sua ação sobre o sistema imunitário de indivíduos participantes de atividade física. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 5, p. 18-27, 2007. ISSN 1981-9927.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: **Editora da UNICAMP**, p. 452, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000200018>

COSTA, M. A. Biocontrole de nematoides com fungos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p. 44. 2015. <http://hdl.handle.net/11449/128036>

CRESPO, R.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M. P.; DAL BELLO, G. M. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.

Microbiological Research, v. 163, n. 2, p. 148-151, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.013>

CROUS, P.W.; BRAUN, U. Mycosphaerella and its anamorphs. 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. **CBS Biodiversity Series**, n. 1, CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, v.1, p. 571, Utrecht. 2003. ISBN: 90-70351-49-8

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by the fungal toxin, cercosporin. **Plant Physiology**. v. 71, n. 4, p. 763-766, 1983 . DOI: 10.1104/pp.71.4.763

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated cercospora toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 461-490, 2000. doi:10.1146/annurev.phyto.38.1.461

DAUB, M. E.; CHUNG, K-R. Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. **The American Phytopathological Society**, 2007.

<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Cercosporin.aspx>

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 197-206, 2005. DOI:10.1016/j.femsle.2005.08.033

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Reactive oxygen species in plant pathogenesis: the role of perylenequinone photosensitizers. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 970-989, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5080>

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1629-1642, 2010. DOI: 10.1007/s00253-009-2355-3

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 2^a Ed. Chichester: Hohn Wiley & Sons LTD, 2002, Cap. 5, p. 167-289. ISBN: 978-0-470-74168-9

FARGUES, J. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. **Mycopathologia**, v. 15, n. 3, p. 127-138, 2001.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.521.8176&rep=rep1&type=pdf>

GARCIA, M. O. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (STERNORRYNCHA: ORTHEZIIDAE); Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, pg. 79, 2004. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-10092004-151307/pt-br.php>

GODOY, C. V.; BERGAMIN-FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. (Ed.). Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas, 3. ed, São Paulo: **Editora Agronômica Ceres**, v. 2, p. 184-200, 1997.

GOUDET, C.; MILAT, M. L.; SENTENAC, H.; THIBAUD, J. B. Beticolins, Nonpeptidic, Polycyclic molecules produced by the phytopathogenic Fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins, **MPM: The American Phytopathological Society**, v. 13, n. 2, p.203-209, 2000. DOI:10.1094/MPMI.2000.13.2.203

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H.-D.; PARK, J.-H.; JAMA, A. N.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115-170, 2013. DOI:10.3114/sim0012

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, v. 95, n. 8, p. 951-959, 2005. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0951>

GUMACH A. S.; FERRARONI N. R. O papel da penicilina na medicina moderna. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2006. <http://www.dst.uff.br/revista18-1-2006/2.pdf>

HEMA. P; MURALI, M.; THRIVENI, M. C.; PRATHIBHA, M.; JAYARAMU, S. C.; AMRUTHESH, K. N. Phytochemical analysis and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Basella rubra* L. - A medicinal plant. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 2971-2978, 2015.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002. DOI:10.1590/S0074-02762002000700017

INDEX Fungorum. [S. l.], 2018. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/>. Acesso em: 22 ago. 2018.

INTARAUDOM, C.; BUNBAMRUNG, N.; DRAMAE, A.; BOONYUEN, N.; KOMWIJIT, S.; RACHTAWEE, P.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Acremonidins F–H and acremoxanthones F–G, antimicrobial substances from the insect fungus *Verticillium* sp. BCC33181. **Tetrahedron**, v. 72, n. 10, p. 1415-1421, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.01.043>.

JALAL, M. A. F.; HOSSAIN, M. B.; ROBESON, D. J.; HELM, D. van der. *Cercospora beticola*, phytotoxins: cebetins that are photoactive, Mg²⁺- Binding, chlorinated anthraquinone – xanthone conjugates. **Journal American Chemical Society**, v. 114, n. 15, p. 5967-5971, 1992. DOI: 10.1021/ja00041a009

KENNEDY, M. J.; READER, S. L.; DAVIES, R. J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 5, n. 42, p. 625-634, 1993. Doi:10.1002/bit.260420511

KIM, J. D.; SHIN, H. D. Taxonomic studies on *Cercospora* and allied genera in Korea (XII), **The Korean Journal of Mycology**, v. 27, n. 5, p. 363-371, 1999. doi:10.1016/s0007-1536(75)80210-5

- LARTEY, R. T.; CAESAR-TONTHAT, T. C.; CAESAR, A. J. Safflower: a new host of *Cercospora beticola*. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 797-801, 2005. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-89-0797>
- LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 209-211, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01879.x>
- LUO, Z.; LI, Y.; MOUSA, J.; BRUNER, S.; ZHANG, Y.; PEI, Y.; KEYHANI, N. O. Bbmsn2 acts as a pH-dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 1189-1202, 2015. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12542>
- MARCUZZO, L. L.; DUARTE, T. S.; FERNANDES, J. M. C.; HILLESHEIN, P. C.; SCHEIDT, B.T. Progresso temporal da cercosporiose da beterraba em diferentes genótipos e épocas de semeadura na primavera. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 3, p. 219-223, 2015. <http://www.scielo.br/pdf/sp/v41n3/0100-5405-sp-41-3-0219.pdf>
- MATEUS, E. C. D. A. F. Ervas que curam. Da “Terra das Ervanárias” à produção de plantas medicinais e de conhecimento. Lisboa. Tese de doutorado, Instituto de Ciências Sociais, Universidade de Lisboa, p.397, 2014. http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/20245/1/ulsd71424_td_Elsa_Mateus.pdf
- MILAT, M. L.; BLEIN, J. P.; EINHORN, J.; TABEL, J. C.; DUCROT, P. H.; LALLEMAND, J. Y. The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Part VII: Isolations and structure of beticolins 3 and 4. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 9, p. 1483-1486, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)60324-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)60324-6)
- MORAES, R. F. O.; TOSCANO, L. C.; PEREIRA, M. F. A.; PIETROBOM, V. L.; BARBOZA, C. A.M. S.; MARUYAMA, W.I. *Beauveria bassiana* em associação com milho geneticamente modificado no manejo de *Spodoptera frugiperda* e *Rhopalosiphum maidis*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-7, 2015. DOI: 10.1590/1808-1657001052013
- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A. C. O.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L., Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000200002>.
- NELSON, S. C. Cercospora leaf spot and berry blotch of coffee. **Plant Disease**, v. 41, p. 1-6, 2008. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-41.pdf>
- NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. *Beauveria bassiana* strains selection for biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 77-82, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100011>
- NORMAN, S. M.; POLING S. M.; MAIER, V. P.; NELSON, D. Ionylideneacetic acids and abscisic acid biosynthesis by *Cercospora rosicola*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 2317-2324, 1985. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867078>
- OLIVEIRA, J. H. H. L. D.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000800028>
- PARINE, N. R.; PATHAN, A. A. K.; B S.; NISHANTH, V. S.; BOBBARALA, V. Antibacterial efficacy of secondary metabolites from entomopathogenic fungi *Beauveria*

bassiana, IJCAS: **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 1, n. 5, p. 94-96, 2010.

http://www.academia.edu/3850322/Antibacterial_Efficacy_of_Secondary_Metabolites_from_Entomopathogenic_Fungi_Beauveria

PENG, W.; YOU, F.; LI, X. L.; JIA, M.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; QIN, L. P. A new diphenyl ether from the endophytic fungus *Verticillium* sp. isolated from *Rehmannia glutinosa*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 6, p. 673-675, 2013.

[https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60078-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60078-3)

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming: da descoberta da penicilina ao Prêmio Nobel. **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, n.3, p.129-151, 2005.

<http://ler.letras.up.pt/uploads/ficheiros/3379.pdf>

PEREIRA, J. M.; BARRETO, R. W.; ELLISON, C. A.; MAFFIA, L. A., *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent for *Lantana camara* from Brazil. **Biological Control**, v. 26, n. 1, p. 21-31, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00112-3)

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>

Portal Anvisa (taxonomia do fungo *Beauveria Bassiana*):

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/B40%2B%2BBeauveria%2BBassiana.pdf/7f3b672d-bd3e-4628-95dd-3b905bcb6569>

PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, 5601-5606, 2017. Doi:10.1073/pnas.1614680114

RANI, R.; SHARMA, D.; CHATURVEDI, M.; YADAV, J. P. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and time kill assay, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 1-6, 2017. DOI: 10.4172/2327-5073.1000280

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Murcha-de-Verticillium: um sério problema para o cultivo de hortaliças no Brasil. **Circular Técnica: Embrapa Hortaliças**, no. 40, p. 1-11, Dez. 2006. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPH-2009/32288/1/ct_40.pdf

RIVERA, A.; BENAVIDES, O. L.; RIOS-M. J. (22E)- Ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinus edodes* (Shiitake). **Natural Product Research**, v. 23, n. 3, p. 293-300, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/14786410802038671>

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. Botânica econômica brasileira. EPU/EDUSP: São Paulo, 1976. ISBN: 9788586742187

SAHAB, A. F., Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria Bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Research**, v. 8, n. 3, p. 1441-1444, 2012.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; BARRETO, S. S.; THEODORO, V. C. Progresso da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke) em cafeeiros sob cultivos orgânico e convencional.

Summa Phytopathologica, v. 34, n. 1, p. 48-54, 2008. DOI:10.1590/S0100-54052008000100009.

SANTOS, N. P. Passando da doutrina à prática: Ezequiel Corrêa dos Santos e a farmácia nacional. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p.1038-1045, 2007.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000400049>

SAVAGE, P. B.; LI, C.; TAOTAFU, U.; DING, B.; GUAN, Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 1-7, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11448.x

SEN, S.; SHUKLA, H.; SANDHU, S. S. Evaluation on *Beauveria Bassiana* for its antibacterial potencial, **International Journal of Pharma and Bio Scienses**, v. 6, n. 4, p.51-58, 2015. http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/4662_pdf.pdf

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>

SHEN, V. K.; SIDERIUS, D.W.; KREKELBERG, W.P.; HATCH, H.W.; Eds.; NIST Standard Reference Simulation Website, NIST Standard Reference Database Number 173, **National Institute of Standards and Technology**, Gaithersburg MD, 20899. <http://doi.org/10.18434/T4M88Q>.

SHIN T-Y.; KO, S-H.; LEE, W-W.; BAE, S-M.; CHOI, J-B.; WOO, S-D. Screening and evaluation of antibacterial metabolites from entomopathogenic fungi, **IJIE: nternational Journal of Industrial Entomology**, v. 26, n. 2, p. 89-94, 2013. DOI: 10.7852/ijie.2013.26.2.89

SOARES, P. H. dos S. **Reações de adição conjugada em esteroides – aplicação a potenciais agentes quimioterápicos**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade da Beira Interior, Corvilhã, 2013. <http://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/1353>

SPIKES, J. D. Photosensitization. In: SMITH, K. C. (Ed.). **The science of photobiology**. Boston, MA: Springer US, 1989. p.79-110. ISBN 978-1-4615-8061-4.

SUN, Y.; LIN, Y.; CAO, X.; XIANG, L.; QI, J. Sterols from *Mytilidae* show anti-aging and neuroprotective effects via anti-oxidative activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 21660-21673, 2014. Doi:10.3390/ijms151221660

TAKIGAWA, H.; NAKAGAWA, H.; KUZUKAWA, M.; MORI, H.; IMOKAWA, G. Deficient production of hexadecenoic acid in the skin is associated in part with the vulnerability of atopic dermatitis patients to colonisation by *Staphylococcus aureus*. **Dermatology**, v. 211, n. 3, p. 240-48, 2005. DOI: 10.1159/000087018

TREMACOLDI, C. R.; FILHO, A. P. S. S. Toxinas produzidas por fungos fitopatógenos: possibilidades de uso no controle de plantas daninhas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. ISSN: 1517-2201

TRUCKSESS, M. W. Mycotoxins. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 1, p. 202-212, 2001.

VALENZENO, D. P.; POOLER, J. P. Photodynamic action. **BioScience**, v. 37, n. 4, p. 270-276, 1987. DOI: 10.2307/1310590

VERTICILLIUM. [S. l.], 2010. Disponível em: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Verticillium>. Acesso em: 10 ago. 2018.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2367-2377, 2012. DOI: 10.3390/molecules17032367

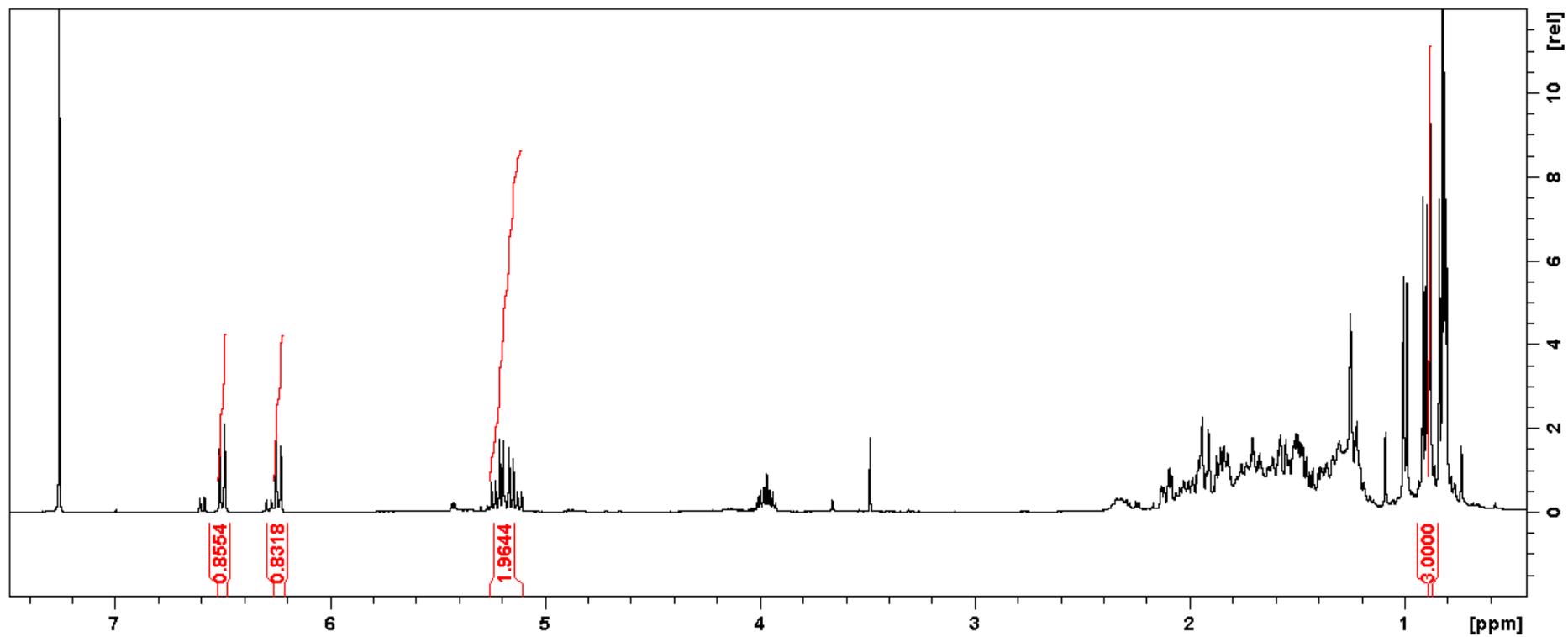
WANG, X.; ZHANG, H.; YANG, X.; ZHAO, J.; PAN, C. Enantioselective total synthesis of (+)-brazilin, (-)-brazilein and (+)-brazilide A. **Chemical Communications**, v. 49, n. 47, p. 5405, 2013. Doi:10.1039/c3cc42385a

WELLES, C. G. Taxonomic studies on the genus *Cercospora* in the *Philippine Islands*. **American Journal of Botany**, v. 12, n. 4, p. 195-2018, 1925. DOI: 10.2307/2435417

WILLE, J. J.; KYDONIEUS, A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 16, p. 176-187, 2003. DOI: 10.1159/000069757)

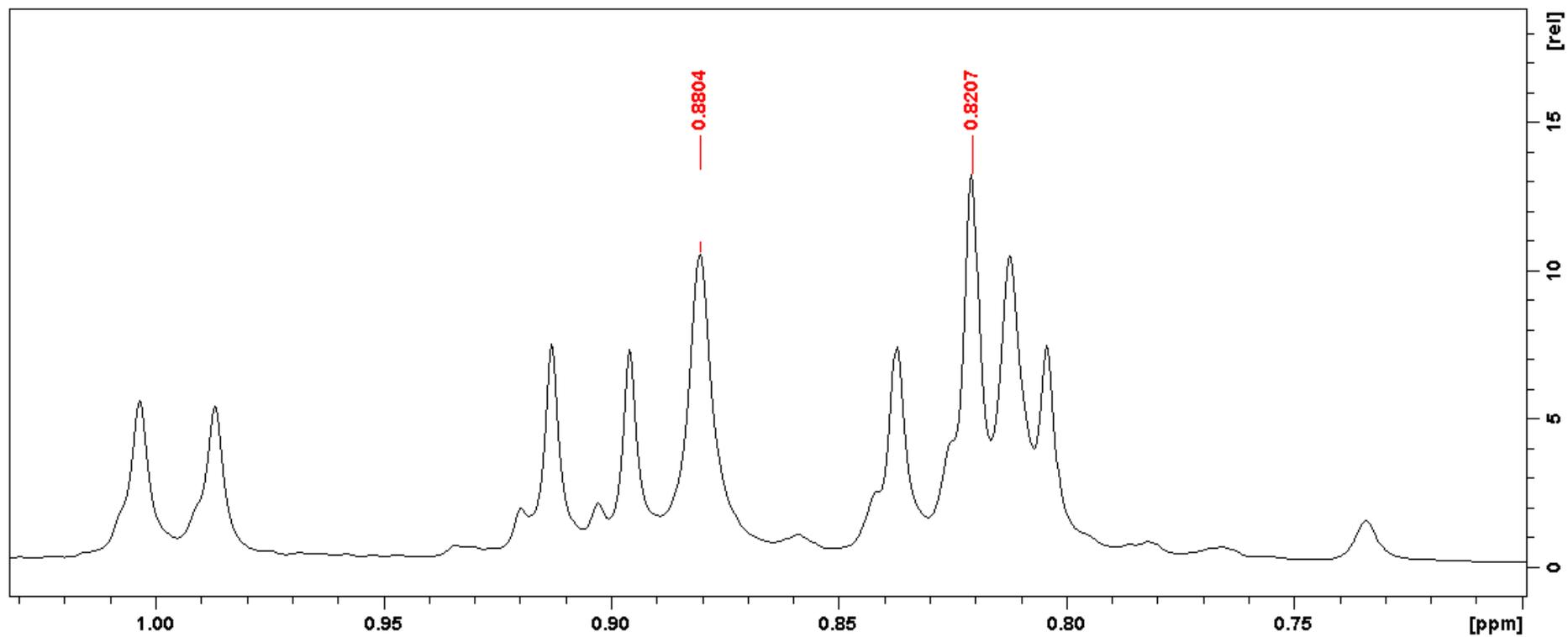
Apêndice 1.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol.



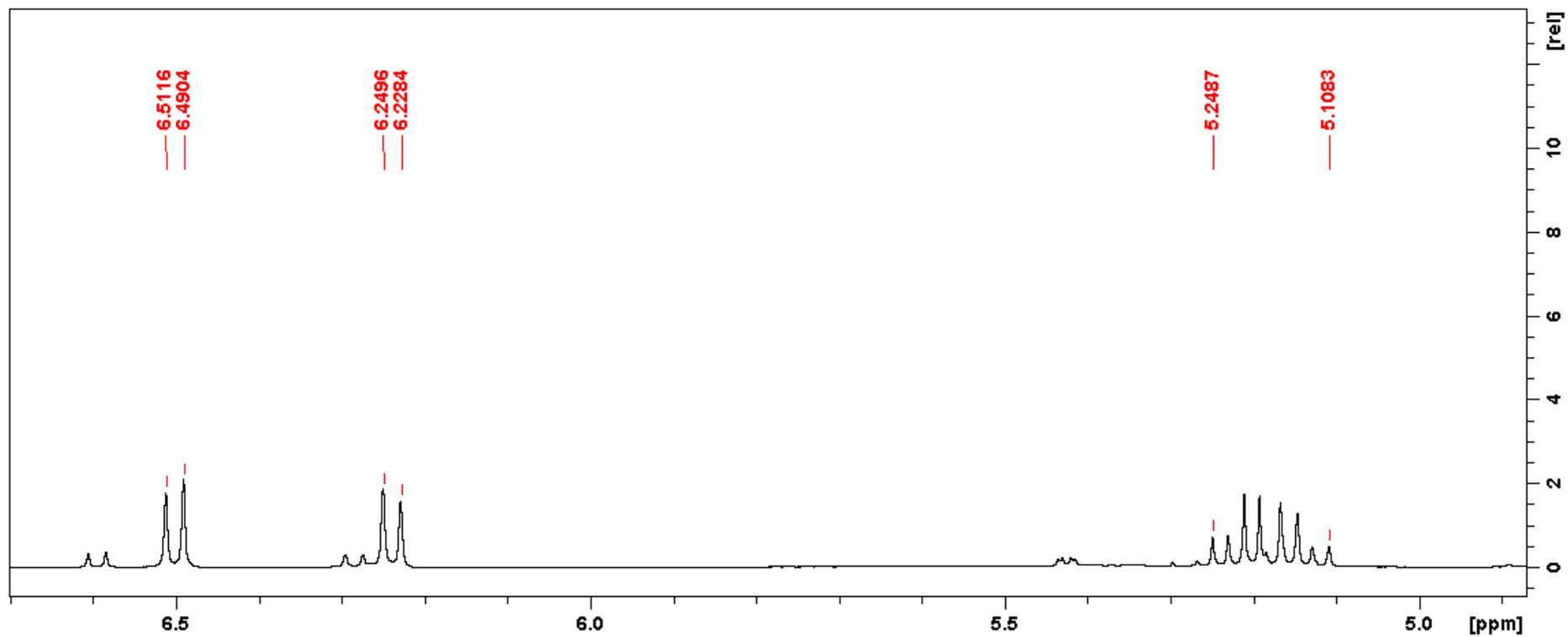
Apêndice 2.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-A).



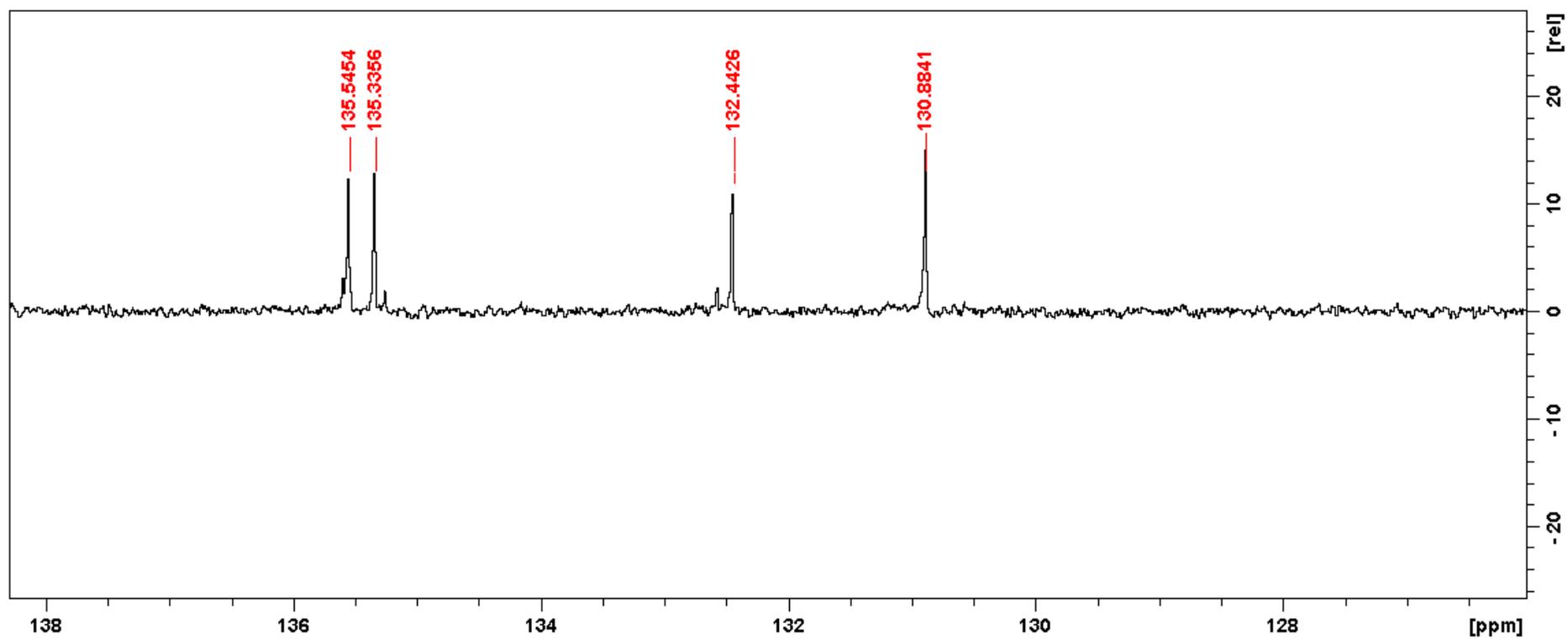
Apêndice 3.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-B).



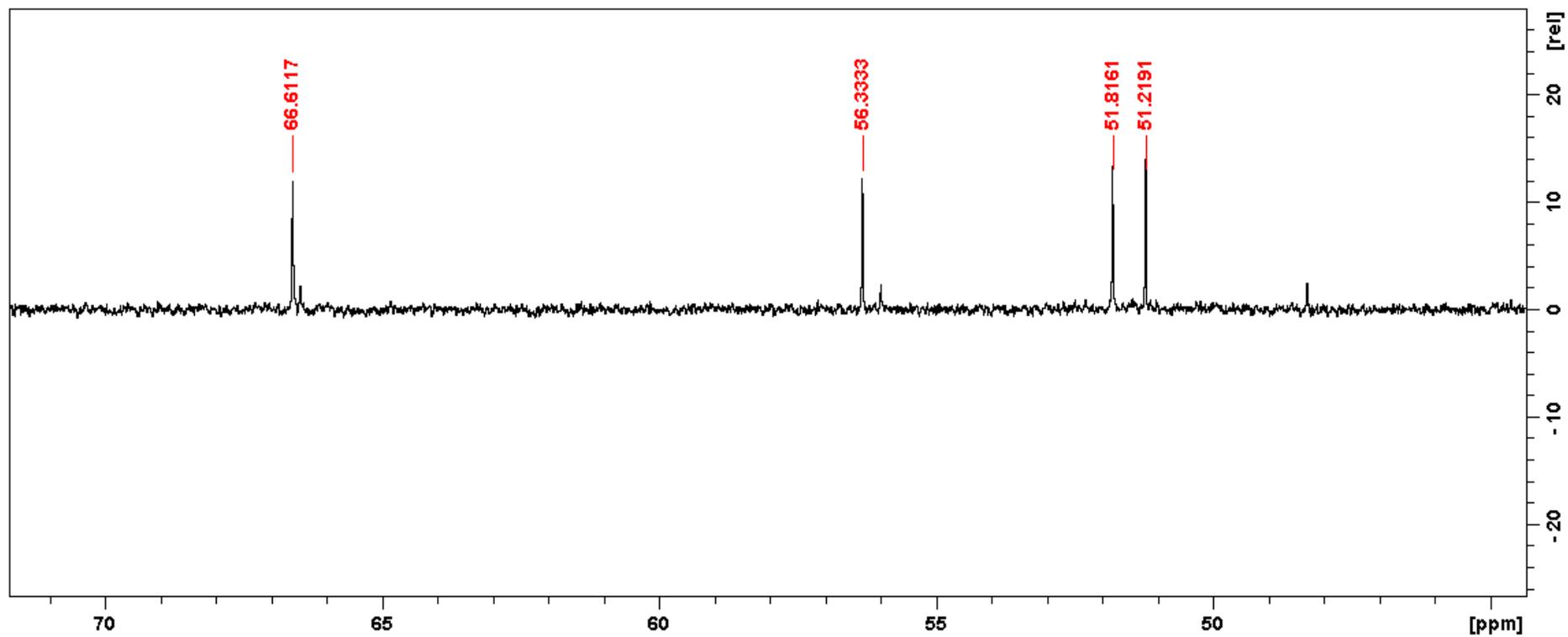
Apêndice 4.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-A).



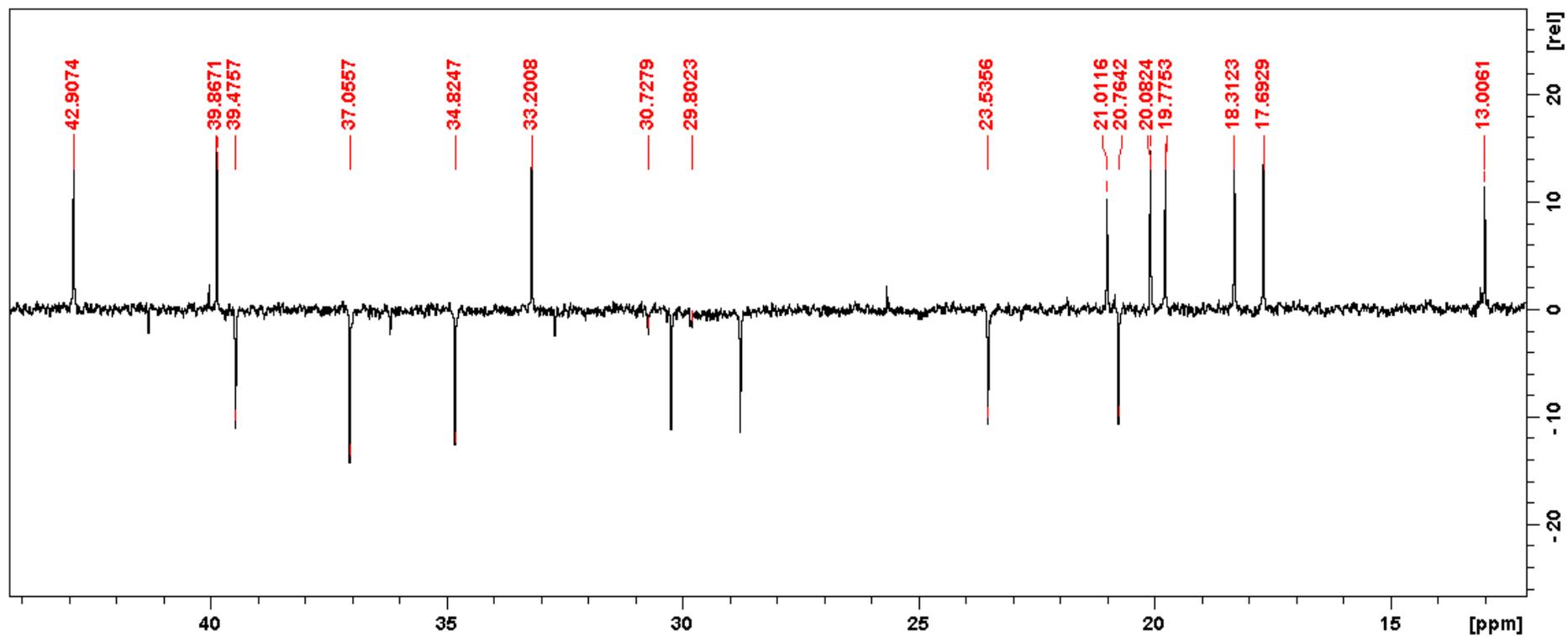
Apêndice 5.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-B).



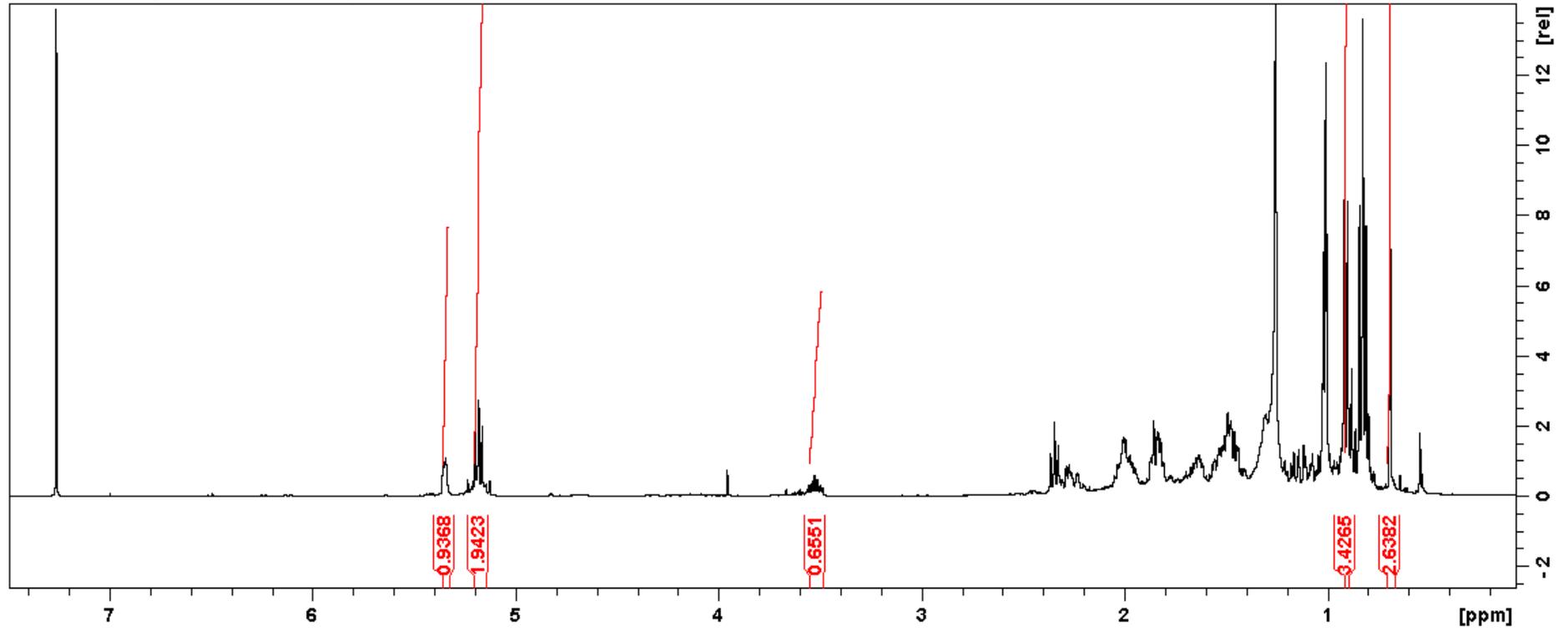
Apêndice 6.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) para o composto ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol (expansão-C).



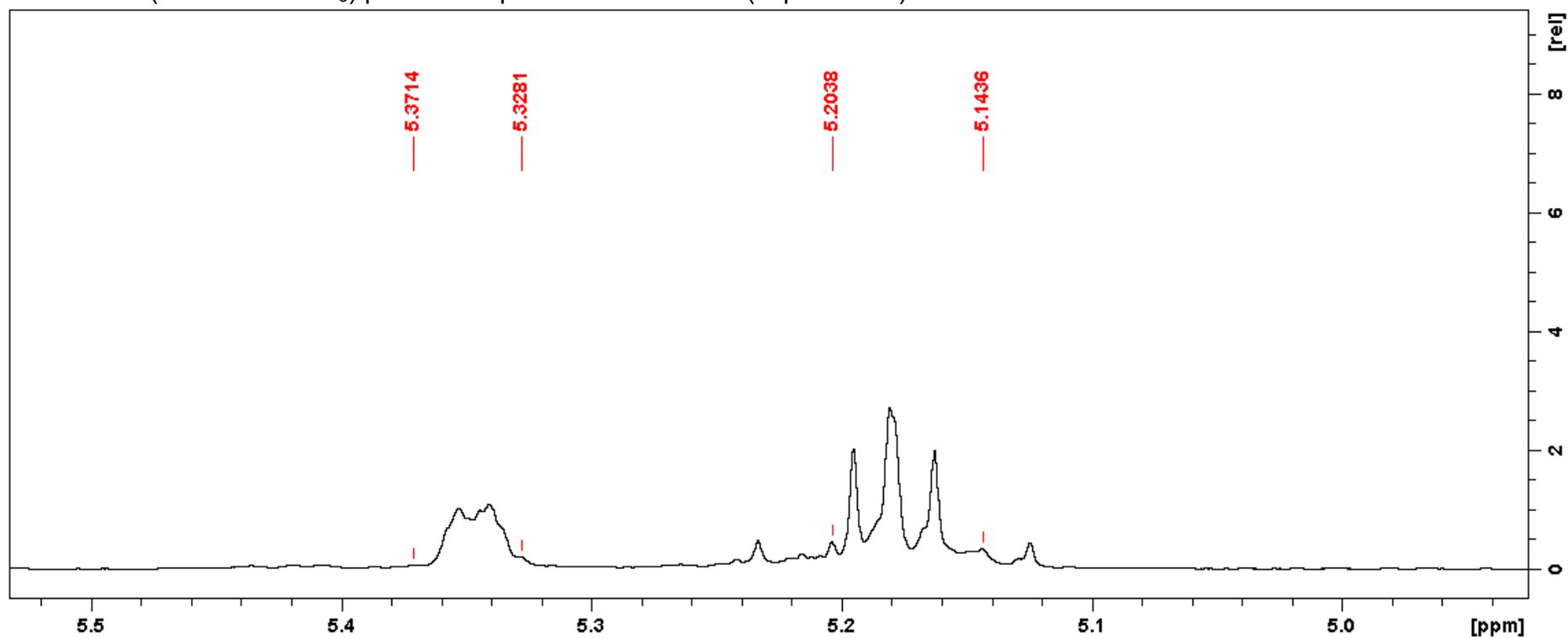
Apêndice 7.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol.



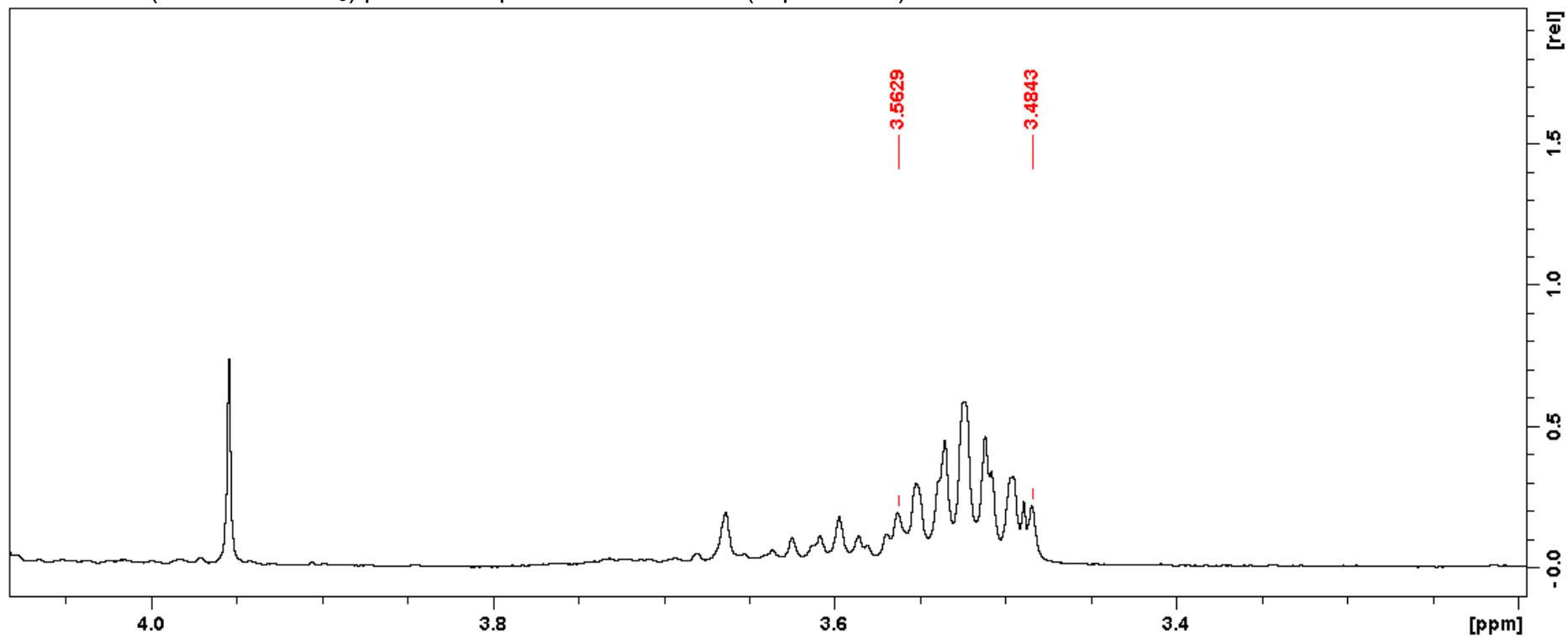
Apêndice 8.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-A).



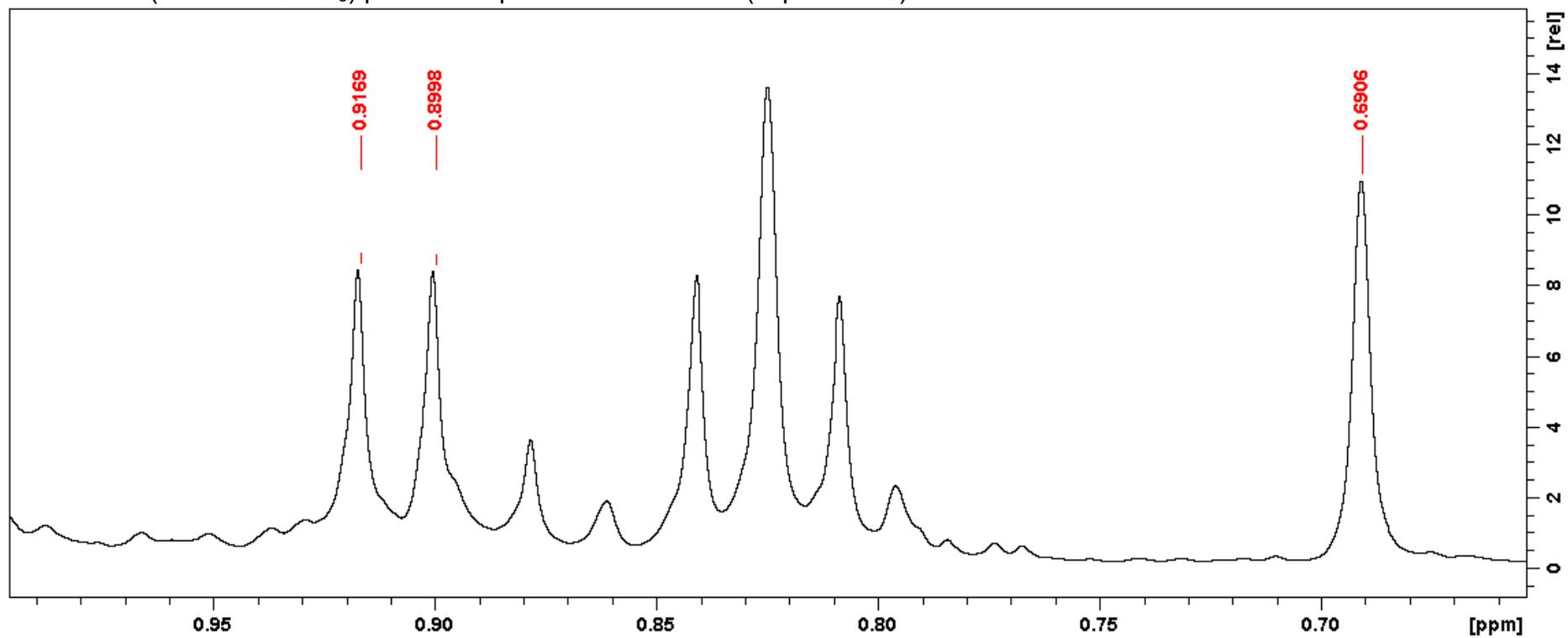
Apêndice 9.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-B).



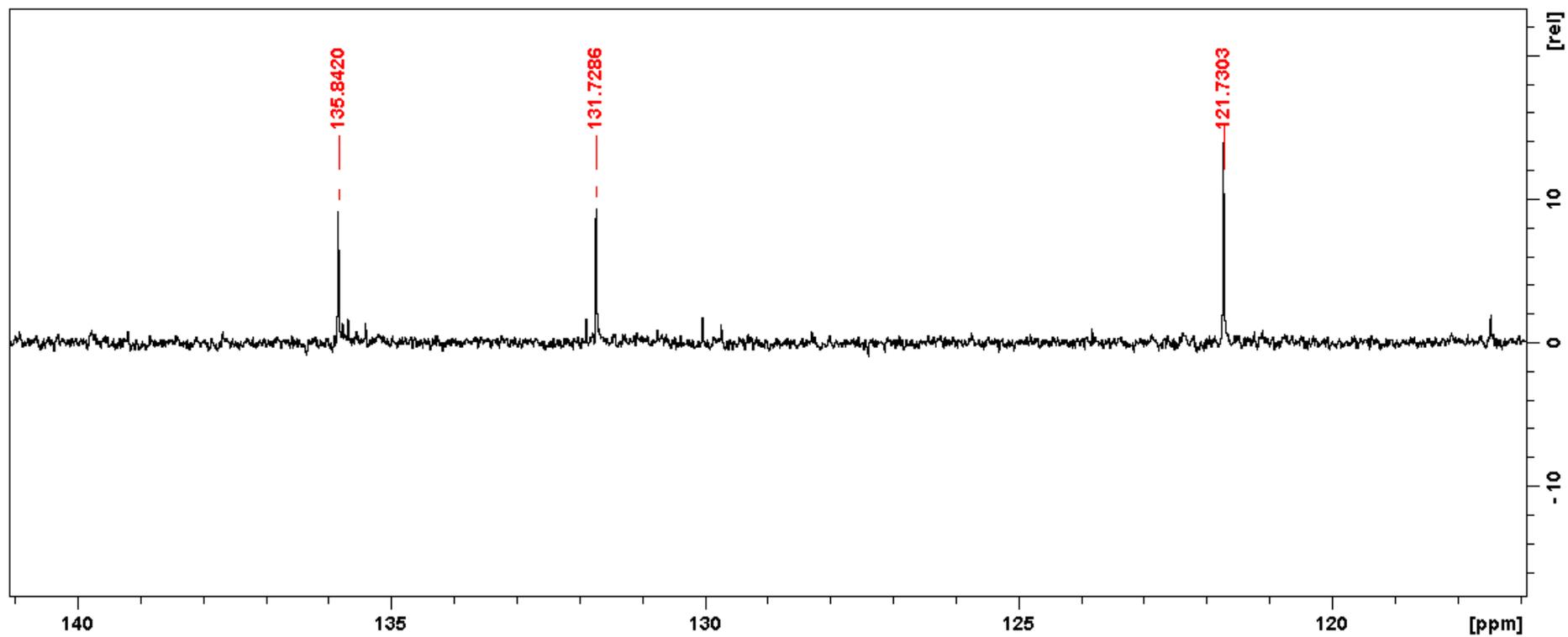
Apêndice 10.

RMN de ^1H (400 MHz- CDCl_3) para o composto brassicasterol (expansão-C).



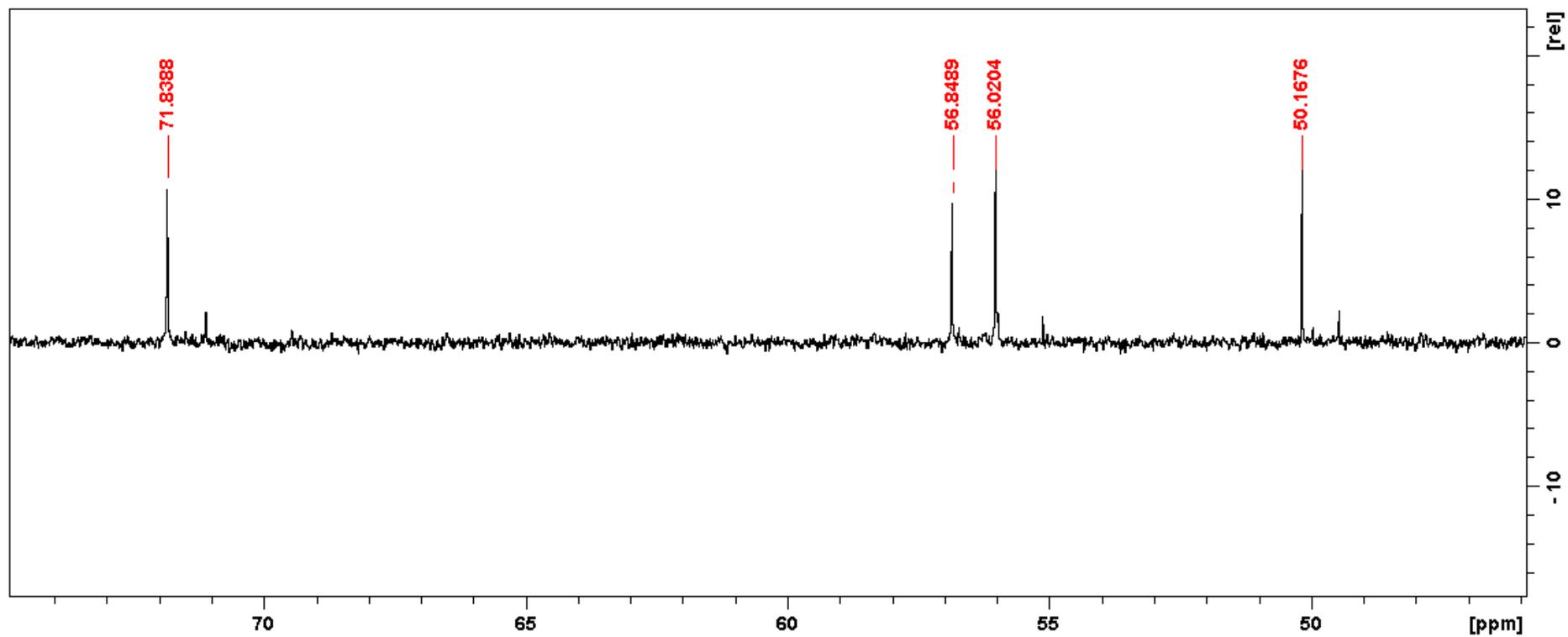
Apêndice 11.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão-A).



Apêndice 12.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão-B).



Apêndice 13.

DEPT de ^{13}C (100 MHz- CDCl_3) do composto brassicasterol (expansão).

