



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Graduação em Química Industrial

VINÍCIUS TOFANIN COSTA

Isolamento e quantificação de cercosporina em extrato de *Cercospora
brachiata*

Uberlândia-MG

2024

VINÍCIUS TOFANIN COSTA

Isolamento e quantificação de cercosporina em extrato de *Cercospora
brachiata*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Instituto de Química da
Universidade Federal De Uberlândia
como requisito para obtenção do título de
Bacharelado em Química Industrial.

Área de concentração: Química
Orgânica

Orientação: Prof.^a. Dra. Raquel Maria
Ferreira de Sousa

Uberlândia-MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Curso de Graduação em Química Industrial
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1A, Sala 1A233 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4103 - coqin@igufu.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Química Industrial				
Defesa de:	Trabalho de Conclusão de Curso - GQR056				
Data:	14/11/2024	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	14:50
Matrícula do Discente:	12011QID007				
Nome do Discente:	Vinicius Tofanin Costa				
Título do Trabalho:	Isolamento e quantificação de cercosporina em extrato de <i>Cercospora brachiata</i>				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se na sala 203 do bloco 3D no Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Coordenador do Curso de Graduação em Química Industrial, assim composta: Prof.ª Dr.ª Raquel Maria Ferreira de Sousa - **Orientadora**; Prof. Dr. Alberto de Oliveira - Titular; Doutorando Diego Godina Prado - Titular e Dr.ª Thamires Rodrigues Freitas - Suplente.

Iniciando os trabalhos, a presidente 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 curso.

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

Aprovado(a) Nota: 91 pontos
 Reprovado(a)

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/11/2024, às 17:32, 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 **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/11/2024, às 21:44, 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 **Diego Godina Prado, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 10:10, 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_externo=0, informando o código verificador **5828791** e o código CRC **C2ADB156**.

AGRADECIMENTOS

À minha família, à minha mãe Josiane, ao meu pai Wanderley à minha irmã Isabella. À minha orientadora Prof^a. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, por todo o seu conhecimento, paciência, apoio e carinho, pela parceria no projeto.

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPeN) e as pessoas que fazem parte dele, pelo acolhimento, carinho e suporte ao longo da realização do projeto.

A todos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram na minha formação acadêmica.

Aos amigos que fiz ao longo da minha graduação, em especial Matheus (Fanfarra), Lara e Nina que me ajudaram muito a chegar aqui hoje.

Ao Dr. John Kenedy R. P. Felisbino por todo ensinamento, apoio e parceria ao nosso projeto em conjunto e ao Dr. Flaysner Magayver Portela, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

À Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM/PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia por fornecer os equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro na realização deste projeto.

RESUMO

Na química dos produtos naturais, os fungos são amplamente reconhecidos por seu papel na produção de compostos bioativos com aplicações em diversas áreas, como saúde, agricultura e indústria. O gênero *Cercospora* é conhecido por sua ampla distribuição e por incluir espécies fitopatogênicas que produzem metabólitos secundários importantes, como a cercosporina. Este composto, uma perilenoquinona com propriedades fotodinâmicas, é responsável por causar necrose em plantas hospedeiras e possui potencial biotecnológico, incluindo aplicações em terapias fotodinâmicas. Além disso, a cercosporina apresenta atropoisomerismo, interconvertendo-se em isocercosporina quando em solução, um fator que dificulta seu isolamento e caracterização. Neste estudo, foi investigada a produção de cercosporina pelo fungo *Cercospora brachiata*, uma espécie ainda pouco explorada cientificamente. A cercosporina foi isolada do extrato fúngico por colunas cromatográficas, monitoradas por cromatografia de camada delgada e para melhor isolamento também foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo semi-preparativo para melhores resultados. A caracterização foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e por fim, quantificadas por CLAE-analítico, a quantificação se deu utilizando métodos analíticos para a criação de uma curva analítica. Os resultados demonstraram que cerca de 20% do extrato era composto por cercosporina. Este trabalho não apenas destaca a relevância de *Cercospora brachiata* como fonte produtora de cercosporina e isocercosporina, mas também reforça a importância do gênero na química de produtos naturais e na descoberta de compostos bioativos com aplicações diversas.

Palavras-chave: Toxina, Isolamento, Cromatografia, Quantificação, Fungo.

ABSTRACT

In natural product chemistry, fungi are widely recognized for their role in the production of bioactive compounds with applications in various fields, such as health, agriculture, and industry. The *Cercospora* genus is known for its wide distribution and includes phytopathogenic species that produce important secondary metabolites, such as cercosporin. This compound, a perylenequinone with photodynamic properties, is responsible for causing necrosis in host plants and holds biotechnological potential, including applications in photodynamic therapies. Additionally, cercosporin exhibits atropoisomerism, interconverting into isocercosporin when in solution, a factor that complicates its isolation and characterization. In this study, the production of cercosporin by the fungus *Cercospora brachiata*, a species that has been scarcely explored scientifically, was investigated. Cercosporin was isolated from the fungal extract using chromatographic columns monitored by thin-layer chromatography (TLC). For improved isolation, high-performance liquid chromatography (HPLC) in semi-preparative mode was employed to achieve better results. The compound was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of ^1H e ^{13}C and subsequently quantified using analytical HPLC. Quantification was performed through analytical methods for constructing a calibration curve. The results demonstrated that approximately 20% of the extract consisted of cercosporin. This study not only highlights the relevance of *Cercospora brachiata* as a source of cercosporin and isocercosporin but also reinforces the importance of the genus *Cercospora* in natural product chemistry and the discovery of bioactive compounds with diverse applications.

Keywords: Toxin, Isolation, Chromatography, Quantification, Fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algumas estruturas de fungos.	11
Figura 2 - Sintomas de doença foliar associados a <i>Cercospora</i> spp.....	12
3	
Figura 4 - Estrutura da cercosporina.	14
5	
Figura 6 - Estrutura da cercosporina e isocercosporina com numeração.	16
Figura 7 - Cromatograma do CLAE-semipreparativo com a programação de isolamento da cercosporina.....	23
Figura 8 - Estruturas da isocercosporina com numeração.	26
Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos da cercosporina e isocercosporina obtidos por CLAE (470 nm).	26
Figura 10 - Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de cercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg/mL).	27
Figura 11 - Curva analítica da área versus concentração de cercosporina..	2829

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coluna cromatográfica 01.	20
Tabela 2 - Coluna cromatográfica 02.	21
Tabela 3 - Coluna cromatográfica 03.	21
Tabela 4 - Dados de RMN da cercosporina do trabalho e da literatura (RMN ¹³ C (125 MHz), RMN ¹ H (400 MHz), CDCl ₃).	24
Tabela 5 - Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de cercosporina com diferentes concentrações.	28

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AE - Acetato de Etila;

AcOEt:MeOH – Mistura de acetato de etila com metanol;

CC - Coluna Cromatográfica;

CCD - Cromatografia em Camada Delgada;

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CP – Cercosporina;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

R_f - Fator de retenção;

HEX – Hexano;

ICP – Isocercosporina;

IQ - Instituto de Química;

MeOH – Metanol;

RMN - Ressonância Magnética Nuclear;

UV/Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível;

ROS - espécies reativas de oxigênio.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Estrutura da cercosporina	14
2.2. Atropoisomerismo e Isolamento de atropoisômeros	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivos gerais	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1. Materiais	17
4.2. Equipamentos	18
4.3. Metodologia	18
4.3.1. Cultivo e extrato fúngicos	18
4.3.3. Caracterização	21
4.3.4. Quantificação	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Isolamento	23
5.2. Caracterização por RMN	23
5.3. Quantificação via CLAE	27
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS	31
APÊNDICES	34
APÊNDICE I – Espectros de RMN de H ¹ e de C ¹³ da cercosporina	34

1. INTRODUÇÃO

Dentre os organismos estudados na química de produtos naturais podemos destacar os fungos visto que eles desempenham papéis importantes para nós, seres humanos, desde a alimentação até a produção de medicamentos. Os fungos estão sendo altamente explorados tanto para fins medicinais, como também para aplicações agroquímicos e ingredientes alimentares (Rodrigues *et al.* 2020).

Os fungos são organismos heterotróficos e eucarióticos, que podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os cogumelos e as orelhas de pau. Pertencem ao reino Fungi, o qual possui uma gama de espécies com diferentes estruturas como cogumelos, bolores, orelhas-de-pau e leveduras, como apresentado na Figura 1. (Bueno; Silva. 2014).

Figura 1 - Algumas estruturas de fungos.

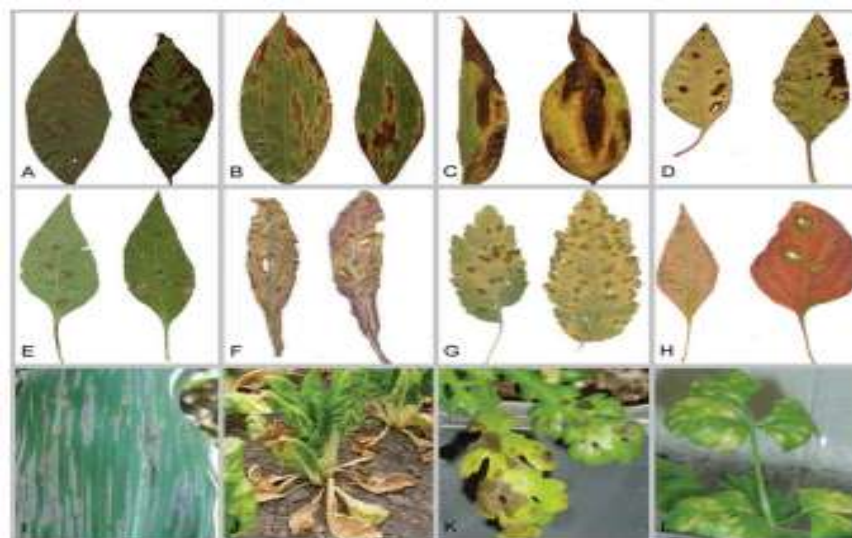


Nota: cogumelos, bolores, orelhas-de-pau e leveduras.

Fonte: O autor.

Os fungos pertencentes ao gênero *Cercospora* são conhecidos por sua fitopatologia, acarretando doenças em culturas agrícolas com impacto mundial, conforme é apresentado na Figura 2. Além disso, esse gênero produz uma alta gama de metabólitos secundários, sendo a cercosporina uma das toxinas mais significativas e importantes (Daub. 1982). A cercosporina tem sido objeto de estudo na fitopatologia, pela contribuição como bioinseticida e fortalecimento de práticas agrícolas mais sustentáveis, além de seu potencial em terapias medicinais, como fármacos anticancerígenos e tratamentos oncológicos (Mulrooney *et al.* 2012; Weiss *et al.* 1987).

Figura 2 - 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*.

Fonte: Adaptado de Groenewald *et al.* (2013).

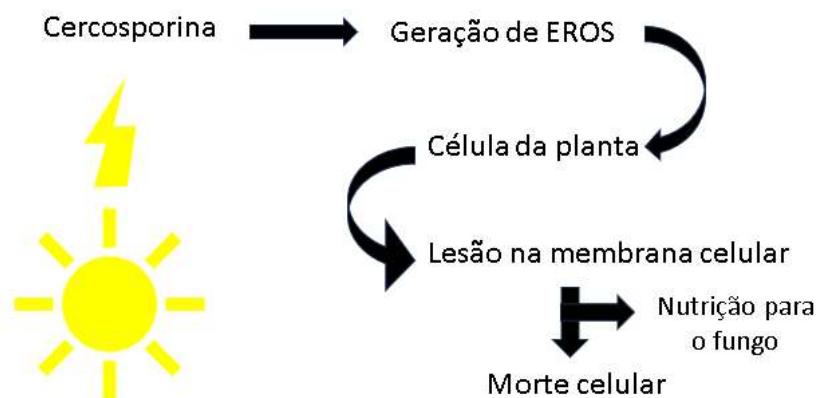
O gênero *Cercospora* abriga diversas espécies que produzem cercosporina, entre as quais se destacam *Cercospora beticola* e *Cercospora zae-maydis*. A produção de cercosporina varia de acordo com as condições ambientais e as interações com as plantas hospedeiras (Groenewald 2013).

Cercospora brachiata foi relatada pela primeira vez no Brasil como mancha foliar de *Cercospora* em *A. viridis* (Caruru), sendo a identidade do agente etiológico confirmada por uma combinação de informações morfológicas e moleculares (Vieira *et al.*, 2019).

A toxina cercosporina, objeto de estudo desse trabalho, é produzida por fungos do gênero *Cercospora*. Essa fitotoxina é conhecida por favorecer a necrose em folhas de diversas plantas, decorrente da sua atividade fotossensibilizadora, ou seja, obtém sua ativação por meio de incidência de luz (Yamane *et al.* 2010). Consequentemente, a cercosporina é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) sobquando há incidência de luz, classificando-a como uma toxina fotodinâmica, causadora das interações entre

patógeno e plantas, conforme demonstrado na Figura 3. 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, maior é a produção de cercosporina (Yamane *et al.* 2010).

Figura 3 - Modo de ação da cercosporina, sendo ativada pela energia da luz e formando os oxigênios singlete e superóxidos.



Fonte: O autor.

Dada a importância da cercosporina, a quantificação precisa da toxina é uma etapa crucial para a avaliação de sua malignidade. A utilização de métodos de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a determinação das concentrações de cercosporina, favorecendo a pesquisa sobre sua toxicidade e eficácia como agente patogênico (Botelho *et al.*, 2022).

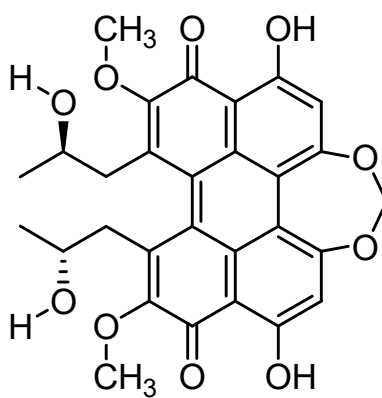
Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e quantificar a cercosporina nos extratos do fungo *Cercospora brachiata*. A investigação é inédita e tem relevante importância, a fim de identificar a capacidade da espécie em produzir a toxina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Estrutura da cercosporina

A estrutura da cercosporina apresentada na Figura 4 é caracterizada por um anel aromático ligado a oxigênios, formando uma molécula capaz de interagir com a luz e gerar ROS o que a torna eficiente em causar danos a tecidos vegetais (Daub; Chung. 2007).

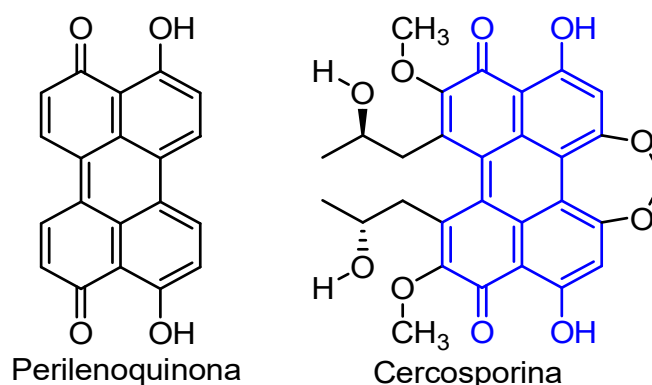
Figura 4 - Estrutura da cercosporina.



Fonte: O autor (2024).

A molécula cercosporina possui um núcleo pentacíclico oxidado como mostrado na Figura 5, sendo classificada como uma perilenoquinona. Os compostos que possuem essa classificação são provenientes de produtos naturais possuindo cores vibrantes e atividades biológicas, atividade fotodinâmica e anticancerígena (Mulrooney *et al.* 2012; Weiss *et al.* 1987).

Figura 5 - Destaque da classificação perilenoquinonas



Fonte: O autor (2024).

Segundo Fajola (1978), a cercosporina é uma fitotoxina com coloração vermelha, que em seus estudos causou danos em plantas, levando a necrose dos tecidos vegetais. Esta toxina apresenta pico característico de absorção máxima em 470 nm no espectro de absorção UV/Vis, tendo temperatura de fusão de 260 °C, se mostra 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.

2.2. Atropoisomerismo e Isolamento de atropoisômeros

O atropoisomerismo é um fenômeno existente em moléculas com rotação restrita ao redor de uma ligação simples, podendo ou não possuir um centro de quiralidade. Isso ocorre, geralmente, devido a grandes grupos de substituintes em anéis aromáticos. Esse fenômeno gera isômeros conformacionais, os atropoisômeros, que não são caracterizados como estereoisômeros tradicionais pois já que podem apresentar características físicas e biológicas diferentes (Mulrooney; O'Brien; Kozlowski. 2007)

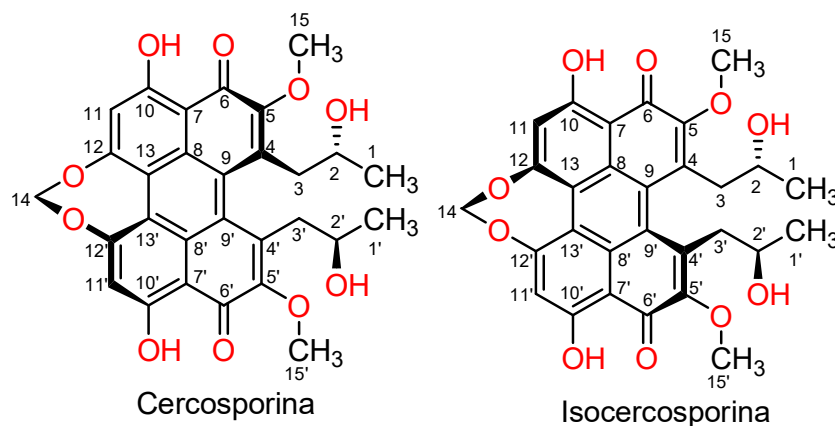
É visto que na cercosporina o fenômeno de atropoisomerismo se manifesta, obtendo a partir da rotação restrita e gera o composto isocercosporina

(ICP). A cercosporina e seu atropoisomero são estruturalmente semelhantes, mas segundo Mulrooney (2012) apresentam comportamentos bioquímicos distintos, destacando diferentes atividades fotodinâmicas e toxicidade. Portanto, a caracterização desses atropoisômeros é essencial.

O composto ICP, apresentada na Figura 6, é interconvertido quando a cercosporina está em solução, ou vice-versa, de acordo com os estudos feitos por Yamazaki e Ogawa (1972) e Tabuchi, Tajimi e Ichihara (1991), é ressaltado que essa interconversão acontece quando ocorre a solubilização em solventes polares, como metanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), devido às suas propriedades que podem influenciar a estabilidade. Desta maneira o isolamento total das substâncias se torna um desafio.

A configuração espacial da cercosporina está diretamente ligada à sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), pois a especificidade do atropoisomerismo influencia a eficiência dessa atividade fotodinâmica. Por isso, é extremamente importante aplicar uma metodologia eficaz que permita a separação e caracterização dos atropoisômeros, para avaliar as propriedades de cada um na produção de ROS (Mulrooney et al. 2012).

Figura 6 - Estrutura da cercosporina e isocercosporina com numeração.



Fonte: O autor (2024).

Para o isolamento de atropoisômeros o uso de técnica de cromatografia, principalmente a CLAE é necessário, afim de estabelecer futuras aplicações

biotecnológicas, tanto para fins farmacêuticos como para o controle de pragas agrícolas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo o isolamento da molécula cercosporina por meio das técnicas de cromatografia, a caracterização do composto por ressonância magnética nuclear e o desenvolvimento de método de análise em CLAE para possibilitar a quantificação da cercosporina em extratos de caldos de crescimentos e de micélios de *Cercospora brachiata*.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar a cercosporina presente no extrato do fungo através de cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (modo semi-preparativo);
- Caracterizar a molécula isolada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Quantificar o composto cercosporina por CLAE.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Os solventes utilizados durante os procedimentos foram: hexano, acetato de etila, os quais foram previamente destilados para maior pureza, metanol (Grau HPLC), etanol, metanol, ácido fórmico e clorofórmio deuterado. Tais solventes disponíveis em laboratório, assim sendo MERCK, SYNTH E VETEC. Para filtrações foram usados papéis de filtro qualitativo (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), reveladas com luz ultravioleta (254 e 366 nm), sem uso de 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

- 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 (Aldrich).

- 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. Metodologia

4.3.1. Cultivo e extrato fúngicos

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.

A extração de *C. brachiata* foi realizada pelo Dr. John Kenedy R. P. Felisbino através da maceração de 502 g de micélios junto às placas com o meio de cultura, usando acetato de etila como solvente extrator. O extrato obtido foi submetido ao evaporador rotatório seguido de liofilização.

4.3.2. Isolamento

O isolamento da cercosporina a partir do extrato acetato de etila foi realizado por cromatografia em coluna (CC) e CLAE com coluna semi-preparativa.

Foram realizadas 03 cromatografias em coluna, sendo que a primeira coluna (01) e a segunda coluna (02) foram realizadas utilizando o extrato, e a terceira coluna (03) foi realizada utilizando uma fração da coluna 02.

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 e hexano 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 (3,7 mg) possuía perfil de composto isolado em CCD e por isto foi separada.

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 e hexano 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 e hexano 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 R_f característicos da cercosporina foi utilizada para fazer o isolamento por CLAE - Semipreparativa.

Foram elaboradas tabelas, Tabela 1,2 e 3, contendo as colunas cromatográficas realizadas.

Tabela 1 - Coluna cromatográfica 01.

	FRAÇÃO	MASSA (mg)	FRAÇÃO	MASSA (mg)
COLUNA 01 EXTRATO 621 mg	1	172,5	12	2,4
	2	172,0	13	8,5
	3	40,2	14	4,4
	4	2,0	15	7,3
	5	5,8	16	2,8
	6	2,6	17	6,0
	7	3,7	18	39,7
	8	26,9	19	2,2
	9	7,6	20	6,1
	10	10,1	21	48,9
	11	1,2		

Tabela 2 - Coluna cromatográfica 02.

	FRAÇÃO	MASSA (mg)
COLUNA 02 EXTRATO 600 mg	1	154,8
	2	75,1
	3	13,3
	4	12,5
	5	9,8
	6	10,6
	7	15,5
	8	180,9
	9	62,9
	10	58,7

Fonte: O autor (2024).

Tabela 3 - Coluna cromatográfica 03.

	FRAÇÃO	MASSA (mg)
COLUNA 03 F8-C02 180,9 mg	1	3,2
	2	6,4
	3	5,0
	4	82,0
	5	48,0
	6	1,7
	7	32,2
	8	2,4

Fonte: O autor (2024).

4.3.3. Caracterização

As frações com maior grau de pureza foram monitoradas por CCD (cercosporina com R_f : 0,68. Frajola, 1978); foram avaliadas analiticamente por CLAE; e submetidas a ressonância magnética nuclear, utilizando como solvente o clorofórmio deuterado.

4.3.4. Quantificação

A quantificação da cercosporina foi realizada pelo 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 Å de diâmetro, protegida pela respectiva pré-coluna. 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} .

Sendo a fração com maior grau de pureza foi analisada por CLAE nessa metodologia e assim possibilitou a criação de uma curva analítica através do gráfico da área (área do composto) em 470 nm *versus* a concentração. A curva foi preparada com as seguintes concentrações: 0,01, 0,05, 0,1, 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.

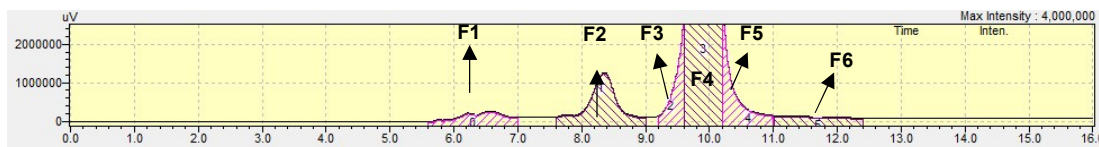
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento

A coluna cromatográfica 01 gerou uma fração (07 de 3,7 mg) que possuía perfil da cercosporina e assim ela foi analisada por a RMN. Já a coluna 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 igual, porém ainda continha algumas impurezas, e desta foi realizada a coluna 03. As frações da coluna 03 foram avaliadas em CLAE e posteriormente a fração 07 dessa mesma coluna com 32,2 mg, por apresentar maior pureza nos cromatogramas, foi escolhida para a partir dela isolar a cercosporina no CLAE-semi-preparativo.

Nessa análise usando a coluna semi-preparativa foram obtidas 6 frações, denominadas de F1, F2, F3, F4, F5 e F6 como destaca a Figura 7 juntamente com a programação usada. Cada coleta das frações, em quantidade de massa, gerou 3,0; 2,2; 0,1; 3,3; 2,9 e 0,1 mg, respectivamente.

Figura 7 - Cromatograma do CLAE-semipreparativo com a programação de isolamento da cercosporina.



Fonte: O autor (2024).

Com o resultado dessa análise foi possível realizar a caracterização da cercosporina por RMN com a fração F4.

5.2. Caracterização por RMN

A fração F4 usada para a caracterização via RMN de ^{13}C indicou a presença de 15 sinais, que estão presentes na cercosporina, Tabela 1.

Tabela 4 - Dados de RMN da cercosporina do trabalho e da literatura (RMN ^{13}C (125 MHz), RMN ^1H (400 MHz), CDCl_3).

N $^{\circ}\text{C}$	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 ^{13}C (125 MHz), RMN ^1H (500 MHz), CDCl_3 . ** RMN ^{13}C (125 MHz), RMN ^1H (400 MHz), CDCl_3 .

Fonte: O autor (2024); Felisbino (2023).

Os sinais foram discutidos como, 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 (C- 14); 09 sinais de carbonos aromáticos 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').

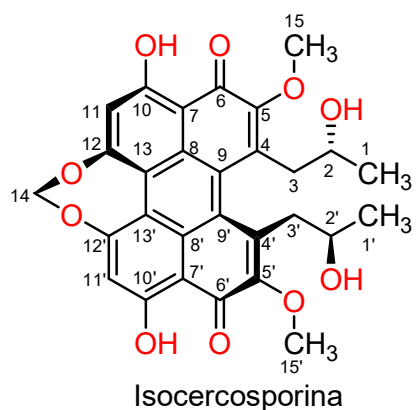
Os carbonos 5 e 5', 10 e 10' e 12 e 12' tem maiores deslocamentos por também estarem ligados a átomos de oxigênio por ligação simples. Há também um sinal de carbono de carbonila em δ 181,2 (C-6 e 6'), a desblindagem do carbono pelo oxigênio na carbonila, faz com que seu deslocamento químico seja maior. E por fim, foram observados dois sinais de carbonos, um metílico 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 5).

No espectro de RMN ^1H foi observado um sinal de hidrogênio 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 1, foi constatada que a substância isolada era cercosporina.

Ao longo do trabalho, a presença de isocercosporina também foi avaliada, sendo definida conforme descrito na literatura por Yamazaki e Ogawa (1972) e Tabuchi, Tajimi e Ichihara (1991). Como já mencionado, a cercosporina é interconvertida em isocercosporina quando em solução, e vice-versa, o que dificulta o isolamento completo de cada substância. A presença da isocercosporina, Figura 8, é destacada no cromatograma, Figura 9, onde em vermelho representa a isocercosporina, obtido a partir da fração F7 da coluna 1 (C1), enquanto o cromatograma em azul corresponde à cercosporina isolada.

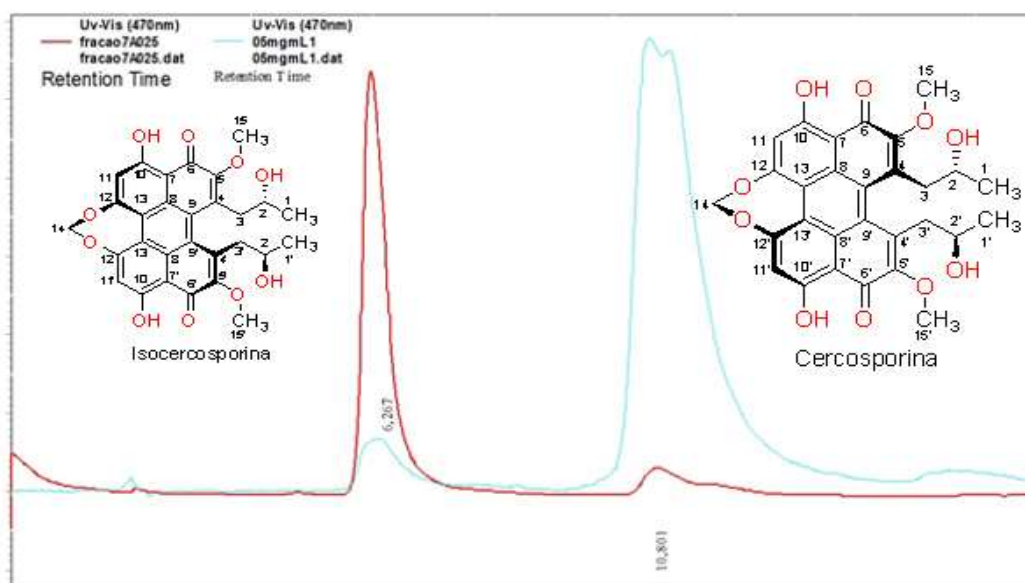
Figura 8 - Estruturas da isocercosporina com numeração.



Fonte: o autor (2024).

A partir do cromatograma mostrado na Figura 9 e do estudo de Felisbino (2023) que é possível identificar a isocercosporina e a cercosporina no cromatograma e que, portanto, é viável o isolamento e quantificação tanto da cercosporina quanto da isocercosporina. Neste trabalho teve o foco majoritário no isolamento e quantificação da cercosporina.

Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos da cercosporina e isocercosporina obtidos por CLAE (470 nm).



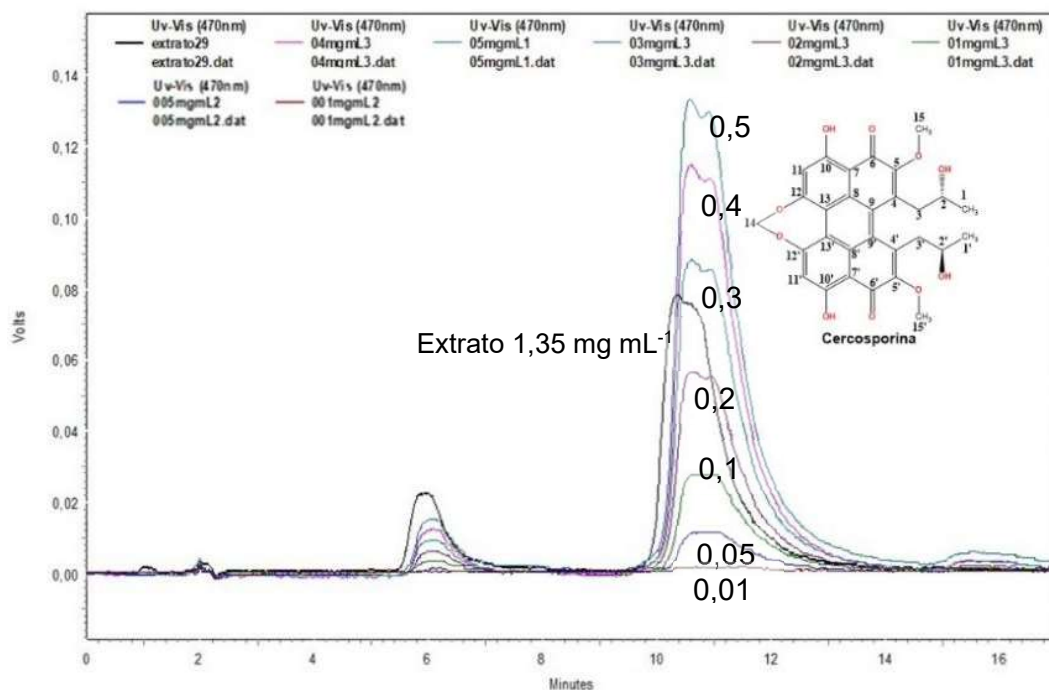
Fonte: o autor (2024).

5.3. Quantificação via CLAE

Após a caracterização da cercosporina foram feitas novas análises do extrato no CLAE-analítico e foi obtido o cromatograma representado na Figura 10, evidenciando que havia a presença majoritária de um composto com t_R : 10,8 minutos e um pico minoritário em 6,2 minutos. Esse pico minoritário advém da conversão que ocorre ao solubilizar a substancia para fazer as análises. Por conseguinte, para a realização da quantificação foi necessário obter a proporção da isocercosporina presente em cada amostra usada para a quantificação, para no final tirar a porcentagem correta.

Foram também analisados os cromatogramas de variadas concentrações de cercosporina, usados para a quantificação, 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 10.

Figura 10 - Cromatogramas em CLAE (470 nm) das soluções de cercosporina e do extrato fúngico em acetato de etila na concentração (1,35 mg/mL).



Fonte: O autor (2024).

Como pode ser evidenciado o pico referente a conversão da cercosporina em isocercosporina é bem inferior, interferindo bem pouco. 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 2 que contém os valores de concentração, tempo de retenção (R_f), área do pico e a média aritmética das áreas.

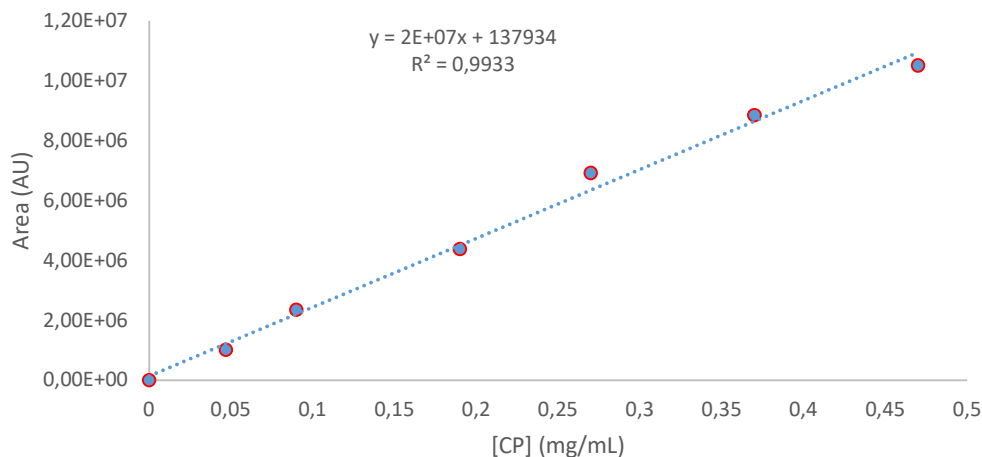
Tabela 5 - Áreas dos picos e tempos de retenções obtidos por CLAE para soluções de cercosporina com diferentes concentrações.

[Cercosporina] mg/mL	% média das áreas	Área média	t_R médio (min)
0,47	93,2	$1,1 \cdot 10^7 \pm 0$	$10,8 \pm 0,00$
0,37	93,2	$8,8 \cdot 10^6 \pm 6,7 \cdot 10^4$	$10,9 \pm 0,08$
0,27	92,9	$6,9 \cdot 10^6 \pm 7,2 \cdot 10^4$	$10,8 \pm 0,02$
0,19	93,4	$4,4 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^4$	$10,9 \pm 0,02$
0,09	93,0	$2,3 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^4$	$10,9 \pm 0,00$
0,047	93,8	$1,0 \cdot 10^6 \pm 6,5 \cdot 10^3$	$10,2 \pm 0,02$
0,01	0,00	0,00	0,00

Fonte: o autor (2024).

Com os dados da Tabela 2 foi elaborada a reta usando o software Origin 8.0. E a quantificação foi feita usando a equação da reta obtida (Figura 11). 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 $1,65 \cdot 10^{-5}$ mg mL⁻¹, o limite de quantificação (LQ) de $5,5 \cdot 10^{-5}$ 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 11 - Curva analítica da área versus concentração de cercosporina.



Fonte: O autor (2024).

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 $37,26 \mu\text{M}$. Enquanto que, a quantidade produzida pelo fungo *C. brachiata* foi de $505,6 \mu\text{M}$ ($0,27 \text{ mg mL}^{-1}$), 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.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados é comprovada a produção de cercosporina pelo fungo que, através de técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível isolar a cercosporina de forma eficiente. A sua caracterização por Ressonância Magnética Nuclear confirmou a estrutura do composto isolado conforme e comparado com a literatura, validando a metodologia usada. A quantificação da cercosporina por CLAE revelou que aproximadamente 20% do extrato bruto do fungo era composto pela cercosporina, que quando comparado com outras espécies do gênero *Cercospora* tem um valor significativo.

Na quantificação, foi traçado uma curva analítica foi traçada com o coeficiente de correlação (r^2) de 0,9933. Podendo confirmar um alto grau de exatidão. Os resultados, comparados a outras espécies do gênero *Cercospora*, demonstram um grande potencial de produção de cercosporina em grandes quantidades, o que a torna uma espécie promissora para futuras aplicações biotecnológicas, podendo ser explorada para o desenvolvimento de agentes bioinseticidas mais sustentáveis, além de suas potencialidades medicinais em tratamentos fotodinâmicos.

7. REFERÊNCIAS

- 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 coffeicola* isolates: spectrophotometry and HPLC quantification and image analysis**. *Chemical Papers*, v. 76, p. 2567–2572, 2022. DOI 10.1007/s11696-021-01965-5.
- BUENO, D. J.; SILVA, J. O. FUNGI - The Fungal Hypha. *In: Encyclopedia of Food Microbiology*, p. 11–19, 2014. DOI 10.1016/b978-0-12-384730-0.00132-4.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a Photosensitizing Toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology*, v. 72, p. 370-374. 1982. DOI 10.1094/Phyto-72-370.
- DAUB, M.E.; CHUNG, K-R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in Plant Disease. *American Phytopathological Society*net Features. 2007. DOI 10.1094/APSnetFeature/2007-0207.
- FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiol Plant Pathol.* v. 13, p. 157-164, 1978. DOI 10.1016/0048-4059(78)90029-2.
- FELISBINO, J. K. **Identificação de substâncias produzidas por fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium sp* e avaliação da atividade antibacteriana**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- FELISBINO, J. K. **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 (doutorado em Química) — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.
- 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. DOI 10.3114/sim0012.

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. DOI 10.1094/pdis-10-15-1192-re.

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. DOI 10.1073/pnas.1712798115.

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. DOI 10.1021/ja902324j.

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. DOI 10.1002/ejoc.201200184.

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. DOI 10.1111/mpp.12879.

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. DOI 10.1371/journal.pntd.0007964.

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. DOI 10.1080/00021369.1991.10870997.

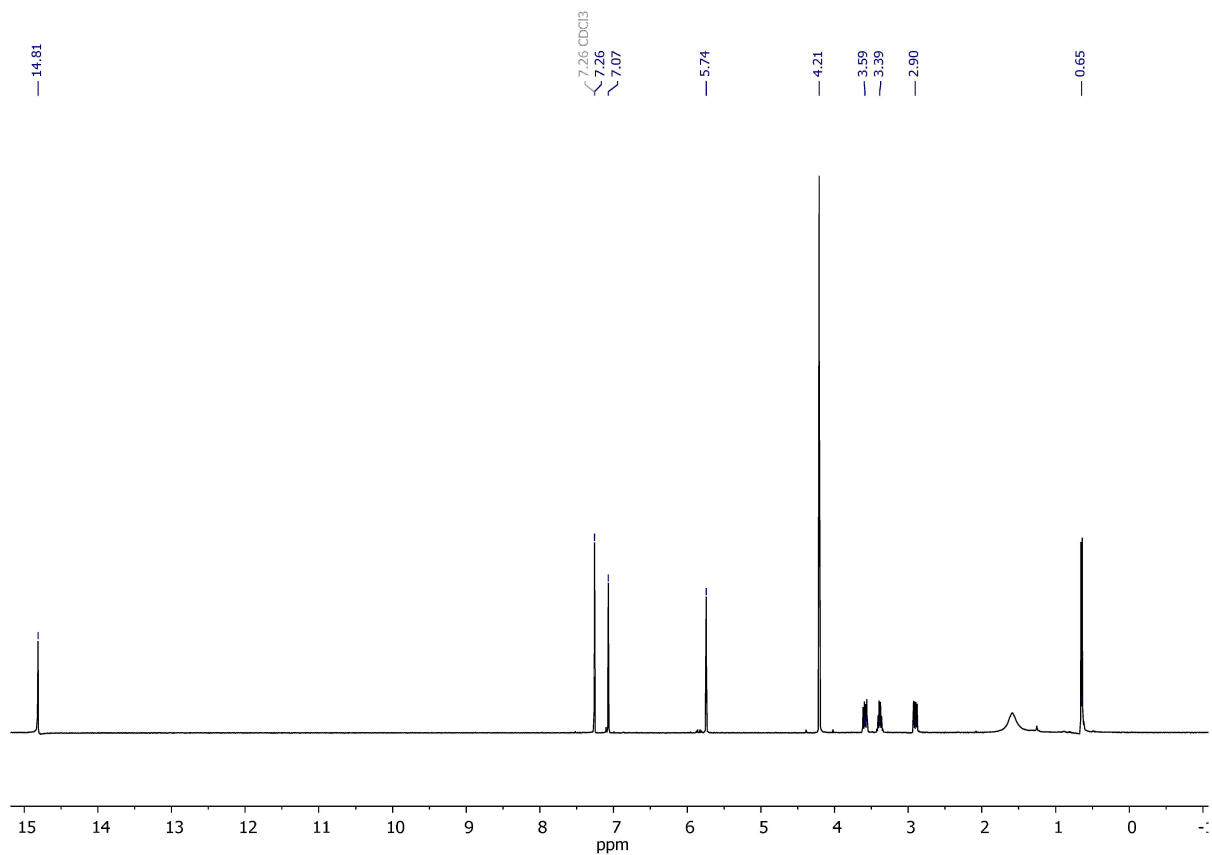
VIEIRA, B. S., DA SILVA, N. A., FIRMINO, A. L., SIQUIEROLI, A. C. S. *Cercospora brachiata* on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 14, n. 1, 2019. DOI 10.1007/s13314-019-0339-4.

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. DOI 10.1007/978-3-7091-8906-1_1.

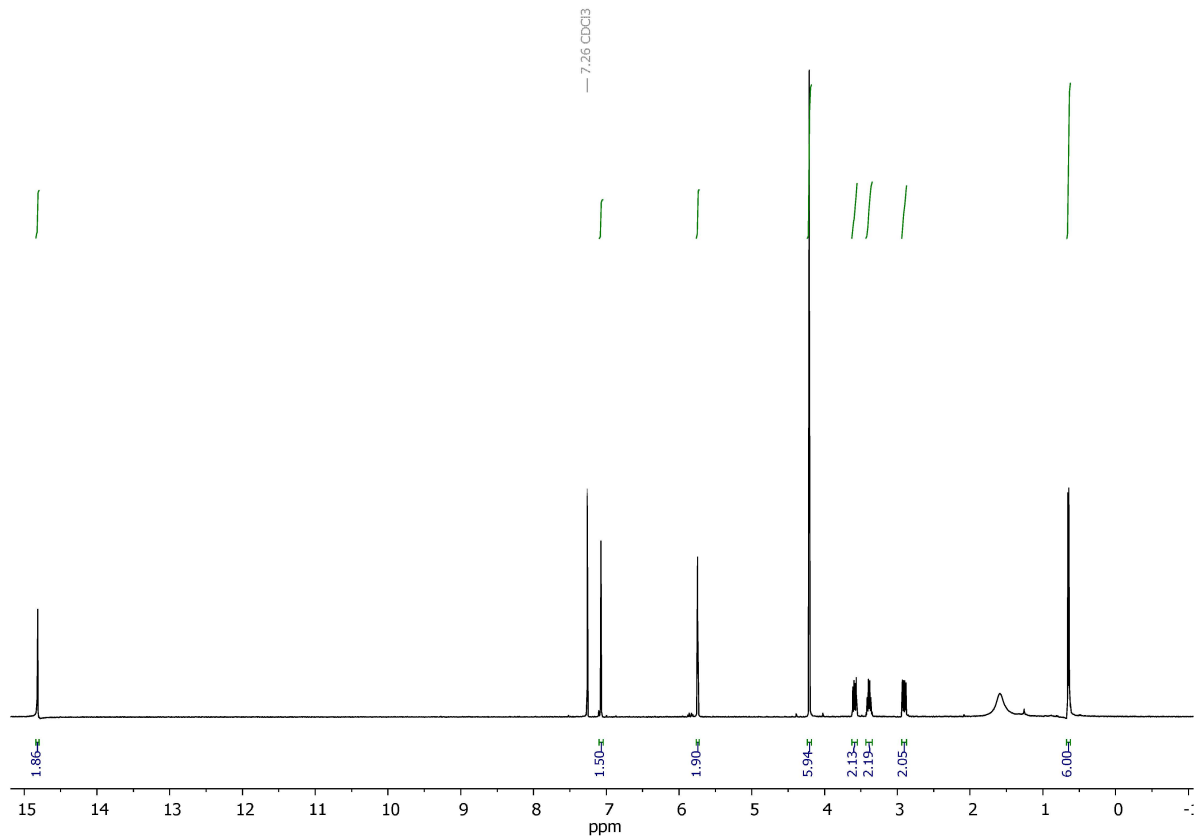
YAMANE, H.; KONNO, K.; SABELIS, M.; TAKABAYASHI, J.; SASSA, T., OIKAWA, H. Chemical Defence and Toxins of Plants. **Comprehensive Natural Products II**, p. 339–385, 2010. DOI 10.1016/B978-008045382-8.00099-X.

YAMAZAKI, S., OGAWA, T. The Chemistry and Stereochemistry of Cercosporin. **Agricultural and Biological Chemistry**, p. 1707–1718, 1972. DOI 10.1080/00021369.1972.10860458.

APÊNDICES

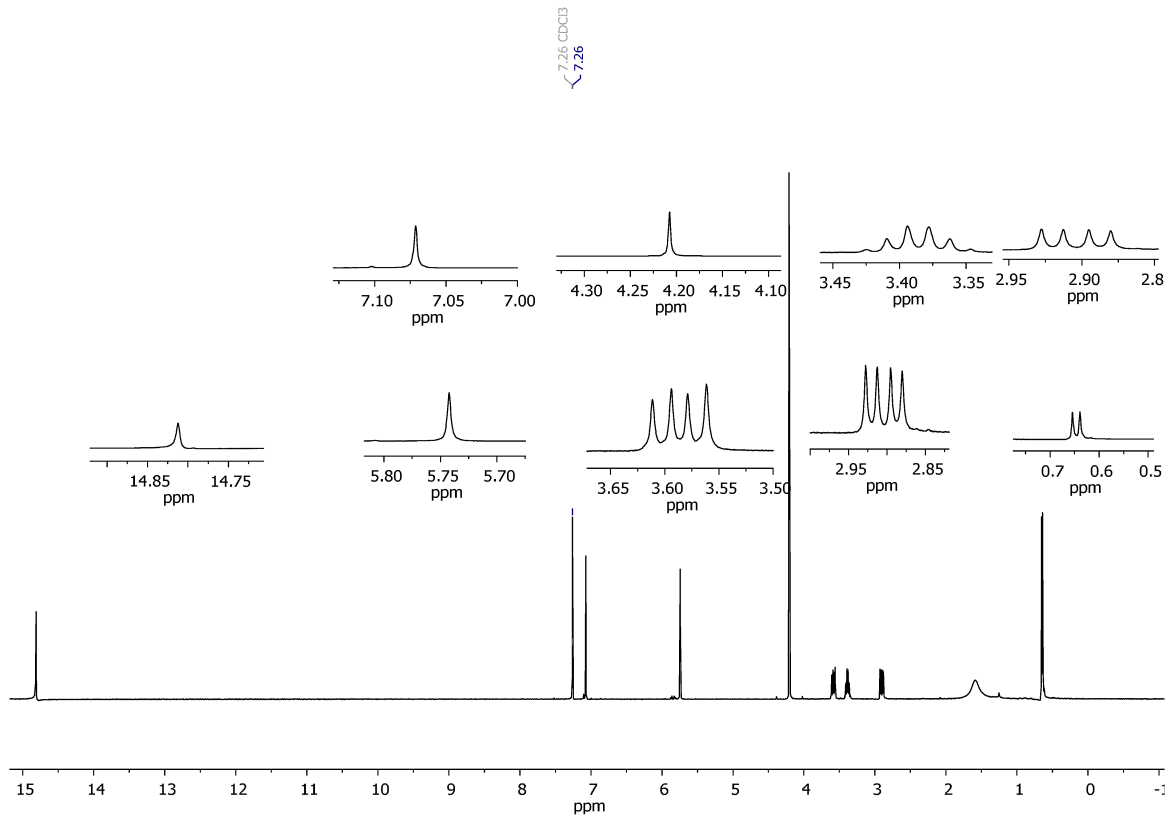
APÊNDICE I – ESPECTROS DE RMN DE H¹ E DE C¹³ DA CERCOSPORINAFigura A: Espectro de RMN de H¹ da cercosporina com deslocamentos químicos.

Fonte: o autor (2024)

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

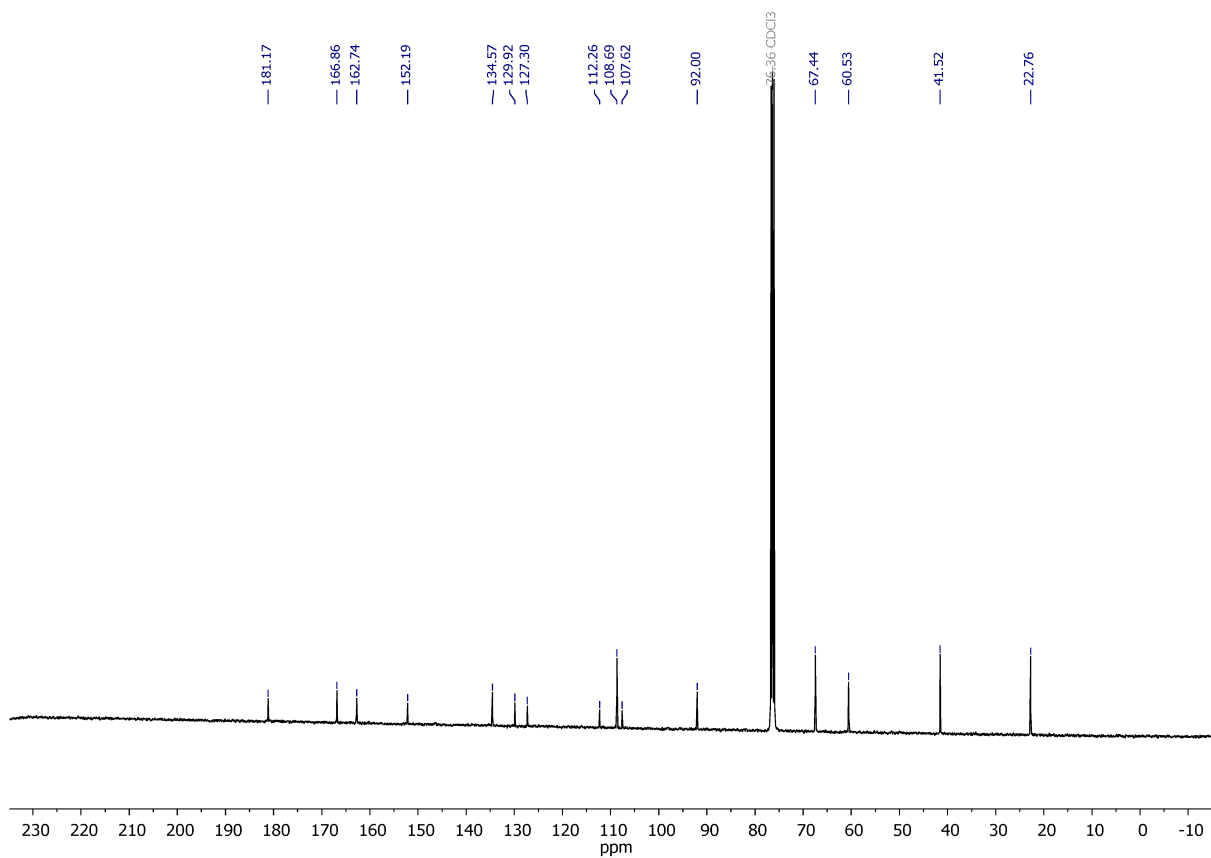
Fonte: o autor (2024).

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



Fonte: o autor (2024).

Figura D: Espectro de RMN de C^{13} da cercosporina com deslocamentos químicos.



Fonte: o autor (2024).