

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Padronização dos métodos de análises da cercosporina e isocercosporina do extrato de *Cercospora brachiata* e avaliação da atividade herbicida e de danos à biomembranas de lipossomas

UBERLÂNDIA

2023

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Padronização dos métodos de análises da cercosporina e isocercosporina do extrato de *Cercospora brachiata* e avaliação da atividade herbicida e de danos à biomembranas de lipossomas

Tese 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 doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa
Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F315 Felisbino, John Kenedy Rodrigues Pereira, 1991-
2023 Padronização dos métodos de análises da cercosporina e
isocercosporina do extrato de *Cercospora brachiata* e
avaliação da atividade herbicida e de danos à
biomembranas de lipossomas [recurso eletrônico] / John
Kenedy Rodrigues Pereira Felisbino. - 2023.

Orientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa.

Coorientador: Alberto de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.637>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-,
(Orient.). II. Oliveira, Alberto de, 1979-, (Coorient.).
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação
em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

| | | | | | |
|------------------------------------|--|-----------------|-----|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | Química | | | | |
| Defesa de: | Tese de Doutorado Acadêmico, 146, PPGQUI | | | | |
| Data: | Trinta de novembro de dois mil e vinte e três | Hora de início: | 14h | Hora de encerramento: | 18:50 |
| Matrícula do Discente: | 11913QMI010 | | | | |
| Nome do Discente: | John Kenedy Rodrigues Pereira Felisbino | | | | |
| Título do Trabalho: | “Padronização dos métodos de análises da cercosporina e isocercosporina do extrato de Cercospora brachiata e avaliação da atividade herbicida e de danos à biomembranas de lipossomas” | | | | |
| Área de concentração: | Química | | | | |
| Linha de pesquisa: | Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos | | | | |

Reuniu-se, por webconferência, no *link*: <https://meet.google.com/mwz-fupe-wjg>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Francisco José Torres de Aquino**, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; **Valeska Barcelos Guzmán**, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia; **Carla de Moura Martins**, do Instituto Federal Goiano/*campus* Morrinhos; **Michelle Nauara Gomes do Nascimento**, Colégio Êxito de Jataí; e **Raquel Maria Ferreira de Sousa**, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidenta da mesa, Dr^a. **Raquel Maria Ferreira de Sousa**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/12/2023, às 09:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco José Torres de Aquino, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/12/2023, às 09:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valeska Barcelos Guzman, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/12/2023, às 09:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla de Moura Martins, Usuário Externo**, em 01/12/2023, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Nauara Gomes do Nascimento, Usuário Externo**, em 01/12/2023, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5012159** e o código CRC **DA48EAA9**.

JOHN KENEDY RODRIGUES PEREIRA FELISBINO

Padronização dos métodos de análises da cercosporina e isocercosporina do extrato de *Cercospora brachiata* e avaliação da atividade herbicida e de danos à biomembranas de lipossomas

Tese 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 doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

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

Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Uberlândia, 30 de novembro de 2023

Banca examinadora:

Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa
(Orientadora – UFU)

Dr. Francisco José Torres de Aquino
(Examinador – UFU)

Profa. Dra. Valeska Barcelos Guzmán
(Examinador – UFU)

Profa. Dra. Carla de Moura Martins
(Examinador – IFG/campus morrinhos)

Profa. Dra. Michelle Nauara Gomes do Nascimento
(Examinador – Colégio Êxito de Jataí)

À Deus.

Aos meus amados pais Edson e Ana Maria.

À minha querida esposa, Laura Ravenna.

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

***Aos meus lindos sobrinhos Laura, Eduarda, Fernanda, Luiza, Priscila, Isa,
Antonella e Pedro.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar a vida e me ajudar na execução deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, por me oportunizar a elaboração e execução deste trabalho para obter o título de doutor.

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira, pela coorientação.

Ao Laboratório Multiusuário (RELAM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, e em especial ao Magayver, pelas análises de RMN e suporte técnico.

Aos amigos do NuPpEn: Tiara, Marcus, Diego, Jessica e Augusto, pelo companheirismo, amizade, e ajuda na utilização de todos os softwares necessários para elucidação de substâncias orgânicas deste trabalho.

Aos meus amigos especiais de doutorado: Raphael, Flávia Clemente e Frank, com os quais tive momentos maravilhosos na vida e com trocas importantes no caminhar. A vocês o meu muito obrigado.

Ao aluno de IC do curso de Química Industrial do IQUFU, Vinicius Tofanin Costa, que foi responsável pela quantificação.

A professora Dra. Tayana M. Tsubone e sua orientanda, Ms. Patrícia A. Matos, do Laboratório Interdisciplinar de Fototerapia e Biomoléculas (LIFeBio) do IQUFU, por me orientar nos estudos com as membranas.

Ao professor Dr. Antônio Otávio T. Patrocínio e seu orientando, Ms. Marcos Eduardo G. Carmo, do Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LAFOT-CM) do IQUFU, por ajudar nos experimentos com absorvância e espectrofluorimetria.

Ao professor Dr. Foued S. Espindola e a Dra. Renata R. Teixeira do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) do IBTEC-UFU, por executar o experimento de fluorescência do PTS.

Aos meus pais, Edson e Ana Maria, pelo dom da vida, sem eles eu não teria a existência.

Aos meus irmãos, Edna Priscila (*In memoriam*), Johnathan e Ediane 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, e por me permitir ser inspiração no amanhã.

A minha esposa Laura Ravenna por estar comigo em todo o tempo e, me impulsionar a ser o melhor de mim em todos os dias da minha vida.

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

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

O fungo *Cercospora brachiata* foi relatado no Brasil pela primeira vez em 2019 como mancha foliar de Caruru, e por pertencer ao gênero *Cercospora*, sabe-se que é responsável por doenças em diversas espécies vegetais, causando grandes prejuízos econômicos. No entanto, a fitopatogenicidade pode ser utilizada para o desenvolvimento de novos herbicidas ou bioherbicidas. Este trabalho, portanto, teve como objetivo avaliar a atividade herbicida do extrato acetato de etila deste fungo, bem como de sua fitotoxina cercosporina, contra a espécie vegetal *Amaranthus viridis* (Caruru). Este trabalho também relatou pela primeira vez a produção da fitotoxina cercosporina e seu principal isômero isocercosporina, na espécie *C. brachiata*, já que não são todas as espécies deste gênero que são capazes de produzir esta substância. Além disto, foi possível realizar a caracterização das substâncias por RMN (Ressonância Magnética Nuclear), a quantificação por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e a avaliação de dano causado pela cercosporina à biomembranas de lipossomas de lecitina, antes e após a exposição da substância à luz. Durante o estudo, verificou-se que o fungo produz as fitotoxinas (cercosporina e isocercosporina) apenas quando seu crescimento ocorre na presença de luz. A quantificação por CLAE mostrou que o teor de cercosporina equivale a 20% do extrato, enquanto que a quantidade de isocercosporina equivale a 0,36% do mesmo. Na avaliação da atividade herbicida, a cercosporina não apresentou atividade contra o Caruru na concentração avaliada, mas o extrato apresentou atividade na concentração de 5,0 mg mL⁻¹. A análise de dano à biomembrana de lipossomas foi realizada através do sistema PTS/MV (pireno tetrasulfonato de sódio/metil viologeno) permitindo verificar que a cercosporina não irradiada e irradiada pode promover dano à biomembranas de lipossomas, mas que a velocidade do dano é muito superior na presença da irradiação. Outros estudos devem ser feitos para compreender as interações entre a substância em estudo e os sistemas de camadas das membranas celulares e avaliar outros componentes que podem interferir na atividade herbicida do fungo estudado.

Palavras-chave: Fungo. *Cercospora*. Fitotoxina, Bioherbicida. Quantificação. Cromatografia. Lipossomas.

ABSTRACT

The fungus *Cercospora brachiata* was reported in Brazil for the first time in 2019 as Caruru leaf spot, and as it belongs to the genus *Cercospora*, it is known to be responsible for diseases in several plant species, causing great economic losses. However, phytopathogenicity can be used to develop new herbicides or bioherbicides. This research, therefore, aimed to evaluate the herbicidal activity of the ethyl acetate extract of this fungus, as well as its phytotoxin cercosporin, against the plant species *Amaranthus viridis* (Caruru). This work also reported for the first time the production of the phytotoxin cercosporin and its main isomer isocercosporin, in the species *C. brachiata*, as not all species of this genus are capable of producing this substance. Furthermore, it was possible to characterize the substances by NMR (Nuclear Magnetic Resonance), quantification by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and assessment of damage caused by cercosporin to lecithin liposome biomembranes, before and after exposure to substance to light. During the study, it was found that the fungus produces phytotoxins (cercosporin and isocercosporin) only when its growth occurs in the presence of light. Quantification by HPLC showed that the cercosporin content is equivalent to 20% of the extract, while the amount of isocercosporin is equivalent to 0.36% of the extract. In the evaluation of herbicidal activity, cercosporin did not show activity against Caruru at the concentration evaluated, but the extract showed activity at a concentration of 5.0 mg mL⁻¹. The analysis of damage to the liposome biomembrane was carried out using the PTS/MV system (sodium pyrene tetrasulfonate/methyl violagen) allowing to verify that non-irradiated and irradiated cercosporin can promote damage to liposome biomembranes, but that the speed of damage is very higher in the presence of irradiation. Other studies must be carried out to understand the interactions between the substance under study and the cell membrane layer systems and evaluate other components that may interfere with the herbicidal activity of the fungus studied.

Keywords: Fungus. *Cercospora*. Phytotoxin. Bioherbicide. Quantification. Chromatography. Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Algumas estruturas de fungos..... | 14 |
| Figura 2: Representação de um cogumelo com suas estruturas..... | 15 |
| Figura 3: Estrutura da cercosporina..... | 16 |
| Figura 4: <i>Cercospora brachiata</i> e seus estágios na conidiogênese..... | 18 |
| Figura 5: Sintomas de doença foliar associados a <i>Cercospora</i> spp..... | 20 |
| Figura 6: <i>Amaranthus Viridis</i> em diferentes estágios fenológicos após 20 dias de análise: (a) regadas com solução extrato bruto de <i>C. brachiata</i> ; (b) regadas com água destilada contendo 0,05% DMSO e Tween 80; (c) regadas com água destilada contendo 0,05% DMSO..... | 22 |
| Figura 7: Estruturas de perilenoquinonas..... | 24 |
| Figura 8: Modo de ação da cercosporina, sendo ativada pela energia da luz e formando os oxigênios singleto e superóxidos..... | 26 |
| Figura 9: Fluxograma do processo de isolamento da cercosporina..... | 36 |
| Figura 10: Estrutura da cercosporina com numeração..... | 42 |
| Figura 11: Cromatograma do CLAE-semipreparativo com a programação de isolamento da cercosporina..... | 43 |
| Figura 12: Estrutura da isocercosporina com numeração..... | 45 |
| Figura 13: Cromatograma sobrepostos da cercosporina e isocercosporina obtido por CLAE (470 nm)..... | 46 |
| Figura 14: Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de cercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg mL ⁻¹)..... | 49 |
| Figura 15: Curva analítica da área <i>versus</i> concentração de cercosporina..... | 51 |
| Figura 16: Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de isocercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg mL ⁻¹)..... | 52 |
| Figura 17: Curva analítica da área <i>versus</i> concentração de isocercosporina..... | 53 |
| Figura 18: Cromatogramas dos extratos de <i>C. brachiata</i> cultivados na ausência e na presença de luz..... | 55 |
| Figura 19: Relação da emissão da espectrofluorescência da cercosporina em função do pH..... | 56 |
| Figura 20: Curva de titulação espectrofluorométrica da cercosporina..... | 57 |
| Figura 21: <i>Amaranthus viridis</i> (Caruru) com lesões irregulares após 5 dias de aplicação de solução de <i>C. brachiata</i> (5 mg mL ⁻¹)..... | 59 |
| Figura 22: Cinética de incorporação da cercosporina em lipossoma de lecitina: a) espectro de emissão, b) normalização..... | 61 |
| Figura 23: Espectro de emissão do PTS <i>versus</i> espectro de absorbância da cercosporina..... | 63 |
| Figura 24: Estruturas do PTS e MV..... | 63 |

Figura 25: Intensidade de fluorescência do PTS em diferentes concentrações de cercosporina, e de tempo para amostras não irradiadas (a) e irradiadas (b).....67

Figura 26: Porcentagem de danos nos lipossomas de lecitina causados por soluções cercosporina não irradiadas (a) e irradiadas (b).....69

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Rendimento dos extratos acetato de etila do fungo <i>C. brachiata</i> | 42 |
| Tabela 2: Tabela 2: Dados de RMN da cercosporina..... | 44 |
| Tabela 3: Dados de RMN da isocercosporina..... | 47 |
| Tabela 4: Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de cercosporina com diferentes concentrações..... | 50 |
| Tabela 5: Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de isocercosporina com diferentes concentrações..... | 53 |
| Tabela 6: Lesões causadas por extrato de <i>C. brachiata</i> e de cercosporina em folhas de <i>Amaranthus Viridis</i> (Caruru)..... | 58 |
| Tabela 7: Absorbância (Abs), concentração e coeficiente de partição de soluções de cercosporina em octanol e água..... | 62 |
| Tabela 8: Intensidade de fluorescência a 400nm do PTS em lipossoma de lecitina com e sem irradiação de luz..... | 64 |
| Tabela 9: Intensidade de fluorescência a 400nm do PTS em lipossomas de lecitina após adição do Triton X-100 com e sem irradiação de luz..... | 65 |
| Tabela 10: Intensidade de fluorescência do PTS no modo não irradiado e irradiado com diferentes concentrações de cercosporina..... | 66 |
| Tabela 11: Porcentagem de danos dos lipossomas de lecitina causados pela ação da cercosporina..... | 68 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE - Acetato de Etila
BDA - Ágar batata dextrose
BRA - 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol
BRT - 2,6-di-*terc*-butil-*p*-cresol
CC: Coluna Cromatográfica
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CGEM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP - Cercosporina
DMSO – Dimetilsulfóxido
 ϵ - coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar
 R_f - Fator de retenção
HEX: Hexano
ICP - Isocercosporina
IQ - Instituto de Química
IR - *Infrared* (infravermelho)
 K_a - Constante de Dissociação Protônica
 k_P - Constante de Partição
 J - Constante de Acoplamento
LAMIF - Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia
MEA - Extrato de ágar malte
MeOH - Metanol
MV - Metil-viologeno
pH - Potencial Hidrogeniônico
PTS - pireno tetrasulfonato de sódio
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RNA - Ácido Ribonucleico
TFD - Terapia Fotodinâmica
 t_R - Tempo de retenção
UV/Vis - Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.0 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 <i>Cercospora brachiata</i> | 17 |
| 2.1.1 Características Gerais | 17 |
| 2.1.2 Metabolismo e atividades biológicas | 18 |
| 2.1.3 Cercosporina e sua relevância ao gênero <i>Cercospora</i> | 23 |
| 2.2 Herbicidas | 27 |
| 3.0 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivos específicos | 29 |
| 4.0 PARTE EXPERIMENTAL | 30 |
| 4.1 Materiais | 30 |
| 4.2 Equipamentos | 30 |
| 4.2.1 Liofilizador | 30 |
| 4.2.2 Evaporador rotatório | 30 |
| 4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 30 |
| 4.2.4 Espectrofotômetro de absorção molecular na região do UV-Vis..... | 31 |
| 4.2.5 Espectrofluorímetro para fluorescência da cercosporina..... | 31 |
| 4.2.6 Espectrofluorímetro para fluorescência do PTS..... | 31 |
| 4.2.7 Cromatógrafo Líquido de alta eficiência..... | 31 |
| 4.3 Cultivo dos Fungos | 32 |
| 4.3.1 Crescimento do fungo <i>Cercospora brachiata</i> na presença de luz..... | 32 |
| 4.3.2 Crescimento do fungo <i>Cercospora brachiata</i> na ausência de luz | 32 |
| 4.4 Obtenção dos extratos fúngicos | 33 |
| 4.4.1 Sob incidência de luz | 33 |
| 4.4.2 Sob ausência de luz..... | 33 |
| 5.0 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA CERCOSPORINA E ISOCERCOSPORINA..... | 33 |
| 5.1 Isolamento | 33 |
| 5.2 Caracterização | 37 |
| 5.3 Quantificação da cercosporina e da isocercosporina no extrato de <i>C. brachiata</i> por meio do CLAE | 37 |
| 5.4 Coeficiente de partição da cercosporina..... | 37 |
| 5.5 Curva de titulação espectrofluorométrica..... | 38 |
| 5.6 Avaliação da permeabilidade em membrana durante fotossensibilização..... | 38 |
| 5.6.1 Soluções | 39 |
| 5.6.2 Filme lipídico | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 5.6.3 Preparo dos lipossomas com PTS/MV..... | 39 |
| 5.6.4 Cromatografia por exclusão de tamanho..... | 39 |
| 5.6.5 Avaliação do dano em lipossoma via vazamento de PTS..... | 39 |
| 5.6.6 Análise da fluorescência..... | 40 |
| 5.6.7 Análise dos dados..... | 40 |
| 6.0 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA CONTRA <i>AMARANTHUS VIRIDIS</i> DO EXTRATO DE <i>C. BRACHIATA</i> E DE SEU ISOLADO CERCOSPORINA..... | 41 |
| 7.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 42 |
| 7.1 Rendimento das extrações..... | 42 |
| 7.2 Isolamento e caracterização da cercosporina e da isocercosporina..... | 42 |
| 7.3 Quantificação por CLAE da cercosporina e isocercosporina..... | 48 |
| 7.4 Produção de cercosporina e isocercosporina durante o cultivo de <i>C. brachiata</i> mediante ação da luz..... | 54 |
| 7.5 Estudo de pKa da cercosporina..... | 55 |
| 7.6 Avaliação da atividade herbicida do extrato de <i>C. brachiata</i> e de cercosporina contra <i>Amaranthus Viridis</i> | 57 |
| 7.7 Dano de lipossomas (lecitina) pela cercosporina..... | 60 |
| 8.0 CONCLUSÕES..... | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |
| APÊNDICES..... | 78 |
| APÊNDICE I – Espectro de RMN de H¹ e C¹³ da cercosporina..... | 79 |
| APÊNDICE II – Espectro de RMN de H¹ e C¹³ da isocercosporina..... | 84 |

1.0 INTRODUÇÃO

Há uma quantidade significativa de fungos presentes no cotidiano dos seres humanos. Alguns desempenham atividades favoráveis à vida humana, outros, no entanto, são nocivos ao serem ingeridos ou por causarem doenças que podem levar à morte (Rodrigues *et al.*, 2020). Portanto as aplicações dos fungos são variadas, e vão da alimentação humana à produção de medicamentos (Pereira; Pita, 2005; Grumach; Ferraroni, 2006).

Inicialmente, pode-se definir os fungos como organismos heterotróficos e eucarióticos, que podem ser unicelulares a exemplo das leveduras, ou multicelulares como os cogumelos e as orelhas de pau (Bueno; Silva, 2014). Pertencem ao reino Fungi, no qual existem várias espécies (Hibbett *et al.*, 2007) que apresentam diferentes estruturas como cogumelos, bolores, orelhas-de-pau e leveduras (Figura 1) (Kirk *et al.*, 2008; Underwood, 1899).

Figura 1: Algumas estruturas de fungos.

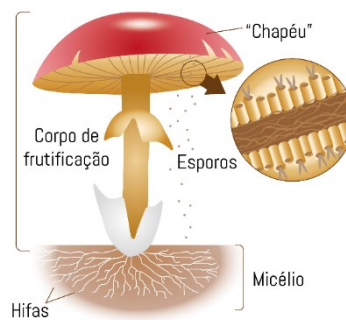


Nota: a) cogumelos, b) bolores, c) orelhas-de-pau, d) leveduras.

Fonte: o autor.

Os fungos denominados de multicelulares, geram filamentos que são chamados de hifas (Zabel; Morrell, 2020), e um conjunto de hifas forma o micélio (Tegelaar; Wösten, 2017). Hifas de algumas espécies podem formar estruturas especiais denominadas de corpos de frutificação e podem ser observados nos cogumelos e nas orelhas-de-pau (Figura 2).

Figura 2: Representação de um cogumelo com suas estruturas.



Fonte: o autor.

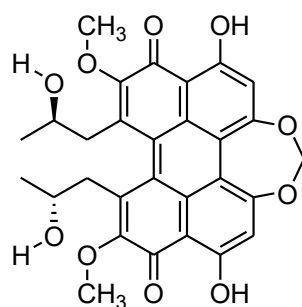
Como já mencionado, os fungos não podem produzir seu próprio alimento, e dependem dos seus hospedeiros para se nutrir. E com relação a esta característica, é relevante entender como os fungos desenvolveram habilidades para tornar este processo mais facilitado, à medida que precisam ou não forçar seus hospedeiros a transmitir nutrientes essenciais a sua sobrevivência, processo denominado de biotrofia (Watkinson, 2016). Segundo Watkinson (2016), existe uma relação entre o fungo e o hospedeiro que, quando ambos são beneficiados, é denominada de mutualismo simbiótico. Os fungos endofíticos, por exemplo, enquanto se nutrem dos tecidos das plantas, conseguem produzir metabólitos que inibem outros seres invasores das plantas e que, em alguns casos, podem fortalecer as disputas por território das mesmas.

Para Pusztahelyi *et al.* (2017), a interação planta-fungo-metabólitos é muito complexa à medida que um tem efeito sobre o outro, podendo ambos produzirem compostos específicos nesta simbiose. Inclusive os fungos fitopatogênicos, que produzem substâncias que causam doenças nas plantas, ao mesmo tempo que as plantas também produzem seus metabolitos, com a finalidade de se protegerem desses fungos (Ribera; Zuñiga, 2012; Thines; Anke; Weber, 2004).

Outro fator a se destacar sobre os metabólitos secundários dos fungos é que suas produções ocorrem sob condições específicas. Em outras palavras é típico que um fungo produza apenas uma fração de sua diversidade química sob um determinado conjunto de condições ambientais (Brakhage, 2012). O que implica dizer que, tanto as capacidades bioquímicas do próprio fungo quanto os estímulos ambientais, determinam a síntese de metabólito secundário.

Existe uma grande variedade de interações destas substâncias com os organismos nos quais elas estão presentes. Algumas participam das cadeias reacionais, outras são simplesmente ativadas no meio por algum agente interno ou externo, por exemplo as substâncias que são ativadas pela luz, como a cercosporina (Figura 3) que é objeto de estudo neste trabalho. Esta fitotoxina possui ativação por meio da luz conferindo a esta molécula atividade fotossensibilizadora (Yamane *et al.*, 2010), sendo esta a principal toxina não específica produzida por fungos do gênero cercospora (Daub, 1982). Além das suas atividades serem dependentes da luz, a sua biossíntese no fungo também é dependente da incidência de luz, ou seja, quanto mais exposto a luz mais os fungos produzem esta toxina (Yamane *et al.*, 2010).

Figura 3: Estrutura da cercosporina.



Fonte: o autor.

Considerando a importância desta toxina para o gênero *Cercospora*, este trabalho teve como objetivo o isolamento, a caracterização e a quantificação da cercosporina e de seu isômero isocercosporina nos extratos do fungo *Cercospora brachiata*, tais aspectos são importantes para compreender se a espécie em questão produz a toxina, já que ainda não havia relato na literatura sobre a produção da referida substância por esta espécie do gênero *Cercospora*.

Avaliou-se também a atividade herbicida do extrato do fungo e da cercosporina isolada contra espécies de plantas *Amaranthus viridis*, com a finalidade de encontrar um novo herbicida ou bioerbicida. Existe um grande interesse na descoberta e desenvolvimento de novos bioerbicidas obtidos a partir de microorganismos, especialmente fungos, e é uma ferramenta importante para o controle biológico.

Por fim analisou a interação (dano em lipossoma) da cercosporina que é um fotossensibilizador, com membranas celulares preenchidos com o marcador fluoróforo/supressor (PTS/MV: pireno tetrasulfonato de sódio/metil viologeno).

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

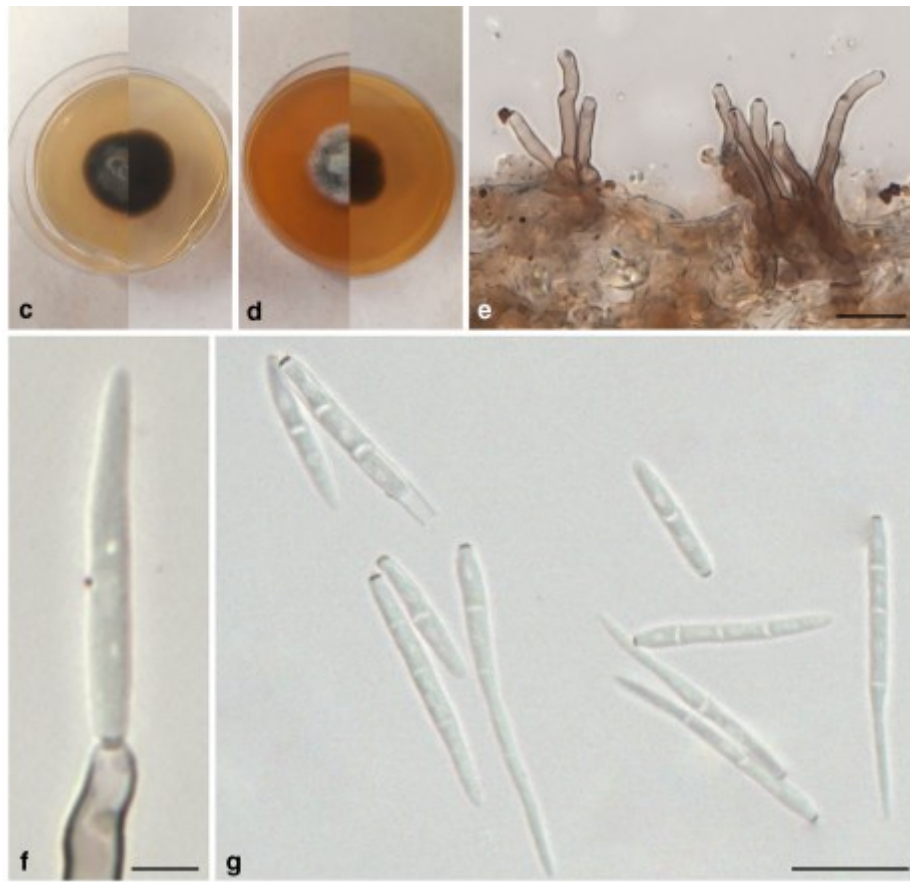
2.1 *Cercospora brachiata*

2.1.1 Características Gerais

Cercospora brachiata foi relatada pela primeira vez no Brasil como mancha foliar de *Cercospora* em *A. viridis* (Caruru) (Vieira *et al.*, 2019). Segundo Vieira *et al.* (2019), a identidade do agente etiológico foi confirmada por uma combinação de informações morfológicas e moleculares. *Cercospora brachiata* é uma espécie de fungo, que pertence ao filo Ascomycota, e foi descrito pela primeira vez por Ellis e Everhart em 1888. A taxonomia segundo Ellis e Everhart (1888) (*apud* Schoch *et al.*, 2020) é classificada como: Eucariotas, Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Dothideomycetes, Ordem: Capnodiales, Família: Mycosphaerellaceae, Gênero: *Cercospora*, Espécie: *Cercospora brachiata*.

Segundo Vieira *et al.* (2019), o fungo apresentava a seguinte morfologia: a) estroma ausente a muito pouco desenvolvido, subepidérmico, castanho claro; b) hifas internas de 3 a 4 µm de largura, ramificadas, septadas, marrom-claras; c) conidióforos reduzidos a células conidiogênicas, monoblásticos ou poliblásticos (até 5 locos), fracamente fasciculados (3–17), não ramificados, retos ou flexuosos, cilíndricos a levemente atenuados em direção à ponta truncada, 42–120 × 4–5,5 µm, geniculados, castanho claro, mais pálido no ápice, células conidiogênicas de paredes finas, lisas, proliferando simpodial; d) locos conidiogênicos conspícuos, espessos e escurecidos, 2,0–2,6 µm; e) conídios solitários, retos a curvos, fusiformes, 40–150 × 2,5–4,5 µm, ápice agudo a subagudo, cronicamente truncado a truncado na base, 1–8 septados, hialinos, de paredes finas, lisos; f) hilo engrossado e escurecido, 2,0–2,3 µm. Características em cultura: a) crescimento lento (22-25 mm de diâmetro após 7 dias), micélio aéreo espalhado, verde-oliva escuro a claro a cinza escuro com centro cinza, rachado reverso, não esporulado (Figura 4).

Figura 4: *Cercospora brachiata* e seus estágios na conidiogênese.



Nota: c) Um dia cultivadas em batata dextrose-ágar (BDA), d) colônia em BDA após 7 dias (superfície/reverso), e) colônia em MEA (Extrato Malde Ágar) após 7 dias (superfície/reverso), f) conidióforos fracamente fasciculados e, g) conídio ligado à célula conidiogênica.

Fonte: Vieira *et al.* (2019).

2.1.2 Metabolismo e atividades biológicas

Há poucas informações sobre o fungo *C. brachiata* na literatura (Silva et al. 2020, Felisbino et al. 2021), o que demonstra que apesar de ter sido catalogado em 1888, pouco se estudou sobre esta espécie fúngica no Brasil e exterior. No entanto, existem outras várias espécies deste gênero que são amplamente estudadas. Para o gênero *Cercospora*, segundo Goodwin, Dunkle e Zismann (2001) em 1954 havia 1.800 nomes de espécies, passando para mais de 3.000 em 1987. Atualmente muitas destas espécies ainda não possuem estágio sexual conhecido.

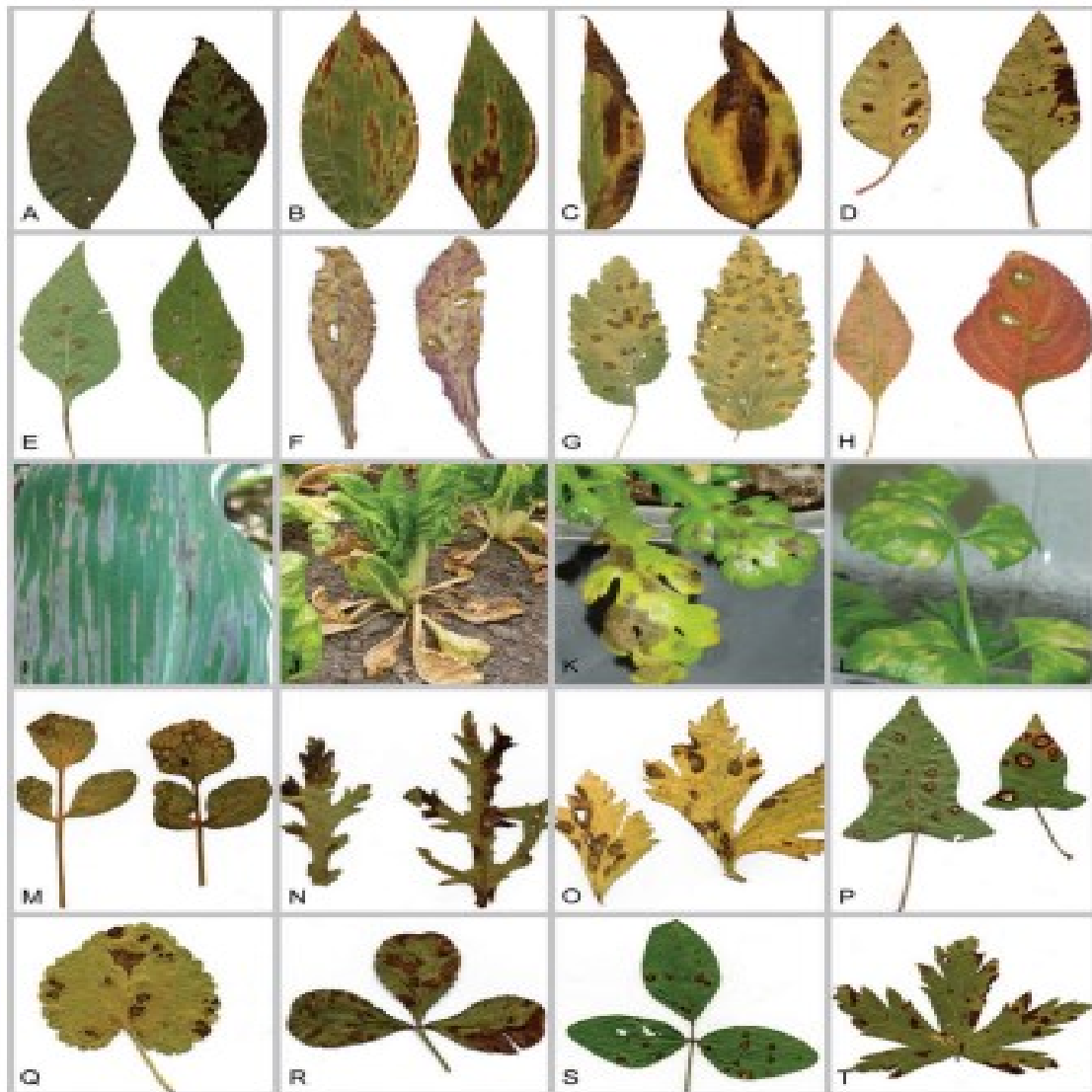
Segundo os autores, houve uma segregação, dando origem a uma reclassificação de muitas espécies de *Cercospora* em outros gêneros, incluindo

Cercosporella, *Cercosporidium*, *Paracercospora*, *Pseudocercospora*, *Pseudocercosporella* e *Pseudocercosporidium*, entre outros, e que este conjunto amplo é referido como o complexo *Cercospora*.

Os fungos do gênero *Cercospora* estão entre os patógenos de plantas mais prevalentes e destrutivos (Polack, 1987). Como grupo, eles são quase universalmente patogênicos, ocorrendo em uma ampla gama de hospedeiros em quase todas as principais famílias de dicotiledôneas, na maioria das famílias de monocotiledôneas e até mesmo em algumas gimnospermas e samambaias (Goodwin; Dunkle; Zismann, 2001). Sua patogenicidade causa danos significativos em lavouras de várias espécies de plantas, a exemplo da doença cercosporiose com uma prevalência de 83% (SANTOS et al., 2014)

Espécies de *Cercospora* foram tradicionalmente nomeadas em homenagem ao hospedeiro do qual foram isolados. A medida em que uma espécie de *Cercospora* foi descrita como nova, quando encontrado em uma planta hospedeira (Groenewald et al., 2013). Como exemplos da correlação de nomeações são apresentadas as seguintes espécies: *Cercospora beticola*, *Cercospora coffeicola*, *Cercospora capsici*, *Cercospora asparagi*, *Cercospora apiicola*, entre outros, que causam respectivamente doenças em plantações de beterraba, café, pimenta, aspargo e aipo. A Figura 5, extraída do trabalho de Groenewald et al. (2013), mostra várias espécies de plantas infestadas por fungos do gênero *Cercospora*, sendo algumas delas com o nome da espécie do fungo associado ao nome do hospedeiro.

Figura 5: Sintomas de doença foliar associados a *Cercospora* spp.



Nota: A) *C. achyranthis* em *Achyranthes japonica*, B) *C. dispori* em *Disporum viridescens*, C) *C. chinensis* em *Polygonatum humile*, D) *C. cf. flagellaris* em *Amaranthus patulus*, E) *C. capsici* em *Capsicum annuum*, F) *Cercospora* sp. na *Ajuga multiflora*, G) *Cercospora* sp. em *Cardamine leucanthe*, H) *C. cf. flagellaris* em *Celosia argentea var. cristata*, I) *C. zeina* em *Zea mays*, J) *C. beticola* em *Beta vulgaris*, K) *C. chrysanthemi* em *Crisântemo*, L) *C. apii* em *Apium*, M) *C. amoraciae* em *Rorippa indica*, N) *C. beticola* em *Chrysanthemum segetum*, O) *C. apiicola* em *Apium*, P) *C. ipomoeae* em *Persicaria thunbergii*, Q) *C. althaeina* em *Althaea rosea*, R) *C. zebrina* em *Trifolium repens*, S) *C. sojae* em *Glycine max*, T) *T. C. brunckii* em *Geranium nepalense*.

Fonte: Groenewald et al. (2013).

Segundo Agrios (2005), os fungos podem penetrar em seus hospedeiros de três formas: direta (por força mecânica ou enzimas), por aberturas naturais ou por ferimentos. O mecanismo de ataque é baseado na utilização de metabólitos, podendo ser: enzimas que desintegram componentes estruturais das células do hospedeiro; toxinas que alteram a permeabilidade das membranas e hormônios que alteram a divisão e crescimento celular.

Desta forma, os fungos se nutrem dos nutrientes que são vazados do interior das células. No entanto, não são apenas os nutrientes que as células vegetais perdem, mas também a clorofila, fazendo com que a planta diminua atividades fotossintéticas essenciais à sobrevivência. Resultando em muitos casos na desfolhação e morte das plantas.

No caso do gênero *Cercospora*, a toxina mais estudada é a cercosporina. Segundo Goodwin, Dunkle e Zismann (2001), apenas espécies dentro do *cluster Cercospora* produziram a toxina cercosporina, sugerindo que a capacidade de produzir este composto teve uma única origem evolutiva. Muitas espécies de *Cercospora* são caracterizadas pela produção deste metabólito fitotóxico de origem policetídica.

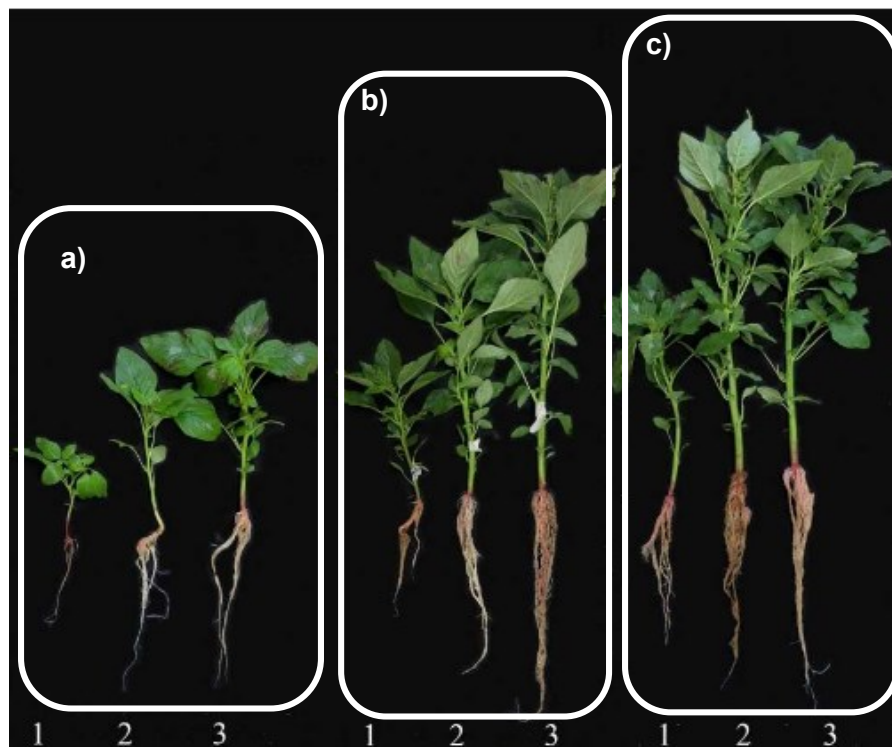
Embora este composto possa aumentar a virulência, não é um fator de patogenicidade universal porque não é produzido por todas as espécies (Assante *et al.*, 1977; Fajola, 1978; Jenks *et al.*, 1989; Dunkle; Levy, 2000). Para Fajola (1978), a produção de cercosporina está associada a espécies “verdadeiras” de *Cercospora*, o que sugere que as espécies que não produzem cercosporina pertencem a outros gêneros relacionados. Entretanto, a capacidade de produzir cercosporina é muitas vezes específica para cepas ou isolados e é influenciado por várias condições ambientais e nutricionais. Essas inconsistências impedem a aplicação definitiva da produção de cercosporina à taxonomia.

Como não são todas as cepas capazes de produzir cercosporina, é comum investigar as atividades biológicas dos extratos fúngicos, antes de investigar os compostos isolados. Ou seja, se os extratos derem a requerida atividade biológica, então o próximo passo é analisar os metabólitos identificados.

Com esta finalidade, já se tem conhecimento de dois trabalhos utilizando extratos de *C. brachiata* em diferentes linhas de pesquisa. No primeiro trabalho de Silva *et al.* (2020) foi avaliada a atividade fitotóxica do extrato do referido fungo sobre a germinação de sementes e parte aérea de *A. viridis*. Neste trabalho concluíram que

o extrato inibe a germinação das sementes e, quando avaliado na parte aérea da planta, inibe também o crescimento, sem afetar o desenvolvimento da mesma (folhação, floração e frutificação) (Figura 6). Indicando que o extrato deste fungo pode ser promissor no desenvolvimento de um novo agente contra plantas daninhas.

Figura 6: *Amaranthus Viridis* em diferentes estágios fenológicos após 20 dias de análise: (a) regadas com solução extrato bruto de *C. brachiata*; (b) regadas com água destilada contendo 0,05% DMSO e Tween 80; (c) regadas com água destilada contendo 0,05% DMSO.



Nota: 1, 2 e 3 refere-se a três estádios fenológicos diferentes: 2, 4 e 6 pares de folhas totalmente desenvolvidas

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2020).

No segundo trabalho, Felisbino *et al.* (2021) avaliaram as atividades de extratos fúngicos em acetato de etila de *C. brachiata* contra bactérias anaeróbicas da cavidade bucal. Os autores relataram que o melhor resultado encontrado foi contra bactérias gram-positivas da espécie *A. naeslundii*. Neste estudo, o extrato foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sendo identificados ácidos graxos e esteróides. Resultados promissores obtidos nestes trabalhos possibilitaram perceber a versatilidade de possíveis aplicações

biotecnológicas principalmente nas áreas biológicas e agrárias para diversos compostos isolados do fungo *C. brachiata*.

2.1.3 Cercosporina e sua relevância ao gênero *Cercospora*

Segundo Kuyama e Tamura (1957), Kikuchi mostrou em 1924 que a “doença da mancha roxa da soja”, considerada uma doença hereditária, era causada por um fungo pertencente ao gênero *Cercospora*. Em 1925, Matsumoto e Tomoyasu confirmaram a observação de Kikuchi e o fungo foi posteriormente nomeado *Cercospora kikuchii* Matsumoto e Tomoyasu. Embora não tivessem estudos consideráveis para os pigmentos deste fungo, os autores conseguiram isolar um pigmento vermelho escuro dos micélios secos do mesmo.

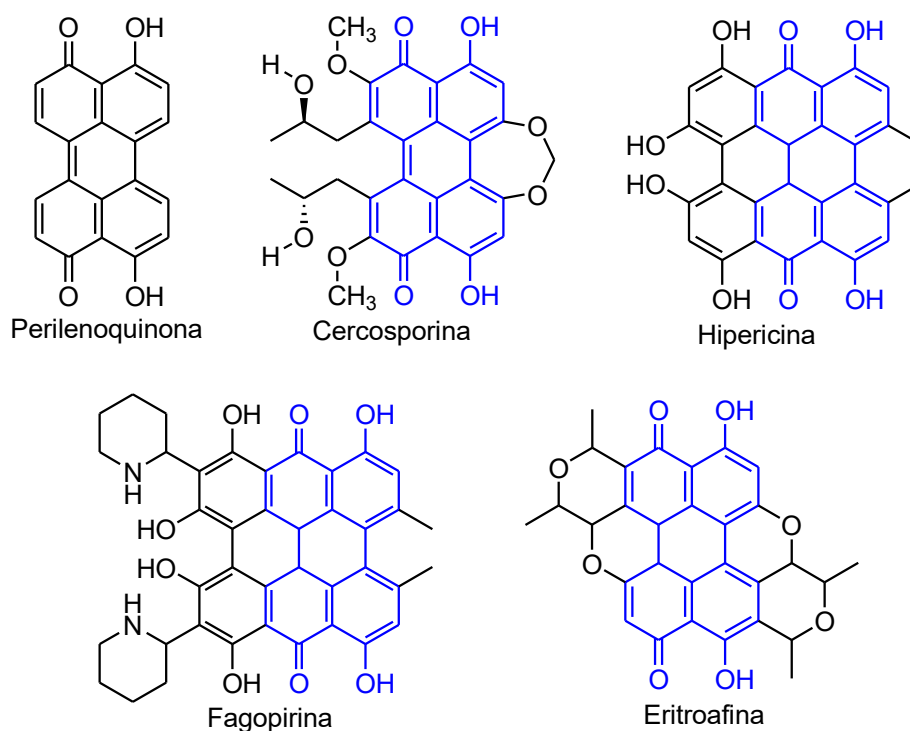
Ainda segundo Kuyama e Tamura (1957), este pigmento possui coloração verde em meio aquoso alcalino e se for reduzido apresenta uma coloração amarela brilhante com fluorescência verde. Sendo, portanto, um cromóforo diferente dos outros pigmentos isolados de fungos ou líquenes. A partir de então, considerou que o pigmento teria o nome de “cercosporina”, sendo que somente em 1957 conseguiram fazer estudos que evidenciaram características físico-químicas importantes deste pigmento. Segundo os cientistas, isolar, purificar e identificar propriedades gerais desta substância não foi fácil, já que a cercosporina é pouco solúvel em clorofórmio e outros solventes voláteis e que em muitos casos, os cristais do pigmento retêm os solventes. Com os estudos concluíram inicialmente que a fórmula geral do composto seria $C_{30}H_{28}O_{10}$. Os autores também conseguiram realizar a redução da cercosporina com zinco em ácido acético glacial e por hidrogenação na presença do catalisador de Adams, formando uma solução amarela brilhante com uma fluorescência verde intensa. E a redução com tiosulfato de sódio ou pó de zinco em meio alcalino, resultando em uma solução laranja com uma fluorescência amarela. Posteriormente a solução reduzida foi oxidada reversivelmente pelo ar, para dar uma solução com a cor original, sugerindo a presença de um sistema quinoide. Também realizaram experimentos demonstrando que a cercosporina é um composto opticamente ativo.

Segundo Fajola (1978), a cercosporina é uma fitotoxina com coloração vermelha, que em seus estudos causou danos em plantas das espécies *Ricinus communis* (mamona), *Glycine max* (soja), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda), mas não ofereceu danos a folhas de *Manihot esculenta*. Esta toxina apresenta pico característico de absorção

máxima em 470 nm no espectro de absorção UV/vis, tendo temperatura de fusão de 260 °C, insolúvel em água e éter de petróleo, solúvel em éter dietílico e álcool etílico, e muito solúvel em acetona. Em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel utilizando uma mistura de AcOEt:MeOH (4:1) como eluente, a toxina é caracterizada por um fator de retenção (R_f) de 0,68. Em seus experimentos, Frajola (1978) analisou extratos de 20 espécies de fungos do gênero *Cercospora*, dos quais 12 produziram cercosporina, em quantidades variadas, e 8 não produziram. Para este autor, a quantidade de toxina produzida é afetada pelo meio de cultura, temperatura e o regime de luz.

Para Mulrooney *et al.* (2012), a cercosporina é classificada como uma perilenoquinona por possuir um núcleo pentacíclico oxidado representado pela perilenoquinona (Figura 7). Para este autor, os compostos que possuem esta classificação e são provenientes de produtos naturais, possuem cores vibrantes e têm sido estudados há anos por suas atividades biológicas.

Figura 7: Estruturas de perilenoquinonas.



Fonte: o autor (2023).

Segundo Weiss *et al.* (1987), a produção de muitas perilenoquinonas por fungos fitopatogênicos têm estimulado hipóteses sobre seu papel nos danos

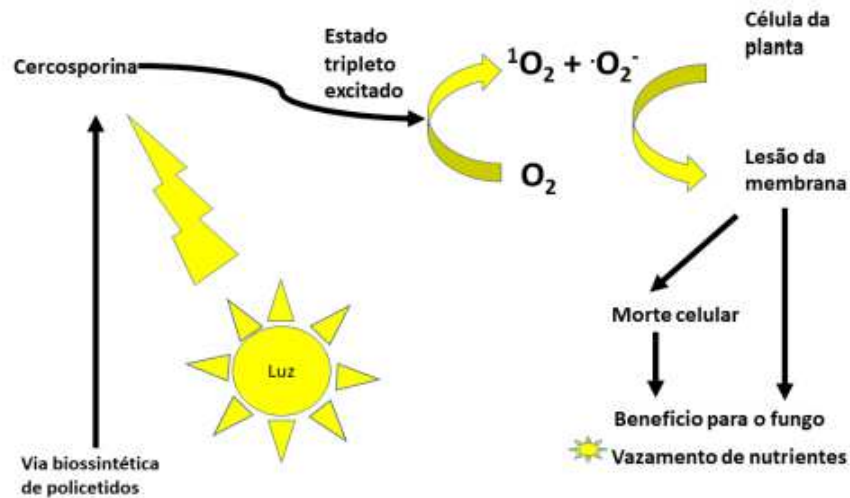
causados às plantas hospedeiras. E que é fato que a cercosporina, (que neste estudo ganhou nova fórmula molecular - $C_{29}H_{26}O_{10}$), causa danos a uma quantidade significativa de plantas, que faz parte da alimentação humana, afetando diretamente a economia, tornando a mesma um composto com necessidades especiais de estudos. Para estes autores, o efeito tóxico inespecífico da cercosporina sugeriu atividade fotodinâmica, com base na semelhança de sua estrutura com a de outros agentes fotodinâmicos, como hipericina, fagopirina e eritroafinas (Figura 7). A atividade da cercosporina em células vegetais ocorre apenas na luz e o oxigênio está envolvido na reação. Esta evidência foi comprovada quando analisaram a ação inibitória da bixina e do 1,4-diazabicyclooctano, dois compostos que interagem com o oxigênio singlete e antioxidantes como 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BRA) e 2,6-di-*terc*-butil-*p*-cresol (BRT) ou sequestradores de radicais livres contra a cercosporina.

Em seus estudos Weiss *et al.* (1987), concluíram que o efeito tóxico da cercosporina foi, portanto, atribuído à produção de oxigênio singlete, pois, além de catalisar a formação do endoperóxido de 2,5-dimetilfurano, induz a peroxidação lipídica em membranas isoladas de plantas e animais e em protoplastos de plantas. E que, a fotooxidação de ácidos graxos insaturados catalisada por cercosporina, produziu monohidroperóxidos com o grupo hidroperoxi ligado aos átomos de carbono na posição da primeira ligação dupla. Este fato e o clareamento da crocina catalisada por cercosporina indicam um mecanismo de fotossensibilização do tipo II, que ocorre com a formação de oxigênios reativos (ERO), o que contrapõe o tipo I que ocorre com a formação de espécies radicalares.

Estas informações sobre o modo de ação da cercosporina foram reafirmadas por Daub e Chung (2007). Para eles, a cercosporina absorve a energia da luz sendo convertida em um estado tripleto ativado energeticamente. A molécula no estado tripleto reage posteriormente com o oxigênio e resulta na geração de espécies tóxicas de oxigênio ativado, como oxigênio singlete (1O_2) e superóxido ($O_2^{\cdot -}$), como mostrado na Figura 8. Esta propriedade classifica a cercosporina como um fotossensibilizador.

A toxicidade dos fotossensibilizadores é devido ao dano oxidativo aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com o alvo celular dependente de onde a molécula do fotossensibilizador se localiza nas células. A cercosporina é um sensibilizador de membrana e um potente produtor de oxigênio singlete. A exposição de células e tecidos vegetais à cercosporina resulta na peroxidação dos lipídios da membrana, levando à ruptura da membrana e morte das células (Daub; Chung, 2007).

Figura 8: Modo de ação da cercosporina, sendo ativada pela energia da luz e formando os oxigênios singleto e superóxidos.



Fonte: Felisbino (2019), adaptada de Daub e Chung (2007).

Classificada como fotossensibilizadora, a cercosporina tem sido estudada para fins de atividades fotodinâmicas (Mulrooney *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 1987). Atualmente há muitos estudos utilizando esta perilenoquinona em terapia fotodinâmica (TFD), como por exemplo Grigalavicius *et al.* (2020), que estudaram a eficácia fotodinâmica da cercosporina em culturas de células tumorais 3D, e concluíram que ela é um fotossensibilizador muito potente. Ye *et al.* (2019) avaliaram TFD contra células tumorais (carcinoma hepatocelular) de um copolímero fotossensibilizador encapsulado com cercosporina e obtendo resultados promissores.

Com estes exemplos, fica ressaltado que os estudos com a cercosporina são promissores em variadas áreas da ciência como na interação da mesma com lipossomas. E que é necessário aprofundar os conhecimentos na forma com que esta molécula interage com diferentes membranas celulares, lipídeos e quais dados podem ser importantes para a manipulação correta desta substância frente a técnica na qual a mesma será utilizada.

2.2 Herbicidas

No Brasil, os herbicidas desempenham um papel fundamental na agricultura, ajudando os produtores a controlar o crescimento indesejado de plantas daninhas que competem por recursos com as culturas desejadas. Os herbicidas são produtos químicos projetados para eliminar ou inibir o crescimento das plantas invasoras, proporcionando assim melhores condições para o cultivo de safras agrícolas (Salomão; Ferro; Ruas, 2020).

Segundo Salomão *et al.* (2020), dados disponibilizados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) mostram que os herbicidas no Brasil são responsáveis por 59% de todo defensivo agrícola vendido no país em 2018. Portanto, no contexto agrícola brasileiro, a aplicação de herbicidas para o controle de plantas daninhas é uma prática comum. No entanto, é importante observar que o uso indiscriminado de herbicidas pode ter impactos ambientais negativos, como a contaminação do solo e da água, bem como a seleção de plantas daninhas resistentes a esses produtos químicos (Nunes *et al.*, 2021; Lopes-Ferreira *et al.*, 2022).

O uso de herbicidas e fungicidas no Brasil está sujeito a regulamentações e diretrizes do governo (Salomão; Ferro; Ruas, 2020), visando minimizar os impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana. Portanto, os agricultores devem seguir as recomendações técnicas agrícolas, a fim de garantir a produção de alimentos saudáveis e a proteção do ambiente, além de adotar práticas de manejo integrado de pragas e doenças que incluam o uso responsável de herbicidas.

Entre essas práticas existe o manejo integrado (uso de métodos mecânicos, físicos, culturais, químicos e biológicos), o controle biológico (utilização de parasitas, predadores ou patógenos capazes de reduzir a população de plantas daninhas e, conseqüentemente, a sua capacidade de competir, por meio do equilíbrio populacional entre o inimigo natural e a planta-alvo), a estratégia de controle clássica (introdução de agente predador inseto ou fungo para manterem em níveis moderados as plantas daninhas), a estratégia de controle inundativa (são utilizados agentes em grande escala, e são eles fungos, bactérias e vírus fitopatogênicos) que pode ser denominadas de micoherbicida ou bioherbicida (Adegas; Silva; Concenço, 2022).

Neste último caso, torna-se interessante o estudo sobre os bioherbicidas que, segundo Charudattan e Dinoor (2000 *apud* Adegas; Silva; Concenço, 2022), são agentes biológicos que promovem o controle de plantas daninhas por meio de sucessivas aplicações de seu inóculo. Já existe uma variedade de bioherbicidas que são comercializados em outros países como os Estados Unidos, o qual não somente

considera útil para o controle das plantas daninhas, como também exige que estes agentes sejam registrados e aprovados como biopesticidas.

Para Adegas, Silva e Concenço (2022), os bioherbicidas são aplicados de forma restrita no mundo, e os fatores e desafios que cooperam para este fato são: a importância das plantas-alvo, elevada especificidade dos produtos, dificuldades técnicas na estabilidade da virulência dos agentes, produção massal, formulação e tecnologias de aplicação apropriadas para os agentes biológicos e dificuldades no processo de registro dos produtos (Tebeest, 1992, apud Adegas, Silva e Concenço 2022). Dessa forma, existem obstáculos que devem ser superados no desenvolvimento dos bioherbicidas visando aumentar a eficiência no campo, tais como: desenvolvimento de formulações adequadas, consequentemente diminuindo o volume de calda e as doses dos agentes de biocontrole necessárias para um controle satisfatório da planta daninha alvo, reduzindo potencialmente o custo do bioherbicida; diminuir a dependência de muitas horas do molhamento foliar, necessários à infecção e à proteção dos propágulos fúngicos contra a radiação UV (ultravioleta), com a utilização de adjuvantes específicos adicionados a calda; investir em tecnologia de aplicação de forma a otimizar o desempenho dos fungos sobre as plantas daninhas alvo; buscar a integração de produtos biológicos com herbicidas químicos ou outro sistema de manejo visando aumentar o espectro de controle de espécies de plantas daninhas (Vieira *et al.*, 2018, apud Adegas, Silva e Concenço 2022). Para que um bioherbicida seja utilizado no controle de plantas daninhas, ele deve ser fácil de produzir e armazenar, de baixo custo, confiável, resultar em altos níveis de controle, ter efeito previsível e ser seguro para o ambiente (Tebeest, 1992, apud Adegas, Silva e Concenço 2022)

Sendo o fungo *Cercospora* um fitopatógeno que afeta várias culturas, incluindo o tabaco e algumas plantas hortícolas, causando doenças foliares em várias culturas, o que pode afetar negativamente a produtividade das plantas como mencionado anteriormente, o mesmo pode ser estudado para controle de plantas daninhas, a exemplo da planta *A. viridis* (Caruru).

O Caruru tem sido problema nos plantios brasileiros por apresentar alta reprodutibilidade e adaptabilidade aos variados tipos de solo e diferentes tipos de vegetações, e também por apresentar resistência herbicida (Francischini *et al.*, 2014), o que a coloca no topo das plantas daninhas mais nocivas ao mercado da agricultura brasileira. Assim, este trabalho visa analisar a atividade do extrato acetato de etila do fungo *C. brachiata* contra esta espécie vegetal *A. viridis*.

3.0 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo o isolamento do metabólito cercosporina e seu isômero isocercosporina produzido pelo fungo da espécie *C. brachiata*, com a finalidade de realizar a quantificação dos compostos isolados por meio do CLAE com relação a massa do extrato obtido. Foi também objetivo deste trabalho avaliar a atividade herbicida do extrato acetato de etila do fungo *C. brachiata* crescido na presença de luz e seu isolado cercosporina contra a espécie vegetal *A. viridis*, além de investigar o dano causado pela cercosporina às membranas celulares através da fluorescência do PTS em um sistema PTS/MV.

3.1 Objetivos específicos

- Cultivar o fungo *C. brachiata* em placas de Petri com Agar Malte na presença de luz;
- Processar a extração por maceração de micélios utilizando o solvente acetato de etila;
- Realizar o isolamento de compostos cercosporina e isocercosporina presentes no extrato acetato de etila através de cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modo semi-preparativo);
- Caracterizar os compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Quantificar os compostos cercosporina e isocercosporina por meio do CLAE;
- Avaliar a viabilidade de produção de compostos mediante presença e ausência de luz;
- Avaliar a atividade herbicida do extrato de *C. brachiata* e da cercosporina isolada, contra a espécie de *A. viridis*;
- Determinar o pKa da cercosporina por meio de titulação espectrofluorimétrica;
- Determinar o coeficiente de partição da cercosporina;
- Avaliar a porcentagem de danos em membranas (lipossomas de lecitina) causados por cercosporina após ser ativada pela ação da luz.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes solventes com 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 normal DIN 53137 (s): 20-25). Para análises em CCD, foram usadas cromatoplasmas de alumínio impregnadas com sílica-gel (Macherey-Nagel), revelação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e vanilina sulfúrica como revelador químico. Para análises de cromatografia em coluna do extrato de *C. brachiata* foi utilizada coluna com 3,0 cm de diâmetro, preenchida com sílica 60G de 40-270 mesh da marca Fluka Analytical.

4.2 Equipamentos

4.2.1 Liofilizador

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

4.2.2 Evaporador rotatório

Para a remoção dos solventes foi utilizado um evaporador rotatório da marca IKA, modelo RV 10 basic.

4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório da Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) da UFU, campus Santa Mônica. Foi utilizado um equipamento da marca Bruker, modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 e 100 MHz, para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (marca: Aldrich).

4.2.4 Espectrofotômetro de absorção molecular na região do UV-Vis

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram realizados no Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LAFOT-CM) do IQUFU pelo Ms. Marcos Eduardo G. Carmo, sob orientação do professor Dr. Antônio Otávio T. Patrocínio. Foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2501 BC e Thermo Scientific modelo Evolution 201. Na leitura dos ensaios foram utilizadas cubetas de quartzo no formato retangular com caminho óptico de 1,000 cm.

4.2.5 Espectrofluorímetro para fluorescência da cercosporina.

A espectroscopia de emissão estacionária em solução a temperatura ambiente (300 K), foi realizada com o espectrofluorímetro Horiba modelo Fluoromax-4, empregando o a abertura de fenda apropriada para cada sinal no monocromador de excitação e/ou emissão em função da intensidade do sinal. Além disso, foi empregado um filtro de corte GG400, a fim de remover os sinais advindos de efeitos de 2ª ordem e/ou espalhamento do feixe de excitação. As medidas de emissão estacionária a 300 K foram realizadas em solução aquosa.

4.2.6 Espectrofluorímetro para fluorescência do PTS.

A avaliação dos danos causados pela cercosporina nos lipossomas foi realizada medindo a intensidade de fluorescência do PTS utilizando um espectrofluorímetro com leitor de microplaca da marca PerkinElmer (modelo EnSpire). O experimento foi realizado pela Dra. Renata R. Teixeira do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) do IBTEC-UFU, sob coordenação do professor Dr. Foued S. Espindola.

4.2.7 Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para isolamento dos compostos por meio do CLAE, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu®, modelo LC-6AD, composto por: bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A5R, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, auto-injetor SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD- evaporative light scattering detector) LT II.

4.3 Cultivo dos Fungos

O crescimento e a obtenção dos micélios de *C. brachiata* foram realizados no laboratório LAMIF (Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia) do Instituto de Ciências Agrárias, localizado na UFU, Campus Monte Carmelo, sob a coordenação do Prof. Dr. Bruno S. Vieira. O fungo *C. brachiata* foi isolado a partir de tecidos infectados da espécie vegetal *A. viridis* (conhecida como caruru) e faz parte da Coleção Micológica do LAMIF. Esta espécie de fungo foi identificada e catalogada por Vieira *et al.* (2019).

4.3.1 Crescimento do fungo *Cercospora brachiata* na presença de luz

Para o crescimento dos fungos foi seguida a metodologia modificada de Daub (1982), onde foram cultivadas em ágar malte (15 g de extrato de malte disco, 3 g de peptona, 30 g de glicose e 9 g de ágar por litro) sob um regime diário de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão por 4 semanas. Os micélios foram coletados junto à placa com o meio de cultura dos fungos (material de análise), mantido em plástico filme e papel alumínio no freezer abaixo de 0 °C. Posteriormente, as massas foram medidas para cálculo de rendimento.

4.3.2 Crescimento do fungo *Cercospora brachiata* na ausência de luz

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 JenkinsPrior 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. 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.

4.4 Obtenção dos extratos fúngicos

4.4.1 Sob incidência de luz

O extrato do *C. brachiata* foi obtido por meio da maceração de 502 g de micélios junto às placas com o meio de cultura, usando acetato de etila como solvente extrator. Para tanto, foram feitas 4 extrações, usando em cada uma delas 500 mL de acetato de etila em intervalos de 24 horas. O extrato obtido foi submetido ao evaporador rotatório seguido de liofilização. Ao final, a massa do extrato seco foi medida para cálculo de rendimento.

4.4.2 Sob ausência de luz

A extração foi realizada por maceração utilizando 174 g de micélios e 600 mL de metanol, deixando em contato por 5 dias em frasco protegido da luz (Intaraudom *et al.*, 2016). Após este procedimento o extrato foi filtrado, transferido para um funil de extração e adicionados 100 mL de água destilada. Na sequência, realizou-se uma extração líquido-líquido utilizando hexano, seguido de acetato de etila. Cada extração foi realizada em triplicata com 200 mL de cada solvente. Os extratos obtidos foram submetidos ao evaporador rotatório seguido de liofilização. Ao final, as massas dos extratos secos foram medidas para cálculo de rendimento.

5.0 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CERCOSPORINA E ISOCERCOSPORINA

5.1 Isolamento

O isolamento da cercosporina do extrato acetato de etila (obtido pelo procedimento 4.4.1) foi realizado por cromatografia em coluna (CC) e CLAE com coluna semi-preparativa. Foram realizadas 03 cromatografias em coluna, sendo que a coluna 01 e 02 foram realizadas utilizando o extrato, e a coluna 03 foi realizada utilizando uma fração da coluna 02. Em todas as CC foi utilizado sílica-gel 40-270 mesh, 63-200 µm, da marca Fluka Analytical. Por fim, através do CLAE foi obtido o isolamento da Cercosporina para a quantificação deste metabólito no extrato do fungo obtido no procedimento 4.3.1.

Coluna 01 (C1): Uma CC de 34,5 cm de altura de fase estacionária e 2,5 cm de diâmetro foi empacotada com 75 g de sílica-gel utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila (AE) e hexano (HEX) em proporção 50:50% (v:v) e foram aplicados 621 mg de extrato. A fase móvel durante a eluição foi em gradiente de polaridade crescente, com as seguintes proporções de acetato de etila / hexano: 5/5 (3 x 200 mL); 6/4 (1 x 200 mL); 7/3 (3 x 200 mL); 8/2 (1 x 200 mL); 9/1 (1 x 200 mL); 10/0 (1 x 200 mL). Após foram utilizados os solventes acetato de etila / metanol, também em gradiente nas proporções: 9/1 (1 x 200 mL); 8/2 (1 x 200 mL); 7/3 (1 x 200 mL); 6/4 (1 x 200 mL); 5/5 (1 x 200 mL); 4/6 (1 x 200 mL); 3/7 (1 x 200 mL); 2/8 (1 x 200 mL); 1/9 (1 x 200 mL); 0/10 (1 x 200 mL). E por fim, foi utilizado como eluente uma mistura de metanol / água na proporção 9/1 (1 x 200 mL) até não restar mais material visível na coluna. Esta coluna resultou 400 frações que, após serem monitoradas por CCD, foram reunidas em 21 frações. Dessas, a fração 07 (3,7mg) possuía perfil de composto isolado em CCD e por isto foi analisada em RMN.

Coluna 02 (C2): Uma CC de 34,5 cm de altura de fase estacionária e 2,5 cm de diâmetro foi empacotada com 68,64 g de sílica-gel utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila (AE) e hexano (HEX) em proporção 50:50% (v:v) e foram aplicados 600 mg de extrato. Repetiu-se a mesma sequência de eluição de C1. Esta coluna resultou 283 frações que, após serem monitoradas por CCD, foram reunidas em 10 frações. A fração 8 (180,9 mg) com coloração vermelha intensa foi utilizada para fazer a coluna 03.

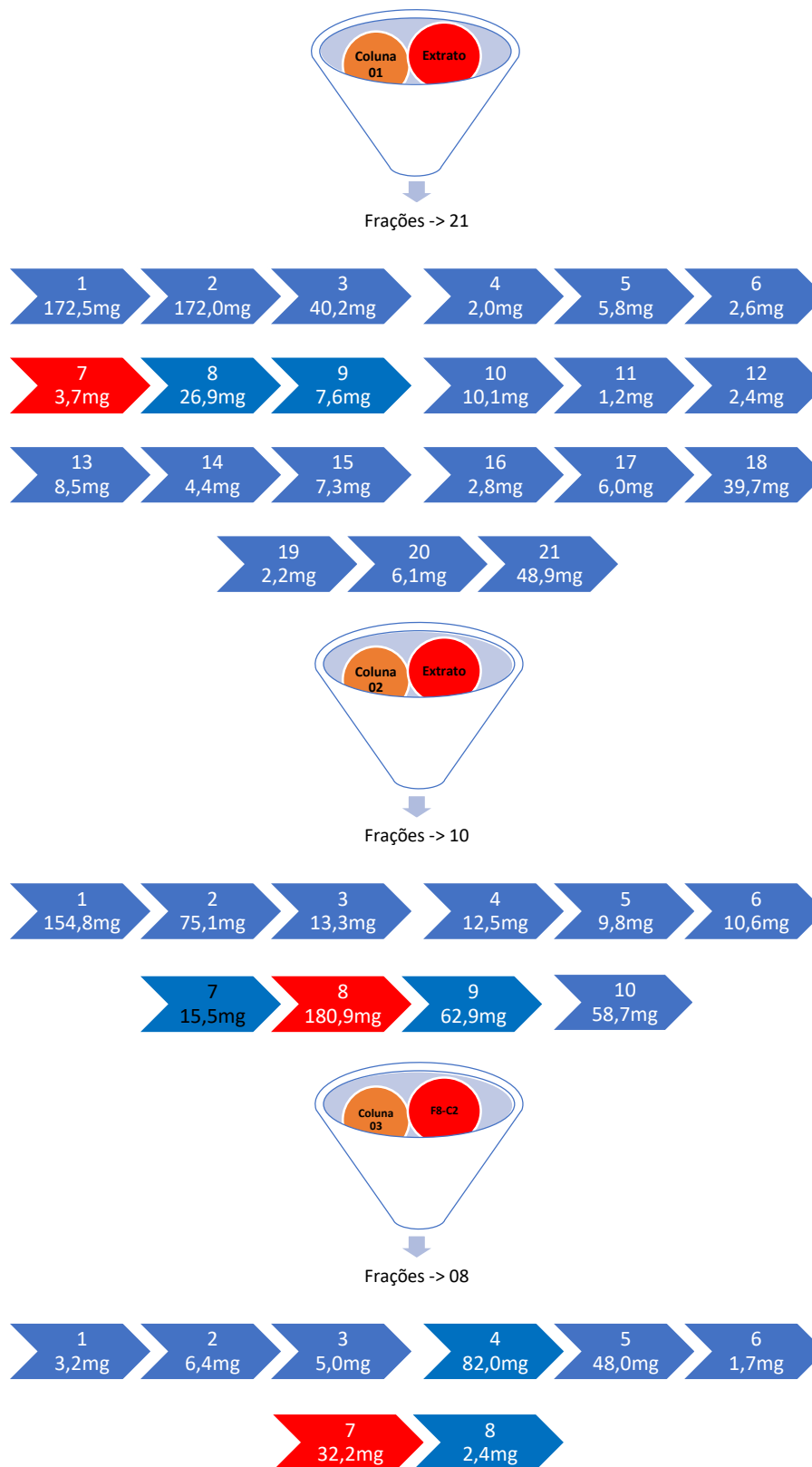
Coluna 03 (C3): Uma CC de 23 cm de altura de fase estacionária e 2,5 cm de diâmetro foi empacotada com 34,0 g de sílica-gel utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila (AE) e hexano (HEX) em proporção 50:50% (v:v) e foram aplicados 180,9 mg da fração 08 extraída da coluna 02. A fase móvel durante a eluição foi em gradiente de polaridade crescente, com as seguintes proporções de acetato de etila / hexano: 6/4 (1 x 100 mL); 7/3 (3 x 100 mL); 8/2 (1 x 100 mL); 9/1 (1 x 100 mL); 10/0 (1 x 100 mL). Após foram utilizados os solventes acetato de etila / metanol, também em gradiente nas proporções: 9/1 (1 x 100 mL); 8/2 (1 x 100 mL); 7/3 (1 x 100 mL); 6/4 (1 x 100 mL); 5/5 (1 x 100 mL); 4/6 (1 x 100 mL); 3/7 (1 x 100 mL); 2/8 (1 x 100 mL); 1/9 (1 x 100 mL); 0/10 (1 x 100 mL). E por fim foi utilizado como eluente uma mistura de metanol / água na proporção (0,1% de ácido fórmico) 9/1 (1

x 100 mL) até não restar mais material visível na coluna. Esta coluna resultou 156 frações que, após serem monitoradas por CCD, foram reunidas em 08 frações. A fração 8 com coloração e RF característicos da cercosporina foi utilizada para fazer o isolamento por CLAE - Semipreparativa.

CLAE-01 com coluna semi-preparativa: A coluna utilizada foi da marca Phenomenex, modelo: OOG-4253NO, Luna C18 (2) (100Å 250,0 × 10,0 mm, 10 µm), com pré-coluna AJO-9281. A partir do perfil cromatográfico da fração 08 da coluna C3, a amostra com concentração de 3,22 mg mL⁻¹ (em metanol) foi submetida ao fracionamento utilizando a coluna semi-preparativa nas condições a seguir: fase móvel A (água deionizada) e fase móvel B (metanol HPLC), a eluição em gradiente iniciou com 90-100% de B (6 mim), 100% de B (5 mim), 100-90% de B (2 mim) e 90% de B (3 mim), fluxo 1 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 250,0 µL, com forno a temperatura de 35 °C. O isolamento foi realizado através da coleta automatizada na saída do detector com coletor de frações. A válvula foi programada para coletar cada composto de acordo com o seu tempo de retenção (t_R). Desta análise foram obtidas seis frações, sendo as frações 04 e 05 selecionadas por ter características da cercosporina. Dessas foi realizado o RMN e a análise com as membranas.

Para melhor compreensão das colunas cromatográficas realizadas foi criado um fluxograma (Figura 9) com as colunas cromatográficas realizadas.

Figura 9: Fluxograma do processo de isolamento da cercosporina.



Fonte: o autor (2023).

5.2 Caracterização

As frações 07 da coluna 01 e a fração 04 obtida por CLAE com a coluna semi-preparativa foram analisadas em RMN, utilizando como solvente clorofórmio deuterado.

5.3 Quantificação da cercosporina e da isocercosporina no extrato de *C. brachiata* por meio do CLAE.

A quantificação da cercosporina foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Sendo utilizada uma coluna analítica de fase reversa C18 da marca: Phenomenex modelo: Luna, 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, partículas de 5 μm e poros de 100 \AA de diâmetro, protegida pela respectiva pré-coluna. Foi injetado um volume de 50 μL de solução na concentração 1,35 mg mL. Utilizou-se na fase móvel água deionizada (fase móvel A) e metanol HPLC (fase móvel B). Foi utilizado o seguinte sistema isocrático 70% de B e 30% de A por 17 minutos, e utilizou-se fluxo de 1 mL min⁻¹.

A frações 07 da coluna 01 e 04 da semi-preparativa foram avaliadas por CLAE e foram construídas curvas analíticas através do gráfico da área (área do composto) em 470 nm *versus* a concentração. As curvas foram preparadas com as seguintes concentrações: 0,01, 0,05, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg mL⁻¹. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) da curva analítica foi calculado de acordo com as equações (Riley; Rosanske, 1996):

$$\text{LD} = 3 (\delta/S) \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{LQ} = 10 (\delta/S) \quad \text{Equação 2}$$

Sendo: δ é a área do maior ruído observado e S é o coeficiente angular da curva analítica.

5.4 Coeficiente de partição da cercosporina

Para o cálculo do coeficiente de partição (K_p) da cercosporina uma quantidade de 2 mg foi adicionada a três microtubos de 3 mL (marca Eppendorf) e foi adicionado 2 mL de uma solução de água:octanol (1:1) (v/v, %). A mistura foi agitada vigorosamente e posteriormente mantida em repouso por 24 horas no escuro, para se alcançar o equilíbrio e determinar a concentração da cercosporina nas fases aquosa e de octanol, por UV-vis (Sangster, 1997). Foram coletadas amostras de 20 μL de cada fase e diluídas em 2 mL de etanol. A absorvância de cada solução foi

medida em 470 nm utilizando um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, (modelo Genesys 10S). Através do valor ϵ (absortividade molar ou coeficiente de extinção) do etanol e da absorvância medida, as concentrações de cercosporina em cada fase da mistura foi calculada e através destes valores o coeficiente de partição foi calculado pela Equação 3 e obtido também o Log P ($\log k_p$):

$$K_p = \frac{[\text{Cercosporina}]_{\text{etanol}}}{[\text{Cercosporina}]_{\text{água}}} \quad \text{Equação 3}$$

5.5 Curva de titulação espectrofluorométrica

A titulação espectrofluorométrica foi realizada no laboratório de fotoquímica e ciências dos materiais (LAFOT-CM) da UFU, a fim de determinar a constante de dissociação protônica em meio aquoso (K_a) referente a cercosporina em seu estado excitado por meio do monitoramento de seu espectro de emissão estacionário (Gonçalves, 2001; Lakowicz, 2006). A titulação foi realizada a partir da espécie protonada adicionando equivalentes molares de KOH, o que leva à diminuição da banda de emissão referente à espécie protonada com máximo em 610 nm em decorrência da formação de sua base conjugada.

Portanto, foi fixado o comprimento de onda de 610 nm para acompanhar a diminuição de sua intensidade com o acréscimo do pH. A curva obtida na titulação possibilita a obtenção do valor correspondente ao pK_a da molécula estudada a partir do ponto de maior inflexão da curva, onde 50% das espécies estão na forma protonada e 50% na forma desprotonada em meio aquoso (Gonçalves, 2001; Lakowicz, 2006).

5.6 Avaliação da permeabilidade em membrana durante fotossensibilização

A avaliação de permeabilidade em membranas por meio da emissão do PTS, foi realizada no laboratório de bioquímica e biologia molecular (LABIBI), da UFU, pela Dra. Renata Roland, sob coordenada do Dr. Foued Salmen. Enquanto que os preparos de soluções e filme lipídico ocorreram no laboratório interdisciplinar de fototerapia e biomoléculas (LIFeBio), do instituto de química da UFU com orientação da aluna Patrícia e coordenada da Dra. Tayana Mazin.

5.6.1 Soluções

A solução de pireno tretrasulfonato de sódio (PTS) de 1mM ($MM_{PTS} = 610,43 \text{ g mol}^{-1}$) foi preparada utilizando 1 mg de PTS em 1,6mL de água destilada. A solução de metil viologenênio (MV) de 0,01M ($MM_{MV} = 257,16 \text{ g mol}^{-1}$), foi preparada utilizando 5,14 mg de MV em 2 mL de 14 mM tampão Tris com pH 8,1. Já a solução de tampão Tris 20mM ($MM_{Tris} = 121,14 \text{ g mol}^{-1}$, pH 8,1) foi preparada com 1,214 g de Tris em 500 mL de água destilada. E por fim foi utilizada a solução surfactante de Triton X-100 (10% em água destilada).

5.6.2 Filme lipídico

O filme lipídico foi preparado utilizando uma solução contendo 30 mg de lipídio (lecitina de soja) em 0,5 mL de clorofórmio. Após solubilização, o clorofórmio foi totalmente removido por meio do fluxo de gás nitrogênio até a observação de formação do filme lipídico. Foi preparado dois dias antes da utilização e foi mantido no freezer a uma temperatura de -20°C .

5.6.3 Preparo dos lipossomas com PTS/MV

Para a preparação do lipossoma com PTS, o filme lipídico (preparado em 5.6.2) foi hidratado com 1,0 mL de solução contendo 1 mM de PTS em água. Posteriormente, a solução foi agitada no vórtex por 15 minutos, e em banho de ultrassom por 5 minutos, para garantir que todo filme fosse removido do tubo.

5.6.4 Cromatografia por exclusão de tamanho

Para a separação do lipossoma/PTS do PTS livre, uma coluna cromatográfica foi realizada utilizando Sephadex G-50 como fase estacionária (diâmetro: 0,5cm e altura: 20cm) e tampão Tris 20mM (pH 8,1) como fase móvel (eluente). Após a aplicação do filme lipídico na coluna e eluição, as frações coletadas que estavam com aspecto de turvo esbranquiçado indicavam a presença do lipossoma/PTS e, portanto, foram separadas para as análises.

5.6.5 Avaliação do dano em lipossoma via vazamento de PTS

A avaliação dos danos causados pela cercosporina nos lipossomas foi realizada medindo a intensidade de fluorescência do PTS utilizando um espectrofluorímetro com leitor de microplaca da marca PerkinElmer (modelo EnSpire). Para esta análise,

foram preparadas 02 microplacas de 96 poços, que foram analisadas no modo escuro (sem irradiação) e irradiada (Fonte de Luz LED de 100W, com filtro amarelo que emite entre 425 a 725 nm). A luz estava a uma distância de 5 cm da amostra. Para esta análise foram avaliadas as intensidades de fluorescência das seguintes amostras em quadruplicada:

- Controle 1 (sem cercosporina): 3000µL de tampão Tris 20mM;
- Controle 2 (sem cercosporina): 2940µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL MV;
- Controle 3 (sem cercosporina): 2910µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL MV + 30µL DMSO (1% da solução);
- Solução 1 (com cercosporina): 2910µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL solução MV + 30 µL cercosporina DMSO (97 µM);
- Solução 2 (com cercosporina): 2920µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL solução MV + 20 µL cercosporina DMSO (65µM);
- Solução 3 (com cercosporina): 2930µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL solução MV + 10 µL cercosporina DMSO (32 µM);
- Controle 4 (sem cercosporina): 2920µL tampão Tris 20mM (pH 8,1) + 30µL Lip/PTS + 30µL solução MV + 20 µL Triton-X 10%.

5.6.6 Análise da fluorescência

Foi medida a intensidade de fluorescência do PTS mediante os tempos de irradiação que somados foram 0, 2, 7, 17, 32, 52, 77 e 107 minutos (das amostras irradiadas e sem irradiação). O PTS possui $\lambda_{exc} \approx 350\text{nm}$ e $\lambda_{em} \approx 400\text{nm}$ (Manzini *et al.*, 2014). Ao final de 107 minutos, foi adicionado 20µL de Triton X-10% em todas as amostras que foram levemente agitadas, e medidas as intensidades de fluorescência do PTS.

5.6.7 Análise dos dados

Para o cálculo da porcentagem do dano em lipossomas causado pela foto-oxidação foi utilizada a equação:

$$P = 100\% \frac{I_{final}}{I_{inicial}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde P é a porcentagem do dano, $I_{inicial}$ é a intensidade de emissão inicial da lip/PTS/MV, e I_{final} é a intensidade após 0, 2, 7, 17, 32, 52, 77 e 107 minutos.

6.0 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA CONTRA *AMARANTHUS VIRIDIS* DO EXTRATO DE *C. BRACHIATA* E DE SEU ISOLADO CERCOSPORINA

Para a análise da atividade herbicida, duas soluções do extrato bruto do fungo obtido pelo crescimento na presença de luz, nas concentrações de 1 e 5 mg mL⁻¹ (em água contendo 2% dimetilsulfóxido (DMSO)) e uma solução de cercosporina na concentração de 0,53 mg mL⁻¹ (em água contendo 2% DMSO) foram avaliadas em *A. viridis* (caruru) nos estádios fenológicos de 2 pares de folhas e de 4 pares de folhas. Um microferimento foi realizado previamente nas folhas do Caruru e, através de uma seringa hipodérmica, 1 gota de 20 µL de cada uma das soluções foi aplicada nos ferimentos. Foram aplicadas 2 gotas por folha e em todas as folhas das plantas. O grupo controle (branco) foi composto por indivíduos nos 2 estádios fenológicos que receberam 20 µL de solução aquosa 2% DMSO por microferimento.

A análise foi realizada em quintuplicata, sendo cada repetição representada por 1 indivíduo. A avaliação foi realizada 5 dias após as aplicações por meio de uma escala visual que varia de 0-4, onde 0 é considerado sem efeito e 4 se considera necrose foliar. Sendo que nesta escala a correspondência em centímetros é de 0 = 0 cm; 1 = 0,25 cm; 2 = 0,5 cm; 3 = 0,75 cm e 4 = 1 cm (Masi *et al.*, 2018).

7.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Rendimento das extrações

Após maceração com acetato de etila de 502 g de micélios do fungo *C. brachiata* crescido em meio luminoso, o extrato foi seco para completa remoção do solvente, e foram obtidas 1,68 g de extrato. Enquanto que, para o fungo que foi mantido sob ausência de luz foram obtidos a partir de 174 g de micélios, 122 mg de extrato, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos acetato de etila do fungo *C. brachiata*.

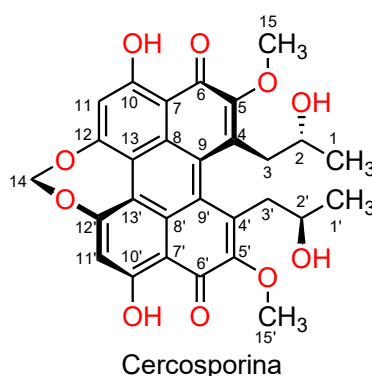
| Tipo de crescimento | Massa de micélio (g) | Massa de extrato (g) | Rendimento (%) |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| Com luz | 502 | 1,68 | 0,33 |
| Sem luz | 174 | 0,122 | 0,07 |

Fonte: o autor.

7.2 Isolamento e caracterização da cercosporina e da isocercosporina

Através das colunas cromatográficas e por meio da CLAE foi possível isolar a cercosporina (Figura 10) e, através da RMN, foi possível caracterizar através da comparação dos dados com a literatura.

Figura 10: Estrutura da cercosporina com numeração.



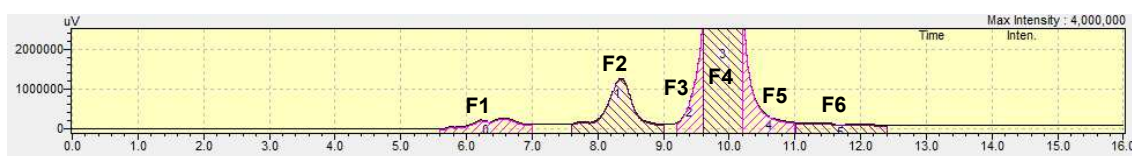
Fonte: o autor

A coluna cromatográfica 02 foi realizada com a finalidade de isolar a cercosporina para a quantificação. A fração 08 com 180,9 mg, apresentou coloração

e perfil em CCD da cercosporina com R_f : 0,68 (Frajola, 1978) porém ainda continha algumas impurezas, e desta foi realizada a coluna 03. As frações da coluna 03 foram avaliadas em CLAE e a fração 07 com 32,2 mg, por apresentar melhor pureza nos cromatogramas, foi escolhida para dela isolar a cercosporina no CLAE-semipreparativo, o fluxograma (Figura 9) apresenta o processo de isolamento.

Na análise da fração 7 (coluna 03) pelo CLAE – semipreparativo, 06 frações foram obtidas, conforme cronograma com programação de isolamento da Figura 11. Sendo que as coletas 0, 1, 2, 3, 4 e 5 do equipamento foram denominadas de fração F1, F2, F3, F4, F5 e F6, respectivamente. Em quantidade de massa, cada fração continha 3,0, 2,2, 0,1, 3,3, 2,9 e 0,1 mg, respectivamente.

Figura 11: Cromatograma do CLAE-semipreparativo com a programação de isolamento da cercosporina.



Fonte: o autor (2023).

As frações desta análise cromatográfica foram úteis para realizar a caracterização da cercosporina por RMN (Fração 04), bem como para realizar os experimentos com os lipossomas (Fração 05), possibilitando a viabilidade dos experimentos neste trabalho, que serão discutidos posteriormente. Os sinais e as correlações com carbonos estão reunidos na Tabela 2.

Tabela 2: Dados de RMN da cercosporina.

| N ^o C | Cercosporina | | LITERATURA Morgan <i>et al.</i> (2009)* | |
|------------------|---------------------------|---|--|---|
| | C ¹³ δ(ppm) | H ¹ δ(ppm), multip., J, Integração | C ¹³ δ(ppm) | H ¹ δ(ppm), multip., J, Integração |
| 1, 1' | 22,8 | 0,65 (d, J=6,1 Hz, 6H) | 23,6 | 0,66 (d, J=6,1 Hz, 6H) |
| 3, 3' | 42,5 | 2,90 (dd, J=6,0 e 13,0 Hz, 2H) | 42,4 | 2,91 (dd, J=6,1 e 13,0 Hz, 2H) |
| | | 3,59 (dd, J=7,0 e 13,0 Hz, 2H) | | 3,54 (dd, J=7,0 e 13,0 Hz, 2H) |
| 15, 15' | 60,5 | 4,21 (s, 6H) | 61,4 | 4,22 (s, 6H) |
| 2, 2' | 67,4 | 3,39 (m, 2H) | 68,3 | 3,39 (m, 2H) |
| 14 | 92,0 | 5,74 (s, 2H) | 92,9 | 5,75 (s, 2H) |
| 11, 11' | 107,6 | 7,07 (s, 2H) | 108,5 | 7,09 (s, 2H) |
| 7, 7' | 108,7 | | 109,6 | |
| 13 | 112,3 | | 113,1 | |
| 4, 4' | 127,3 | | 128,2 | |
| 9, 9' | 130,0 | | 130,8 | |
| 8, 8' | 134,6 | | 135,4 | |
| 5, 5' | 152,2 | | 153,1 | |
| 12, 12' | 162,7 | | 163,6 | |
| 10, '0' | 166,9 | | 167,7 | |
| 6, 6' | 181,2 | | 182,0 | |
| OH | | 14,81 (s, 2H) | | 14,8 (s, 2H) |

*Nota: RMN ¹³C (125 MHz), RMN ¹H (500 MHz), CDCl₃.

Fonte: o autor (2023).

A fração 4 (F4) ao ser analisada em RMN de ¹³C (Figura D, apêndice I, pg.79), indicou a presença de 15 sinais, que são atribuídos a cercosporina. Destes sinais, 3 sinais estavam na região de carbonos carbinólicos com δ 60,5 (C-15 e 15'), 67,4 (C-2 e 2') e 92,00 ppm (C-14); 09 sinais de carbonos metínicos (sp²) em δ 107,6 (C-7 e 7'), 108,7 (C-11 e 11'), 112,3 (C-13 e 13'), 127,3 (C-4 e 4'), 130,0 (C-9 e 9'), 134,6 (C-8 e 8'), 152,2 (C-5 e 5'), 162,7 (C-12 e 12'), 166,9 (C-10 e 10').

Os carbonos 5 e 5', 10 e 10' e 12 e 12' tem maiores deslocamentos por também estarem ligados a átomos de oxigênio por ligação simples. Há também um sinal de carbono de carbonila em δ 181,2 (C-6 e 6'), a desblindagem do carbono pelo oxigênio

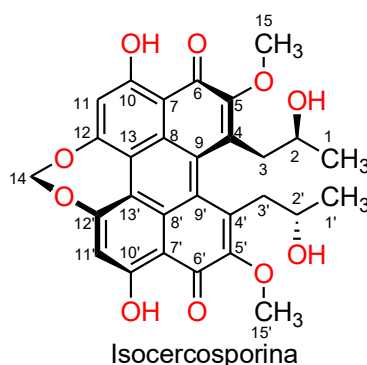
na carbonila, faz com que seu deslocamento químico seja maior. E por fim, foram observados dois sinais de carbonos, um metílico (sp^3) em δ 22,8 (C- 1 e 1') e outro, mais desblindado, em δ 41,5 (C- 3 e 3'). Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura publicada por Morgan *et al.* (2009), o que comprovou esta estrutura (Figura 11). Os espectros de RMN deste composto pode ser visualizado no apêndice I anexado neste trabalho.

No espectro de RMN 1H foi observado um sinal de hidrogênio metínico em δ 7,07 (s, 2H) ligado aos carbonos 11 /11' e característico de aromático, outros sinais em δ 5,74 (s, 2H) ligado ao carbono 14, δ 3,39 (m, 2H) ligado aos carbonos 2/ 2', δ 4,21 (s, 6H) ligado aos carbonos 15/15', δ 2,90 (dd, $J=6,0$ Hz, 13 Hz, 2H) e 3,59 (dd, $J=7,0$ Hz, 13 Hz, 2H) ligado aos carbonos 3/3' onde o sinal é desdobrado por serem diastereotópicos, um sinal de hidrogênio metílico em δ 0,65 (d, $J= 6,1$ Hz, 6H) ligado aos carbonos 1/1', e há um sinal de hidrogênio em δ 14,81 (s, 2H) que é atribuído ao hidrogênio fenólico.

Após comparar os valores encontrados neste trabalho com os valores da literatura conforme a Tabela 2, foi constatada que a substância isolada era cercosporina.

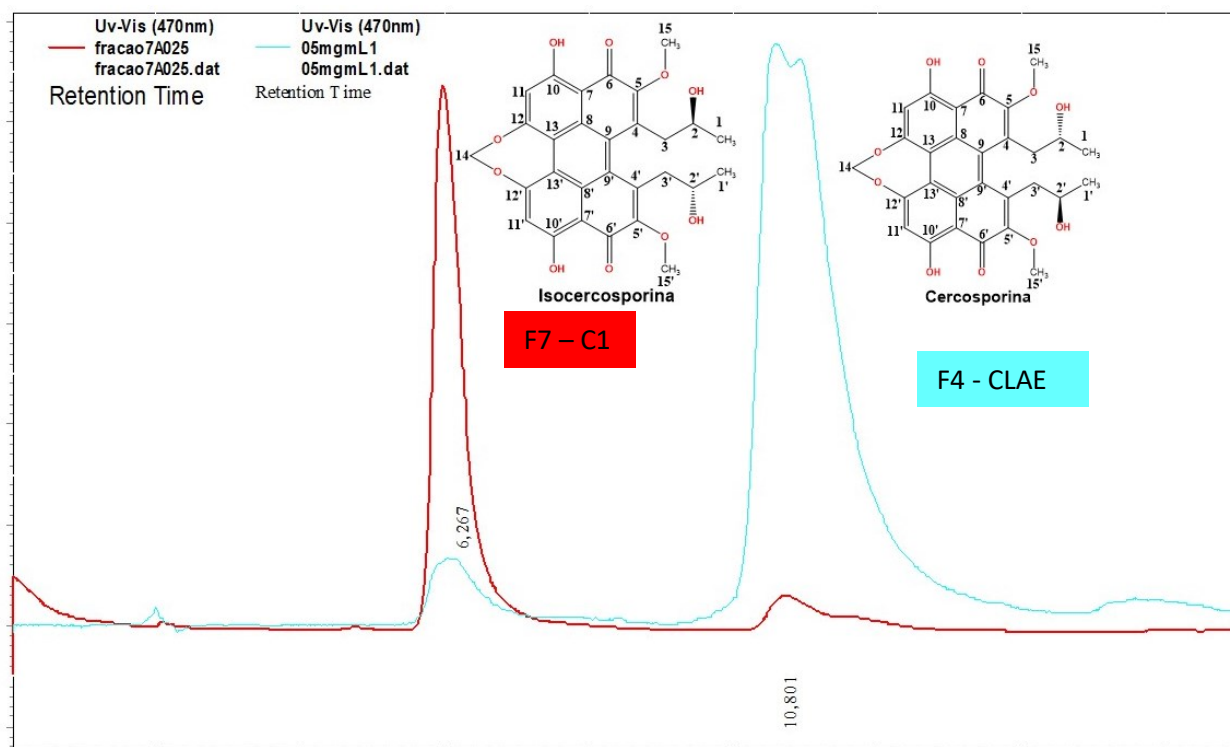
Também foi possível realizar o isolamento da isocercosporina (Figura 12), principal isômero da cercosporina, e a mesma foi obtida da fração 7 da coluna 01, que sendo submetida a análise de CLAE constatou-se seu isolamento de uma fração com sua composição majoritária, conforme cromatograma presente na Figura 13.

Figura 12: Estrutura da isocercosporina com numeração.



Fonte: o autor.

Figura 13: Cromatogramas sobrepostos da cercosporina e isocercosporina obtido por CLAE (470 nm).



Fonte: o autor (2023).

Os dados de deslocamento do RMN para a isocercosporina foram reunidos na Tabela 3 e comparados com a literatura, para comprovação de que o composto isolado era a isocercosporina. As diferenças nos dados de RMN entre as moléculas são destacadas apenas para os deslocamentos dos hidrogênios e seus acoplamentos.

Tabela 3: Dados de RMN da isocercosporina.

| N ^o C | Isocercosporina | | LITERATURA Savi <i>et al.</i> (2018)* | |
|------------------|---------------------------|--|--|--|
| | C ¹³ δ(ppm) | H ¹ δ(ppm), multip., J, Integração | C ¹³ δ(ppm) | H ¹ δ(ppm), multip., J, Integração |
| 1, 1' | 24,1 | 0,96 (d, J=6,1 Hz, 6H) | 24,0 | 0,95 (d, J=6,1 Hz, 6H) |
| | | 2,88 (dd, J=8,4 e 13,2 Hz, 2H) | | 2,85 (dd, J=8,4 e 13,5 Hz, 2H) |
| 3, 3' | 41,7 | 3,50 (dd, J=3,2 e 13,2 Hz, 2H) | 42,5 | 3,49 (dd, J=3,2 e 14,0 Hz, 2H) |
| 15, 15' | 60,32 | 4,23 (s, 6H) | 61,2 | 4,21 (s, 6H) |
| 2, 2' | 68,5 | 3,70 (m, 2H) | 69,8 | 3,68 (m, 2H) |
| 14 | 92,0 | 5,71 (s, 2H) | 92,8 | 5,71 (s, 2H) |
| 11, 11' | 108,7 | 6,99 (s, 2H) | 109,4 | 7,03 (s, 2H) |
| 7, 7' | 107,8 | | 108,6 | |
| 13 | 112,4 | | 113,2 | |
| 4, 4' | 127,0 | | 127,6 | |
| 9, 9' | 131,0 | | 131,8 | |
| 8, 8' | 136,0 | | 136,8 | |
| 5, 5' | 151,5 | | 153,4 | |
| 12, 12' | 162,8 | | 163,6 | |
| 10, 10' | 167,0 | | 167,8 | |
| 6, 6' | 181,1 | | 181,9 | |
| OH | | 14,88 (s, 2H) | | 14,89 (s, 2H) |

*Nota: RMN ¹³C (100 MHz), RMN ¹H (400 MHz), CDCl₃.

Fonte: o autor (2023).

Conforme confirmado com a literatura, a substância isolada é a isocercosporina que, segundo Yamazaki e Ogawa (1972) e Tabuchi, Tajimi e Ichihara (1991), é interconvertida quando a cercosporina está em solução, ou vice-versa, a isocercosporina é convertida em cercosporina, o que inviabiliza o isolamento das substâncias em sua totalidade.

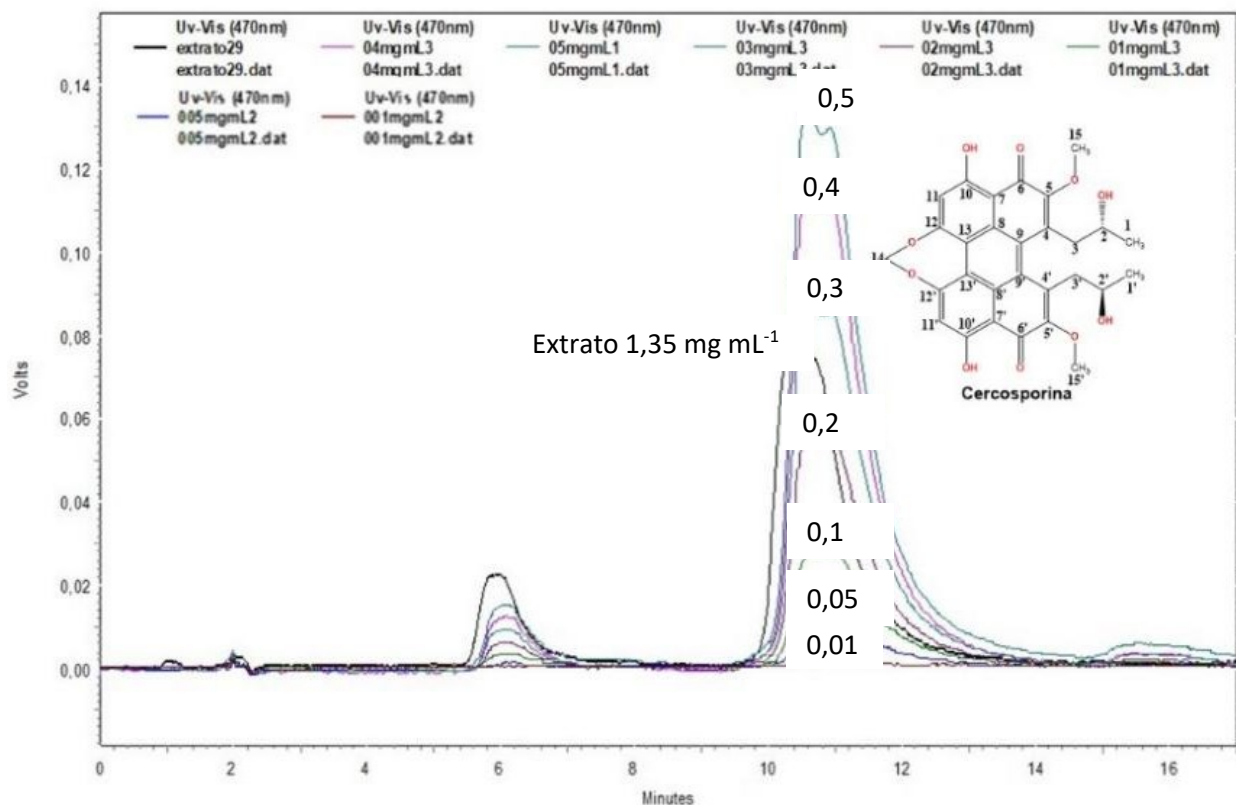
Os espectros de RMN mostram que as diferenças significativas entre as substâncias estão: 1) no deslocamento referente aos hidrogênios metílicos ligados aos carbonos 1/1' em que a isocercosporina mostra um deslocamento mais desblindado (δ 0,96) em relação à cercosporina (δ 0,65); 2) o mesmo é observado no deslocamento referente aos hidrogênios dos carbonos 2/2' em que a isocercosporina

mostra um deslocamento mais desblindado (δ 3,70) em relação à cercosporina (δ 3,39). Além disso, é observada diferença quanto à constante de acoplamento (J) dos hidrogênios diastereotópicos dos carbonos 3/3'. Enquanto a cercosporina apresenta $J=6,0$ e $13,0$ Hz para o deslocamento δ 2,90 e $J=7,0$ e $13,0$ Hz para o deslocamento δ 3,59, a isocercosporina apresenta $J=8,4$ e $13,2$ Hz para o deslocamento δ 2,88 e $J=3,2$ e $13,2$ Hz para o deslocamento δ 3,50. Os espectros de RMN deste composto pode ser visualizado no apêndice II anexado neste trabalho.

7.3 Quantificação por CLAE da cercosporina e isocercosporina

Após a caracterização da cercosporina por RMN no extrato de *C. brachiata*, foram feitas novas análises do extrato no CLAE-analítico e foi obtido o cromatograma representado na Figura 14, evidenciando que havia a presença majoritária de um composto com t_R : 10,8 minutos. Foram também analisados os cromatogramas de variadas concentrações de cercosporina, com a finalidade de encontrar a similaridade entre o pico característico da cercosporina isolada, e o pico que a mesma representaria no extrato em questão. Os cromatogramas de todas as concentrações analisadas para quantificação da cercosporina estão reunidos na Figura 14.

Figura 14: Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de cercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg mL⁻¹).



Fonte: o autor (2023).

Como pode ser evidenciado, para as soluções de cercosporina não houve grandes variações nos tempos de retenção, e o perfil e intensidade dos picos se mantiveram nas diferentes análises. Com os dados obtidos pelo CLAE, foi elaborada a Tabela 4 que contém os valores de concentração, tempo de retenção (t_R), área do pico e a média aritmética das áreas.

Tabela 4: Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de cercosporina com diferentes concentrações

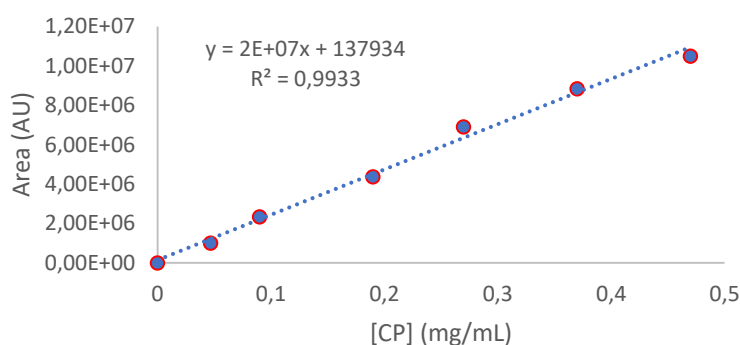
| [Cercosporina] mg/mL | % média das áreas | Área média | t_R médio (min) |
|---------------------------------|------------------------------|---|--------------------------------------|
| 0,47 | 93,2 | 1,1.10 ⁷ ± 0 | 10,8 ± 0,00 |
| 0,37 | 93,2 | 8,8.10 ⁶ ± 6,7 10 ⁴ | 10,9 ± 0,08 |
| 0,27 | 92,9 | 6,9.10 ⁶ ± 7,2 10 ⁴ | 10,8 ± 0,02 |
| 0,19 | 93,4 | 4,4.10 ⁶ ± 5,5 10 ⁴ | 10,9 ± 0,02 |
| 0,09 | 93,0 | 2,3.10 ⁶ ± 2,9 10 ⁴ | 10,9 ± 0,00 |
| 0,047 | 93,8 | 1,0.10 ⁶ ± 6,5 10 ³ | 10,2 ± 0,02 |
| 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Nota: As análises para cada concentração não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p < 0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor (2023).

Com os dados da Tabela 4 foi elaborada a reta usando o software Origin 8.0. E a quantificação foi feita usando a equação da reta obtida (Figura 15). Para este cálculo, foi usada a equação da reta $y = a + bx$, sendo y a área do pico, a o coeficiente linear, b o coeficiente angular, e x a concentração de cercosporina. Os valores obtidos para cada parâmetro foi $a = 2,0 \cdot 10^7$, $b = 1,4 \cdot 10^5$, e $y = 5,6 \cdot 10^6$ mAU. Sendo o limite de detecção (LD) calculado de $1,65 \text{ mg mL}^{-1}$, o limite de quantificação (LQ) de $5,5 \text{ mg mL}^{-1}$, e os mesmos foram calculados utilizando a razão entre o maior ruído encontrado na reta ($1,1 \cdot 10^7$) e o coeficiente angular da reta ($2,0 \cdot 10^7$), conforme Equações 1 e 2.

Figura 15: Curva analítica da área *versus* concentração de cercosporina.



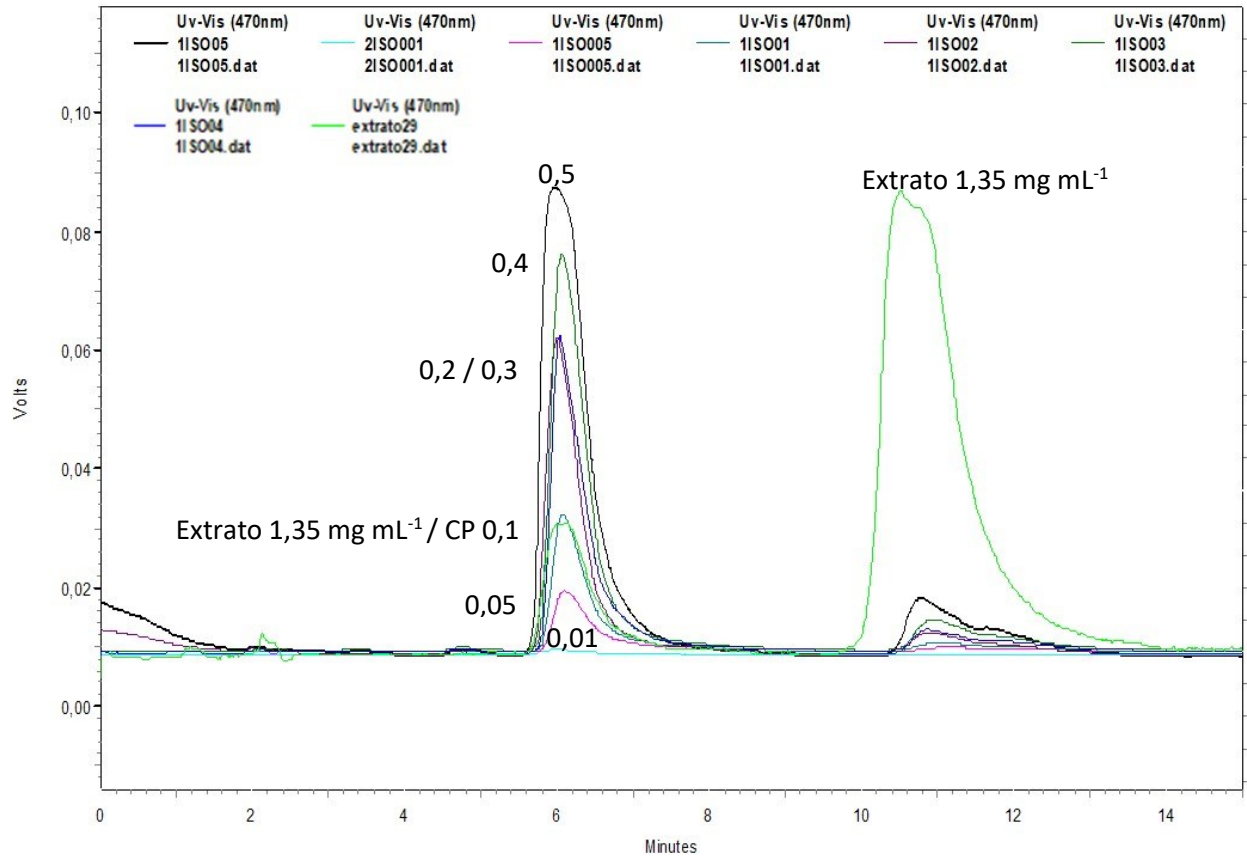
Fonte: o autor (2023).

Através desses dados verificou-se que a concentração da cercosporina no extrato cultivado sob luz apresentava $0,27 \text{ mg mL}^{-1}$, o que infere que há $0,27 \text{ mg}$ de cercosporina em $1,35 \text{ mg}$ de extrato, ou seja, aproximadamente 20% do extrato obtido é cercosporina. Assim, se inicialmente foram obtidos $1,68 \text{ g}$ de extrato, isto implica dizer que neste extrato há aproximadamente 336 mg de cercosporina.

Comparando os valores obtidos neste trabalho com a quantidades mensuradas por Botelho *et al.* (2022) para a espécie *Cercospora coffeicola*, é possível notar que diferentes espécies do gênero *Cercospora* produzem diferentes quantidades de cercosporina, e isto está relacionado a vários fatores como temperatura, meio de cultura, tempo de exposição a luz e etc (Gunasinghe *et al.*, 2016; Jonge *et al.*, 2018; Rezende *et al.*, 2020). A maior concentração quantificada através do CLAE por Botelho *et al.* (2022) foi de $37,26 \text{ }\mu\text{M}$. Enquanto que, a quantidade produzida pelo fungo *C. brachiata* foi de $505,6 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,27 \text{ mg mL}^{-1}$), ou seja, aproximadamente 13,6 vezes maior que a maior quantidade encontrada para *Cercospora coffeicola*. Isso demonstra que a espécie *C. brachiata* é promissora para produção de cercosporina nas condições em que o fungo foi cultivado.

Através de uma fração de isocercosporina do CLAE-semipreparativo foi realizada a análise no CLAE-analítico para quantificação no extrato. A Figura 16 mostra a abundância da isocercosporina em t_R : 6,1 minutos, que é menor se comparada a quantidade de cercosporina no extrato (linha verde) em t_R : 10,8 minutos.

Figura 16: Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de isocercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg mL⁻¹).



Fonte: o autor (2023).

Seguindo o método utilizado para quantificar a cercosporina, foi possível fazer a quantificação da isocercosporina. Os valores de áreas obtidos para cada concentração testada foram reunidos na Tabela 5.

Tabela 5: Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de isocercosporina com diferentes concentrações.

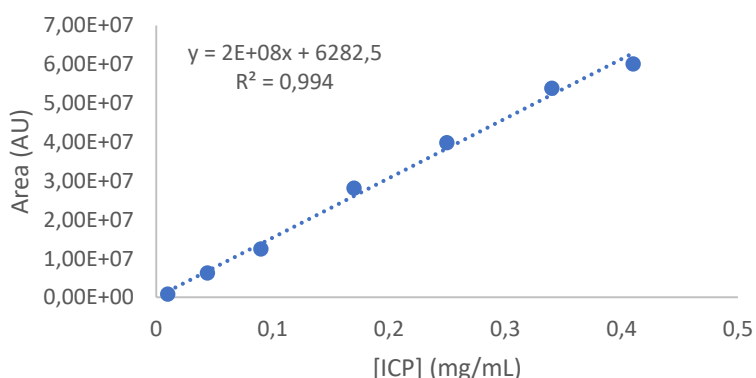
| [Isocercosporina] mg/mL | % média das áreas | Área média | t_R médio (min) |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 0,41 | 82,4 | $6,01 \cdot 10^7 \pm 9,5 \cdot 10^4$ | $6,1 \pm 0,00$ |
| 0,34 | 83,8 | $5,38 \cdot 10^7 \pm 4,6 \cdot 10^5$ | $6,1 \pm 0,00$ |
| 0,25 | 85,1 | $3,98 \cdot 10^7 \pm 1,5 \cdot 10^7$ | $6,1 \pm 0,00$ |
| 0,17 | 85,9 | $2,81 \cdot 10^7 \pm 5,4 \cdot 10^5$ | $6,1 \pm 0,00$ |
| 0,09 | 86,4 | $1,24 \cdot 10^7 \pm 2,1 \cdot 10^5$ | $6,1 \pm 0,00$ |
| 0,044 | 88,2 | $6,33 \cdot 10^6 \pm 2,5 \cdot 10^5$ | $6,2 \pm 0,00$ |
| 0,01 | 93,36 | $8,90 \cdot 10^5 \pm 6,4 \cdot 10^4$ | $6,3 \pm 0,00$ |

Nota: As análises para cada concentração não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido $p < 0,01$ para todas as correlações com médias diferentes.

Fonte: o autor (2023).

Os valores obtidos para cada parâmetro foi $a = 2,0 \cdot 10^8$, $b = 6,3 \cdot 10^3$, e $y = 9,7 \cdot 10^5$ mAU (Figura 17). Sendo o limite de detecção (LD) calculado de $0,90 \text{ mg mL}^{-1}$, o limite de quantificação (LQ) de $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Para esses cálculos foram utilizados os valores do maior ruído encontrado na reta ($6,01 \cdot 10^7$) e o coeficiente angular da reta ($2,0 \cdot 10^8$).

Figura 17: Curva analítica da área *versus* concentração de isocercosporina.



Fonte: o autor (2023).

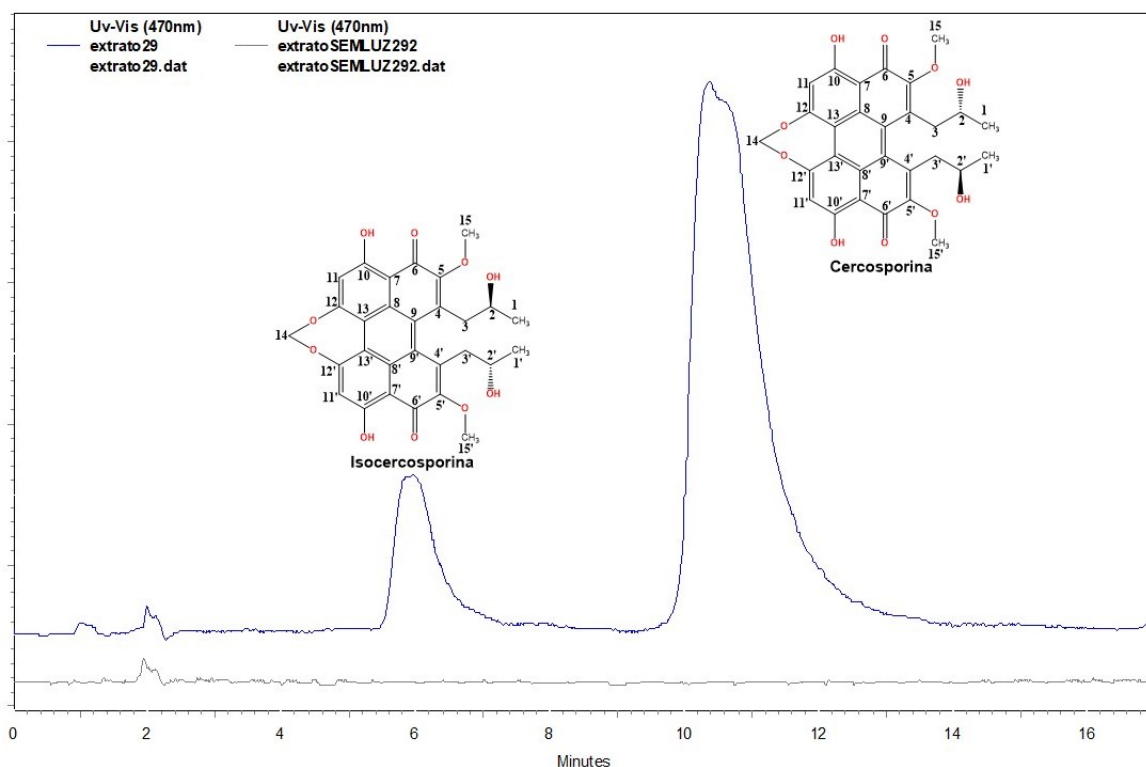
Através desses dados verificou-se que a concentração da isocercosporina no extrato cultivado sob luz apresentava concentração de $0,0048 \text{ mg mL}^{-1}$, o que infere que há $0,0048 \text{ mg}$ de cercosporina em $1,35 \text{ mg}$ de extrato. Portanto, a massa de isocercosporina corresponde a $0,36\%$ da massa do extrato. Assim, se inicialmente foram obtidos $1,68 \text{ g}$ de extrato, isto implica dizer que neste extrato há aproximadamente $6,01 \text{ mg}$ de isocercosporina. Sendo assim, pela quantificação por CLAE observa-se que a cercosporina compõe 20% da massa do extrato, enquanto que a isocercosporina corresponde a apenas $0,36\%$ da massa do extrato, ou seja, segundo estas análises, a quantidade de cercosporina neste extrato é cerca de $55,5$ vezes maior que a quantidade de isocercosporina.

Segundo Arnone *et al.* (1993), as perilenoquinonas cercosporina e isocercosporina coexistem por haver um equilíbrio tautomérico entre elas, e que as variações estruturais são apenas espaciais. Assim sendo, não é possível separar as substâncias de forma que elas estejam totalmente isoladas, já que haverá uma interconversão de uma na outra.

7.4 Produção de cercosporina e isocercosporina durante o cultivo de *C. brachiata* mediante ação da luz

As análises por CLAE evidenciaram que a ação da luz influencia a produção de cercosporina, como demonstrado na Figura 18. Comparando os cromatogramas analisados em 470nm (comprimento de máxima absorção da cercosporina) foi possível verificar que o fungo, ao se desenvolver na ausência de luz, não produziu cercosporina (linha cinza), e que ao contrário disto, quando o fungo foi exposto a ação da luz houve produção significativa da fitotoxina. Estas análises corroboram com o que já se tem relatado na literatura (Ehrenshaft *et al.*, 1998; Daub, Ehrenshaft, 2000).

Figura 18: Cromatogramas dos extratos de *C. brachiata* cultivados na ausência e na presença de luz.



Fonte: o autor (2023).

Esta análise contribui para a amplificação do conhecimento a respeito deste gênero de fungos, que necessitam de luz para potencializar suas atividades biotróficas sobre as plantas e que a produção de cercosporina pelo fungo *C. brachiata* na ausência de luz é inviável.

7.5 Estudo de pKa da cercosporina

Os compostos orgânicos podem ser classificados como ácidos ou básicos, sendo esta propriedade relacionada com a capacidade de protonar ou desprotonar pelo solvente do meio no qual estão solubilizados (definição de Brønsted-Lowry). Segundo Agnes *et al.* (2018), estas substâncias são praticamente universais, sendo necessário conhecer a força ácida ou básica que as mesmas possuem. No caso dos ácidos, esta força é medida pelo pKa, e quanto menor for o valor de pKa, maior é acidez da substância.

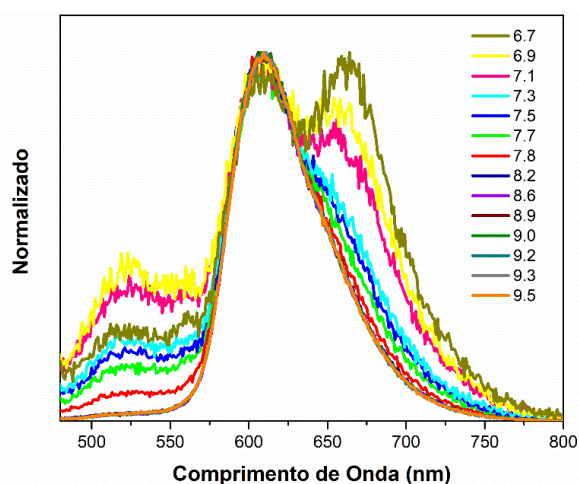
Para Berkhout e Ram (2019), a constante de dissociação ácida (pKa) indica o estado de ionização de um composto em um determinado pH. E que o estado de

ionização é de extrema importância na Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) de substâncias. Portanto, o valor de pK_a de um composto afeta propriedades físico-químicas como: solubilidade aquosa que depende do pH, interação proteica e permeabilidade da membrana. Assim sendo, é crucial entender e analisar adequadamente o valor de pK_a dos compostos, para saber a relação dos mesmos com o organismo.

Sobre as técnicas de determinação do pK_a , Berkhout e Ram (2019) afirmam que a espectrometria UV-Vis é tradicionalmente um dos métodos mais utilizados para determinar o pK_a de um composto. Atualmente ainda é utilizada devido à sua disponibilidade, precisão, simplicidade e reprodutibilidade. Para usar a espectroscopia UV-Vis na determinação de pK_a é necessário que um cromóforo esteja presente próximo ao local de ionização do composto. Se isso for cumprido, uma distinção no espectro da forma ionizada e não ionizada da molécula pode ser observada.

Logo, a intensidade da emissão é então plotada contra o pH, a partir do qual uma curva sigmóide é obtida, e o pK_a pode ser estimado a partir do ponto de inflexão da curva, como demonstrado na Figura 20. Entretanto, primeiramente se faz a relação da intensidade de emissão pelo pH, para compreender se o pH está alterando a estrutura molecular. No caso específico da cercosporina estes dados podem ser observados na Figura 19.

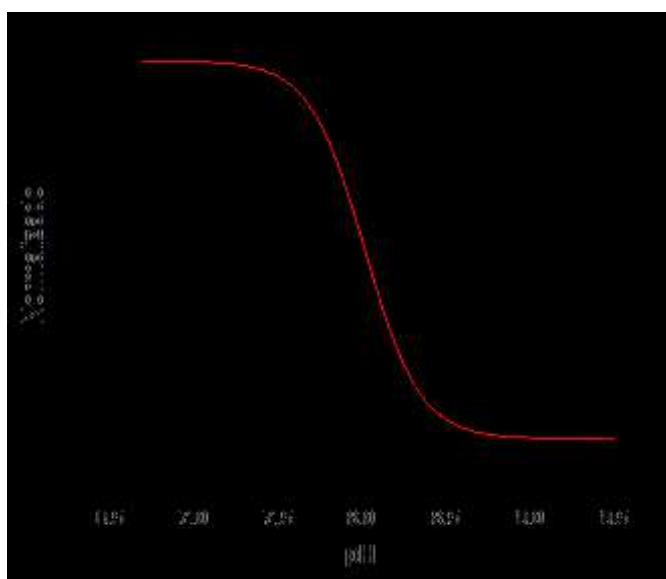
Figura 19: Relação da emissão da espectrofluorescência da cercosporina em função do pH.



Fonte: o autor (2023).

Através do gráfico da Figura 19 observa-se que em pH próximo ao meio neutro, em torno de 6,7 a 6,9, a cercosporina apresenta maiores intensidades de emissões. À medida que o pH aumenta, a emissão vai diminuindo, o que demonstra que quando mais desprotonada estiver a cercosporina, menos ela emite radiação no comprimento de onda avaliado na região do visível. Os dados desta análise, permitiu construir uma curva analítica (Figura 20), possibilitando o cálculo do pKa.

Figura 20: Curva de titulação espectrofluorométrica da cercosporina.



Fonte: o autor (2023).

A partir do gráfico mostrado na Figura 20, constatou-se que o valor pKa da cercosporina no estado excitado é de 8,02. Evidenciado pela curva de titulação na relação entre absorbância normalizada e o pH, já que o ponto isobéptico pela análise demonstra que neste valor a cercosporina está 50% de protonada e 50 % desprotonada. E por estas análises, é possível saber em qual pH há maior absorção de energia pela cercosporina, para que no futuro se avalie se neste pH há a maior atividade da mesma, já que sua atividade está diretamente relacionada a absorção de energia.

7.6 Avaliação da atividade herbicida do extrato de *C. brachiata* e de cercosporina contra *Amaranthus viridis*

Os resultados desta análise podem ser vistos na Tabela 6 e seguem a escala visual de dano a folha, sendo de 0 a 4 (MASI, et al., 2018). Onde 0 equivale a 0 cm de diâmetro de lesão, ou seja, não houve lesão aparente na folha da planta, 1 a 0,25

cm, 2 a 0,5 cm, 3 a 0,75 cm e 4 a 1,0 cm. Esta escala mostra o quão danoso está sendo o extrato ou o composto a planta. E a intensidade do dano é medida pelo diâmetro que posteriormente é transformado na escala visual. Segundo os autores, danos acima de 1 cm de diâmetro indicam necrose foliar, ou seja, a evidência de que a planta sofreu danos irreversíveis em seu metabolismo. O que implicará em perda na capacidade fotossintética levando a planta a morte.

Tabela 6: Lesões causadas por extrato de *C. brachiata* e de cercosporina em folhas de *Amaranthus viridis* (Caruru).

| Estágio fenológico – 02 pares de folhas | | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Material de análise | Planta 1/ escala | Planta 2/ escala | Planta 3/ escala | Planta 4/ escala | Planta 5/ escala |
| Extrato bruto (5 mg mL ⁻¹) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Extrato bruto (1 mg mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cercosporina (0,53 mg mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Estágio fenológico – 04 pares de folhas | | | | | |
| Material de análise | Planta 1/ escala | Planta 2/ escala | Planta 3/ escala | Planta 4/ escala | Planta 5/ escala |
| Extrato bruto (5 mg mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Extrato bruto (1 mg mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cercosporina (0,53 mg mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota: Necrose com escala visual de 0 a 4 (0 = sem lesões, 4 = necrose com lesões acima de 1 cm de diâmetro), escala segundo o modelo de Masi, *et al.* (2018).

Fonte: o autor.

Os dados obtidos da análise de dano foliar (Tabela 6) demonstraram que apenas o extrato acetato de etila do fungo crescido na presença de luz, na

concentração de 5 mg mL^{-1} foi capaz de causar lesões significativas no Caruru. Além disto, o extrato causou lesões apenas em plantas com estágio fenológico de 02 pares de folhas, sendo, portanto, eficiente em plantas em estágios iniciais de desenvolvimento. Estas lesões podem ser vistas na Figura 21. O extrato com concentração de 1 mg mL^{-1} e a cercosporina na concentração $0,53 \text{ mg mL}^{-1}$, não apresentaram capacidade de causar lesões nas folhas de caruru, independente do estágio fenológico da planta. O fato de o extrato apresentar atividade herbicida em comparação à cercosporina pode estar relacionado com efeitos sinérgicos que necessitam de mais estudos para a comprovação.

Figura 21: *Amaranthus viridis* (Caruru) com lesões irregulares após 5 dias de aplicação de solução de *C. brachiata* (5 mg mL^{-1}).



Fonte: o autor (2023).

O indivíduo mostrado na Figura 21 apresenta clorose acentuada e desfolhadas, 5 dias após aplicação do extrato bruto na concentração de 5 mg mL^{-1} . Lesões irregulares com mais de 1 cm de extensão são observadas na imagem, predominante sobre as bordas foliares. As folhas caíram após 5 dias, demonstrando que nesta fase de lesão avançada as folhas perderam sua atividade fotossintética na planta.

Fungos do gênero *Cercospora* são capazes de causar lesões graves em plantações e, consecutivamente, a perda de parte da lavoura (Vale *et al.*, 2019), o que já foi discutido anteriormente neste trabalho. O *A. viridis* (Caruru) é uma planta

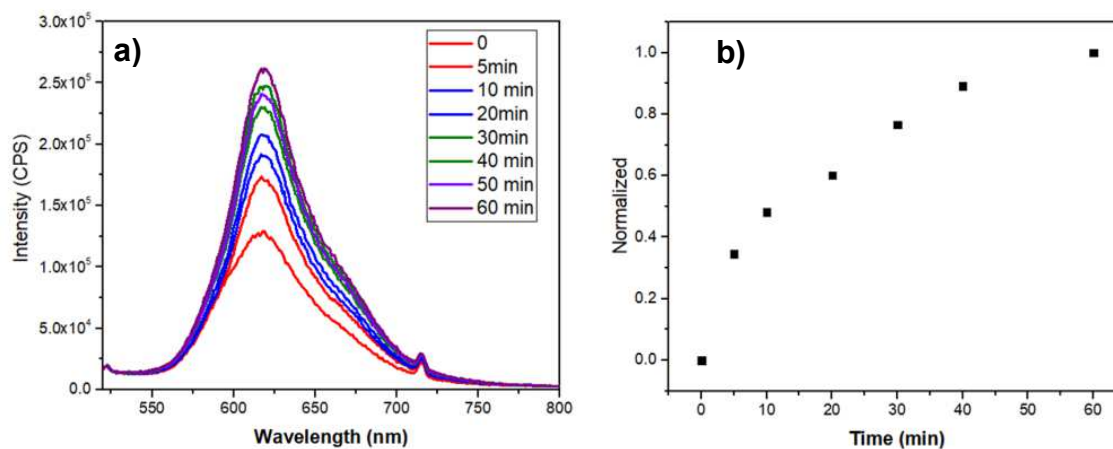
daninha que tem afetado plantações por todo Brasil, e a principal causa é a resistência a defensivos agrícolas (Francischini *et al.*, 2014). Em 2020, Silva *et al.* publicou um trabalho demonstrando a eficácia do extrato de *C. brachiata* na inibição do crescimento de *A. viridis* em diferentes estágios fenológicos, para se perceber em qual dos estágios, haveria melhor atividade de inibição da planta. Em concordância ao trabalho de Silva *et al.* (2020) que utilizou o extrato de *C. brachiata* (crescido na ausência de luz) na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ para inibir o crescimento de *A. viridis*, este trabalho conseguiu comprovar a atividade fitotóxica do extrato de *C. brachiata* contra o Caruru.

7.7 Dano de lipossomas (lecitina) pela cercosporina

Os danos em lipossomas são causados entre outras coisas por agentes fotossensibilizadores como a cercosporina (substâncias que são ativadas por irradiação da luz) (Liu *et al.*, 2022), ou por agentes indutores de vazamento, a exemplo do Triton X-100 (substâncias com capacidade de causar rupturas nas membranas celulares) (Ladokhin; White, 2001), afetando o sistema das membranas celulares que perdem sua atividade.

Sobre o modo de ação da cercosporina, a literatura diz que com incidência de luz a cercosporina produz Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que danificam a membrana celular (Mastrangelopoulou *et al.*, 2018), com a finalidade de expor os nutrientes ao meio extracelular, possibilitando a nutrição do fungo (Daub; Chung, 2007; Tang *et al.*, 2019), e conseqüentemente sua reprodução. Como um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o dano causado pela ação da cercosporina em membrana de lipossomas de lecitina, inicialmente foi avaliado o tempo de incorporação da cercosporina no lipossoma (Figura 22), que foi de 60 minutos aproximadamente, sendo monitoradas com $\lambda_{exc} = 477 \text{ nm}$ e $\lambda_{max} = 617 \text{ nm}$.

Figura 22: Cinética de incorporação da cercosporina em lipossoma de lecitina: a) espectro de emissão, b) normalização.



Fonte: o autor.

A cinética de incorporação demonstra o tempo gasto para as moléculas aderirem as membranas do lipossoma. E este tempo foi considerado para início das análises, já que após este tempo, grande parte das moléculas analisadas estão fixadas aos lipossomas, e assim podem ser ativadas e, portanto, terem sua atividade provocada pela ação da luz.

Para garantir que a cercosporina possui eficiente aderência aos lipossomas, sua lipofilicidade foi avaliada, calculando o coeficiente de partição da mesma em um sistema octanol/água (Sangster, 1997; Cumming; Rücker, 2017; Amézqueta *et al.*, 2020). Através da espectrofotometria foi possível calcular a absorvância e, conseqüentemente, a concentração (Tabela 7) de cercosporina em cada solvente do sistema. O coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar (ϵ) da cercosporina em etanol (solvente usado na análise espectrofotométrica) é de 23300 (Almeida *et al.*, 2005).

Tabela 7: Absorbância (Abs), concentração e coeficiente de partição de soluções de cercosporina em octanol e água.

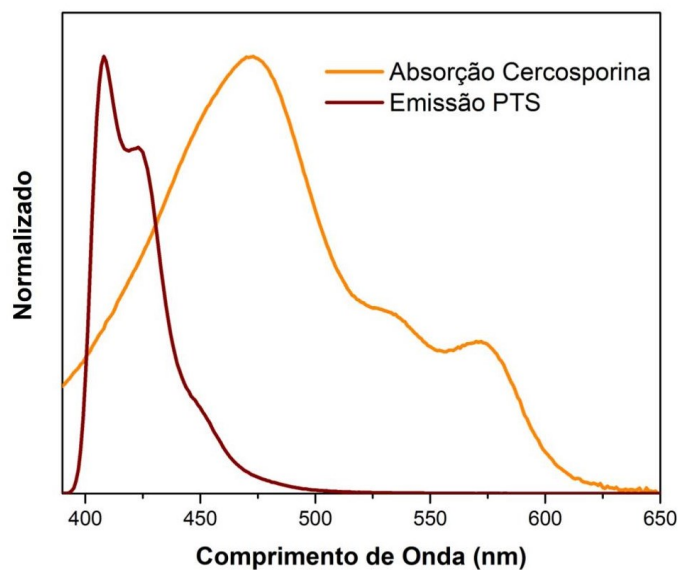
| Análise | Abs - octanol | Concentração em octanol (mol/L) | Abs - H ₂ O | Concentração em água (mol/L) | Coeficiente de partição |
|--|---------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,91 | 3,91x10 ⁻⁵ | 0,089 | 3,82 x10 ⁻⁶ | 10,23 |
| 2 | 0,87 | 3,73 x10 ⁻⁵ | 0,086 | 3,69x10 ⁻⁶ | 10,11 |
| 3 | 0,80 | 3,43 x10 ⁻⁵ | 0,094 | 4,03 x10 ⁻⁶ | 8,51 |
| Coeficiente de partição por média aritmética (k_P) | | | | | 9,61 |

Fonte: o autor (2023).

O coeficiente de partição (k_P) da cercosporina em um sistema octanol/água foi de 9,61, portanto, Log P de 0,98. Segundo Cumming e Rücker (2017), os compostos orgânicos que possuem valores de Log P (coeficiente de partição) elevados são hidrofóbicos, sendo Log P entre -3 (muito hidrofílico) e +10 (extremamente hidrofóbico). A cercosporina apresenta $\log P = 0,98$, ou seja, a cercosporina tem solubilidade mais expressiva em octanol do que em água. Demonstrando que a cercosporina possui maior lipofilicidade do que hidrofiliabilidade. E esta propriedade explica as interações da cercosporina com as paredes celulares que também são lipofílicas, e o motivo pelo qual a toxina consegue atuar na mesma quando é ativada pela luz.

Após avaliar a lipofilicidade da cercosporina e seu tempo de incorporação no lipossoma, foi analisada a absorbância da cercosporina *versus* a emissão do PTS (pireno tetrasulfonato), um fluoróforo que não perde sua fluorescência quando é encapsulado por membranas lipídicas (Shima *et al.*, 2004). Sendo assim, é possível demonstrar que ao excitar a cercosporina não ocorreria a excitação simultânea do PTS. Portanto, através dessa análise é possível verificar que os danos causados aos lipossomas são referentes a ação apenas da cercosporina. Os espectros de fluorescência do PTS e da absorbância da cercosporina (Figura 23).

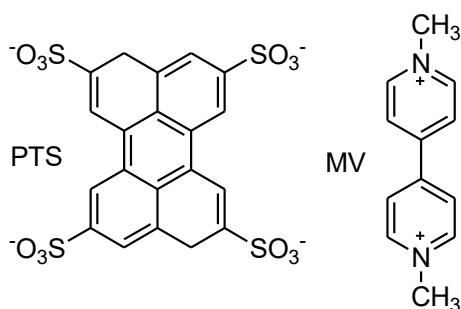
Figura 23: Espectro de emissão do PTS *versus* espectro de absorbância da cercosporina.



Fonte: o autor.

Após analisar as intensidades de fluorescência do PTS e da absorbância da cercosporina, foi possível constatar que o PTS não emite fluorescência na região de absorção da cercosporina, e que, portanto, a excitação da luz entre 425 nm e 525 nm não excitaria o PTS, mas somente a cercosporina. Ao medir a fluorescência do PTS dentro do lipossoma, ficou constatado que o mesmo não havia apresentado a fluorescência suprimida, mesmo quando havia MV (metil viologêneo) externo ao lipossoma. Neste caso, o MV foi usado como agente supressor de fluorescência (Nakashima; Kido, 1996; Mukherjee; Mishra; Datta, 2005; Pavanelli, 2006; Santana *et al.*, 2014). As estruturas do PTS e do MV (Figura 24).

Figura 24: Estruturas do PTS e MV.



Fonte: o autor.

Há também os supressores de fluorescência do PTS internos aos lipossomas, como exemplo os íons Tl^+ , Cs^+ e Ag^+ (Garcia, 1992), no entanto, estes não são objetos de estudo deste trabalho, já que este trabalho objetiva analisar o rompimento dos lipossomas e, conseqüentemente, a saída do PTS, que tem fluorescência suprimida pelo MV do meio. Para analisar os dados de intensidade de fluorescência do PTS, primeiramente foi analisado os dados de intensidade com o meio reacional sem cercosporina, tampão Tris 20mM (água contendo 1% de DMSO), com MV e lipossomas com PTS encapsulado (Tabela 8).

Tabela 8: Intensidade de fluorescência a 400nm do PTS em lipossoma de lecitina com e sem irradiação de luz.

| Tempo (min) | Não irradiada | Irradiada |
|--------------------|----------------------|------------------|
| 0 | 4600,0 ± 20,25 | 4684,0 ± 24,75 |
| 2 | 4564,5 ± 37 | 4632,0 ± 48,25 |
| 7 | 4526,0 ± 34,5 | 4516,5 ± 70 |
| 17 | 4426,0 ± 43 | 4447,5 ± 172,5 |
| 32 | 4451,5 ± 12,5 | 4274,5 ± 110 |
| 52 | 4298,5 ± 31,375 | 4054,0 ± 111,5 |
| 77 | 4151,5 ± 36,75 | 3914,5 ± 114,375 |
| 107 | 4174,0 ± 33,5 | 3694,5 ± 166,75 |

Fonte: o autor.

Como pode ser observado na Tabela 8, não houve grandes variações para a intensidade de fluorescência do PTS na microplaca que não foi irradiada, e que houve uma variação, mas não tão significativa para a microplaca que foi irradiada, e que, portanto, estes são os valores considerados para o cálculo do dano nos lipossomas. Além destes dados, foi também necessário calcular os valores após a adição de Triton X-100 em todas as amostras, para então obter valores capazes de preencher a Equação 3. Os valores de intensidade de fluorescência do PTS após a adição de Triton X-100 estão reunidos na Tabela 9, e foram calculados em todos os tempos de irradiação e concentrações de cercosporina avaliadas.

Tabela 9: Intensidade de fluorescência a 400nm do PTS em lipossomas de lecitina após adição do Triton X-100 com e sem irradiação de luz.

| Cercosporina (μM) | Não irradiada | Irradiada |
|--|----------------------|--------------------|
| 97 | 3118,5 \pm 61,3 | 3147,5 \pm 91,1 |
| 65 | 3045,5 \pm 39,0 | 3053,5 \pm 44,5 |
| 32 | 3270,5 \pm 160,0 | 3303,0 \pm 155,3 |

Fonte: o autor

Comparando os valores de intensidades presentes na Tabela 8 com os valores de intensidade mostrados na Tabela 9, é possível dizer que houve significativa variação e diminuição da intensidade de fluorescência do PTS, quando se adicionou Triton X-100, mas que, no entanto, não houve significativa variação entre os modos irradiado e não irradiado, como ocorreu sem a adição do mesmo.

As análises de intensidade inicial eram medidas após cada tempo de irradiação, e também eram analisadas as amostras que foram mantidas no escuro. Entre estas análises e a avaliação com Triton X-100, cinco concentrações amostras de cercosporina foram avaliadas, obtendo a porcentagem de dano que a cercosporina causou no lipossoma para cada concentração. Assim, é possível compreender se a luz potencializa o modo de ação desta fitotoxina. Os dados obtidos estão inseridos na Tabela 10, que reúne as intensidades de fluorescência do PTS nas concentrações analisadas e com os respectivos tempos de irradiação.

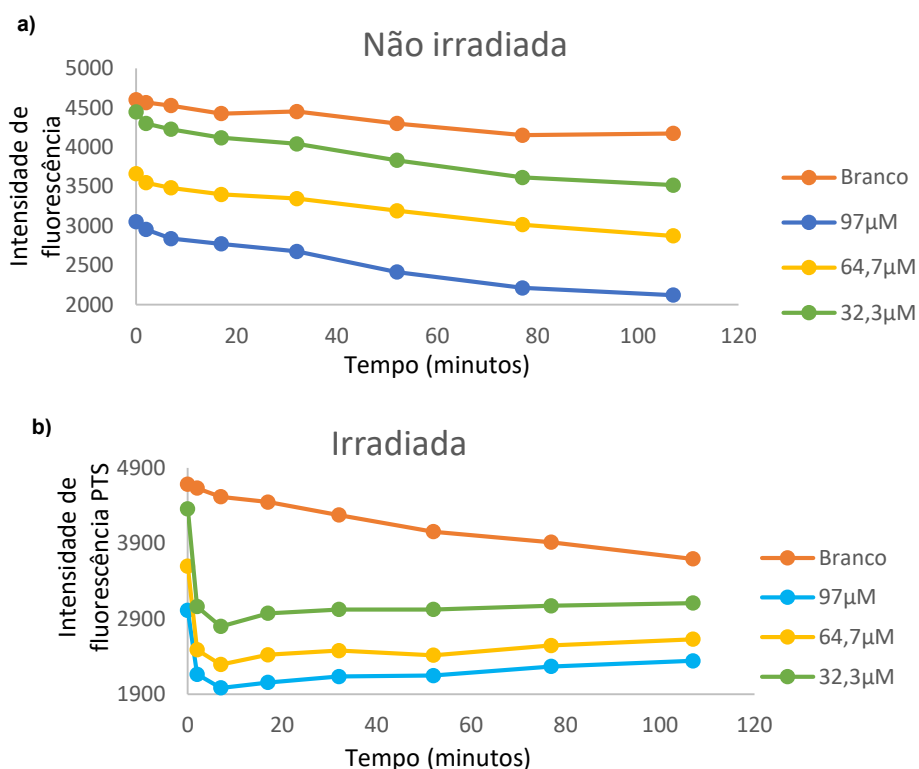
Tabela 10: Intensidade de fluorescência do PTS no modo não irradiado e irradiado com diferentes concentrações de cercosporina.

| Não irradiadas | | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Tempo (minutos) | Concentrações / Intensidade | | | |
| | Branco | 97 µM | 65 µM | 32 µM |
| 0 | 4600,0 ± 20,3 | 3053,5 ± 28,0 | 3662,0 ± 42,0 | 4447,0 ± 67,4 |
| 2 | 4564,5 ± 37,0 | 2954,0 ± 32,5 | 3547,0 ± 52,0 | 4299,0 ± 48,5 |
| 7 | 4526,0 ± 34,5 | 2839,0 ± 4,3 | 3483,5 ± 29,0 | 4227,0 ± 34,0 |
| 17 | 4426,0 ± 43,0 | 2771,5 ± 22,0 | 3400,5 ± 10,3 | 4119,5 ± 35,3 |
| 32 | 4451,5 ± 12,5 | 2676,5 ± 22,5 | 3346,5 ± 32,0 | 4040,5 ± 60,3 |
| 52 | 4298,5 ± 31,4 | 2415,0 ± 31,1 | 3192,5 ± 33,8 | 3831,5 ± 43,8 |
| 77 | 4151,5 ± 36,8 | 2214,5 ± 28,1 | 3015,5 ± 29,3 | 3615,0 ± 41,3 |
| 107 | 4174,0 ± 33,5 | 2121,5 ± 15,9 | 2874,5 ± 8,4 | 3516,5 ± 43,5 |
| Triton x- 10% | - | 2886,5 ± 98,4 | 3035,5 ± 39,0 | 3270,5±160,0 |
| Irradiadas | | | | |
| 0 | 4684,0 ± 24,8 | 3012,5 ± 68,5 | 3596,5 ± 18,4 | 4358,0 ± 35 |
| 2 | 4632,0 ± 48,3 | 2165,0 ± 98,5 | 2488,5± 122,9 | 3062,5±100,3 |
| 7 | 4516,5 ± 70,0 | 1984,0 ± 27,5 | 2293,5 ± 27,5 | 2799,0 ± 16,3 |
| 17 | 4447,5 ± 172,5 | 2055,5 ± 35,3 | 2423,5 ± 21,5 | 2971,5 ± 46,3 |
| 32 | 4274,5 ± 110,0 | 2133,5 ± 18,8 | 2477,5 ± 20,1 | 3024,5 ± 30,3 |
| 52 | 4054,0 ± 111,5 | 2146,0 ± 61,8 | 2417,0 ± 70,5 | 3023,0± 97,6 |
| 77 | 3914,5 ± 114,4 | 2267,0 ± 45,8 | 2546,0 ± 45,5 | 3072,5 ± 56,9 |
| 107 | 3694,5 ± 166,8 | 2343,0 ± 73,8 | 2628,0 ± 92,3 | 3108,0±165,3 |
| Triton x- 10% | - | 2823,5±85,8 | 3053,5±44,5 | 3303,0±155,3 |

Fonte: o autor.

Para a melhor compreensão dos dados, foram elaborados os gráficos 1 e 2 (Figura 25), que demonstram o comportamento da intensidade de fluorescência do PTS em cada uma das soluções de cercosporina e suas respectivas concentrações.

Figura 25: Intensidade de fluorescência do PTS em diferentes concentrações de cercosporina, e de tempo para amostras não irradiadas (a) e irradiadas (b).



Fonte: o autor.

Através dos gráficos da Figura 25 é possível verificar que para amostras não irradiadas a intensidade de fluorescência do PTS diminuiu com o tempo, e para as maiores concentrações de cercosporina a intensidade de fluorescência do PTS diminuiu em maiores proporções, sugerindo que a concentração de cercosporina interferiu na quantidade de membranas que foram danificadas.

Assim como para as amostras não irradiadas, as irradiadas demonstraram acentuada diminuição de intensidade de fluorescência do PTS conforme o aumento da concentração, bem como para o tempo de exposição a irradiação, no entanto, a diminuição foi significativa nos primeiros 5 minutos. A redução inicial de intensidade de fluorescência está relacionada com o efeito do filtro interno (Lakowicz, 2006), que pode ser observado na Figura 23, onde parte da fluorescência do PTS está sendo absorvida pela cercosporina.

Após os 5 minutos iniciais, a intensidade de fluorescência praticamente se manteve. Sendo que a diminuição foi mais significativa para a maior concentração avaliada, que foi de 97 μ M, e a menor diminuição de intensidade foi para a menor

concentração avaliada que foi de 32 μM , o que corresponde ao resultado esperado, já que com maior concentração de moléculas maior a quantidade de ERO são produzidos, indicando a danificação de uma maior quantidade de lipossomas.

Após avaliar as intensidades de fluorescência, foram analisadas também as percentagens de danos nas membranas, que relaciona as intensidades de fluorescência do PTS das soluções com cercosporina e com o Triton X-100 que foi adicionado em todos os poços analisados ao final do tempo de 107 minutos. O Triton X-100 é um agente causador do rompimento das membranas, como já mencionado anteriormente, e demonstrado na literatura (Mukherjee; Mishra; Datta, 2005; Ladokhin; White, 2001). E, por meio da Equação 3, foi possível calcular esta porcentagem de danos. Para melhor elucidação dos dados obtidos, os mesmos foram agrupados na Tabela 11, que contém a porcentagem de danos para amostras irradiadas e não irradiadas, considerando o tempo de incidência de irradiação.

Tabela 11: Porcentagem de danos dos lipossomas de lecitina causados pela ação da cercosporina.

| Tempo (min) | Não irradiada (%) | | | Irradiada (%) | | |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 97μM | 65μM | 32μM | 97μM | 65μM | 32μM |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 3 | 3 | 3 | 28 | 31 | 30 |
| 7 | 7 | 5 | 5 | 34 | 36 | 36 |
| 17 | 9 | 7 | 7 | 32 | 33 | 32 |
| 32 | 12 | 9 | 9 | 29 | 31 | 31 |
| 52 | 21 | 13 | 14 | 29 | 33 | 31 |
| 77 | 27 | 18 | 19 | 25 | 29 | 29 |
| 107 | 30 | 21 | 21 | 22 | 27 | 29 |

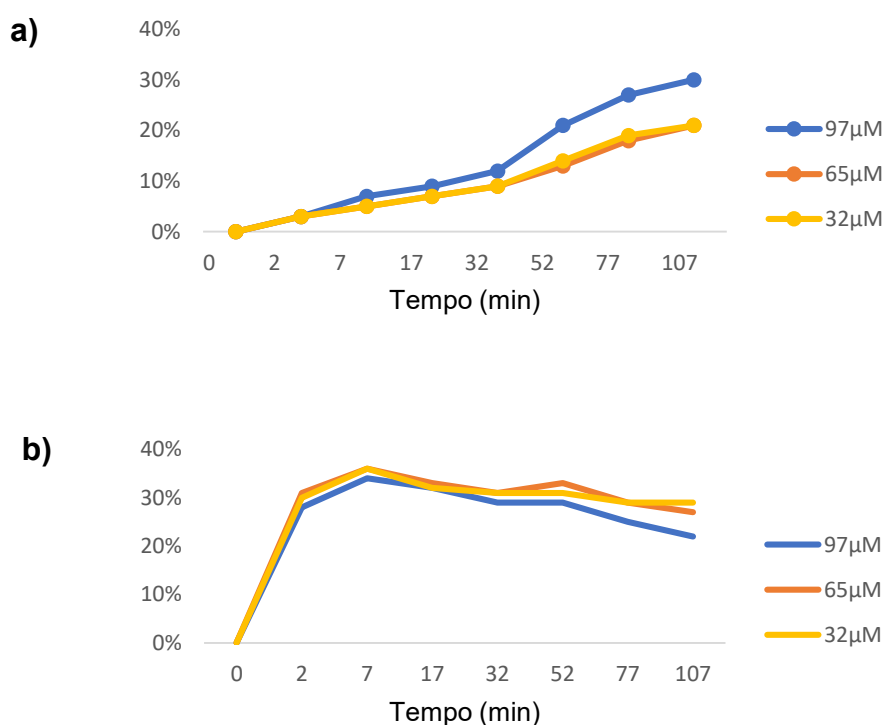
Fonte: o autor (2023).

Os dados obtidos e reunidos na Tabela 11 evidenciam que os danos nos lipossomas aumentaram conforme o aumento da concentração de cercosporina, e que foram maiores para a concentração de 97 μM e as menores porcentagens de danos foram observadas em soluções com a concentração de 32 μM , ou seja, a concentração

influencia na porcentagem de dano nas membranas dos lipossomas, e estas conclusões podem ser confirmadas nos gráficos da Figura 26. É perceptível pelas curvas do gráfico que o tempo de ação e a concentração influenciaram na porcentagem de dano nos lipossomas para as amostras não irradiadas. E se comparada estas porcentagens com as amostras irradiadas a porcentagem de danos foram ainda maiores.

No entanto, a porcentagem de danos nas amostras irradiadas foi aumentada significativamente nos primeiros 5 minutos, e foram independentes das concentrações testadas. Já que para a menor concentração $32\mu\text{M}$ alcançou 36% de dano logo o início, valor próximo para as outras concentrações avaliadas, o que indica que neste caso a luz teve grande influência sobre o dano causado, e a medida que o tempo de exposição de irradiação aumentou, houve pequena variação nas porcentagens de danos.

Figura 26: Porcentagem de danos nos lipossomas de lecitina causados por soluções cercosporina não irradiadas (a) e irradiadas (b).



Fonte: o autor.

Assim sendo, quando não houve incidência de luz a cercosporina causou danos gradativos as membranas chegando até 30%, sendo os danos dependentes das concentrações e do tempo de experimento. O que não ocorreu para as amostras irradiadas que atingiram até 36% de danos as membranas para a menor concentração avaliada, com um tempo de 7 minutos de irradiação.

8.0 CONCLUSÕES

Pode-se concluir inicialmente por considerar que o fungo *C. brachiata* é uma espécie relatada recentemente no Brasil, e que ainda não havia relato sobre a produção de cercosporina nesta espécie, que este trabalho foi pioneiro nesta investigação, e que além de comprovar a produção de cercosporina e isocercosporina na espécie estudada, também quantificou o teor da mesma em extratos de micélios de *C. brachiata*.

Através da CLAE foi possível quantificar a cercosporina e isocercosporina, previamente caracterizadas por RMN, sendo o teor de cercosporina produzida por esta espécie do fungo é de cerca de 20% do extrato, enquanto que a isocercosporina representa 0,36% da massa do extrato. Os dados são relevantes neste aspecto, já que não são todas as espécies de *Cercospora* que são capazes de produzir a fitotoxina, assim sendo, esta espécie torna-se uma fonte promissora para a produção de cercosporina.

Na análise da atividade herbicida contra espécie *A. viridis* (Caruru), a cercosporina isolada nas concentrações avaliadas não demonstrou atividade considerável, no entanto, o extrato bruto na concentração de 5 mg mL⁻¹ demonstrou atividade herbicida contra a referida espécie de planta daninha. O fato pode estar relacionado com outras substâncias presentes no extrato, estando estas associadas ou não com a cercosporina (sinergismo), o que demanda mais estudos para compreensão.

As análises de fluorescência do PTS em lipossomas demonstraram resultados significativos, pois a cercosporina tanto irradiada quanto não irradiada foram capazes de provocar a ruptura nas membranas dos lipossomas, provocando o vazamento do PTS que estava internalizado, e assim complexado ao MV, teve sua fluorescência suprimida, permitindo a análise de dano a membrana dos lipossomas.

Nesta análise, a solução com maior concentração de cercosporina, 97 µM, demonstrou maior dano as membranas no sistema não irradiado, com valor de 30%, ou seja, um sistema que depende da concentração e do tempo de interação. Para amostras irradiadas, o máximo de 36% de danos foi alcançado nos primeiros 07 minutos, na concentração 32 µM, ou seja, a sistema foi influenciado pela irradiação sobre as amostras, não sendo dependente das concentrações avaliadas.

O estudo de danos à biomembrana de lipossomas, utilizando a cercosporina no sistema de fluorescência PTS/MV, foi realizado pela primeira vez. Este estudo

contribui para compreender as interações entre esta substância com os sistemas de camadas das membranas celulares, podendo ser aplicados em outros tipos de membranas e outros lipossomas, para compreender a forma de dano que a fitotoxina causa nos hospedeiros dos fungos do gênero *Cercospora*.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; SILVA, A. F.; CONCENÇO, G. Bioinsumos na cultura da soja. In: MEYER, M. C.; BUENO, A. de F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: Embrapa, 2022. cap. 16. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1147037/1/cap-16-Bioinsumos-na-cultura-da-soja.pdf> Acesso em: 20 oct. 2023.

AGNES, K.; SIGRID, S.; IVARI, K.; SOFJA, T.; AGNES, H.; ASTRID, D.; KARL, K.; MARE, P.; IVO, L. pKa values in organic chemistry - making maximum use of the available data. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n. 42, p. 3738-3748, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.08.054>

AGRIOS, G. N. How Pathogens Attack Plants. *Plant Pathology*. p. 175-205, 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50011-7>

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; SARTORI, F.; COSTAMILAN, L. M.; TEIXEIRA, M. R. O.; LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira*. v. 6, n. 30, p. 594-602, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000600005>

AMÉZQUETA, S.; SUBIRATS X.; FUGUET, E.; ROSÉS, M.; RÀFOLS, C. Octanol-Water Partition Constant. In: *Liquid-Phase Extraction*, Elsevier, cap. 6, p. 183-208, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00006-2>

ARNONE, A., MERLINI, L., MONDELLI, R., NASINI, G., RAGG, E., SCAGLIONI, L., WEISS, U. NMR study of tautomerism in natural perylenequinones. *Journal of The Chemical Society, Perkin Transactions*, v. 2, n. 8, 1447, 1993. <https://doi.org/10.1039/p29930001447>

ASSANTE, G.; LOCCI, R.; CAMARDA, L.; MERLINI, L.; NASINI, G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry*, v. 16, p. 243-247, 1977. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86794-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86794-1)

BERKHOUT, H.; RAM, A. Recent Advancements in Spectrophotometric pKa Determinations: A Review Job. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 53, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.4s.141>

BOTELHO, D. M. DOS S.; de RESENDE, M. L. V.; TEIXEIRA, A. R.; SANTIAGO, W. D.; POZZA, E. A.; MOREIRA, S. I.; RAMOS, J. B.; de AQUINO, S. O.;

FERREIRA, A. G.; REICHEL, T.; GUERRA GUIMARÃES, L. Cercosporin production by *Cercospora cofeicola* isolates: spectrophotometry and HPLC quantification and image analysis. *Chemical Papers*, v. 76, p. 2567-2572, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01965-5>

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>

BUENO, D. J.; SILVA, J. O. FUNGI - The Fungal Hypha. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 11-19, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00132-4>

CUMMING, H., RÜCKER, C. Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method. *ACS Omega*, v. 2, n. 9, 6244-6249, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01102>

DAUB, M. E. Cercosporin, a Photosensitizing Toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology*, v. 72, p. 370-374. 1982. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-370>

DAUB, M.E.; CHUNG, K-R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in Plant Disease. *American Phytopathological Societynet Features*. 2007. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature/2007-0207>

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. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461>

DUNKLE, L. D., LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zea-maydis*. *Phytopathology*, v. 90, p. 486-490, 2000. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.486>

EHRENSHAFT, M., JENNS, A., CHUNG, K., DAUB, M. SOR1, a Gene Required for Photosensitizer and Singlet Oxygen Resistance in *Cercospora* Fungi, Is Highly Conserved in Divergent Organisms. *Molecular Cell*, v. 1, n. 4, p. 603-609, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80060-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80060-X)

FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiol Plant Pathol*. v. 13, p. 157-164, 1978. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(78\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0048-4059(78)90029-2)

FELISBINO, J. K. R. P. Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp e avaliação da atividade antibacteriana. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI 10.14393/ufu.di.2019.349

FELISBINO, J.K.R.P.; VIEIRA, B.S.; DE OLIVEIRA, A.; DA SILVA, N.A.; MARTINS, C.H.G.; SANTIAGO, M.B.; MUNOZ, R.A.A.; CUNHA, L.C.S.; SOUSA, R.M.F. Identification of Substances Produced by *Cercospora brachiata* in Absence of Light and Evaluation of Antibacterial Activity. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 9, p. 680, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7090680>

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. DOI 10.1023/a:1016068102003

FRANCISCHINI, A. C., CONSTANTIN, J., OLIVEIRA JR., R. S., SANTOS, G., BRAZ, G. B. P., DAN, H. A. First report of *Amaranthus viridis* resistance to herbicides. *Planta Daninha*, v. 3, n. 3, p. 571-578, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582014000300013>

GARCIA, A. M. Determination of ion permeability by fluorescence quenching. *Ion Channels*, v. 33, p. 501-510, 1992. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)07035-M](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)07035-M)

GONÇALVES, M. Métodos Instrumentais para Análise de Soluções: Análise quantitativa, 4ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic Analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* Based on the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Phytopathology*, v. 91, n. 7, p. 648-658, 2001. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.7.648>

GRIGALAVICIUS, M.; MASTRANGELOPOULOU, M.; AROUS, D.; JUZENIENE, A., MÉNARD, M.; SKARPEN, E.; BERG, K.; THEODOSSIOU, T. A. Photodynamic efficacy of cercosporin in 3D tumor cell cultures. *Photochemistry and Photobiology*, 2020. <https://doi.org/10.1111/php.13257>

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

GRUMACH A. S.; FERRARONI N. R. O papel da penicilina na medicina moderna. *Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases*, v. 1, n. 18, p. 7-13, 2006. Disponível em: <https://www.bjstd.org/revista/article/view/1176/1149> Acesso em: 20 oct. 2023.

GUNASINGHE, N.; YOU, M. P.; CAWTHRAY, G. R.; BARBETTI, M. J. Cercosporin From *Pseudocercospora capsellae* and its Critical Role in White Leaf Spot Development. *Plant Disease*, n. 8, v. 100, p. 1521-1531, 2016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1192-RE>

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; LÜCKING, R. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>

INTARAUDOM, C.; BUNBAMRUNG, N.; DRAMAE, A.; BOONYUEN, N.; KOMWIJIT, S.; RACHTAWEE, P.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Acremonidins F-H and acremoxanthenes 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>

JENNS, A.E.; DAUB, M.E.; UPCHURCH, R.G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology*, v. 79, p. 213-219, 1989. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-213>

JONGE, R.; EBERT, M. K.; HUITT-ROEHL C. R.; PAL, P.; SUTTLE, J. C.; SPANNER, R.E.; NEU-BAUER, J.D.; JURICK, W. M.; STOTT, K. A.; SECOR, G. A.; THOMMA, B. P. H. J.; VAN DE PEER, Y.; TOWNSEND, C. A.; BOLTON, M.D. Gene cluster conservation provides insight into cercosporin biosynthesis and extends production to the genus *Colletotrichum*. *National Academy of Sciences (PNAS)*, v. 115, p. 459-466, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712798115>

KIRK, P. M., CANNON, P.F., MINTER, D.W., STALPERS, J.A. *Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford. 10^a ed, 2008.

KUYAMA, S.; TAMURA, T. Cercosporin. A Pigment of *Cercosporina Kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of Fungus, Isolation and Purification of Pigment. *Journal of the American Chemical Society*, v. 79, n. 21, p. 5725-5726, 1957.
<https://doi.org/10.1021/ja01578a038>

LADOKHIN, A. S., WHITE, S. H. "Detergent-like", permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1514, n. 21, p. 253-260, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00382-0)

LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

LIU, M.; YAN, Z.; YUAN, Z.; LU, L.; LIU, X.; ZHU, X.; WANG, L.; LIU, C.; RAO, Y. Cercosporin-bioinspired photoinactivation of harmful cyanobacteria under natural sunlight via bifunctional mechanisms. *Water Research*, v. 215, p. 118-242, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118242>

LOPES-FERREIRA, M.; MALESKI, A. L. A.; BALAN-LIMA L.; BERNARDO J. T. G.; HIPOLITO L. M.; SENI-SILVA A. C.; BATISTA-FILHO J.; FALCAO M.A.P.; LIMA, C. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. *International Journal Environmental Research and Public Health*. v. 19, n. 6, p. 3198, 2022.
<https://doi.org/10.3390/ijerph19063198>

MANZINI, M. C., PEREZ, K. R., RISKE, K. A., BOZELLI, J. C., SANTOS, T. L., DA SILVA, M. A., CUCCOVIA, I. M. Peptide: lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1838, n.7, p. 1985 - 1999, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.004>

MASI, M.; NOCERA, P.; ZONNO, M. C., TUZI, A.; PESCIPELLI, G.; CIMMINO, A.; BOARI, A.; INFANTINO, A.; VURRO, M.; EVIDENTE, A. Lentiginones A, B, and C,

Phytotoxic Anthraquinone Derivatives Isolated from *Ascochyta lentis*, a Pathogen of Lentil. *Journal of Natural Products*. v. 81, p. 2700–2709, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00556>

MASTRANGELOPOULOU, M., GRIGALAVICIUS, M., BERG, K., MENARD, M., THEODOSSIOU, T. A. Cytotoxic and Photocytotoxic Effects of Cercosporin on Human Tumour Cell Lines. *Photochemistry and Photobiology*, v. 95, n. 1, p. 387-396, 2018. <https://doi.org/10.1111/php.12997>

MORGAN, B. J.; DEY, S.; JOHNSON, S. W.; KOZLOWSKI, M. C. Design, Synthesis, and Investigation of Protein Kinase C Inhibitors: Total Syntheses of (+)-Calphostin D, (+)-Phleichrome, Cercosporin, and New Photoactive Perylenequinones. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 26, p. 9413-9425, 2009. <https://doi.org/10.1021/ja902324j>

MUKHERJEE, T. K.; MISHRA, P. P.; DATTA, A. Photoinduced electron transfer from chlorin p6 to methyl viologen in aqueous micelles. *Chemical Physics Letters*, v. 407, n. 1-3, p. 119-123, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.03.055>

MULROONEY, C. A.; O'BRIEN, E. M.; MORGAN, B. J.; KOZLOWSKI, M. C. Perylenequinones: Isolation, Synthesis, and Biological Activity. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 21, p. 3887-3904, 2012. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200184>

NAKASHIMA, K., KIDO, N. Fluorescence Quenching of 1-Pyrenemethanol by Methylviologen in Polystyrene Latex Dispersions. *Photochemistry and Photobiology*, v. 64, n. 2, p. 296-302, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb02461.x>

NUNES, A. ; SCHMITZ, C. ; MOURA, S. ; MARASCHIN, M. The use of pesticides in Brazil and the risks linked to human health. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 37885-37904, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-311>

PAVANELLI, David Domingues. Propriedades de vesículas unilamelares gigantes. 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. DOI 10.11606/T.46.2006.tde-12032008-103016.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming: Da descoberta da penicilina ao Prémio Nobel. *Revista da Faculdade de Letras*. v. 6, p.129-151, 2005. Disponível em: <https://ler.letras.up.pt/uploads/ficheiros/3379.pdf> Acesso em: 20 oct. 2023.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Plant-Fungal Interactions: Special Secondary Metabolites of the Biotrophic, Necrotrophic, and Other Specific Interactions. *Fungal Metabolites*, p. 133-190, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_39

REZENDE, J. S.; ZIVANOVIC, M.; NOVAES, M. I. C.; CHEN, Z.Y. The AVR4 effector is involved in cercosporin biosynthesis and likely affects the virulence of *Cercospora*

cf. fagellaris on soybean. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, p. 53-65, 2020. <https://doi.org/10.1111/mpp.12879>

RIBERA, A.E.; ZUÑIGA, G. Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 12, n. 4, p. 893-911, 2012. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012005000040>

RILEY, C. M.; ROSANSKE, T. W. *Development and Validation of Analytical Methods*. 1. ed. Oxford: Pergamon, 1996. ISBN: 9780080530352

RODRIGUES, MARCIO L.; NOSANCHUK, JOSHUA D.; REYNOLDS, TODD B. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007964>

SALOMÃO, P. E. A.; FERRO, A. M. S.; RUAS, W. F. Herbicides in Brazil: a brief review. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 2, p. 4-22, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i2.1990>

SANGSTER, J. M. *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons, 1997. ISBN: 978-0-471-97397-3

SANTANA, J., PEREZ, K. R., PISCO, T. B., PAVANELLI, D. D., BRIOTTO FILHO, D., REZENDE, D., POLITI, M. J. A high sensitive ion pairing probe (the interaction of pyrenetetrasulphonate and methyl viologen): Salt and temperature dependences and applications. *Journal of Luminescence*, v. 151, p. 130-137, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.01.062>

SAVI, D. C., SHAABAN, K. A., GOS, F. M. W. R., PONOMAREVA, L. V., THORSON, J. S., GLIENKE, C., ROHR, J. *Phaeophleospora vochysiae* Savi & Glienke sp. nov. Isolated from *Vochysia divergens* Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-21400-2 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21400-2>

SCHOCH, C.L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: the journal of biological databases and curation Database*, v. 2020, p. 1-21, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

SHIMA, M., KOBAYASHI, Y., FUJII, T., TANAKA, M., KIMURA, Y., ADACHI, S., & MATSUNO, R. Preparation of fine W/O/W emulsion through membrane filtration of coarse W/O/W emulsion and disappearance of the inclusion of outer phase solution. *Food Hydrocolloids*, v. 18, n. 1, p. 61-70, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00042-0)

SILVA, N. A. DA; VIEIRA, B. S.; RIBEIRO, G. M.; FELISBINO, J. K. R. P.; SOUSA, R. M. F. Atividade fitotóxica de um filtrado de cultura de *Cercospora brachiata* sobre sementes e parte aérea de *Amaranthus viridis*. *Agrarian*. v. 13, n. 49, p. 339-351, 2020. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v13i49.9660>

TABUCHI, H., TAJIMI, A., ICHIHARA, A. (+)-Isocercosporin, A Phytotoxic Compound Isolated from *Scolecotrichum graminis* Fuckel. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 2675-2676, 1991. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870997>

TANG, Z.; LI, J.; LIN, FU.; BAO, W.; ZHANG, S.; GUO, B.; HUANG, S.; ZHANG, YA.; RAO, Y. Cercosporin-bioinspired photoreductive activation of aryl halides under mild conditions. *Journal of Catalysis*, v. 380, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2019.09.036>

TEGELAAR, M.; WÖSTEN, H. A. B. Functional distinction of hyphal compartments. *Scientific Reports*, v. 7, n.1, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06422-6>

THINES, E.; ANKE, H.; WEBER, R. W. S. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological Research*, v. 108, n. 1, p.14-25, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008943>

UNDERWOOD, L.M. *Moulds, mildews and mushrooms: a guide to the systematic study of the Fungi and Mycetozoa and their literature*. New York: Henry Holt and Company, p. 236, 1899. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4057>

VALE, P. A. S.; RESENDE M. L. V.; BOTELHO, D. M. S.; POZZA, E. A.; OGOSHI C.; MONTEIRO, A. C. A.; COSTA, B. H. G.; VASCONCELOS, V. A. M. Temperature, incubation time and virulence of *Cercospora coffeicola* in the production of cercosporin. *Journal of Phytopathology*, v. 167, p. 371-379, 2019. <https://doi.org/10.1111/jph.12802>

VIEIRA, B. S., DA SILVA, N. A., FIRMINO, A. L., SIQUIEROLI, A. C. S. *Cercospora brachiata* on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, v. 14, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13314-019-0339-4>

WATKINSON, S. C. Mutualistic Symbiosis Between Fungi and Autotrophs. *The Fungi*. p. 205-243, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00007-4>

WEISS, U.; MERLINI, L.; NASINI, G. Naturally Occurring Perylenequinones. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.*, p. 1-71, 1987. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8906-1_1

YAMANE, H.; KONNO, K.; SABELIS, M.; TAKABAYASHI, J.; SASSA, T., OIKAWA, H. Chemical Defence and Toxins of Plants. *Comprehensive Natural Products II*, p. 339-385, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00099-X>

YAMAZAKI, S., OGAWA, T. The Chemistry and Stereochemistry of Cercosporin. *Agricultural and Biological Chemistry*, p. 1707-1718, 1972. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860458>

YE, Z.; HUA, D.; RAO, Y.; BAI, S.; SEEBERGER, P. H.; YIN, J.; HU, J. Targeted photodynamic therapy with a novel photosensitizer cercosporin encapsulated

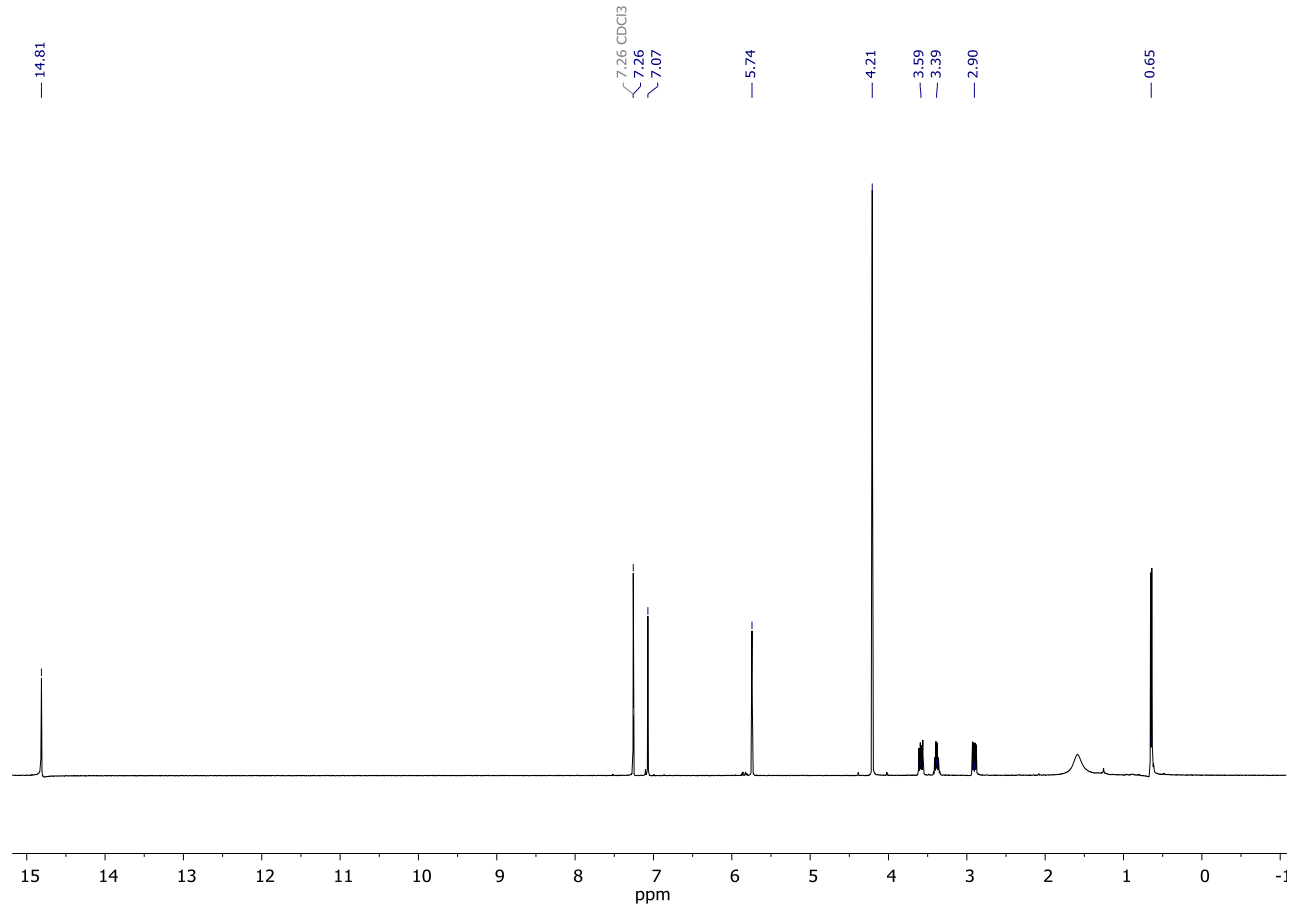
multifunctional copolymer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124136>

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. The characteristics and classification of fungi and bacteria. In: *Wood Microbiology*, Elsevier. cap. 3, p. 55-98. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00003-6>

APÊNDICES

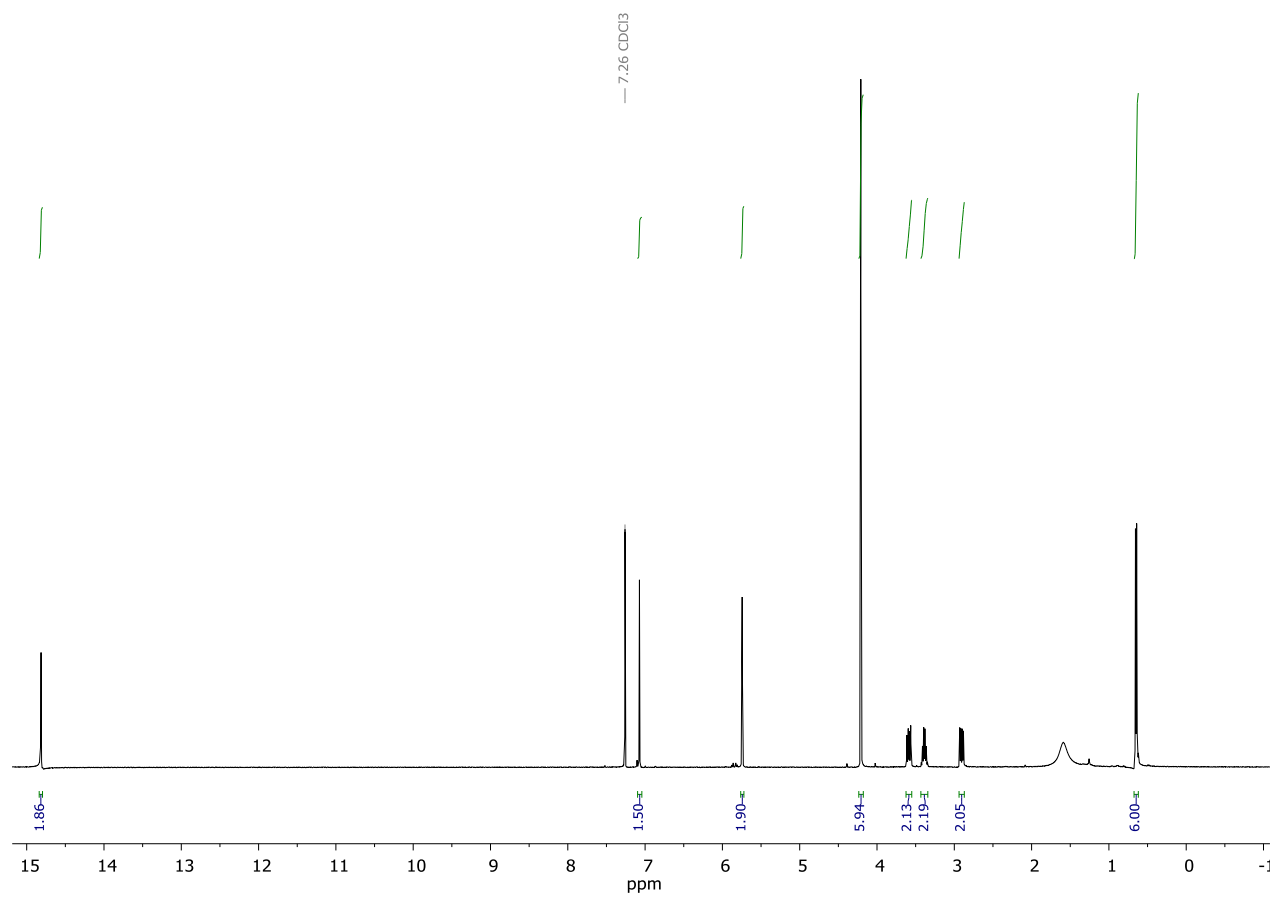
APÊNDICE I – Espectros de RMN de H¹ e de C¹³ da cercosporina

Figura A: Espectro de RMN de H¹ da cercosporina com deslocamentos químicos.



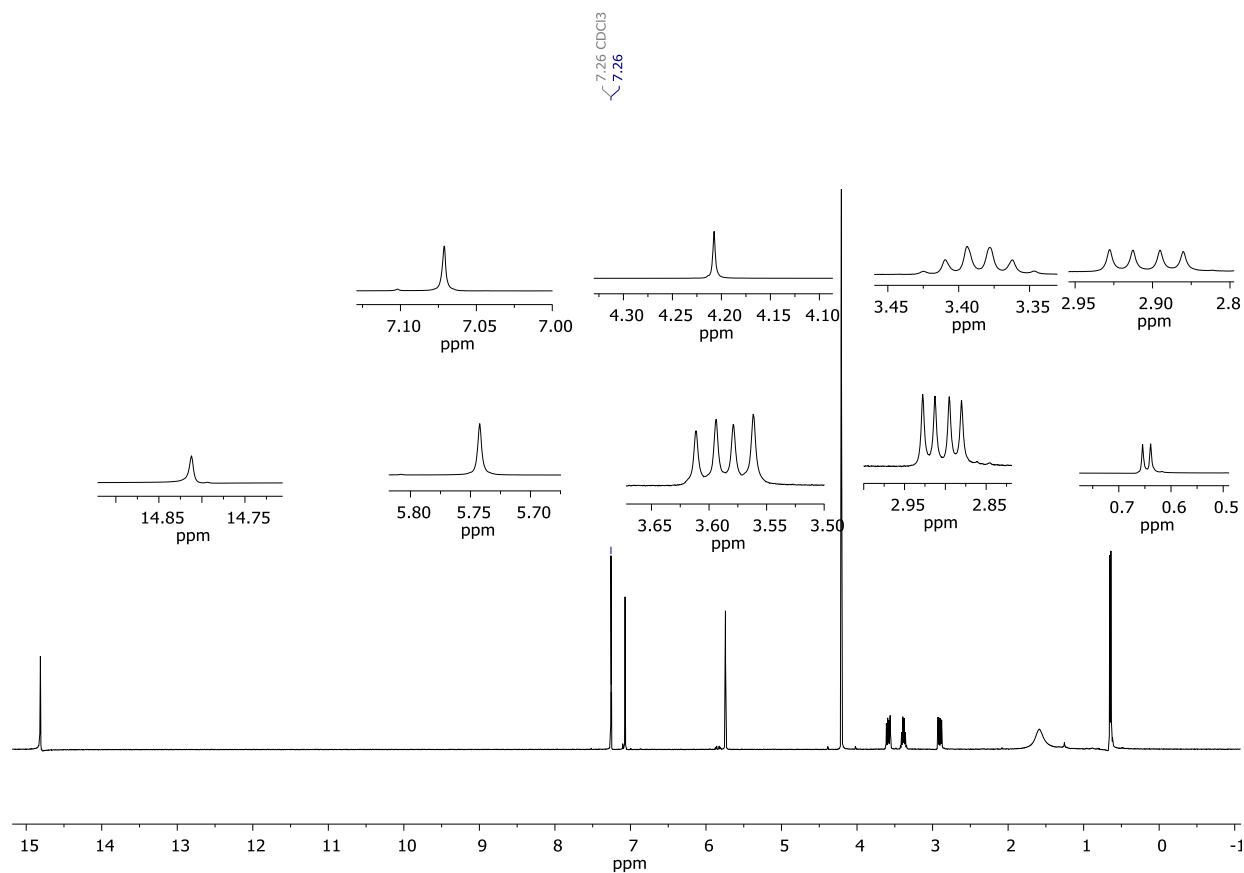
Fonte: o autor (2023)

Figura B: Espectro de RMN de H¹ da cercosporina com valores de integrais.



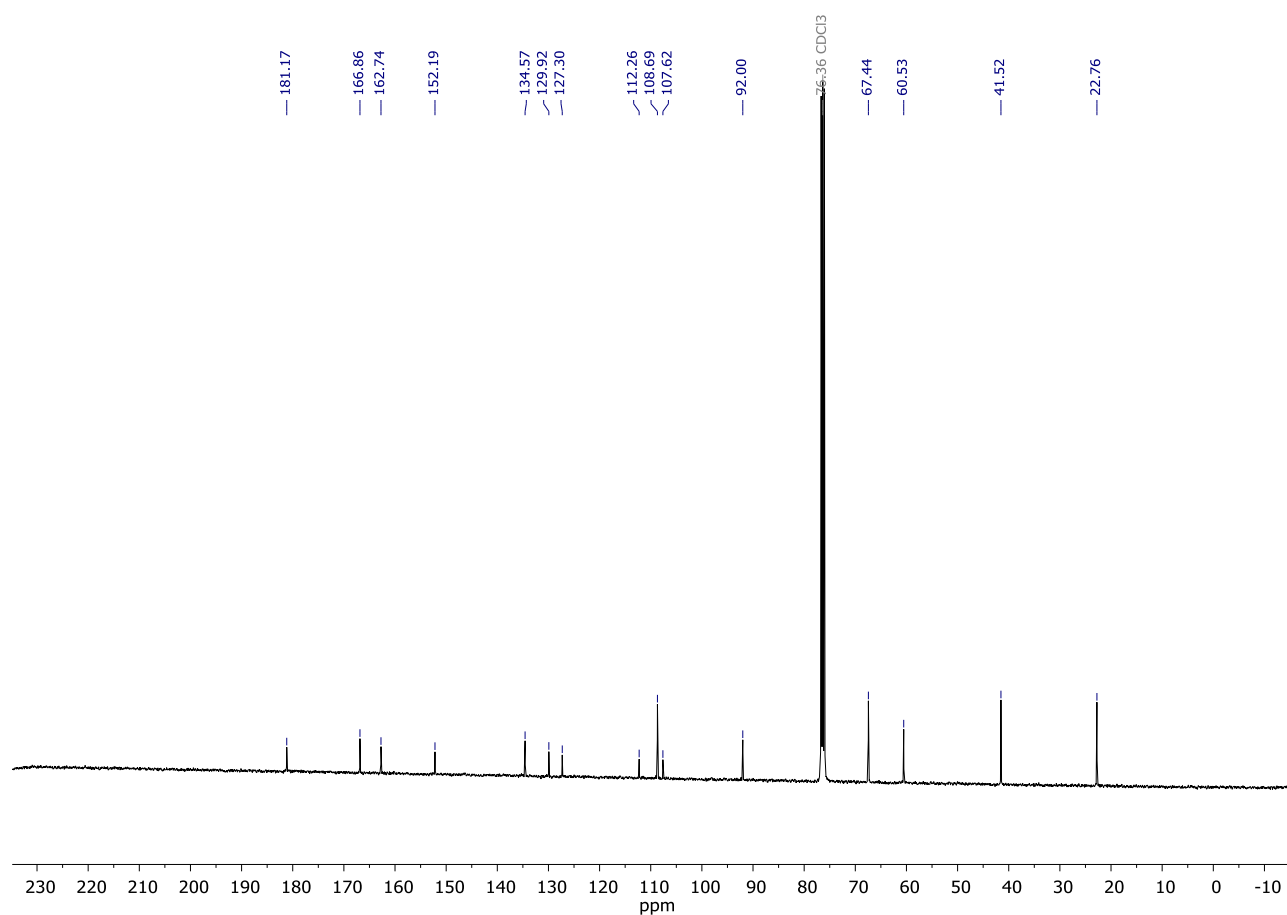
Fonte: o autor (2023).

Figura C: Espectro de RMN de H¹ da cercosporina com ampliações nos deslocamentos químicos.



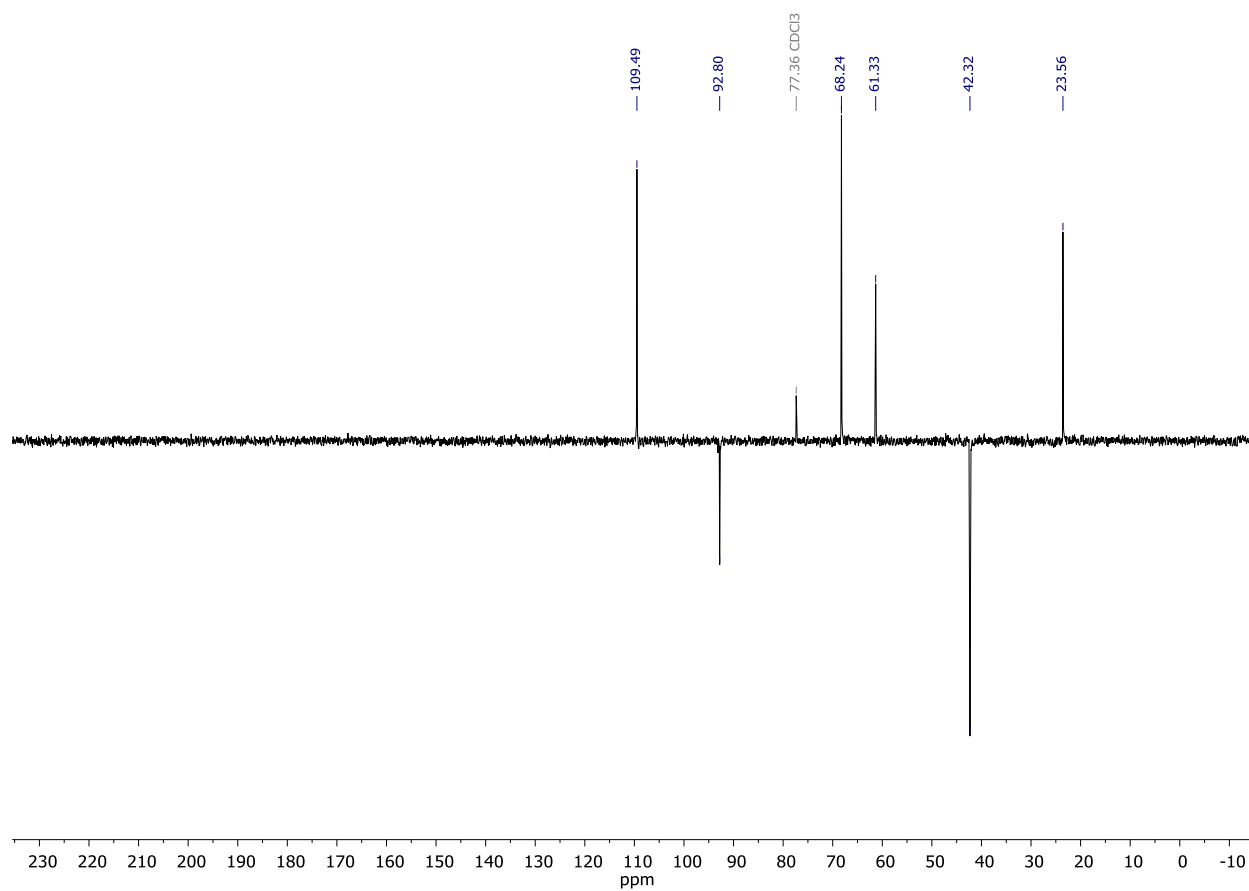
Fonte: o autor (2023).

Figura D: Espectro de RMN de C¹³ da cercosporina com deslocamentos químicos.



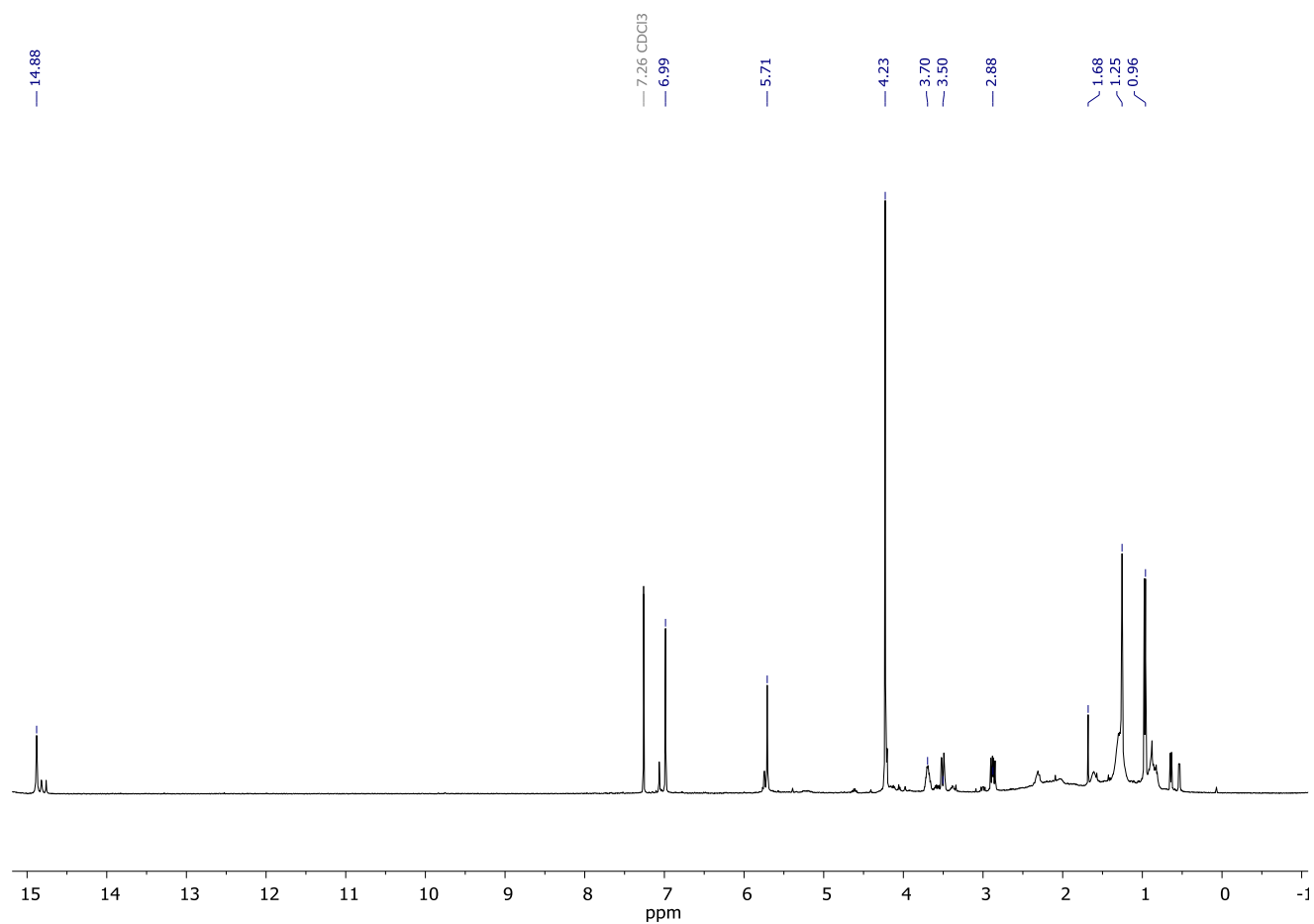
Fonte: o autor (2023).

Figura E: Espectro de RMN/DEPT-135 de C^{13} da cercosporina com deslocamentos químicos.



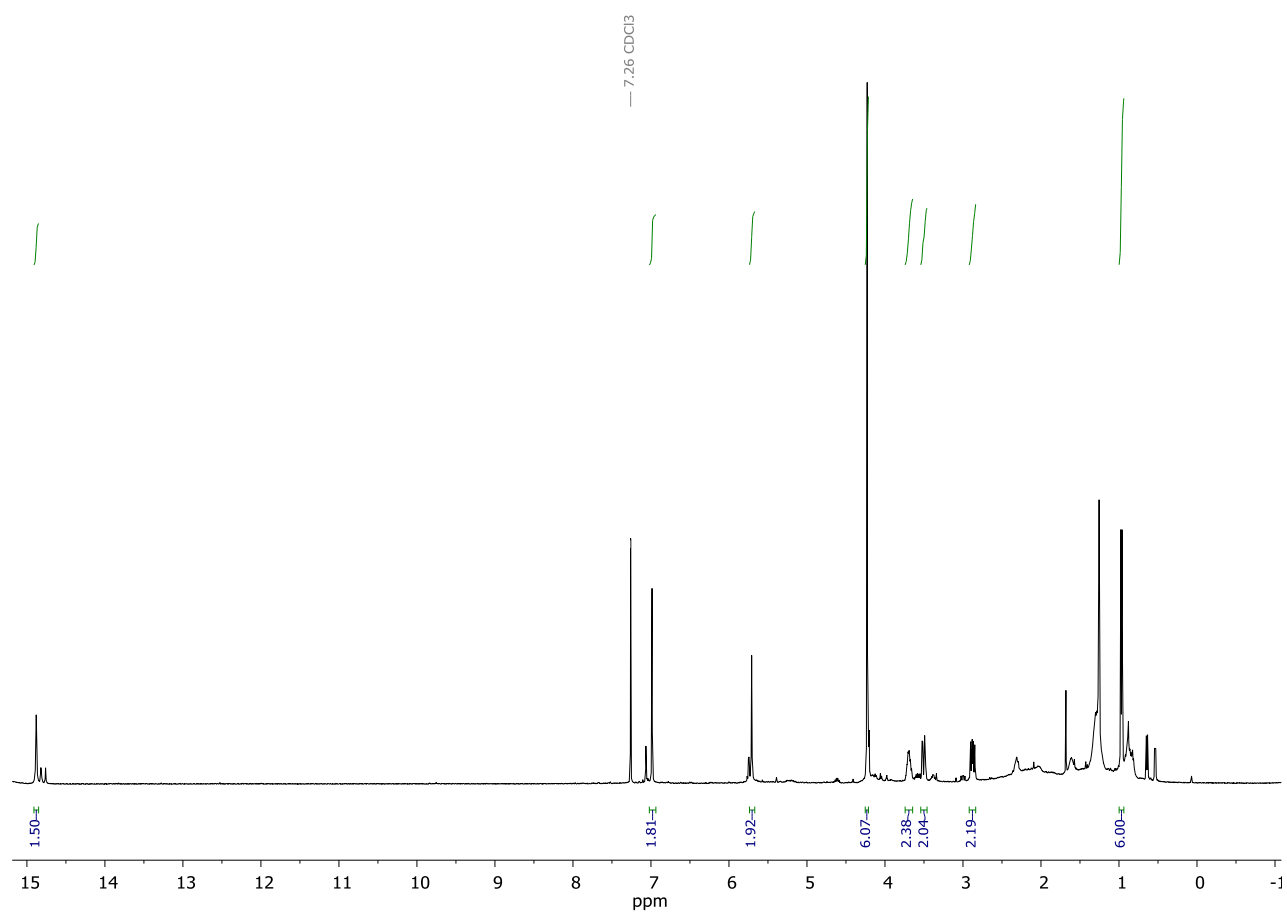
APÊNDICE II – Espectros de RMN de H¹ e de C¹³ da isocercosporina

Figura F: Espectro de RMN de H¹ da isocercosporina com deslocamentos químicos.



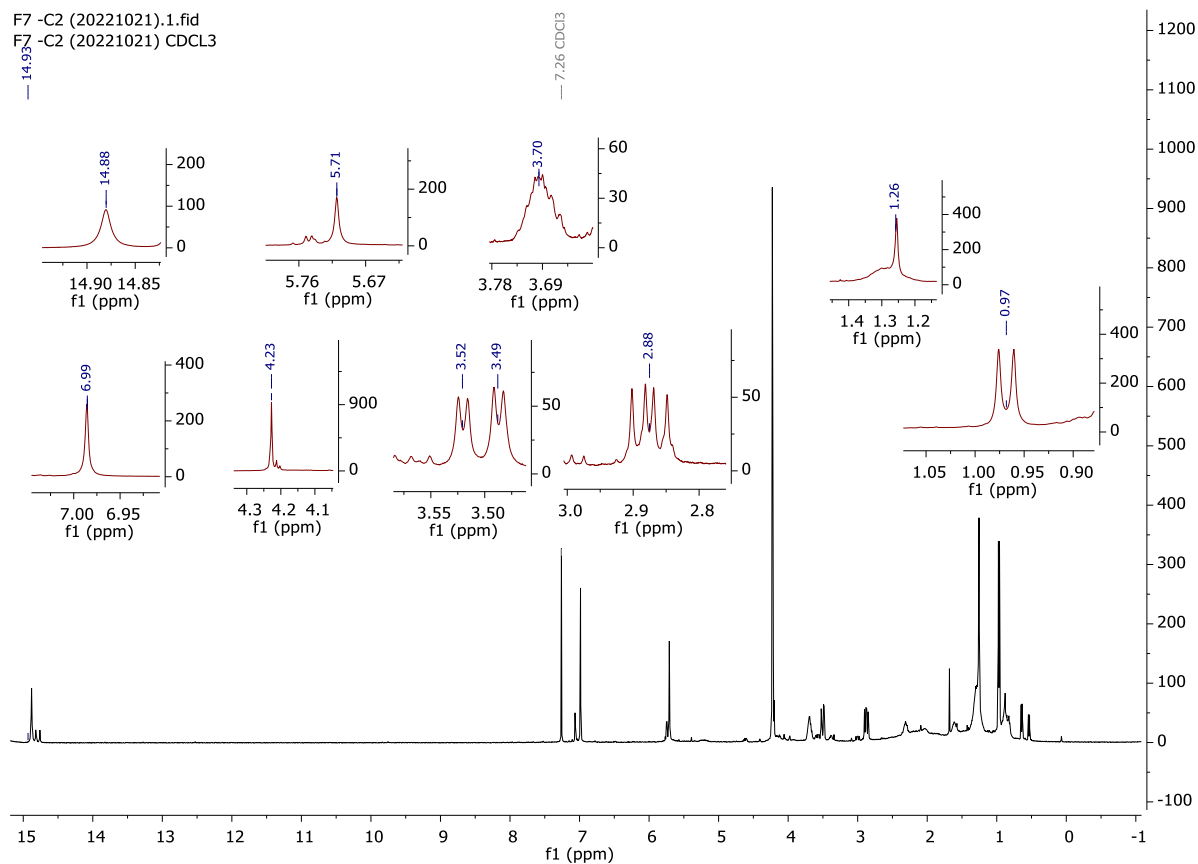
Fonte: o autor (2023).

Figura G: Espectro de RMN de H¹ da isocercosporina com valores de integrais.



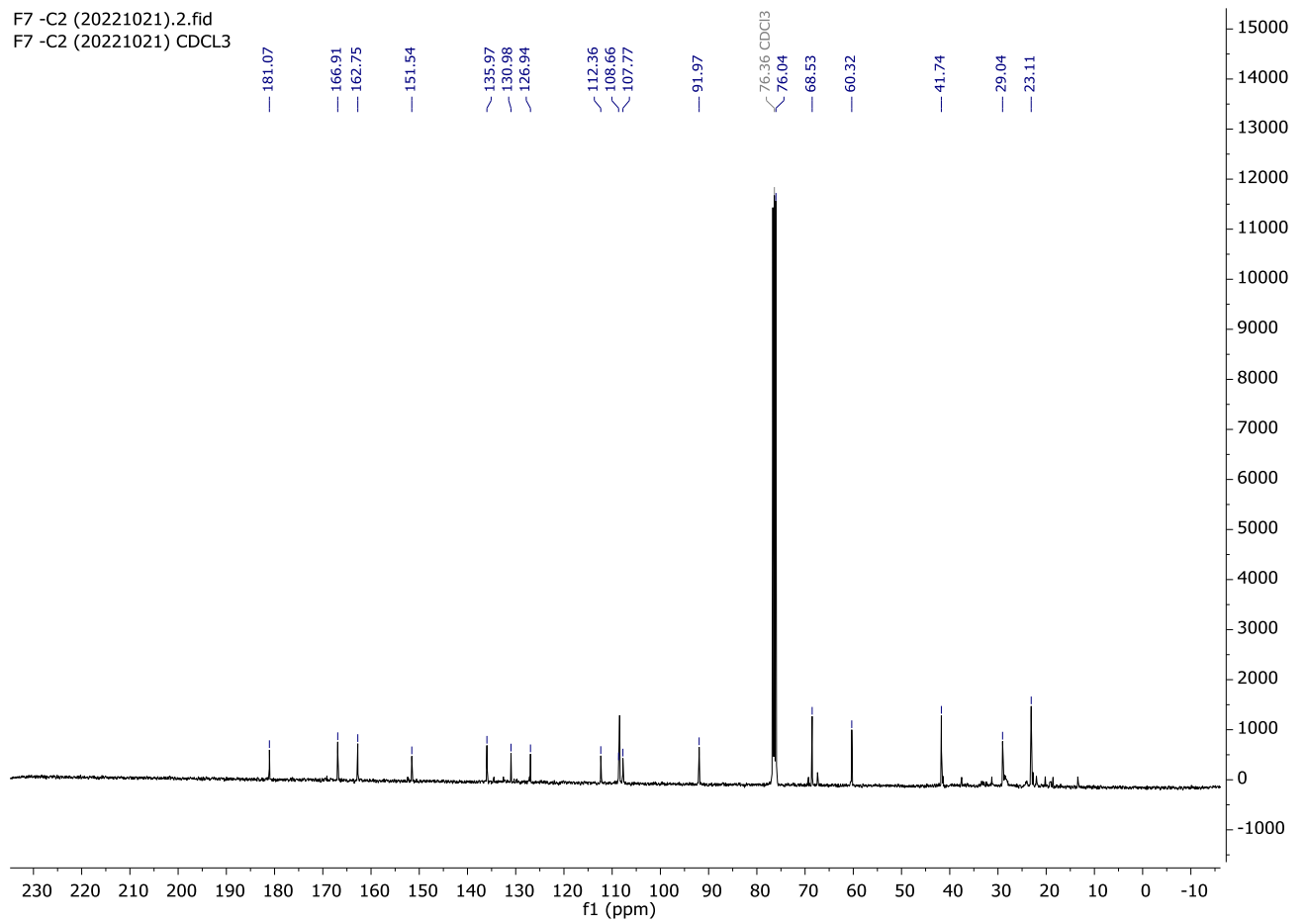
Fonte: o autor (2023).

Figura H: Espectro de RMN de H¹ da isocercosporina com ampliações nos deslocamentos químicos.



Fonte: o autor (2023).

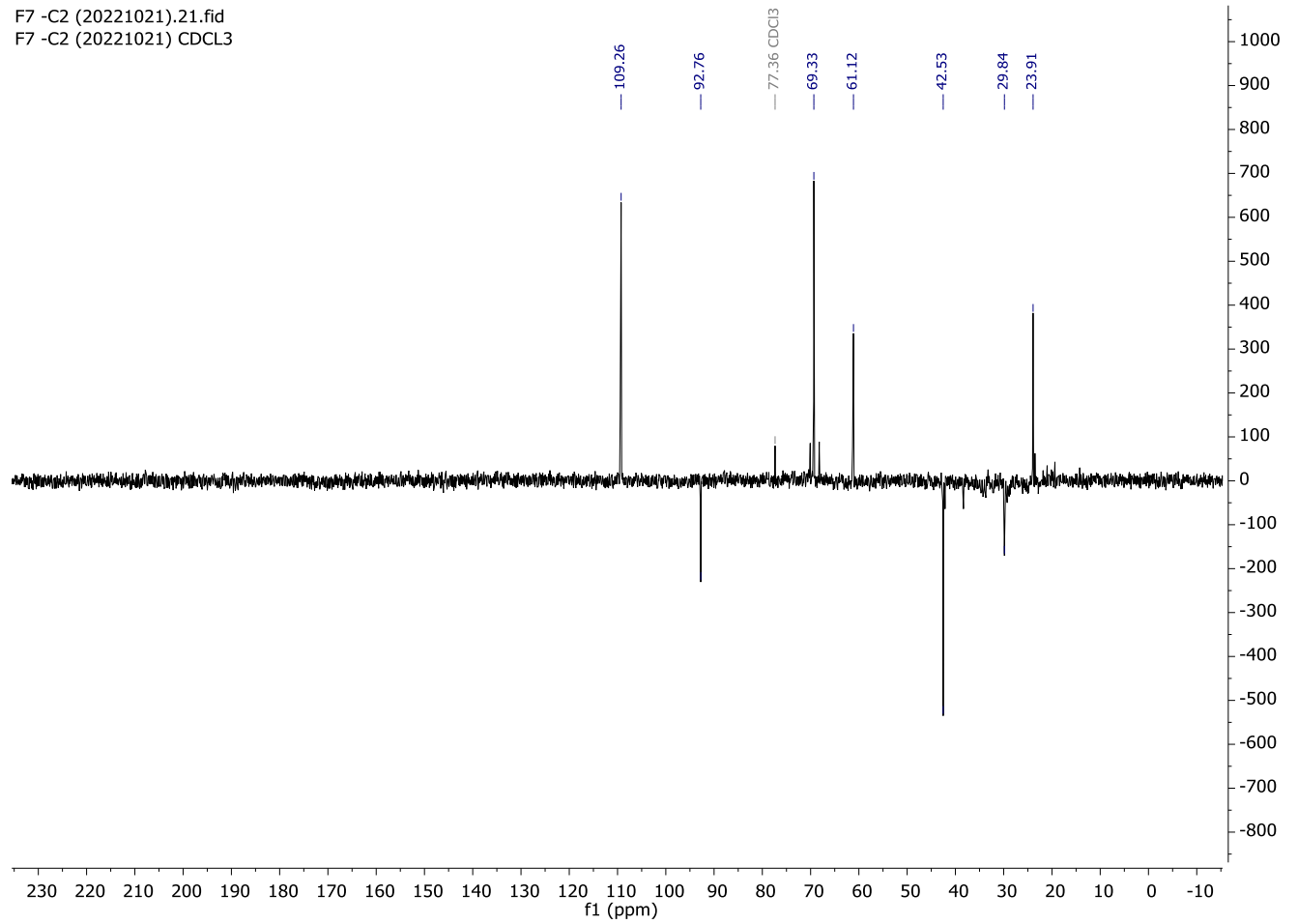
Figura I: Espectro de RMN de C¹³ da isocercosporina com deslocamentos químicos.



Fonte: o autor (2023).

Figura J: Espectro de RMN/DEPT-135 de C¹³ da cercosporina com deslocamentos químicos.

F7 -C2 (20221021).21.fid
F7 -C2 (20221021) CDCL3



Fonte: o autor (2023).