



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG – CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



MARCELA APARECIDA MIRANDA MOREIRA

ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA *IN VIVO*

ALFENAS-MG

2018

MARCELA APARECIDA MIRANDA MOREIRA

ESTUDO QUÍMICO DE EXTRATOS DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

Dissertação mestrado apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Marisi Gomes Soares

ALFENAS-MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Moreira, Marcela Aparecida Miranda.
M838e Estudo químico de extratos de sclerotinia sclerotiorum e atividade anti-inflamatória in vivo. – Alfenas/MG, 2018.
64 f.: il. --

Orientadora: Marisi Gomes Soares.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Anti-inflamatório. 2. Edema de orelha. 3. Mieloperoxidase. 4. Ressonância Magnética Nuclear. I. Soares, Marisi Gomes. II. Título.

CDD-547.7

Marcela Aparecida Miranda Moreira

“Estudo químico dos extratos de Sclerotinia sclerotiorum e atividade anti-inflamatória in vivo”


A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 26/10/18

Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. João Henrique Ghilard Lago
Instituição: Universidade Federal do ABC

Assinatura:  _____

Dedico este trabalho a memória de minhas avós
Conceição e Maria, e a toda a minha família,
vocês são minha inspiração e força!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a orientação, atenção e apoio incondicional da professora Dra. Marisi Gomes Soares.

As professoras coordenadoras do laboratório de fitoquímica e química medicinal, professora Dra. Daniela Chagas de Paula e Professora Dra. Danielle Ferreira Dias, por todos os sábios conselhos, e pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de fitoquímica e química medicinal, em especial ao Pós doutorando Mário Santos e a aluna de iniciação científica Cristiane dos Reis Feliciano por todo o carinho, amizade, companheirismo e dedicação sem vocês nada teria sido possível.

Aos demais colegas do laboratório de fitoquímica e química medicinal, aos doutorandos Welton Rosa, Olivia Domingos, Laís Folquito; Aos mestrandos Paula Salem, Aline de Fátima Silva, Bianca Gonçalves;

Aos meus pais Rosilene e Marcelo, por todo o amor, carinho e apoio, por estarem sempre ao meu lado, me ajudarem em todos os momentos, sem vocês ao meu lado nada teria sido possível!

Aos meus irmãos João Luiz, Pedro Lucas e Plínio, por todas as vezes que me ouviram mesmo sem entender e me apoiaram mesmo assim, sempre pude contar com vocês e saibam que também podem contar comigo sempre!

Ao meu marido Elder e a minha filha Sophia, por todo o carinho e compreensão, vocês são minha força e minha inspiração.

A todos os meus familiares pelas palavras de apoio e incentivo, vocês são minha força em números, a fé de vocês move montanhas e sempre me motivou!

RESUMO

A *Sclerotinia sclerotiorum* é um importante fungo fitopatogênico, em parte devido à vasta gama de hospedeiros que este fungo possui, em torno de 408 espécies, e em parte devido a sua habilidade de formar estruturas de resistência denominadas escleródios, podendo estes sobreviver no solo por até 11 anos. Dentre as espécies hospedeiras deste fungo destacam-se a soja e o feijão devido a sua grande importância econômica, a doença causada na planta pela *Sclerotinia sclerotiorum* chamada mofo branco causa o apodrecimento do caule da planta, a formação de escleródios na vagem das plantas acarreta em grandes prejuízos devido a significativa redução na produção que este provoca, cerca de 70%. A *Sclerotinia sclerotiorum* possui atividade carcinogênica comprovada quando ingerida em altas concentrações, como sabe-se que atividade anticarcinogênica e atividade anti-inflamatória estão relacionadas faz-se necessário investigar a potencial farmacológico deste fungo. Assim buscou-se neste trabalho determinar a possível atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato bruto e das frações acetato, hexânica e Hidroalcoólica de *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como isolar e identificar compostos constituintes destes e posteriormente avaliar a atividade inflamatória destes compostos. Para avaliar a atividade anti-inflamatória realizou-se o teste de edema de orelha, sendo possível observar que a fração hexânica possui atividade anti-inflamatória comparável com a do fármaco de referência, reduzindo o edema em 70% enquanto que o fármaco de referência inibiu 60%. A fim de determinar-se a via inflamatória inibida no teste de edema de orelha realizou-se o teste de recrutamento de neutrófilos, neste observou-se que a fração hexânica reduziu significativamente os níveis de mieloperoxidase (MPO) indicando que esta inibe a via inflamatória da lipooxigenase (LOX). Isolou-se através de coluna cromatográfica e de coluna *Sephadex* da fração acetato de *Sclerotinia sclerotiorum* dois compostos, sendo estes identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H como sendo o manitol e o peróxido de ergosterol. O manitol e o peróxido de ergosterol foram então submetidos ao teste de edema de orelha aonde pode-se observar que ambos possuem atividade anti-inflamatória, apresentando porcentagem de inibição do edema 53% e 68%, o que comprova que a relação entre atividade antitumoral e atividade anti-inflamatória visto que o peróxido de ergosterol possui atividade anticarcinogênica, imunossupressora e antioxidante comprovada. A fração hexânica foi analisada em massas de alta resolução desta forma foi possível desreplificar vários compostos que possivelmente constituem esta fração sendo estes de diversas classes como flavonoides, cumarina e também terpenos. A maioria dos compostos desreplificados pertence a classe dos flavonoides, estes possuem atividade anti-inflamatória comprovada o que nos

permite inferir que a ação anti-inflamatória da fração hexânica se deve possivelmente a grande quantidade de flavonoides observada nesta.

Palavras-Chave: Anti-inflamatório. Edema de orelha. Mieloperoxidase. Ressonância magnética nuclear.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is an important phytopathogenic fungus, in parts due to the wide range of hosts that this fungus has, around of 408 species, and partly due to its ability to form resistance structures called sclerodes, Which can survive in soil for up to 11 years. Among the host species of this fungus stand out soybeans and beans due to its economic importance, the disease caused in the plant by *Sclerotinia sclerotiorum* called white mold causes the stem rot, the sclerodes formation in leguminous plants entails large losses due to a significant reduction in production that this causes, about 70%. *Sclerotinia sclerotiorum* has proven carcinogenic activity when ingested at high concentrations, as it is known that anticarcinogenic activity and anti-inflammatory activity are related it is necessary to investigate the pharmacological potential of this fungus. *Sclerotinia sclerotiorum* has proven carcinogenic activity, as it is known that anticarcinogenic activity and anti-inflammatory activity are related it is necessary to investigate the potential anti-inflammatory activity of this fungus. The aim of this work was to determine the possible *in vivo* anti-inflammatory activity of the crude extract and the acetate, hexane and hydroalcoholic fractions of *Sclerotinia sclerotiorum*, as well as to isolate and identify constituent compounds of these and later to evaluate the inflammatory activity of these compounds. To evaluate the anti-inflammatory activity, the ear edema test was performed, and it was possible to observe that the hexane fraction had anti-inflammatory activity compatible with that of the reference drug, reducing edema by 70%, while the reference drug inhibited 60%. In order to determine the inhibited inflammatory pathway in the ear edema test the neutrophil recruitment test was performed, in which it was observed that the hexane fraction significantly reduced myeloperoxidase (MPO) levels indicating that it inhibited the inflammatory pathway of lipoxygenase (LOX). Two compounds were isolated by chromatographic column and Sephadex column from the acetate fraction of *Sclerotinia sclerotiorum*, which were identified by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) as mannitol and ergosterol peroxide. Mannitol and ergosterol peroxide were then submitted to the ear edema test, where it can be observed that both have anti-inflammatory activity, presenting a 53% and 68% inhibition of edema, which proves that the relation between antitumor activity and anti-inflammatory activity since ergosterol peroxide has proven anticarcinogenic, immunosuppressive and antioxidant activity. The hexane fraction was analyzed in masses of high resolution of this form it was possible to dereplicate several compounds that possibly constitute this fraction being these of diverse classes like flavonoids, coumarin and also terpenes. Most of the compounds that are not replicated belong to the class

of flavonoids, these have a proven anti-inflammatory activity, which allows us to infer that the anti-inflammatory action of the hexanic fraction is possibly due to the large number of flavonoids observed in this class.

Key words: Anti-inflammatory. Ear edema. Myeloperoxidase. Nuclear magnetic resonance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Ciclo de vida do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>20
FIGURA 2-	(A) Escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (B) Escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em lotes de soja20
FIGURA 3-	Composto isolado por Keates et al. (1998).21
FIGURA 4-	Compostos voláteis constituintes da <i>sclerotinia sclerotiorum</i>21
FIGURA 5-	Esteroides isolados em extrato aquoso de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>22
FIGURA 6-	Compostos desreplcados por Azevedo et al. (2016).22
FIGURA 7-	Estrutura do peroxido de ergosterol45
FIGURA 8-	Estrutura do manitol46
FLUXOGRAMA 1-	Obtenção das frações hidroalcoólica ii, acetato etílica e hexânica a partir de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>31
FLUXOGRAMA 2-	Isolamento dos compostos obtidos a partir da fração acetato etílica do extrato de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FLUXOGRAMA 3-	Isolamento de compostos da fração acetato etílica através da coluna <i>Sephadex</i> ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FLUXOGRAMA 4-	Perfil de análise anti-inflamatória ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FLUXOGRAMA 5-	Perfil de análise anti-inflamatória para o composto 1..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FLUXOGRAMA 6-	Perfil de análise anti-inflamatória do composto 236
GRÁFICO 1-	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
GRÁFICO 2-	Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos isolados da fração acetato de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>40
GRÁFICO 3-	Avaliação da atividade anti-inflamatória do composto 2. ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
GRÁFICO 4-	Efeito dos extratos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO). ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

GRÁFICO 5- Efeito dos compostos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Cronograma de obtenção dos extratos.....	30
TABELA 2 - Rendimento do extrato bruto etanólico do escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	31
TABELA 3 - Rendimento do particionamento do extrato de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	31
TABELA 4 - Percentagem de inibição do edema de orelha dos extratos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e dos controles.	39
TABELA 5 - Percentagem de inibição do edema de orelha dos compostos isolados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e dos controles.....	40
TABELA 6 - Percentagem de inibição do edema de orelha do composto 2.	41
TABELA 7 - Quantificação de mieloperoxidase nos extratos de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (MPO).	42
TABELA 8 - Quantificação de mieloperoxidase dos composto 1.	43
TABELA 9 - Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para o peróxido de ergosterol	45
TABELA 10- Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para o manitol.	46
TABELA 11- Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação do modo positivo.....	47
TABELA 12- Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação do modo negativo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	- Acetonitrila
Abs.	- Absorbância
COX	- Ciclooxigenase
COX 1	- Ciclooxigenase 1
COX 2	- Ciclooxigenase 2
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
DMSO	- Dimetilsulfoxido
E.B.	- Extrato Bruto
E.M.	- Espectrômetro de Massas
ES-QTOF	- Ionização por elétron spray tempo de voo
E.M.P.	- Desvio Padrão
LOX	- Lipooxigenase
LFQM	- Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
LC-MS	- Cromatografia líquida com espectrômetro de massas
MPO	- Mieloperoxidase
MHz	- MegaHertz
MAPA	- Manual de análises de sementes
MS	- Espectrometria de Massas
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
UFPA-MG	- Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais
UNIFAL-MG	- Universidade Federal de Alfenas-Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	FAMÍLIA SCLEROTINACEAE	18
2.2	SCLEROTINIA SCLEROTIORUM	18
2.3	SUBSTÂNCIAS RELATADAS PARA SCLEROTINIA SCLEROTIORUM	20
2.4	PRODUTOS NATURAIS	23
2.5	INFLAMAÇÃO	23
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	PARTE EXPERIMENTAL	27
5.1	MATERIAIS, INSTRUMENTOS E REAGENTES UTILIZADOS	27
5.1.2	Ressonância magnética nuclear	Erro! Indicador não definido.
5.1.1	Espectrometria de massas	27
5.1.2	Evaporação dos solventes	28
5.1.3	Liofilizador	28
5.1.4	Solventes utilizados	28
5.1.5	Cromatografia em coluna (CC)	28
5.1.6	Cromatografia em camada delgada (CCD)	28
5.2	PROCEDIMENTOS	29
5.2.1	Coleta e identificação	29
5.2.2	Trituração	29
5.2.3	Obtenção do extrato	29

5.2.4	Particionamento	30
5.2.5	Obtenção das frações hexânica, acetato etílica e hidroalcoólica	30
5.2.6	Rendimento do extrato bruto - E.B.....	31
5.2.7	Rendimento do particionamento.....	31
5.2.8	Cromatografia da fração acetato de etila	32
6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	34
6.1	EDEMA DE ORELHA	36
6.2	MPO	37
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
7.1	ATIVIDADE BIOLÓGICA	38
7.1.1	Edema de orelha	38
7.1.2	Mieloperoxidase	41
7.2	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	43
7.2.1	Composto 1.....	44
7.2.2	Compostos 2	46
7.3	Desreplicação da fração hexânica.....	46
8	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICES	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo fitopatogêno pertencente ao reino *fungi*, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotinaceae, gênero *Sclerotinia* (JULIATTI; JULLIATI, 2010; BOLTON; THOMA; NELSON, 2006). A *Sclerotinia sclerotiorum* se encontra distribuído por todas as regiões agrícolas do mundo independente do seu regime climático, a *Sclerotinia sclerotiorum* parasita plantas de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies, dentre elas culturas de grande importância econômica como a soja, feijão, girassol, tomate, batata (BOLAND; RALL, 1994; BOLTON; THOMA; NELSON, 2006; XU et al., 2014).

A *Sclerotinia sclerotiorum* causa a doença conhecida como mofo branco que provoca o apodrecimento do caule da planta, sendo esta uma das principais doenças que atacam as plantações de soja e feijão no Brasil, levando a perdas significativas na produção destes alimentos (LEITE, 2005). É considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo devido ao grande número de hospedeiros que esta possui, ao fato de não se restringir a nenhum regime climático e a sua difícil eliminação do solo, esta dificuldade se deve as suas estruturas de resistência, os esclerócios, os quais apresentam melanina que confere proteção sob diferentes condições sobrevivendo assim durante vários anos no solo, o que inviabiliza a rotação de culturas como forma de contenção da proliferação do fungo, pois os escleródios podem permanecer no solo por até 11 anos, conservando intacto seu poder patogênico (LEITE, 2005; PURDY, 1979). Este fungo também possui a habilidade de se misturar com a semente na colheita ou localizar-se no interior das sementes, na forma de micélio dormente (LUCCA FILHO, 1985).

Devido à relevância das sementes na disseminação da patogenicidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA implantou a Portaria 47 de 26 de Fevereiro de 2009 que retrata o padrão de tolerância zero para *S. sclerotiorum* em 500 g de sementes de algodão, feijão, girassol e soja da classe básica e certificada com o propósito de evitar a comercialização de lotes de sementes contaminados com escleródios e restringir assim sua disseminação para outras áreas de cultivo (MAPA, 2009). Mesmo com a retirada dos escleródios dos lotes de sementes, aquelas já infectadas com o micélio dormente dificilmente serão detectadas sem a ajuda de um laboratório especializado, seguindo para a plantação ou consumo (NASSER; NAPOLEÃO; CARVAJAL, 1999).

Pouco se conhece sobre a composição química da *Sclerotinia sclerotiorum* o que impossibilita uma melhor compreensão de suas propriedades, bem como sua possível utilização como fármaco. Estudos recentes demonstraram que a ingestão de *Sclerotinia sclerotiorum* em grandes concentrações induz a mutagênese em células da medula e cólon de camundongos sendo que em células do cólon esta induz a apoptose ou seja a morte celular programada (GIANNINI, 2016).

Visando assim obter uma melhor compreensão dos possíveis efeitos farmacológicos do extrato e das frações de *Sclerotinia sclerotiorum*, foi realizado o teste anti-inflamatório de edema de orelha *in vivo* e o teste da quantificação de mieloperoxidase, realizou-se também estes testes para as substâncias isoladas da fração acetato de *Sclerotinia sclerotiorum*. A fim de obter-se uma melhor compreensão sobre a composição química dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum*, analisou-se a composição da fração hexânica utilizou-se a técnica cromatográfica de massas de alta resolução, os compostos isolados foram identificados utilizando-se ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fim de se obter uma melhor compreensão sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e seu potencial farmacológico segue-se uma discussão mais detalhada sobre este, sobre produtos naturais, bem como sobre inflamação.

2.1 FAMÍLIA SCLEROTINACEAE

A família Sclerotinaceae pertence ao filo ascomycota que compreende cerca de 75 % de todos os fungos conhecidos (MORAES et al., 2009). Essa família compreende mais de 30 gêneros de fungos dentre estes importantes fitopatógenos, como os gêneros *Monilinia*, *Botryotinia*, *Sclerotinia*. Uma das principais características desta família são fungos de micélios bem desenvolvidos tipicamente septados, com células uninucleadas reproduzindo-se por esporos endógenos (ascóporos), são caracterizadas por ascóporos discoides também chamados de apotécios e possuem ascas semitunicadas, entre os membros desta família destacam-se a *Monilinia frutícola* que provoca a podridão parda em pessegueiros (*Prunus persicae*), a *Botryotinia ricini* que é o agente causal do mofo cinzento, e a *Sclerotinia sclerotiorum* agente causal do mofo branco, cujos principais hospedeiros são plantações de soja, feijão e girassol (KRUGNER; BACCHI, 1995). Fungos pertencentes a essa família produzem estruturas de resistência, escleródios, sendo estes extremamente importantes para a dispersão e sobrevivência dos fungos, facilitando a identificação das espécies de fungos pertencentes a essa família (SILVEIRA, 1995; DUGAN, 2006; ROQUE, 2013).

2.2 SCLEROTINIA SCLEROTIORUM

A *Sclerotinia sclerotiorum* é responsável por causar o mofo branco doença que causa a podridão do caule da planta hospedeira, presente em todas as regiões produtoras e em todos os regimes climáticos este fungo é conhecido por sua difícil eliminação do solo, devido a suas estruturas de resistência que podem permanecer no solo por 11 anos conservando seu poder patogênico (LEITE, 2005). A *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao reino fungi, ao filo ascomycota que compreende o grupo mais diverso de fungos com ciclo de vida complexo, os ciclos de reprodução sexuado e assexuado, ocorrem em diferentes momentos da vida do fungo e em diferentes partes do fungo como demonstrado na figura 1, são características principais

deste filo a presença de estruturas biológicas como o asco, pertence á classe dos discomicetos, a ordem dos helotiales que são uma grande ordem dos discomicetos inoperculados dos quais a maioria são fitopatógenos (DUGAN, 2006). A descrição do mofo branco causado pela *Sclerotinia sclerotiorum* foi feita no Brasil pela primeira vez em 1921, na batata (*Solanum tuberosum* L.), no estado de São Paulo (CHAVES, 1964). A família sclerotinaceae compreende importantes fungos fitopatógenos dentre estes se destaca os fungos pertencentes ao gênero *Sclerotinia*, principalmente a *Sclerotinia sclerotiorum* devido à elevada resistência devido à formação de suas estruturas de resistência os escleródios demonstrados na figura 2 (GARCIA, 2012).

A capacidade de infectar as sementes da planta hospedeira com uma hifa dormente faz com que estas se tornem um vetor de disseminação do fungo, o que também acarreta o consumo acidental de *Sclerotinia sclerotiorum* por humanos e animais através de rações contaminadas (LUCCA FILHO, 1985). Giannini (2016) relata que quando adicionado à alimentação em teste *in vivo*, o extrato bruto produzido a partir de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em acetato de etila, possui atividade carcinogênica em tecidos de colón, fígado e medula este também provoca um aumento nas concentrações de células apoptóticas.

Figura 1- Ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*



Fonte: Adaptação pelo autor de www.potatodiasies.org

Figura 2- (a) Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (b) Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de soja

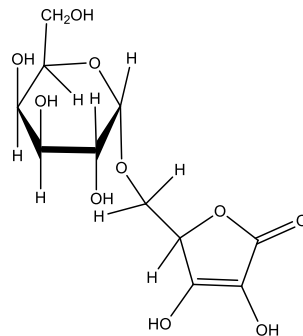


Fonte: Do autor

2.3 SUBSTÂNCIAS RELATADAS PARA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Apesar dos extensos estudos sobre novas técnicas que permitam a eliminação da *Sclerotinia sclerotiorum* do solo, poucos compostos foram relatados para este fungo. Keates et al. (1998) isolou o 5-O- (α -D-Galactopiranosil)-D-Glicero-Pent-2-Enono-1,4-lactona cuja a estrutura é demonstrada na figura 3.

Figura 3- Composto isolado por KEATES et al. (1998).

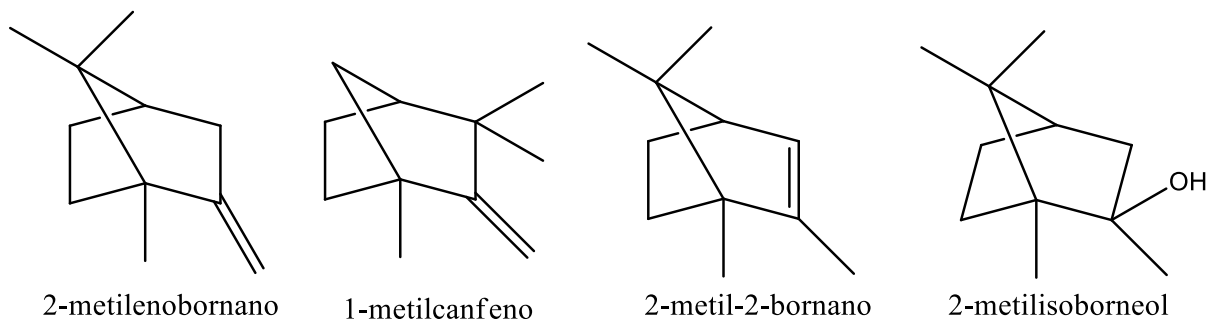


5-O-(α -D-Galactopiranosil)-D-Glicero-Pent-2-Enono-1,4-Lactona

Fonte: Do autor

Fravel et al. (2002) identificou compostos químicos voláteis emitidos a partir de *S. sclerotiorum*, entre eles: 2-metil-2-bornano, 1-metilcanfeno, 2-metilenobornano, 2-metilisoborneol representados na figura 4, sendo o odor característico terroso e mofado do fungo *S. sclerotiorum* atribuído ao composto 2-metilisoborneol.

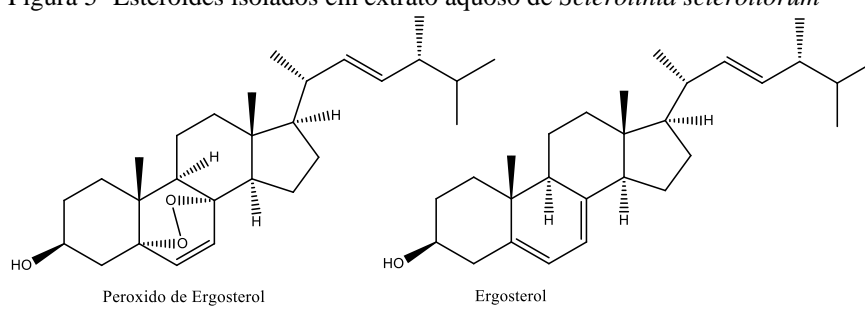
Figura 4- Compostos voláteis constituintes da *Sclerotinia sclerotiorum*



Fonte: Do autor

Garcez et al. (2005) isolou esteróides como ergosterol e peróxido de ergosterol.

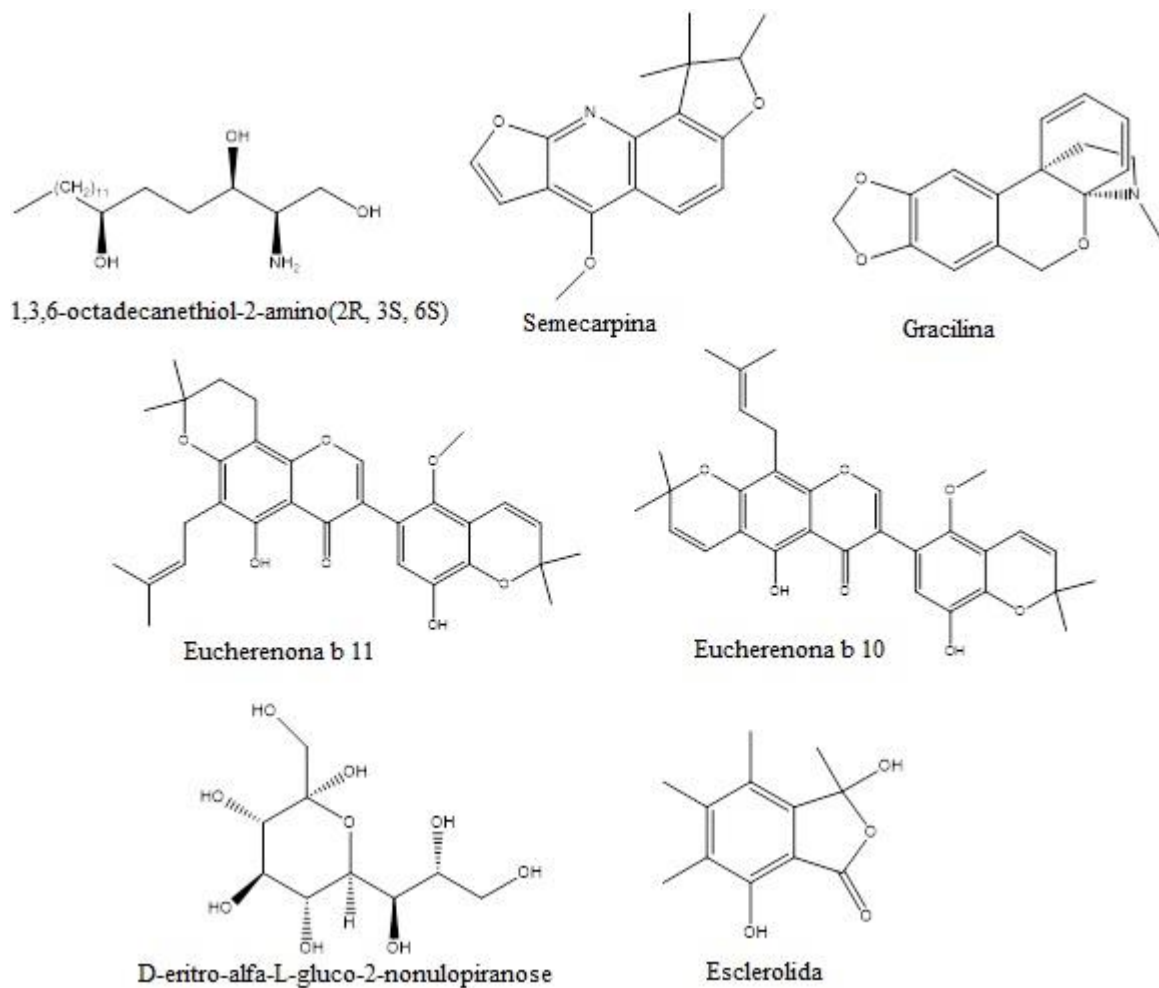
Figura 5- Esteroides isolados em extrato aquoso de *Sclerotinia sclerotiorum*



Fonte: Do autor.

Azevedo et al. (2016) identificou os compostos descritos na figura 6.

Figura 6- Compostos desreplcados por Azevedo et al. 2016.



Fonte: Do autor

Roque (2013) identificou o manitol e a trealose (205,07; 365,11 e 381,08 m/z) em *Sclerotinia sclerotiorum*. Starratt (2002) identificou o composto 1,8 dihidroxinaftaleno monoglicosido.

2.4 PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos naturais como fontes de medicamentos, remonta os primórdios da nossa civilização, em diversas culturas espalhadas pelo tempo e pelo espaço. Os mais diversos produtos naturais foram utilizados como fonte de fármacos a fim de aliviar as doenças que afligiam os povos antigos, ao longo de nossa evolução como sociedade, também evoluiu a forma como utilizamos os produtos naturais e devido ao maior conhecimento sobre plantas, fungos e micro-organismos que adquirimos (JI; LI; ZHANG, 2009).

Os produtos naturais são produzidos pelo metabolismo secundário de organismos vivos através das vias metabólicas biosintéticas como as vias do mevalonato, acetato, chiquimato e dos alcaloides, sendo produzidos pelas plantas, por micro-organismos como fungos, animais, insetos, algas e pelo próprio homem (DEWICK, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2013).

A descoberta de que fungos poderiam ser fontes de produtos naturais com propriedades farmacológicas ocorre a partir da descoberta da penicilina por Fleming em 1928, hoje os fungos são considerados uma das mais abundantes fontes de produtos naturais (STROBE, 2004; TULP, 2004). Diversos fármacos utilizados hoje são provenientes de fungos dentre estes antibióticos das classes da penicilina e da cefalosporina, fármacos redutores do colesterol como a lovastatina e imunossuppressores como a ciclosporina e a rapamicina (GREVE, 2010; CRAGG; NEWMAN, 2005).

Muitos dos fármacos utilizados atualmente são de origem natural. A maioria das substâncias sintéticas foi criada a partir de modelos estruturais derivados de produtos naturais. Cerca de 80% dos medicamentos são de origem natural ou foram inspiradas em compostos naturais (HARVEY, 2008). Mais de 50% dos fármacos disponibilizados no mercado no período de 1981 à 2002 são derivados de produtos naturais ou possuem grupo farmacofórico de produtos naturais e vários outros produtos naturais estão sendo estudados como protótipos para novos fármacos (BRANDÃO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2016). O Brasil apresenta uma flora e fauna extremamente rica, o que contribui e facilita a busca por moléculas bioativas com propriedades farmacológicas, às plantas representam a fonte mais antiga e promissora de medicamentos para o homem, estima-se que menos 10% de todas as espécies de plantas foram estudadas (BRANDÃO et al., 2010).

2.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é o mecanismo de defesa do organismo frente a uma lesão, sendo normalmente caracterizada por diversos sintomas dentre os quais os mais comuns são dor e febre local (COTRAN et al., 2000). Medicamentos anti-inflamatórios são conhecidos pela humanidade há pelo menos cem anos, atualmente a busca por novos medicamentos anti-inflamatórios está voltada para aqueles capazes de inibir a ação das enzimas envolvidas diretamente no processo inflamatório, entre elas a enzima ciclooxigenase, que apresenta duas isoformas intituladas COX-1 e COX-2 responsáveis pelo acúmulo no local da inflamação de prostaglandinas, a enzima lipooxigenase LOX e outros mediadores químicos responsáveis pela dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores (RANG et al., 2000; KUMMER, 2002). Uma vez iniciado, o processo inflamatório pode se resolver neutralizando e eliminando o agente agressor e restaurando o tecido afetado. O processo de resolução envolve além da neutralização e eliminação do agente agressor, da normalização da permeabilidade vascular, cessação da infiltração, apoptose dos neutrófilos presentes no sítio inflamatório e remoção dos corpos estranhos (GILROY et al., 2004; KUMAR et al., 2005; WEIGERT et al., 2009). Mas o processo inflamatório pode não cessar e evoluir resultando em uma fibrose (substituição por tecido conectivo) ou ainda progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor ou falhas nos processos de resolução (KUMAR et al., 2005). O processo inflamatório está envolvido em diversos tipos de doenças sendo responsável por iniciá-las ou por agravar o quadro de algumas destas, dentre as quais se destacam tendinites, inflamações respiratórias e doenças autoimunes (COUTINHO et al., 2009).

Torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir as vias inflamatórias reguladas pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, produtos naturais são amplamente usados para o tratamento da inflamação (KUMMER, 2002).

3 JUSTIFICATIVA

Devido à vasta gama de hospedeiros que a *Sclerotinia sclerotiorum* possui esta se encontra distribuída por todas as partes do globo, causando prejuízos a grandes culturas em diversos países, fazendo com que o foco das pesquisas em todo o mundo esteja centrado na sua eliminação do solo e assim muito pouco se estudou sobre possíveis usos deste fungo como fonte de produtos naturais com propriedades farmacológicas.

Medicamentos oriundos de produtos naturais são utilizados desde os primórdios da civilização nas formas de extratos alcoólicos, chás e emplastos.

Os fungos representam hoje uma fonte abundante de produtos naturais, a partir destes foram descobertos medicamentos de extrema importância como a penicilina, sabe-se hoje que os fungos produzem compostos de diversas classes representando um grande potencial

A inflamação se inicia como um processo de defesa do organismo frente a organismos invasores ou substâncias irritantes, mas quando em sua fase proliferativa crônica causa à degeneração do tecido e fibrose, descobriu-se que o processo de inflamação é regido pela ação das enzimas ciclooxigenases, sendo a COX-2 a responsável pela evolução do processo inflamatório, levando a uma busca por anti-inflamatórios que inibam especificamente a ação desta enzima (KUMMER, 2002). Os micro-organismos são uma fonte importante de produtos naturais sendo ainda pouco explorada, a riqueza de fauna e flora do Brasil possibilita um ambiente propício para a proliferação de uma vasta gama de micro-organismos que podem possuir diversas propriedades entre elas antibióticos e anti-inflamatórios (BRANDÃO et al. 2010).

4 OBJETIVOS

Objetivo Geral e detalhamento dos objetivos específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química da *Sclerotinia sclerotiorum* e seu potencial farmacológico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e identificar compostos constituintes químicos presentes nos extratos do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, através de ressonância magnética nuclear, massa de alta resolução.

Realizar testes biológicos *in vivo* para avaliar o possível efeito anti-inflamatório dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* de compostos isolados dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

5 PARTE EXPERIMENTAL

Detalhamento de todos os materiais, métodos, reagentes, e as metodologias utilizadas a fim de alcançar os objetivos propostos.

5.1 MATERIAIS, INSTRUMENTOS E REAGENTES UTILIZADOS

Detalhamento das condições, materiais, instrumentos e reagentes utilizados, bem como das condições necessárias para a utilização destes.

5.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos a foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo AVANCE III, da UNIFAL-MG á 300 MHz, com campo de 7,05 Tesla, utilizando como solventes clorofórmio deuterado e dimetilsulfoxido (DMSO) deuterado. As substâncias isoladas foram identificadas por ressonância magnética nuclear unidimensionais (^1H , ^{13}C).

5.1.2 Espectrometria de Massas

Os espectros da fração hexânica foram obtidos através do equipamento LC-MS com sistemas ESI-QTOF (alta resolução), sendo a ionização da amostra por elétron spray, com Coluna: AcclaimTM RSLC 120, C18 2,2 μm 120 \AA 2,1X100 mm/ Pré-coluna, utilizando-se como solventes:

Solvente A: Água 0,1% de ácido fórmico e 0,025 % de hidróxido de amônio

Solvente B: ACN 0,10 % de ácido fórmico e 0,025 % de hidróxido de amônio

Com Fluxo de 0,4 mL/ min, pelo método gradiente.

5.1.3 Evaporação dos solventes

As frações obtidas foram concentradas e/ou secas usando-se:

Rotaevaporadores IKA RV8 da SOVEREIGN BRASIL, e IKA RV05 basic da SOVEREIGN BRASIL sob pressão reduzida.

5.1.4 Liofilizador

As frações após a retirada dos solventes foi então liofilizadas para a retirada da água presente nas amostras visto que a água presente nas frações pode agir como interferente nas análises e até mesmo possibilitar o crescimento de micro-organismos nos extratos, para tanto foi utilizado o liofilizador LJJ04 da JJ CIENTIFICA, durante 72h a uma temperatura média de -50°C e a uma pressão média de 340 mmHg.

5.1.5 Solventes utilizados

Não deuterados: Dinamica, Synth P. A.

Deuterados: Aldrich Chemistry P.A.

5.1.6 Cromatografia em coluna (CC)

A cromatografia em coluna foi feita usando sílica 60 - 70 a 230 flash. Também foi realizada coluna cromatografia em coluna tipo *Sephadex* da marca AMBERLITE.

5.1.7 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em CCD foram realizadas em placas de sílica gel 60 da marca MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG

5.2 PROCEDIMENTOS

Detalhamento dos processos utilizados e detalhamento das condições necessárias para estes.

5.2.1 Coleta e identificação

A *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtida na forma de escleródios a partir de lotes de sementes de soja contaminadas, proveniente de plantações de soja do Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). O material recebido foi devidamente armazenado no laboratório de fitoquímica e química medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas. Após o armazenamento os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* foram então separados das sementes de soja e sementes de plantas invasoras por processo de separação manual.

5.2.2 Trituração

Os escleródios separados foram então armazenados e posteriormente triturado em moinho de facas tipo cróton modelo TE-625 visando assim garantir que os escleródios possuíssem maior área superficial durante a extração. Visando assim um melhor rendimento do extrato.

5.2.3 Obtenção do extrato

A massa de escleródios foi então transferida para o mariote (vidraria própria para a preparação de extratos) devido à economia de solvente que este proporciona em seguida adicionou-se o solvente, álcool etílico P.A. + 30% de água (etanol:água) 7:3 de acordo com a tabela 1.

Tabela 1- Cronograma de obtenção dos extratos

Massa de escleródios (Kg)	Volume de etanol (L)	Início	Fim
2.947,6	3,0	07/12/15	15/12/15
1.680,5	2,7	05/07/16	05/08/16

Fonte: Do autor

5.2.4 Particionamento

O particionamento visa à separação dos constituintes químicos do extrato etanólico de *Sclerotinia sclerotiorum*, de acordo com as suas polaridades, para tanto, foram empregados os solventes, acetato de etila, etanol, hexano como procedimento padrão.

5.2.5 Obtenção das frações hexânica, acetato etílica e hidroalcoólica

Utilizou-se particionamento líquido-líquido para obter-se as frações hidroalcoólica, acetato etílica e hexânica. Após pesagem do extrato bruto, este foi suspenso em solução etanol/Água (1:2), transferido para funil de separação para realizar o particionamento. A suspensão de extrato/etanol/água foi então adicionado hexano (3x500 mL), para a obtenção de compostos apolares, característicos dessa fase (fração hexânica).

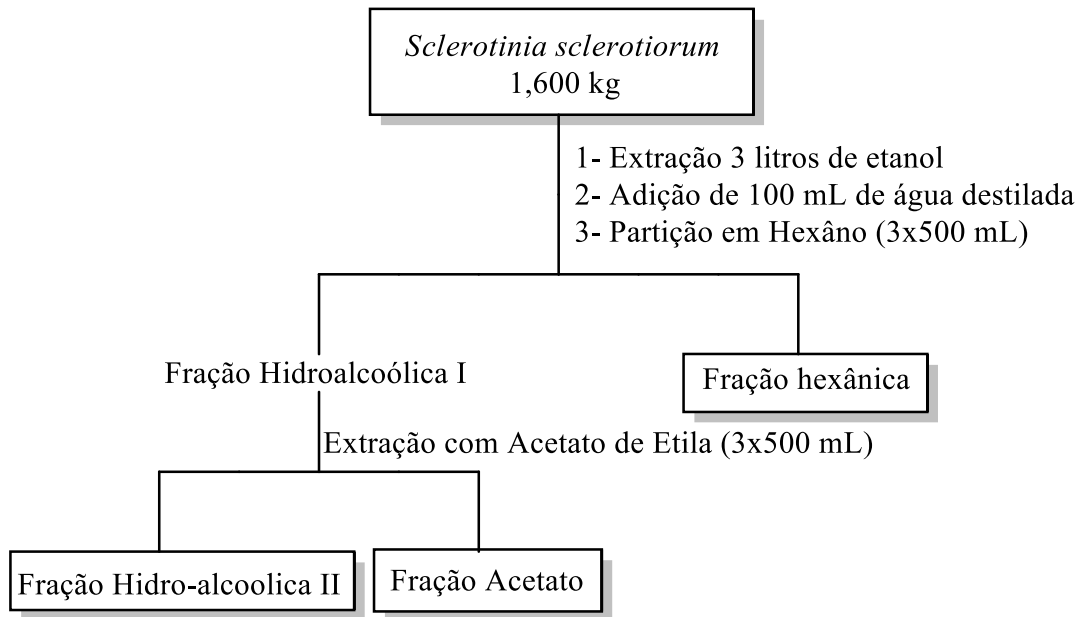
Em seguida adicionado Acetato de Etila (3x500 mL), para a obtenção de compostos que possuam polaridade intermediária (fração acetato).

Concentração da fração hidroalcoólica II, onde compostos de elevada polaridade estarão presentes.

As frações foram então concentradas em rota evaporador e em seguida liofilizadas e armazenadas ao abrigo da luz e umidade.

Para o particionamento seguiu-se o padrão de solventes (0,5/1L) para 100 gramas de amostra. Utilizou-se assim a proporção de etanol/água (100/200mL) e Hexano (300mL), acetato de etila (300mL) visando extrair todas as substâncias de diferentes polaridades presentes no extrato bruto como demonstrado no fluxograma 1.

Fluxograma 1- Obtenção das frações Hidroalcoólica II, acetato etílico e hexânica a partir de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.



fluxograma 1

Fonte: Do autor

5.2.6 Rendimento do extrato bruto - E.B.

Tabela 2- Rendimento do extrato bruto etanólico do escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum*

Massa escleródios (kg)	E.B (g)	Rendimento (%)
2.947,0	139,8	4,74
1.680,5	91,10	5,42

Fonte: Do autor.

5.2.7 Rendimento do particionamento

Tabela 3- Rendimento do particionamento do extrato de *Sclerotinia sclerotiorum*

Massa Inicial de E.B. (g)	Frações	Partições (g)	Rendimento (%)
50,5	Hexânica	25,10	49,70
	Acetato	15,63	30,95
	Hidroalcoólica II	8,74	17,31

Fonte: Do autor

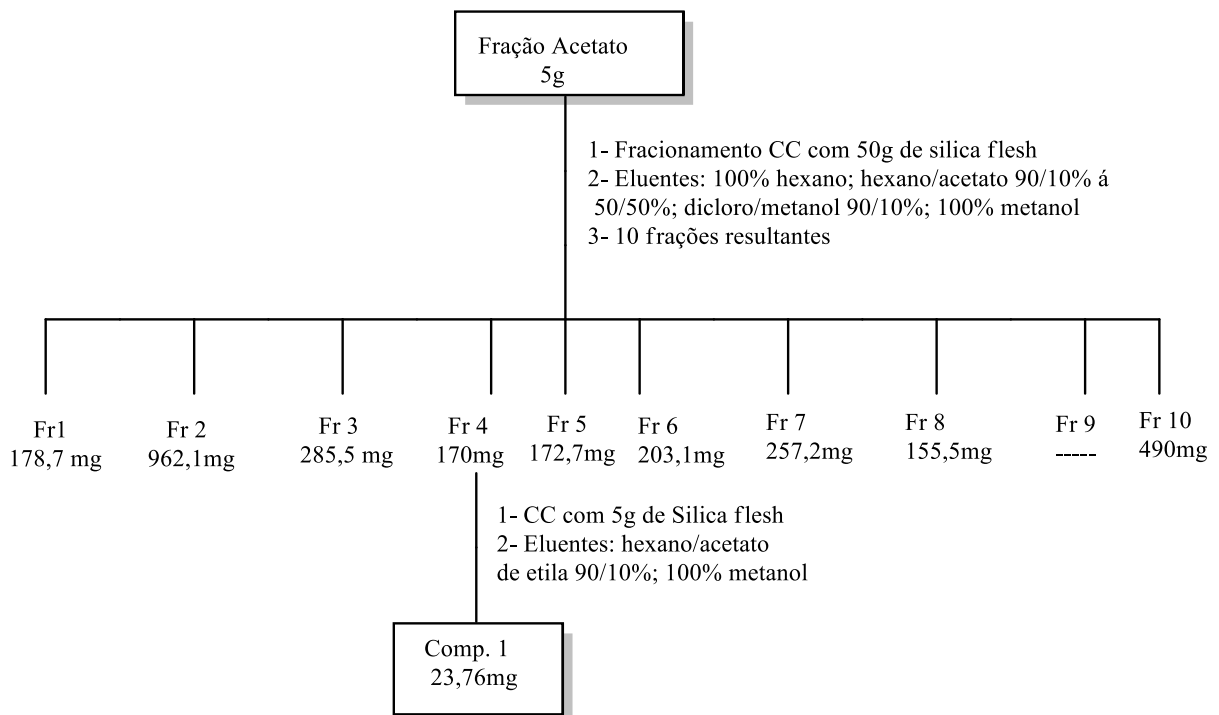
Observa-se que o rendimento da obtenção das frações é aproximadamente a 98% sendo este considerado satisfatório, pode-se observar que a fração hexânica obteve melhor rendimento, cerca de 50%, indicando que o extrato seja composto majoritariamente de

substâncias apolares, o que condiz com os dados descritos na literatura visto que a composição majoritária dos fungos ser de lipídeos.

5.2.8 Cromatografia da fração acetato de etila

Para o fracionamento dos constituintes químicos dos extratos obtidos, realizou-se cromatografia em coluna delgada com 50g de sílica 60 - 70 a 230 flash e 5g da fração acetato de etila em coluna de vidro, utilizando-se eluentes os solventes hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol, a partir da qual obteve-se um total de 10 frações as quais foram secas e em seguida foram analisadas através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com fase móvel composta de 40% hexano e 60% acetato de etila, sendo esta revelada no ultravioleta e vanilina. Como demonstrado no fluxograma 2.

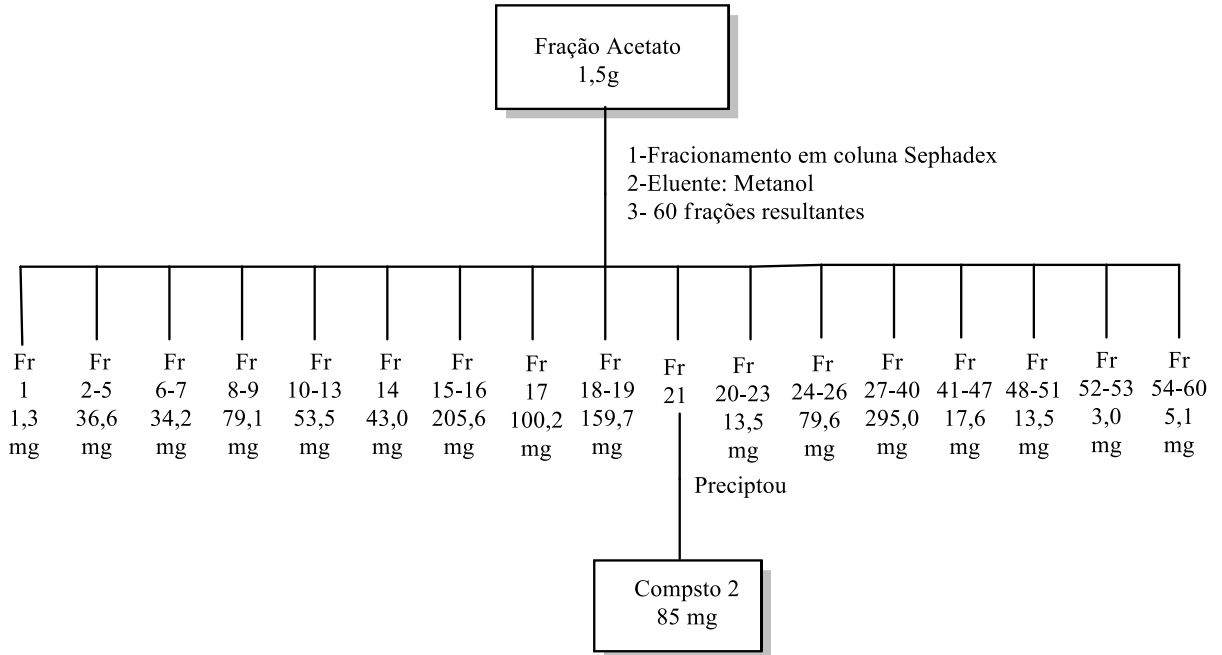
Fluxograma 2- Isolamento dos compostos obtidos a partir da fração acetato etílica do extrato de *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Do autor

Tentando-se isolar novos compostos da fração acetato foi realizada uma coluna *Sephadex* com comprimento de 2 metros, utilizando como solvente metanol P.A. e 1,5 gramas da fração acetato, a qual originou ao todo 60 frações.

A fração 21 precipitou um composto sólido branco denominado composto 2.

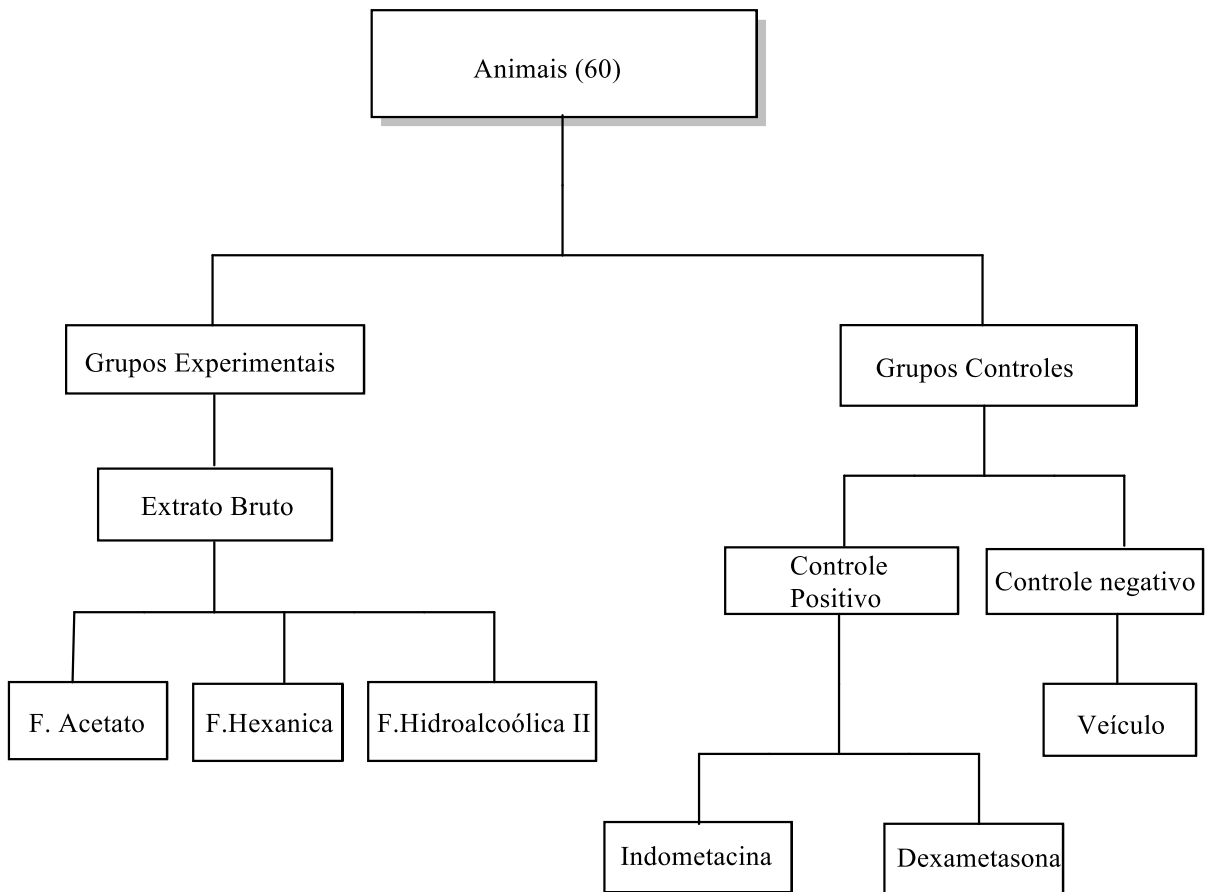
Fluxograma 3- Isolamento de compostos da fração acetato etílica através da coluna *Sephadex*.

Fonte: Do autor.

6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

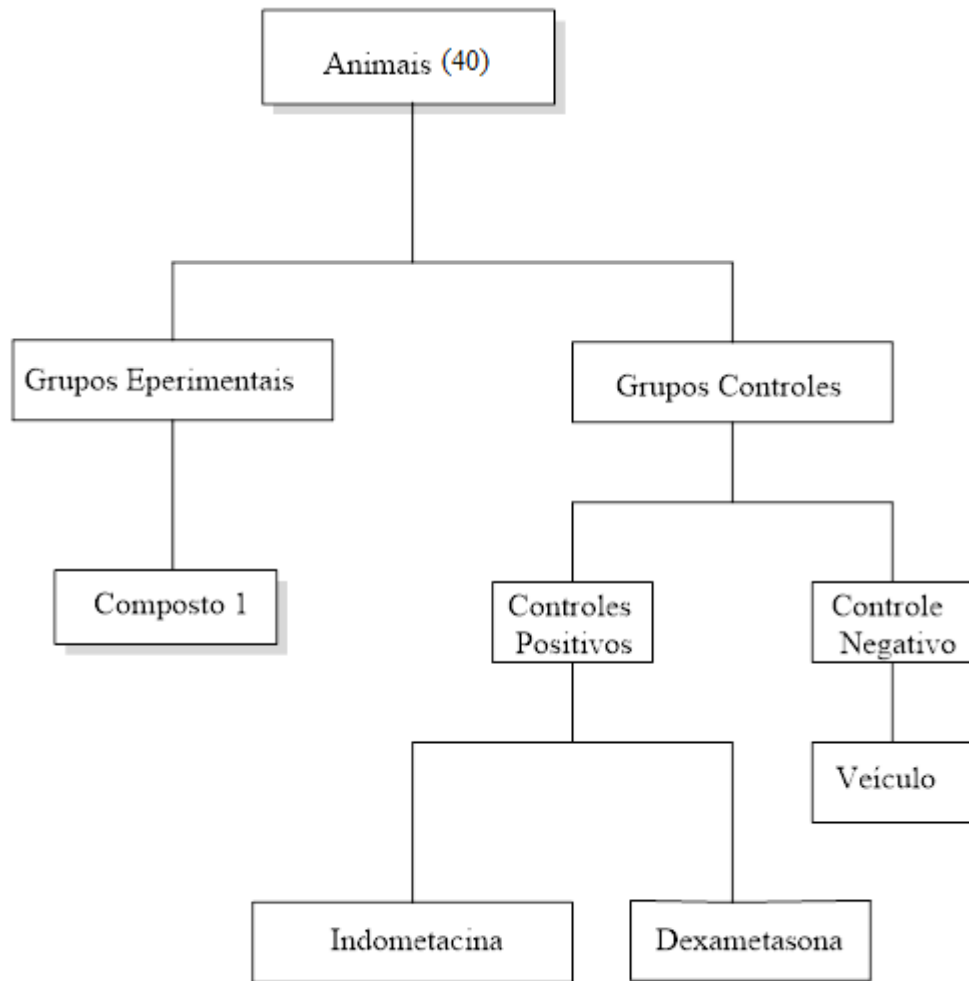
Os animais necessários para a realização dos ensaios foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG, então mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (25-35g) aclimatados às condições do laboratório, sendo então agrupados em grupos de 8 animais, sendo o delineamento experimental para o extrato bruto e frações descrito na figura 11, o delineamento experimental para os compostos 1 e 2, são descritos nas figuras 12 e 13 respectivamente.

Fluxograma 4- Perfil de análise anti-inflamatória.



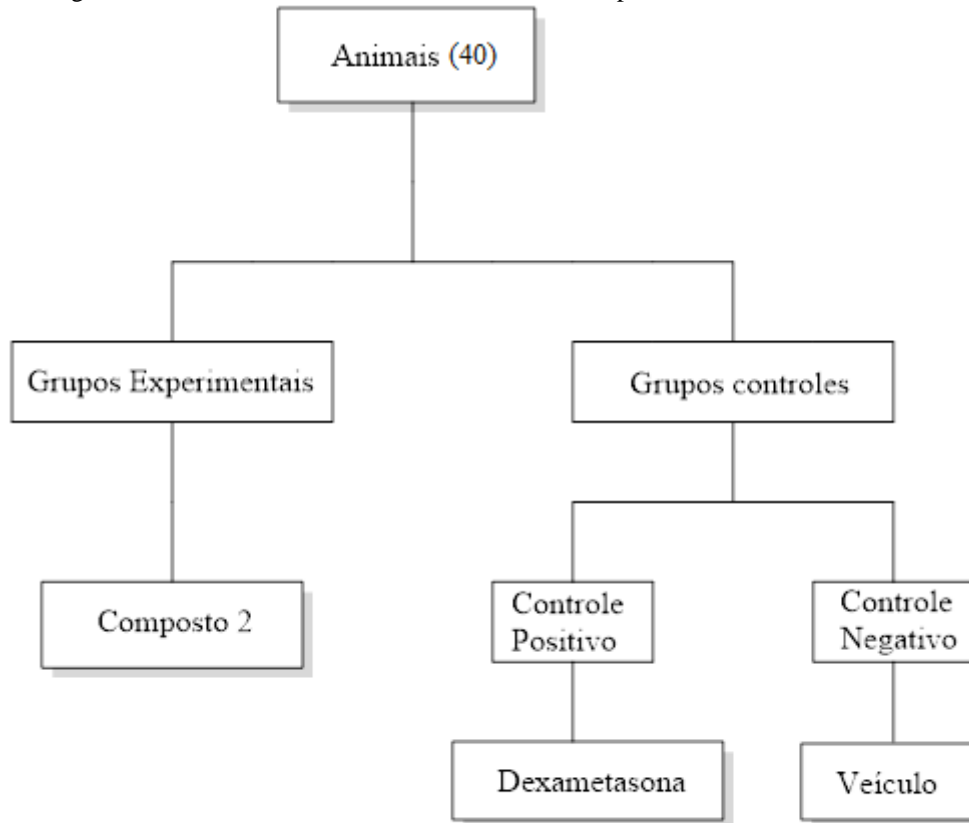
Fonte: do autor.

Fluxograma 5- Perfil de análise anti-inflamatória para o composto 1



Fonte: Do autor.

Fluxograma 6- Perfil de análise anti-inflamatória do composto 2



Fonte: Do autor.

6.1 EDEMA DE ORELHA

O ensaio foi realizado baseado na metodologia revisada por TUBARO et al. (1985), na sala de experimentação animal do laboratório de fitoquímica e química medicinal. A inflamação cutânea foi então induzida na orelha esquerda dos camundongos (n=8) pela aplicação tópica do óleo de cróton 5% dissolvido em acetona, enquanto que, na orelha direita foi aplicado somente acetona, como veículo. O ensaio foi iniciado no período da manhã (9h - 10h), com a aplicação de 20 μ L da solução irritante (óleo de cróton) e após trinta minutos, foi realizado tratamento tópico com doses dos extratos nas concentrações de 0,5 mg/orelha. Os animais do grupo controle negativo receberam apenas a solução irritante (óleo de cróton), enquanto que os do grupo controle positivo foram tratados topicamente com o fármaco de referência (indometacina - 0,5 mg/orelha e dexametasona - 0,5 mg/orelha). A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical, 6h após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de ambas orelhas, utilizando-se um punch. A quantificação do

edema foi determinada por meio da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das orelhas direitas de cada um dos animais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way seguido teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP.

Os fragmentos obtidos neste ensaio de edema de orelha foram então mantidos em 200 μ L de tampão NaEDTA/NaCl pH 4,7 a -20 °C até serem analisados.

6.2 MPO

A análise de MPO visa quantificar a concentração da enzima mieloperoxidase, sendo esta uma das principais enzimas reguladoras da via inflamatória da LOX, presente nas orelhas tratadas com os grupos experimentais após a indução do processo inflamatório e assim determinar se a ação anti-inflamatória observada se deve pelo processo de inibição da via inflamatória da LOX pela inibição da ação da enzima mieloperoxidase.

A manipulação dos fragmentos sempre foi realizada sob refrigeração. Os fragmentos foram homogeneizados no tampão utilizando o macerador de tecidos (13000 rpm; 3 vezes) e centrifugados a 3000 rpm por 15 min. Os precipitados foram ressuspensos em 200 μ L de tampão pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio e homogeneizados novamente. As amostras foram então centrifugadas e os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação da enzima MPO. Foram seguidas as recomendações dos seus respectivos kits (MPO n° de catálogo 600620, Cayman Chemical; PG: n° de catálogo 514010, Cayman Chemical; LC: n° de catálogo 520111 Cayman, Chemical) (TUBARO et al. 1985). Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

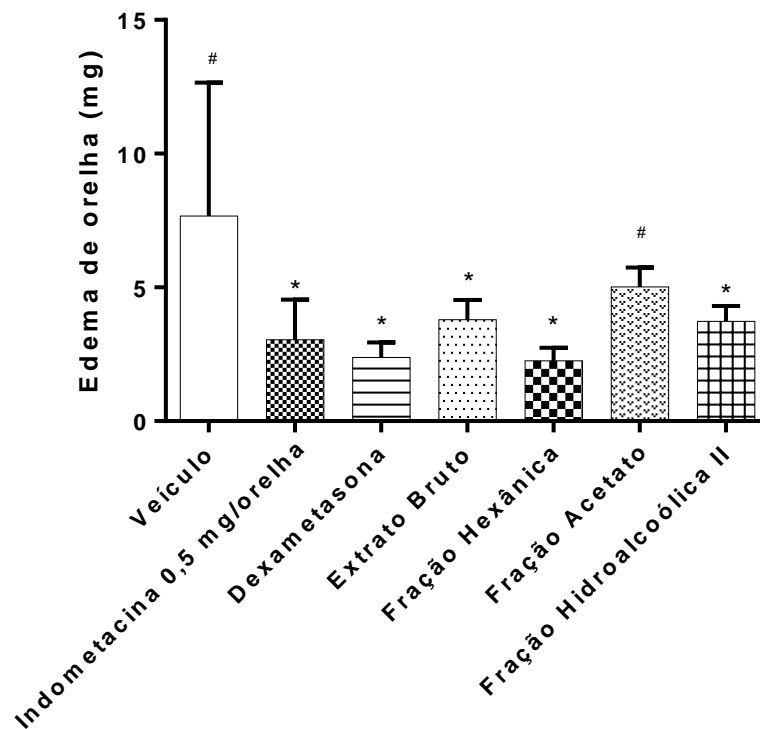
Para uma melhor compreensão dos resultados estes foram divididos em atividade biológica, identificação dos compostos isolados e desrepliação de compostos constituintes da fração hexânica.

7.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os resultados dos testes de atividade biológica serão discutidos separadamente, sendo divididos em edema de orelha e mieloperoxidase.

7.1.1 Edema de orelha

O teste de edema de orelha avalia a atividade anti-inflamatória através da diferença de peso entre a orelha tratada com o fármaco de referência e a orelha tratada com as substâncias de interesse. Testou-se o extrato bruto, e as frações acetato etílica, hexânica e hidroalcoólica 2, na concentração de 0,5 mg para assim observar se estes possuem atividade anti-inflamatória como demonstrado no gráfico 1. Pode-se observar que quando comparada ao controle negativo as frações hexânica, hidroalcoólica 2 possuem atividade anti-inflamatória e são significativamente diferente do controle negativo $p < 0,05$, portanto a fração acetato não foi significativamente diferente do controle negativo e não apresentando ação anti-inflamatória. Quando comparados ao fármaco de referência, a indometacina, todos os extratos foram estatisticamente iguais á indometacina sendo que apenas o controle negativo foi significativamente diferente deste. A porcentagem de inibição demonstrou que a fração hexânica possui inibição comparável a do fármaco de referência 70,6%, o que pode ser atribuído a grande quantidade de lipídeos constituintes dessa fração.

Gráfico 1- Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum*.

* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde $p \leq 0,05$ e ^{ns} indica que não há significância estatística, ainda em comparação com o veículo. # indica os níveis de significância em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde $p \leq 0,05$.

Fonte: Do autor

Tabela 4- Percentagem de inibição do edema de orelha dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum* e dos controles.

Tratamento	Edema de orelha Média (mg) ± E.M.P	% Redução
Veículo	7,671 ± 4,984 [#]	-
Indometacina	3,043 ± 1,501	60,3 *
Dexametasona	2,565 ± 0,724	66,6*
Extrato Bruto	3,800 ± 0,737	50,5 *
Fração Hidroalcoólica II	3,729 ± 0,579	51,4 *
Fração Hexânica	2,257 ± 0,483	70,6 *
Fração Acetato	5,014 ± 0,727	34,6 ^{ns}

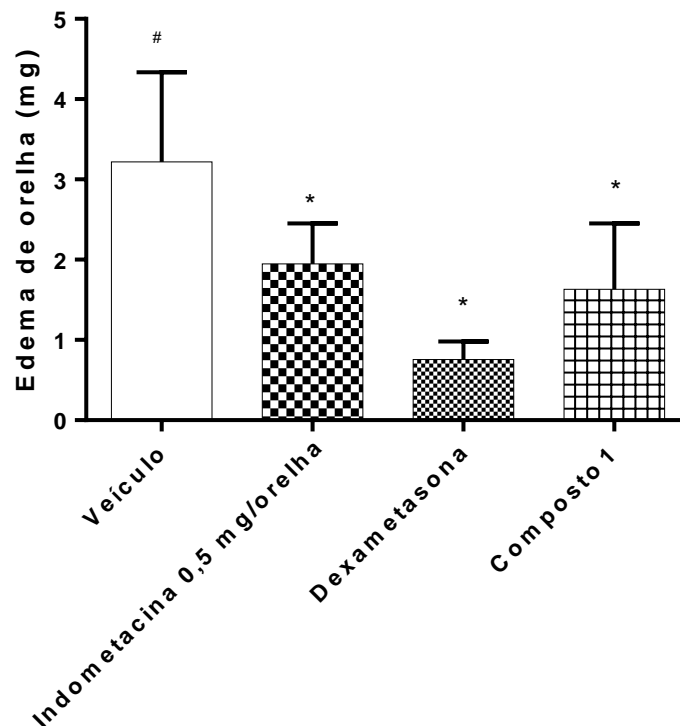
* indica os níveis de significância em comparação com o veículo, onde $p \leq 0,05$ e ^{ns} indica que não há significância estatística, ainda em comparação com o veículo. # indica os níveis de significância em comparação com o fármaco referência, indometacina, onde $p \leq 0,05$.

Fonte: Do autor.

Após purificação e isolamento de compostos constituintes da fração acetato do extrato de *Sclerotinia sclerotiorum*, foram analisados para atividade anti-inflamatória pelo teste de edema de orelha o composto 1 demonstrado no gráfico 2, e o composto 2 como visto

no gráfico 3. Assim foi possível determinar que o composto 1 possui atividade anti-inflamatória significativa. Analisando-se a tabela 5 pode-se observar que quando comparado ao fármaco de referencia o composto 1 possui porcentagem de inibição do edema similar, sendo que este inibi cerca de 53% o edema enquanto que o fármaco de referencia inibiu cerca de 44% do edema.

Gráfico 2- Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos isolados da fração acetato de *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Do autor.

Tabela 5- Porcentagem de inibição do edema de orelha dos compostos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* e dos controles.

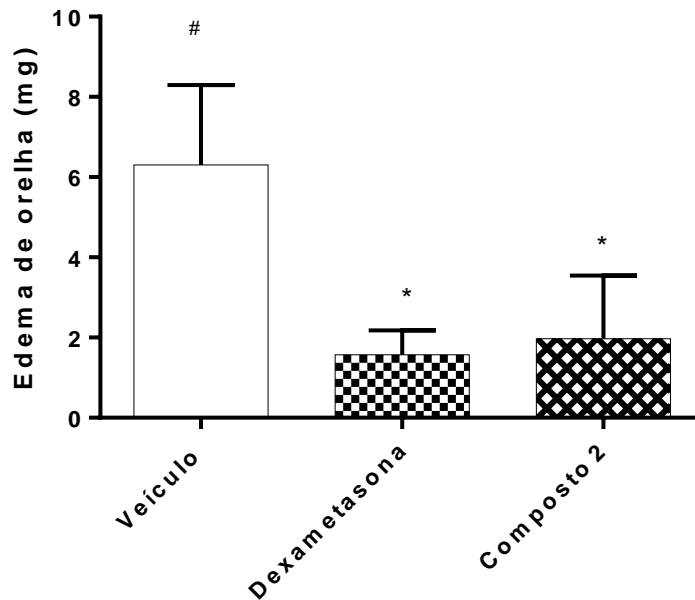
Tratamento	Edema de orelha (mg ± E.M.P)	% Redução
Veículo	3,50 ± 1,06	-#
Indometacina	1,95 ± 0,50	44*
Composto 1	1,63 ± 0,82	53*

Fonte: Do autor.

Submeteu-se o composto 2 ao teste anti-inflamatório de edema de orelha como demonstrado no gráfico 3, assim pode-se observar que o composto 2 possui atividade anti-inflamatória significativa quando comparados ao fármaco de referencia no caso a dexametasona. A porcentagem de redução do edema observada na tabela 6, demonstrou que o

composto 2 inibiu 68% do edema enquanto que a dexametasona inibiu 75% do edema, podendo então concluir que o composto 2 teve uma importante atividade anti-inflamatória.

Gráfico 3- Avaliação da atividade anti-inflamatória do composto 2



Fonte: Do autor.

Tabela 6- Percentagem de inibição do edema de orelha do composto 2.

Veículo	Edema de Orelha (mg ± E.M.P)	% Redução
Veículo	6,30±1,99	-#
Dexametasona	1,57±0,61	45*
Composto 2	1,97±1,58	68*

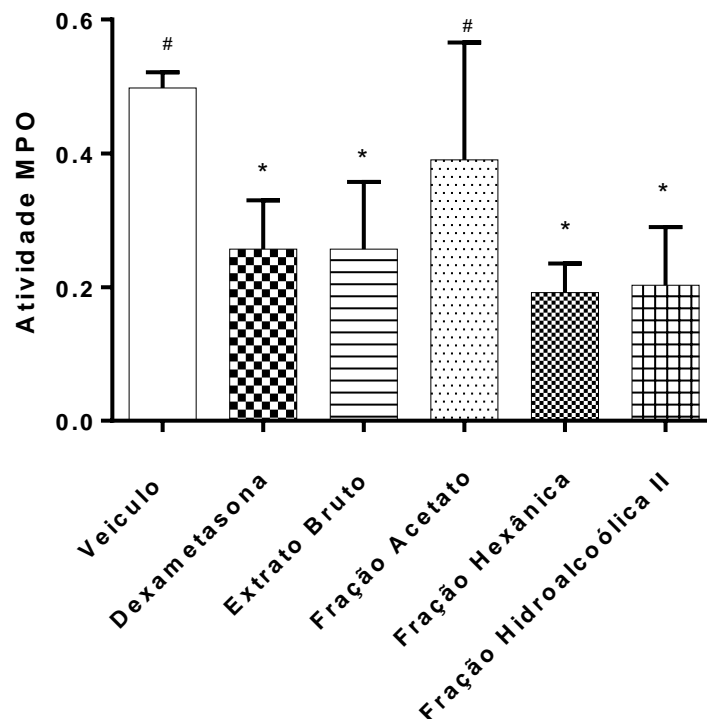
Fonte: Do autor.

7.1.2 Mieloperoxidase

Através da quantificação da enzima mieloperoxidase, foi possível determinar que as frações estatisticamente diferentes do veículo demonstrando assim que apresentaram níveis significativos de mieloperoxidase e portanto apresentaram ação anti-inflamatória por inibição da COX, visto que a presença de MPO indica que esta não foi inibida. Quando comparadas ao controle apenas a fração acetato foi significativamente diferente do controle, e esta apresentou os maiores níveis de mieloperoxidase indicando que a fração acetato não inibiu a ação da enzima MPO, portanto não inibi a via da LOX. As frações hexânica, hidroalcoólica 2 e o

extrato bruto, apresentaram níveis baixos de MPO inibindo assim o processo inflamatório iniciado por esta enzima. A fração Acetato não inibiu a via da LOX devendo portanto inibir a via da COX, por isso decidiu-se isolar compostos desta fração para tentar assim identificar quais compostos poderiam causar a porcentagem de inibição observada, estes compostos após isolados serão submetidos aos testes anti-inflamatórios como demonstrado no gráfico 4.

Gráfico 4- Efeito dos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).



Fonte: Do auto

Tabela 7- Quantificação de mieloperoxidase nos extratos de *Sclerotinia sclerotiorum* (MPO).

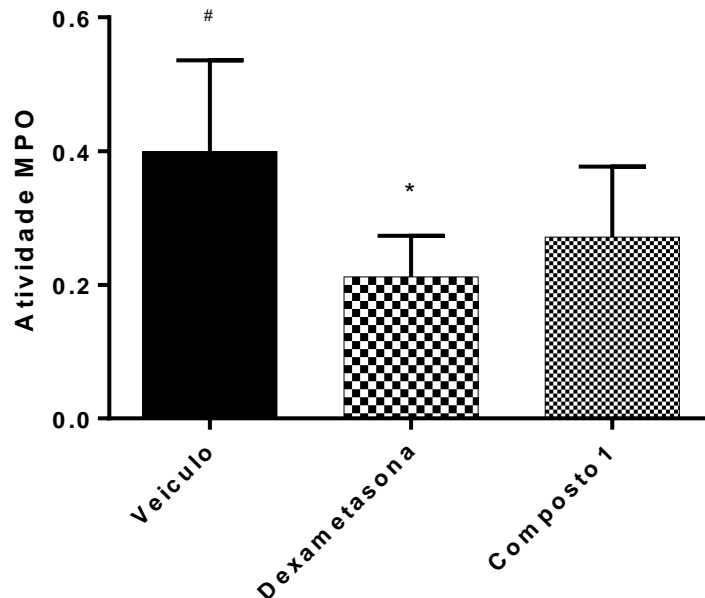
Tratamento	Abs \pm σ
Veículo	0,498 \pm 0,024 [#]
Dexametasona	0,256 \pm 0,073*
Extrato Bruto	0,257 \pm 0,100*
Fração Hidroalcoólica 2	0,216 \pm 0,075*
Fração Hexânica	0,192 \pm 0,044*
Fração Acetato	0,547 \pm 0,259 [#]

Fonte: Do autor.

Após o fracionamento e isolamento dos compostos constituintes da fração acetato, decidiu-se testar o composto 1 ao teste de quantificação de mieloperoxidase como demonstrado no gráfico 5, para assim tentar determinar a via inflamatória inibida pelo composto como observado no teste de edema de orelha. Foi possível observar que embora o

composto 1 possui a atividade anti-inflamatória esta não se deve a inibição da enzima mieloperoxidase como observado pelos valores descritos na tabela 8.

Gráfico 5- Efeito dos compostos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* no recrutamento de neutrófilos via dosagem de mieloperoxidase (MPO).



Fonte: Do autor

Tabela 8- Quantificação de mieloperoxidase do composto 1.

TRATAMENTO	Abs ± Desvio
Veículo	0,3993 ± 0,1366 [#]
Dexametasona	0,2117 ± 0,0614 [*]
Composto 1	0,2715 ± 0,1052

Fonte: Do autor.

7.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

A partir dos resultados obtidos nos testes de atividade anti-inflamatória decidiu-se isolar inicialmente os compostos constituintes da fração acetato de etila, e assim esclarecer a baixa atividade anti-inflamatória observada no teste de edema de orelha. Serão isolados compostos de todas as frações excetuando-se a fração hidro alcoólica devido a esta ter apresentado uma quantidade alta de lipídeos em seu perfil cromatográfico.

7.2.1 Composto 1

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (apêndice A), pode-se observar sinais de hidrogênios hibridizados sp^2 no duplo dubleto em δ_{H} 6,24 (d, 1H, 9,0 Hz); δ_{H} 6,5 (d, 1H, 9,0 Hz) e no duplo dubleto em δ_{H} 5,16 (dd, 2H, 7,77 e 12,06 Hz), indicando assim haver duas duplas ligações na molécula. Também observou-se sinais de hidrogênio entre δ_{H} 0,79 (m) e δ_{H} 1,24(s) que indicam a presença de varias metilas na molécula, os sinais entre δ_{H} 1,5(m) e δ_{H} 2,0 (m), juntamente com os sinais das metilas observados é característico de compostos da classe dos esteroides.

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C (apêndice B), foi possível observar 4 sinais em 135,42; 135,18; 132,29 e 130,72 ppm característicos de carbonos hibridizados sp^2 confirmando assim os dados do RMN de ^1H de que o composto 1 possui duas duplas ligações em sua estrutura. Observou-se um sinal de carbono em 66,44 ppm sendo este característico de carbono ligado a átomo eletronegativo, indicando assim a possível existência de uma hidroxila na molécula. Os carbonos observados em 82,18 e 79,44 ppm indicam a presença de carbono ligado a peroxido, indicando assim a presença de um grupo peroxido na estrutura do composto 1. Também é possível observar sinais entre 10 e 25 ppm correspondentes a sinais de carbonos metilênicos indicando a presença de ao menos 6 metilas na molécula, bem como sinais entre 55-30 ppm correspondentes a carbonos metínicos indicando a presença de cadeia metínica.

À partir dos dados observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C especulou-se que este composto poderia se tratar do peroxido de ergosterol, devido a este ser encontrado amplamente em fungos, por ser um componente da parede celular destes. Assim para confirmar-se esta suposição foi realizada comparação entre os dados experimentais e os dados descritos na literatura por Kim et al. 1997 como observado na tabela 9.

Pode-se então concluir que o composto 1 se trata realmente do peroxido de ergosterol cuja estrutura é representada na figura 8.

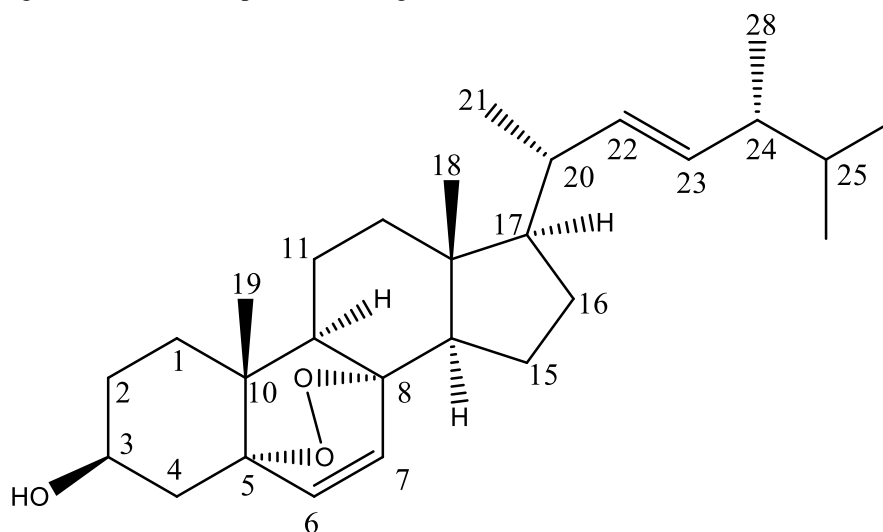
O peroxido de ergosterol é comumente isolado de fungos e apresenta atividades anticancerígena comprovada (TAKEI, 2005; NEWMAN, 2000). Além da propriedade anticarcinogênica o peroxido de ergosterol, 5α , 8α -epidioxi-22*E*-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, possui atividade antioxidante e imunossupressora, ainda não esta esclarecido a forma como o peroxido de ergosterol exerce atividade anticancerígena (KOBORI et al. 2007). Entretanto Takei 2005 demonstrou que este é capaz de induzir a atividade apoptótica em linhagens de células cancerígenas.

Tabela 9- Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o peróxido de ergosterol

	<i>Exp.</i> ^1H	<i>Exp.</i> ^{13}C	<i>KIM et al</i> ^1H	<i>KIM et al</i> ^{13}C
1	1,70 (m); 1,94 (m)	34,68	1,71 (dd, 13,5; 3,1), 1,98 (dd, 13,5;3,1)	35,06
2	1,54; 1,83 (m)	30,04	1,55 (dd-like), 1,85 (dd-like)	30,47
3	5,14 (m)	66,44	3,98 (m)	66,84
4	1,90 (m); 2,07(dd,5,19; 1,8)	36,87	1,94 (dd-like), 2,11 (dd-like)	37,29
5	-	82,18	-	83,10
6	6,50 (d, 9,0)	135,42	6,51 (d, 8,6)	135,80
7	6,24 (d, 9,0)	130,72	6,25 (d, 8,6)	131,12
8	-	79,44	-	79,82
9	1,50 (m)	51,07	1,50 (dd-like)	51,43
10	-	36,95	-	37,33
11	1,29(m); 1,53(m)	23,39	1,22 (m), 1,53 (m)	23,77
12	1,24 (m); 1,93 (m)	39,33	1,25 (m), 1,96 (m)	39,70
13	-	44,55	-	44,93
14	1,57 (m)	51,67	1,57 (m)	52,05
15	1,42(m); 1,60(m)	20,62	1,40 (m), 1,65 (m)	21,01
16	1,36(m); 1,80(m)	28,63	1,35 (m), 1,80 (m)	29,05
17	1,21(m)	56,18	1,24 (m)	56,55
18	0,81(s)	12,86	0,83 (s)	13,25
19	0,89(s)	18,16	0,89 (s)	18,57
20	1,95(m)	39,72	2,03 (m)	40,14
21	1,00 (d, 6,6)	20,87	1,00 (d, 6,6)	21,26
22	5,16 (dd, 12,06; 7,77)	135,19	5,15 (dd, 15,2;7,7)	135,58
23	5,20 (dd, 8,16; 5,61)	132,29	5,22 (dd, 15,2,8,2)	132,40
24	1,85(m)	42,76	1,85 (m)	43,14
25	1,51(m)	33,05	1,50 (m)	33,44
26	0,81(s)	19,63	0,82 (d, 6,7)	20,03
27	0,83(d, 6,0)	19,94	0,84 (d, 6,7)	20,34
28	0,91(d, 2,1)	17,55	0,91 (d, 6,7)	17,95

Fonte: Do autor.

Figura 7- Estrutura do peróxido de ergosterol



Fonte: Do autor

7.2.2 Compostos 2

A análise dos espectros de ^1H e ^{13}C RMN do composto 4 (apêndices C e D) permitiu concluir que os compostos 4 e 6 na verdade se tratam do mesmo composto e que este trata do composto manitol, devido aos picos no espectro de hidrogênio característicos deste composto em δ_{H} 3,3 (s); δ_{H} 3,4 (m); δ_{H} 3,5 (m); e δ_{H} 3,6 (m); confirmados pelo espectro de RMN de ^{13}C que apresentou picos já descritos na literatura como sendo característicos do manitol em δ_{H} 64; δ_{H} 70 e δ_{H} 71,78.

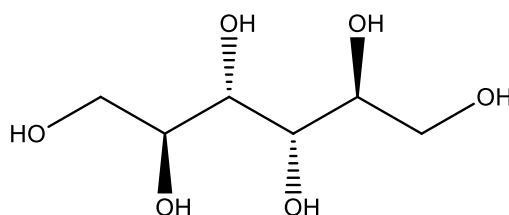
O manitol é um alditol (derivado de um glucido por redução do grupo aldeído a álcool) com seis carbonos, é uma molécula com elevada capacidade de armazenamento de energia, sendo produzido na natureza por uma vasta gama de organismos, entre estes destacam-se fungos, levedura e bactérias (MORADINI, 2013). O manitol possui diversas aplicações entre estas destaca-se a sua utilização como edulcorante na fabricação de compostos dietéticos e como excipiente de comprimidos na indústria farmacêutica (OLIVEIRA, et. al. 2009).

Tabela 10- Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o manitol.

	Exp. ^1H	Exp. ^{13}C	Roque, 2013 ^1H	Roque, 2013 ^{13}C
1 e 1'	3,33	71,78	3,23	72
2 e 2'	3,58-3,50	70,15	3,59-3,53	70,08
3 e 3'	3,58-3,50	64,32	3,59-3,53	64,27

Fonte: Do autor.

Figura 8- Estrutura do manitol

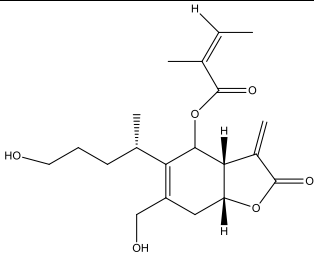
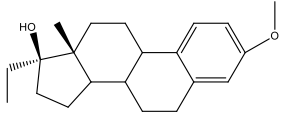
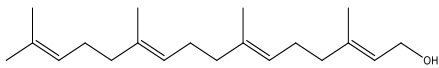


Fonte: Do autor

7.3 DESREPLICAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA

Afim de melhor compreender a ação anti-inflamatória observada no teste de edema de orelha pela fração hexânica, esta foi analisada por espectrometria de massas (MS) de alta resolução, assim de acordo com o padrão de fragmentação e com base no banco de dados *Bruker Summer metabobase plant library* foi possível observar uma vasta gama de possíveis compostos constituintes da fração hexânica, entre estes flavonas e esteroides, mais devido à presença abundante de vários compostos lipídicos não foi possível isola-los. Assim os compostos desreplcados a partir do modo positivo encontram-se listados na tabela 11 bem como os seguintes dados: Tempo de retenção (T. (min)), formula molecular, m/z , estrutura e o numero de vezes que a massa de cada composto foi escrita na literatura (N° de Hits).

Tabela 11- Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplcação do modo positivo.

Estrutura	Formula molecular	m/z [M+H] ⁺	N° hits	Composto	T. (min)
	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	365,1959	8	Eriolangina	6,85
	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315,2319	11	17α-Etil-17β-estradiol-3-metil ester	15,22
	C ₂₀ H ₃₄ O	291,3683	12	Geranilgeraniol	16,87

Fonte: Do autor.

Os possíveis compostos observados pela desreplcação do modo positivo do espectro de massas pode-se observar que o composto com m/z 365,1959 (apêndice E), sugerido pela biblioteca do software como sendo o eriolangina é um sesquiterpeno, sendo estes comumente encontrados em fungo endofíticos como descrito por CHAPLA et. al. 2013.

O composto com m/z 315,2319 (apêndice F) é um fitoestrógeno denominado 17α-Etil-17β-estradiol-3-metil éster, assim como o estradiol este composto pode ser utilizado para a reposição hormonal (HALBE, 2005).

O composto com m/z 291,3683 (apêndice G) é segundo a base de dados uma álcool diterpeno denominado geranilgeraniol.

Os compostos desreplcados pelo modo negativo, bem como: a razão m/z , a formula molecular, o tempo de retenção destes compostos e o numero de hits que relata quantas vezes esta massa foi descrita na literatura, se encontram descritos na tabela 12.

Tabela 12- Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação do modo negativo

(Continua)

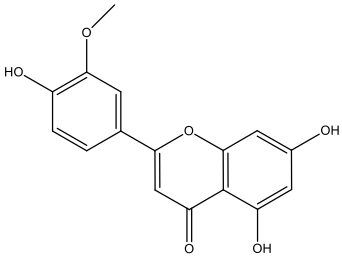
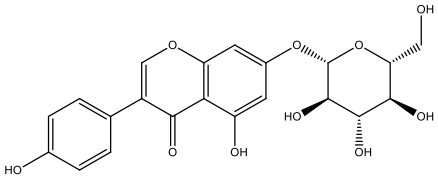
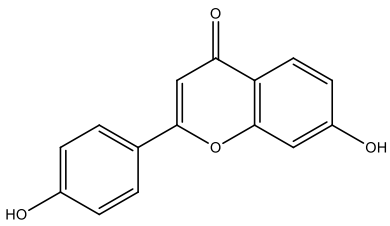
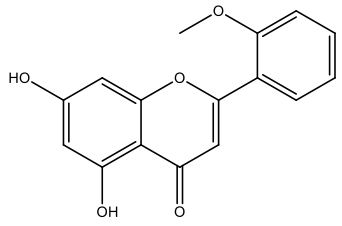
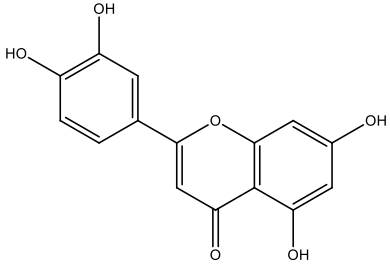
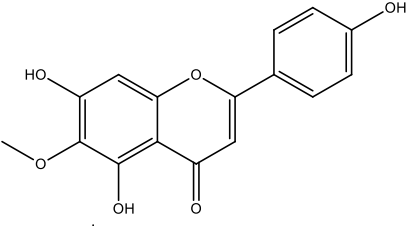
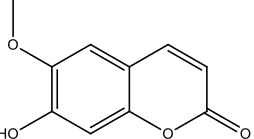
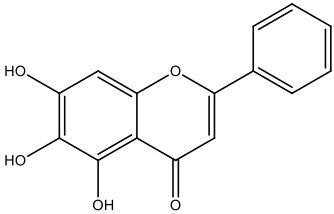
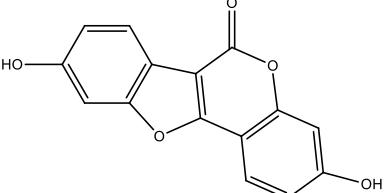
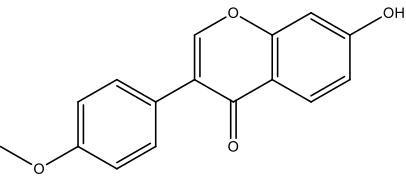
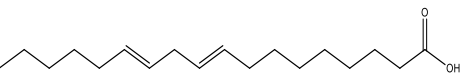
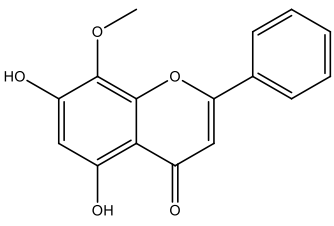
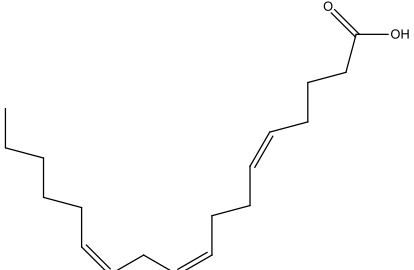
Estrutura	Formula molecular	m/z [M-H] ⁻	Nº hits	Composto	T. (min)
	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299,0561	15	3'-O-Metil luteolina (Chrysoeriol)	5,39
	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	431,0983	7	Genistina	5,58
	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253,0506	12	7,4'-Dihidroxi flavona	6,20
	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283,0611	19	5,7-Dihidroxi-4'-metoxiflavona	6,39
	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0404	12	Luteolina	6,75
	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299,0561	15	Hispidulina	6,81
	C ₁₀ H ₈ O ₄	191,0349	12	Escopoletina	7,19

Tabela 12. Estruturas obtidas a partir da espectrometria de massa por desreplicação do modo negativo (Conclusão)

Estrutura	Formula molecular	m/z [M-H] ⁻	Nº hits	Composto	T. (min)
	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0455	18	Bacaleina	7,36
	C ₁₅ H ₈ O ₅	267,0298	1	Coumestrol	7,38
	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267,0622	7	Formononetina	8,48
	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279,2329	5	Ácido linoleico	16,23
	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283,0611	20	Wogonina	6,50
	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277,2173	6	Ácido gama linoleico	12,28

Fonte: Do autor.

Analisando as moléculas possíveis observadas no modo negativo é possível observar isoflavonas normalmente encontradas na soja como a genestina composto com m/z 431,0983 (apêndice I) e a formononetina composto com m/z 267,0622 (apêndice R). Isoflavonas são fitoestrógenos possuindo então estrutura química similar ao estradiol principal

hormônio feminino, sendo, portanto compostos bioativos (FERRARI,R.A.;DEMIATE, I.M.; 2001).

O coumestrol composto com m/z 267,0298 (apêndice Q) é um isoflavonoide da classe dos coumestanos e um fitoestrógeno podendo ser utilizado para a reposição hormonal, sendo normalmente isolado da soja, é um também encontrado na alface (FRANCO, 2007).

A luteolina composto com m/z 285,0404 (apêndice M) é um flavonoide pertencente à classe das flavonas, tem propriedades anti-inflamatória, cardioprotetora e neuroprotetora conhecidas (GALEGO, 2014). Baicaleina composto com m/z 269,0455 e wogonina composto com m/z 283,0611, Chrysoeriol composto com m/z 299,0561, 7,4'-Dihidroxi flavona composto com m/z 253,0506 e 5,7 Dihidroxi-4'-metoxiflavona m/z 283,0611 (apêndices P, K, H, J, L), são flavonoides pertencentes à classe das flavonas estas possuem atividade antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante (H-B, LI. 2005). Hispidulina m/z 299,0561 (apêndice N) é um flavonoide pertencente a classe das flavona, encontrado em diversas plantas, incluindo algumas utilizadas para fins medicinais como a carqueja, possui atividade hepatoprotetora e assim como as demais flavonas atividade antioxidante e pro-oxidante (SCOPARO, 2012; HERREIRAS, 2009).

Escopoletina composto com m/z 191,0349 (apêndice O) é uma cumarina com atividade farmacológica comprovada atuando na regulação da pressão arterial além de possuir atividade bactericida contra varias espécies (COSTA et. al., 2012).

Demonstrando a presença de lipídeos na fração hexânica foi possível observar os compostos com m/z 277,2173 e 279,2329 (apêndices T e S) sendo estes provenientes dos picos de maior intensidade do cromatograma da fração (apêndice U), sendo estas provavelmente correspondentes ao ácido gama linoleico e ao ácido linoleico respectivamente.

Os micro-organismos produzem lipídeos durante o seu processo de crescimento, a composição do lipídeo bem como a quantidade produzida deste depende de vários fatores tais como a disponibilidade de nutrientes e o estágio de crescimento, o ácido gama linoleico é produzido por fungos filamentosos, é um ácido graxo essencial (RUEGGER, 2001). O ácido gama linoleico é precursor da prostaglandina E1, sendo esta capaz de reduzir a inflamação, tendo várias ações benéficas ao organismo como dilatar veias, abaixar a pressão sanguínea e reduzir os níveis de colesterol (HORROBIN, 1992).

Fungos endofíticos podem produzir os mesmos metabolitos secundários que suas plantas hospedeiras, estes metabolitos podem ser de diversas classes, podendo ser estes policetídeos, derivados de chiquimato, derivados de isocumarina, compostos alifáticos, flavonóides, ácidos fenólicos, quinonas, tetralonas, xantonas, lactonas, lignanas, terpenóides,

esteróides, alcalóides e peptídeos (CRISTIANI et al 2017). A *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo que parasita as mais diversas culturas entre estas as culturas das quais são extraídos todas as classes de compostos desreplicados pela análises do MS, o ciclo de vida da *Sclerotinia sclerotiorum* não se encontra totalmente elucidado, sendo assim plausível que estes estejam metabolitos produzidos pelo fungo, visto que o mecanismo para a troca de nutrientes entre a planta hospedeira e os fungos não foi estabelecido.

8 CONCLUSÃO

Pode-se observar que a composição química do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é composta majoritariamente de lipídeos, sendo metabolitos secundários deste os flavonoides, esteroides, terpenos e cumarina.

A fração hexânica bem como o peróxido de ergosterol e o manitol, possuem atividade anti-inflamatória sendo esta comparável com as dos fármacos de referência utilizados nas análises de edema de orelha, através do teste de recrutamento de neutrófilos foi possível observar que a fração hexânica inibiu a ação da mieloperoxidase, assim a ação anti-inflamatória observada para esta fração se deve provavelmente a inibição da via inflamatória da LOX.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, L. et al. White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), friend or foe: Cytotoxic and mutagenic activities in vitro and in vivo. **Food Research International**, v. 80, p. 27-35, 2016.
- BOLAND, G. J.; RALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 16, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. p. 1-16, USA, 2005.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. 2010. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de análise sanitária de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. p.202.
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentae**, Viçosa, v. 4, p. 69-133, 1964.
- CHAPLA, V. M. et al. Fungos endofíticos uma fonte inexplorada e sustentável de produtos naturais. **Revista Virtual Química**, v.5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- COUTINHO, M. A. S. et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo de inflamatório. **Revista Virtual Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.
- COSTA et al. Constituintes químicos do caule de *Proteim hebetatum* (Burscraceae). **Acta Amazônica**, v. 42, n. 4, p. 557-560, 2012.
- COTRAN, R. S. et. al. **Robbins – Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1830, n. 6, p.3670-3695, 2013.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.** v. 77, p. 7, 2005.
- CRISTIANI, C. S. et al. Produção de flavonoides por fungos endofíticos. **Ensaio USF**, p. 69-79, 2017.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.
- DUGAN, F. M. The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. **American Phytopathological Society**, 2006.
- FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja uma breve revisão. **UEFG-Biological and health Scienses**, v. 7, n.1, p. 39-46, 2001.
- FRANCO, C. **Associação do coumestrol com β -ciclodextrina: caracterização e avaliação da penetração cutânea**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2007.
- FRAVEL, D. R. et al. Volatile Compounds Emitted by Sclerotia of *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotium rolfsii*. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p. 3761-3764, 2002.

- GALEGO, F. I. F. **Contributo para o design de formas farmacêuticas: polimorfismos e co-critais do flavonoide luteolina**. 2014. 98f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica Industrial) - Universidade de Coimbra, Coimbra, set. 2014.
- GARCEZ, F. R. et al. Constituintes Químicos de Escleródios do Fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Universidade Federal de Mato Grosso, RESUMO: 28a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2005.
- GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 28, n. 1, p. 1-7, jan./feb. 2012.
- GIANNINI, L. S. V. ***Sclerotinia sclerotiorum* (MOFO BRANCO): Avaliação das propriedades mutagênicas in vivo**. 2016, 62f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas á Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.
- GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug Discovery*, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.
- GREVE, H. et al. Fungal metabolites: Structural diversity as incentive for anticâncer drug development. **Phytochem. Rev.** v. 9, p. 537, 2010.
- HALBE, H. W. Conceitos e aspectos bioquímicos dos estrógenos. **Ver. Clinica Ter.**, v. 31, p.68-76, 2005.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.
- HERREIRAS, T. **Efeitos de flavonoides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma**. 2009. 146 f. Tese (Pós-Graduação em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- HORROBIN, D. F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. **Prog. Lipid Res.**, v.31, n.2, p.163-94, 1992.
- JI, H.-F.; LI, X.-J.; ZHANG, H.-Y. Natural products and drug discovery. **EMBO Reports**, v. 10, n. 3, p.194–200, 2009.
- JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. Podridão Branca da haste de soja: Manejo e Uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. **Composer**, Uberlândia, v. 2, n. 29, p. 33, 2010.
- KIM, D. S.; et al. Anticomplementary Activity of Ergosterol Peroxide from *Naematoloma fasciculare* and Reassignment of NMR Data. **Arch. Pharm. Res.** v.20, p.201, 1997.
- KEATES, S. E. et al. 5-o-(α -D-galactopyranosyl)-D-glycero-pent-2-enono-1,4-lactone: Characterization in the oxalate-producing fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2397-2401, 1998.
- KOBORI, M. et al. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264,7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 209-219, 2007.
- KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
- KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase-2(COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, p. 498-512, 2002.
- KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-96.
- LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 3 (Comunicado Técnico 76).

- LUCCA FILHO, O. A. Importância da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 113-124, 1985.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. v.4.
- MORADINI, L. M. B. **Isolamento, determinação estrutural e atividade microbiológica de moléculas bioativas no fungo ectomicorrizico *Scloderma* UFMSc1(Person)Fries**. 2013, 189 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2013.
- NASSER, L. C. B; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R. A. Mofo branco – cuidado com a semente. 4.ed., Revista Cultivar Grandes Culturas, 1999.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod Rep**, v. 17, p. 215, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- OLIVEIRA, P. S. M. De. et. al. Utilização do D-Manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009.
- PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, disease and symptomatology host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875-880, Aug. 1979.
- RANG, H. P. et. al. Farmacologia, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- ROQUE, A. C. M. **Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*): Estudo dos compostos químicos e da modulação de lesões de DNA e pré-neoplásicas in vivo**. 2014. 70f Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.
- RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido gama linoleico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins-SP**. 2001. 98f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - USP, São Paulo, 2001.
- SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ambito Cultural 1995. p 332.
- SCOPARO, C. T. **Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade de células de hepatoma humano**. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímicas) - Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2012.
- STARRATT, A. N.; ROSS, L. M.; LAZAROVITS, G. 1, 8-Dihydroxynaphthalene monoglucoside, a new metabolite of *Sclerotinia sclerotiorum*, and the effect of tricyclazole on its production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 320-325, 2002.
- STROBEL, G. et al. Natural Products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p.257, 2004.
- TAKEI, T.; et al. Ergosterol Peroxide, an Apoptosis-Inducing Component Isolated from Sarcodon aspratus (Berk.) S. Ito. Biosci. **Biotechnol. Biochem.**, v. 69, p. 212-215, 2005.
- TUBARO, A.; et al. The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, p. 3–4, 1985.
- TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional sources of future drugs discovery. **Drug Discov. Today**, v. 9, p. 450, 2004.
- WEIGERT, A. et al. The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 5-6, p. 379-390, 2009.
- XU, C., et al. Activity of a novel strobilurin fungicide benzothiofostrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 32–38, 2014.

Apêndice A- Espectro de RMN de ^1H (clorofórmio) do peróxido de ergosterol

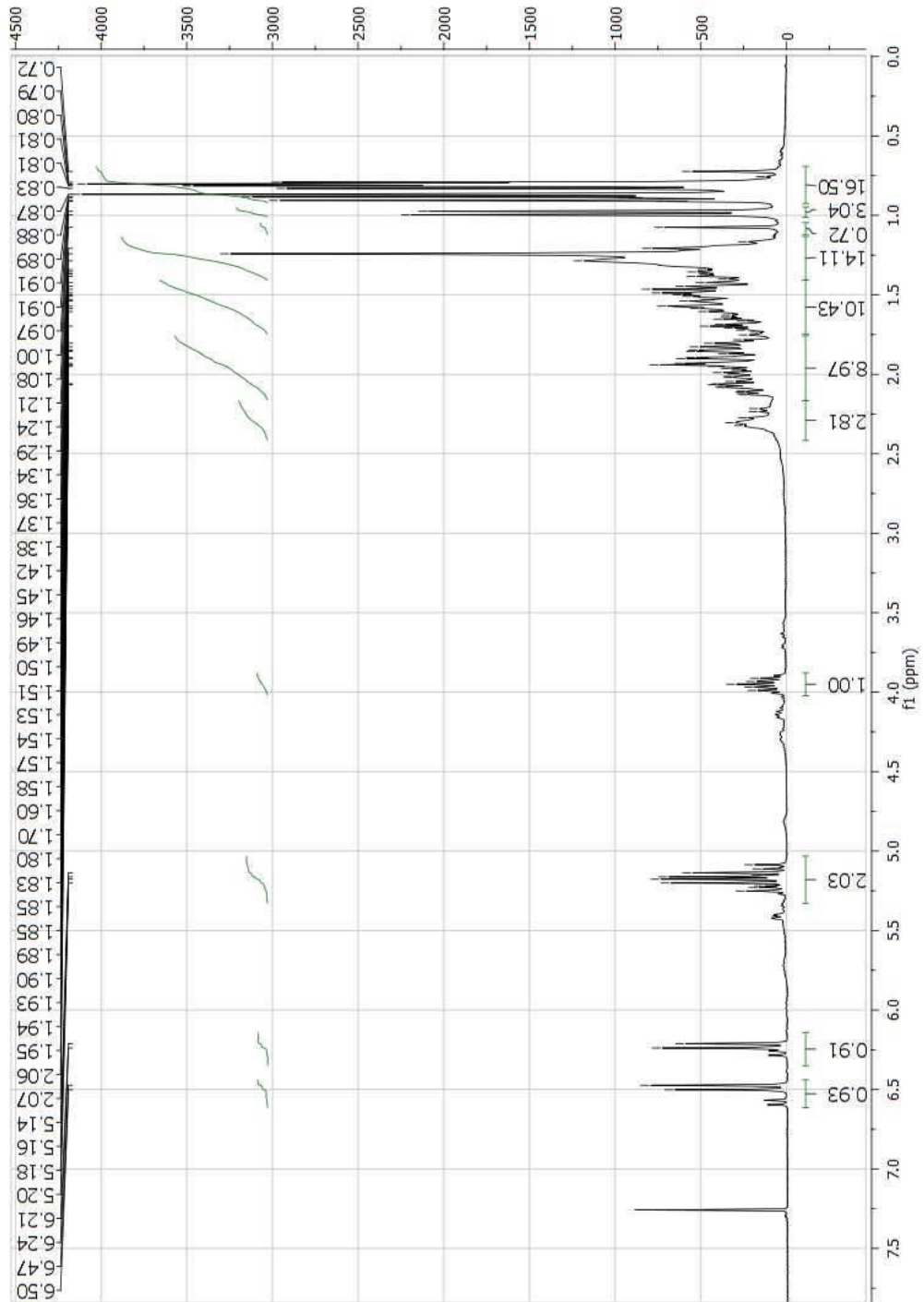


Figura obtida a partir do programa MestReNova

Fonte: Do autor

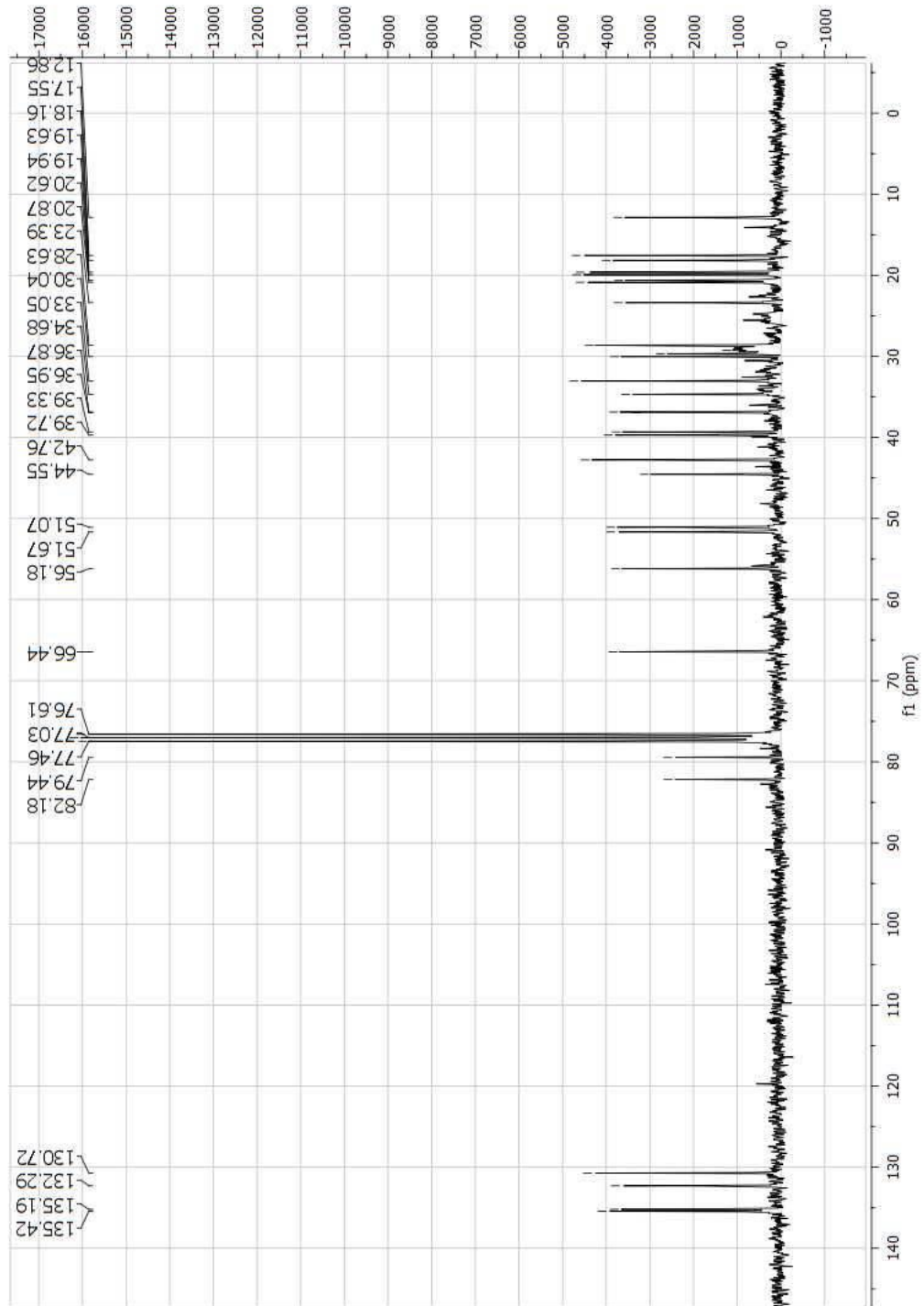
Apêndice B- Espectro de RMN de ^{13}C (clorofórmio) do peróxido de ergosterol

Figura obtida a partir do programa MestReNova
Fonte: Do autor

Apêndice C- Espectro de RMN de ^1H (DMSO) do Manitol

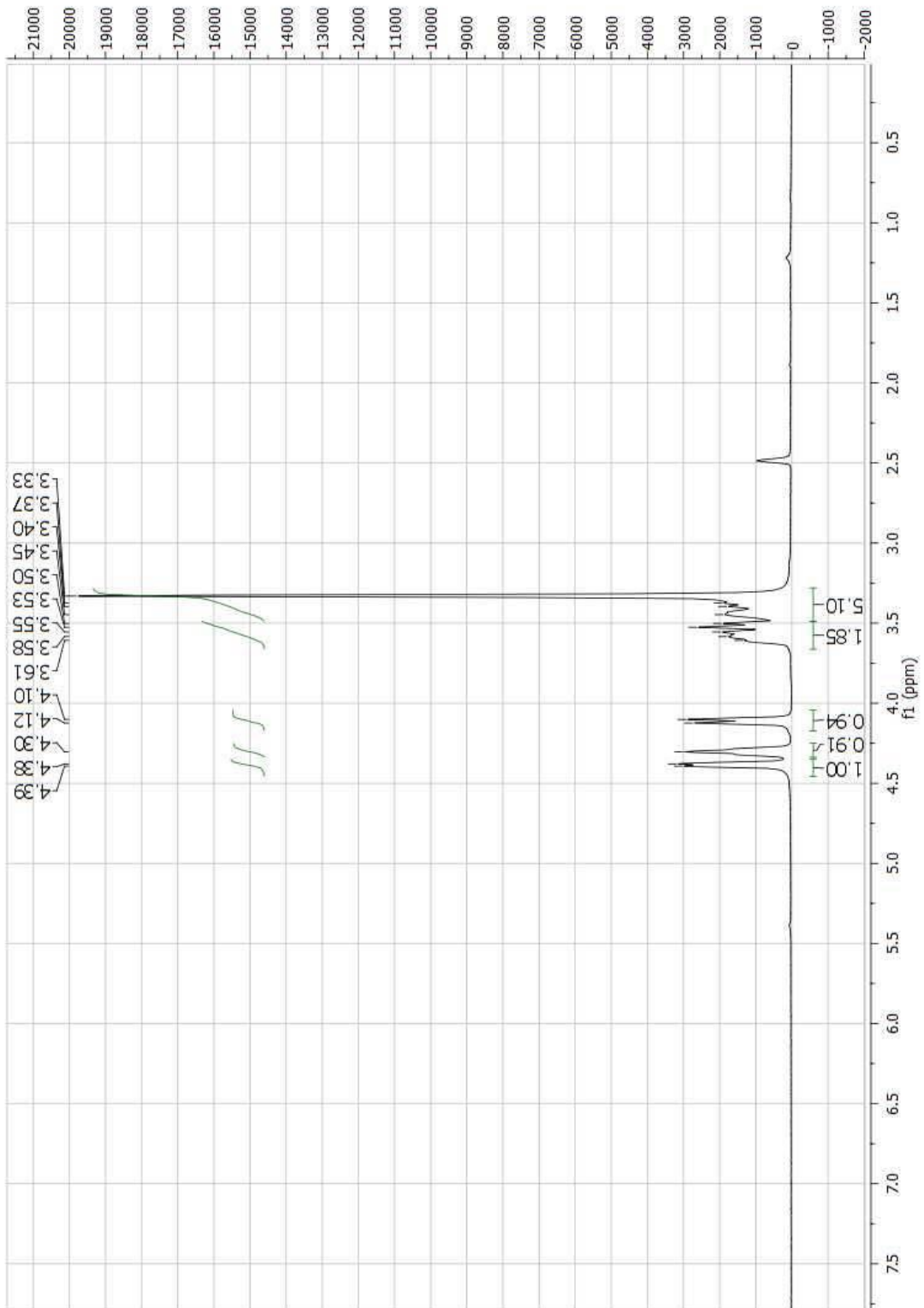


Figura obtida a partir do programa MestReNova
 Fonte: Do autor.

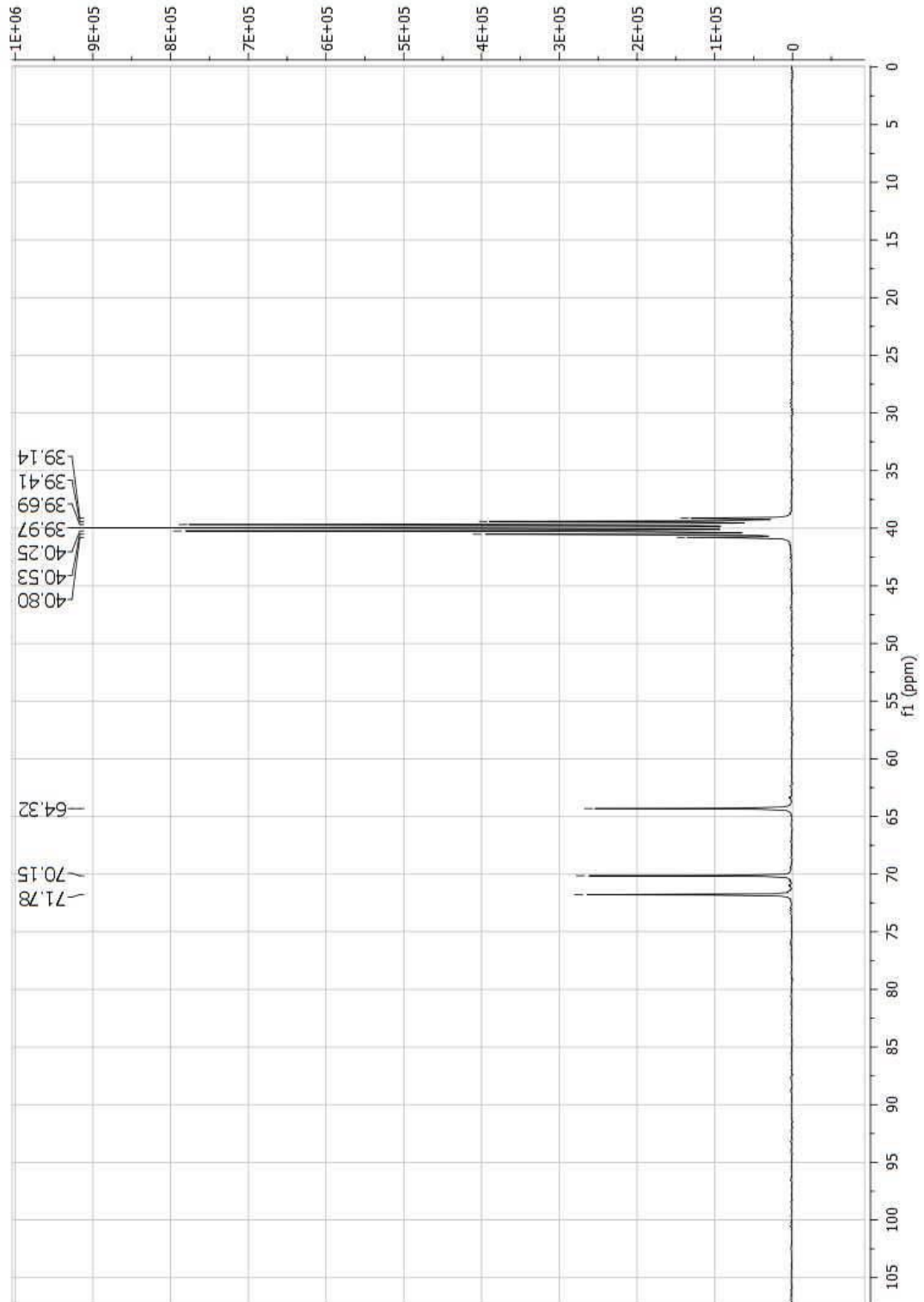
Apêndice D- Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO) do manitol

Figura obtida a partir do programa MestReNova
Fonte: Do autor.

Apêndice E- Espectro de EM do composto com m/z : 365,1859

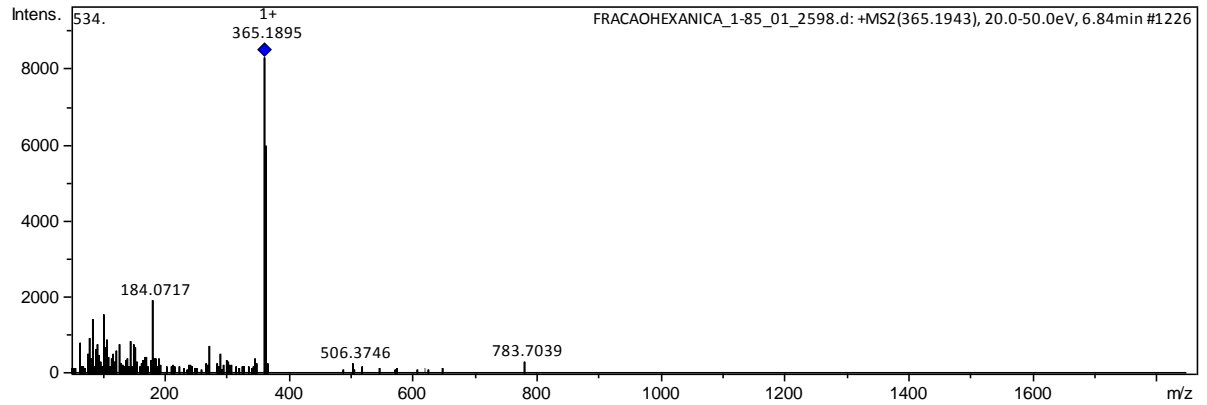


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice F- Espectro de EM do composto com m/z : 315,219

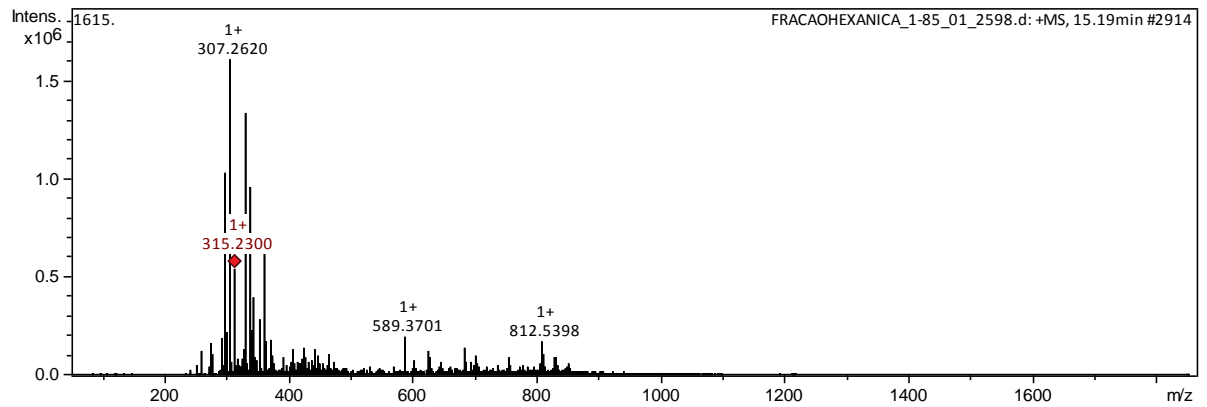


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice G- Espectro de EM do composto com m/z : 291,2683

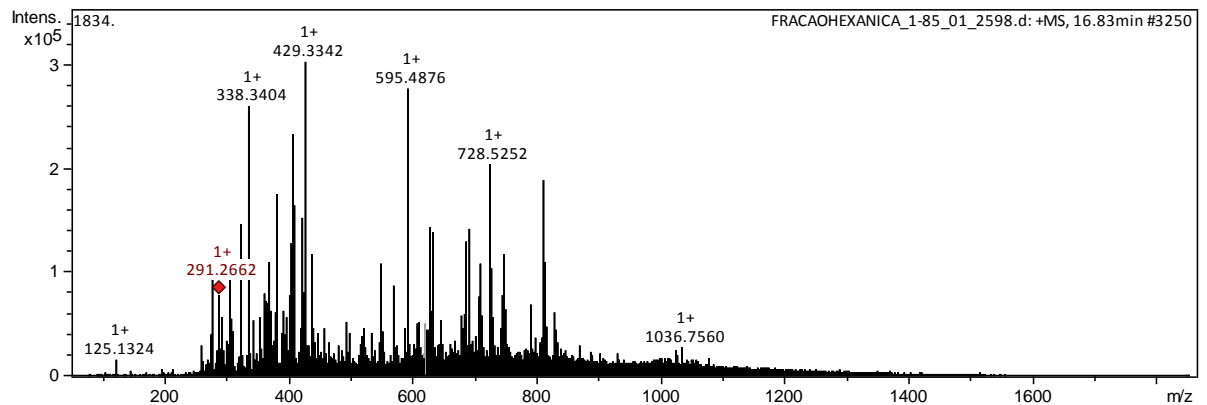


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice H- Espectro de EM do composto com m/z 299,0561

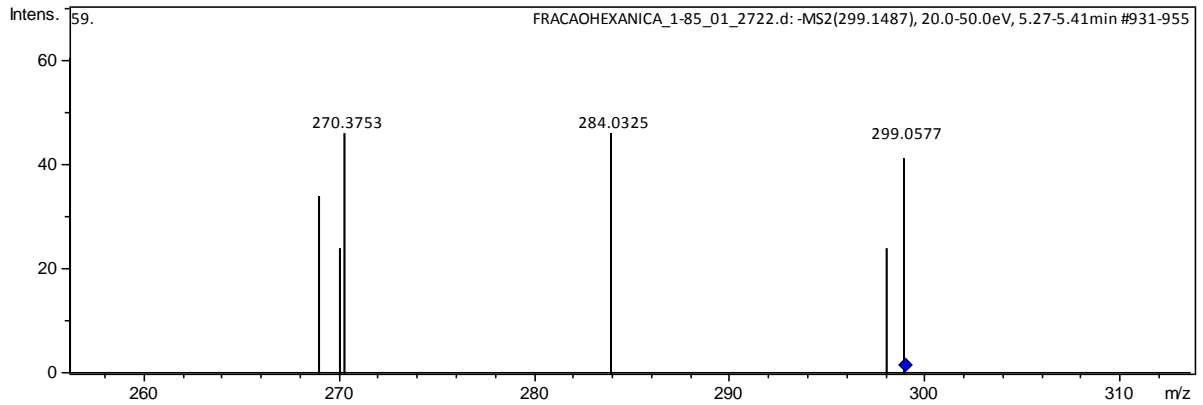


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice I- Espectro de EM do composto com m/z 431,0983

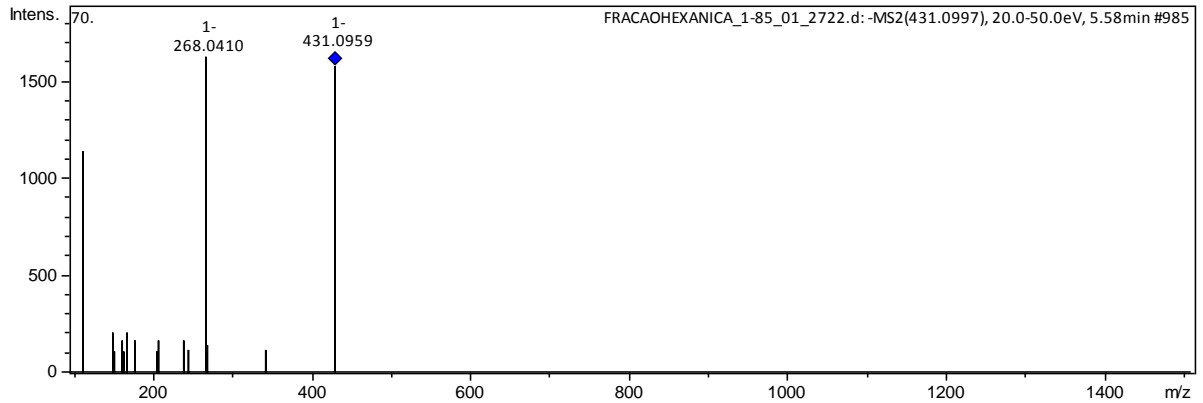


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice J- Espectro de EM do composto com m/z 253,0506

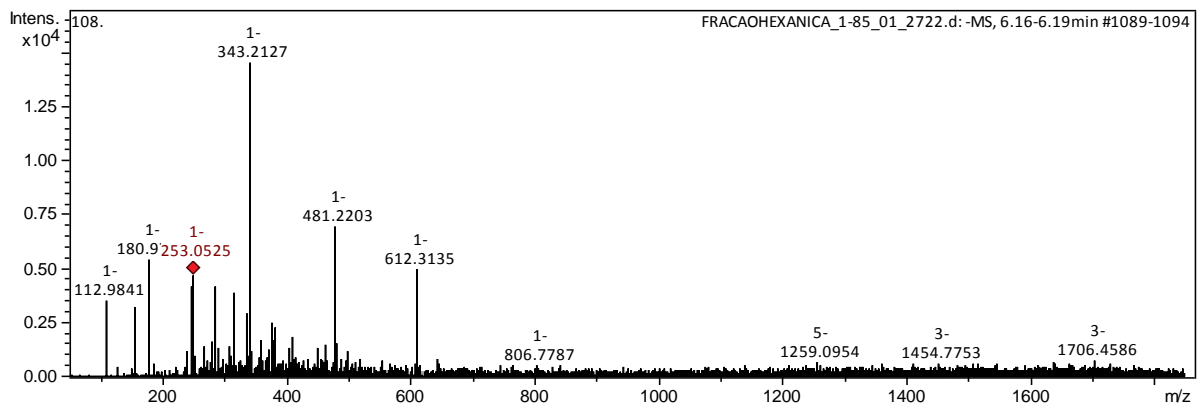


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice k- Espectro de EM do composto com m/z 283,0611

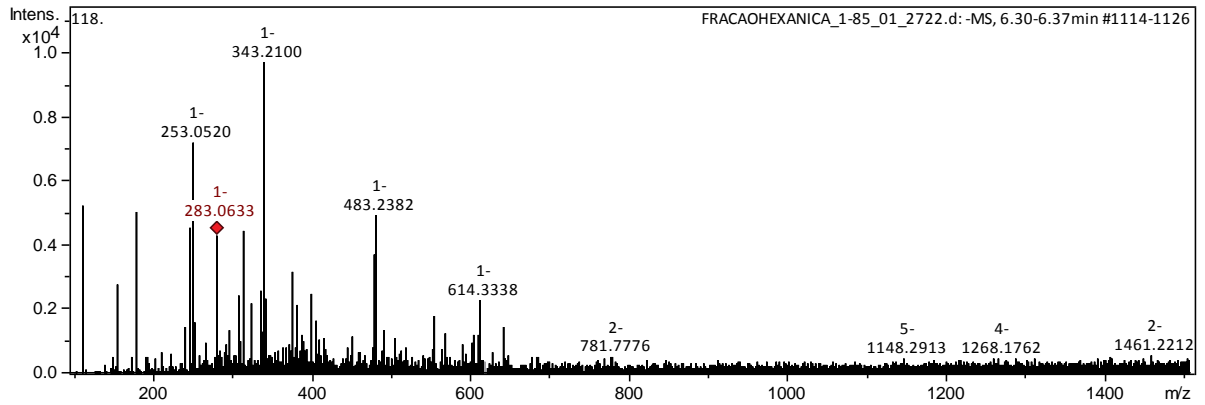


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice L- Espectro de EM do composto com m/z 283,0611

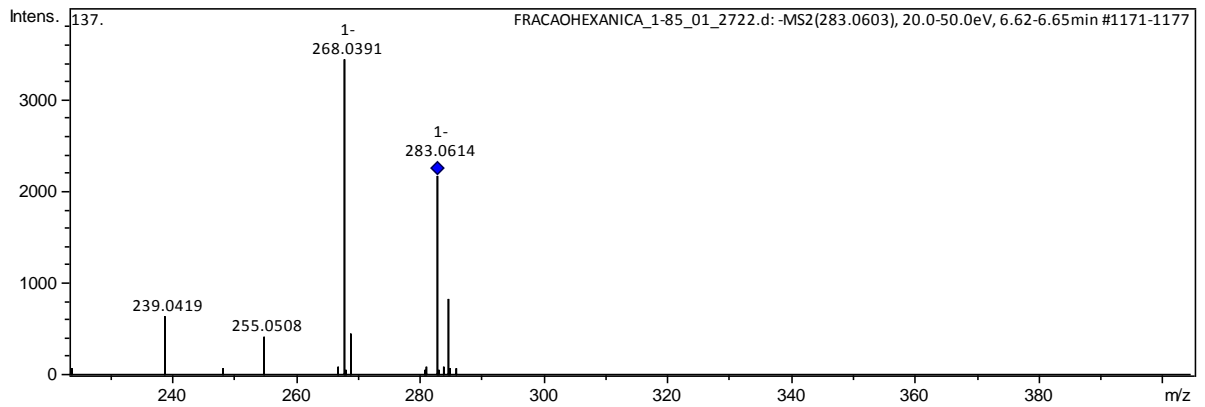


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor

Apêndice M- Espectro de EM do composto com m/z 285,0404

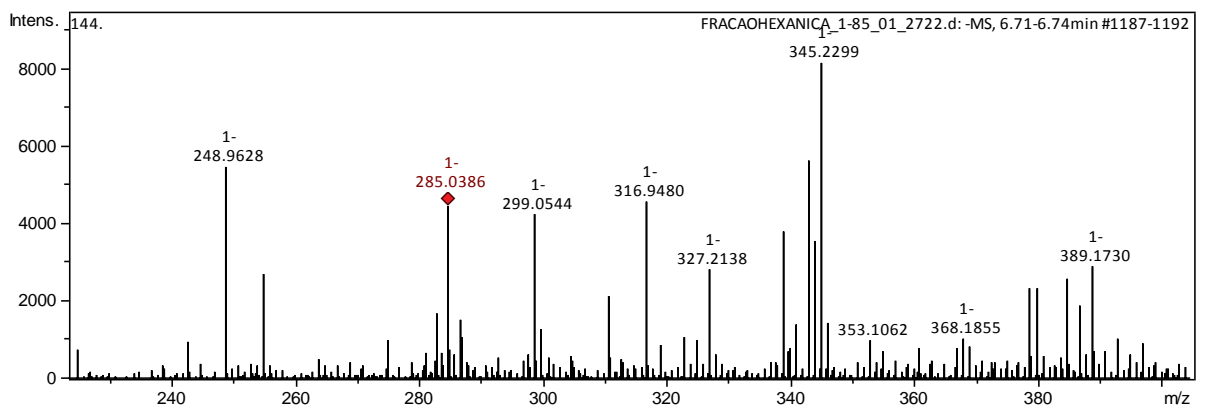


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
Fonte: Do autor.

Apêndice N- Espectro de EM do composto com m/z 299,0561

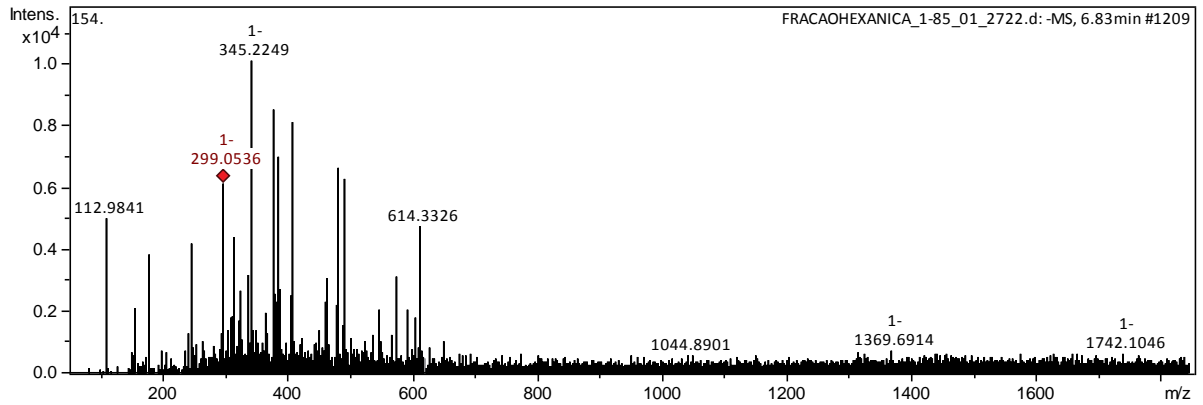


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice O- Espectro de EM do composto com m/z 191,0349

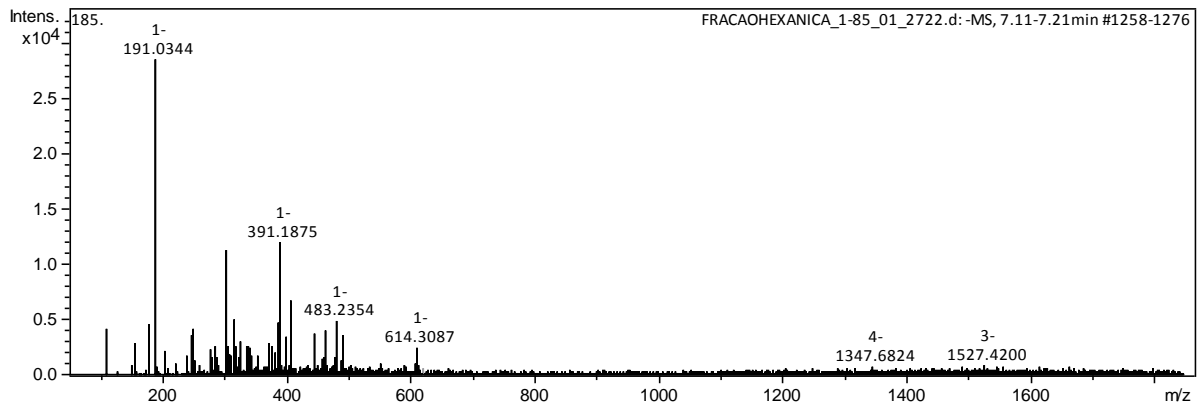


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice P- Espectro de EM do composto com m/z 269,0455

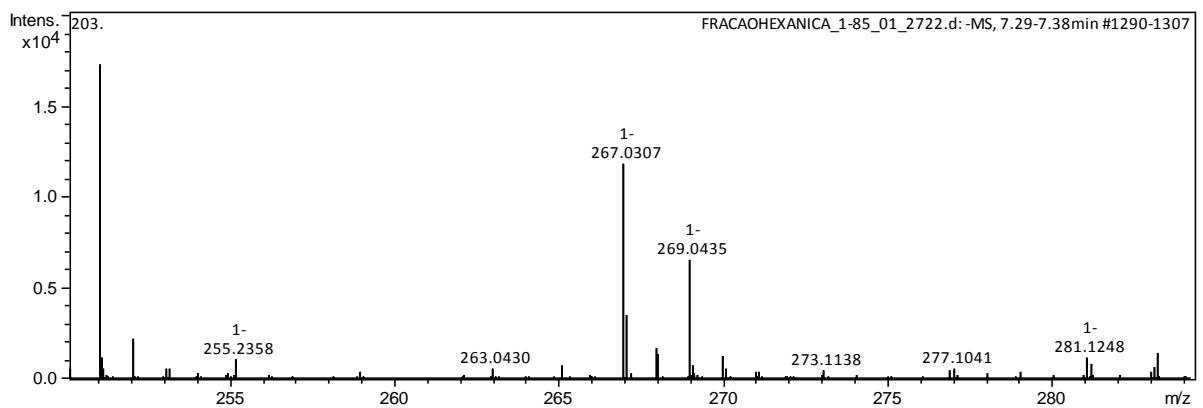


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice Q- Espectro de EM do composto com m/z 267,0298

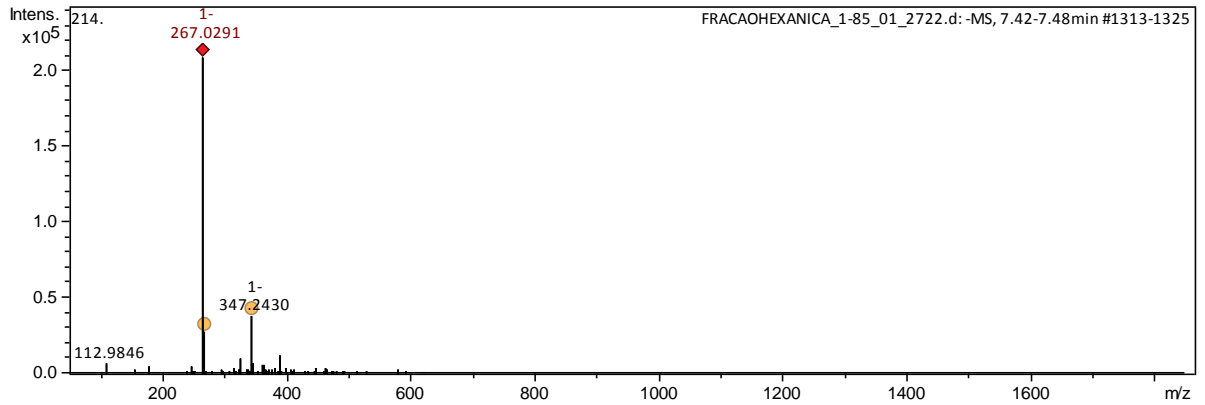


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice R- Espectro de EM do composto com m/z 267,0622

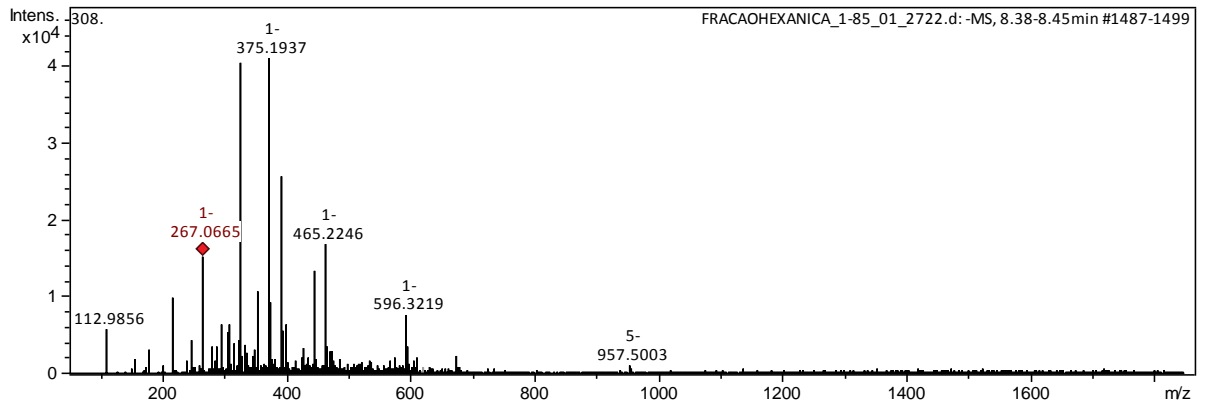


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice S- Espectro de EM do composto com m/z 279,2329

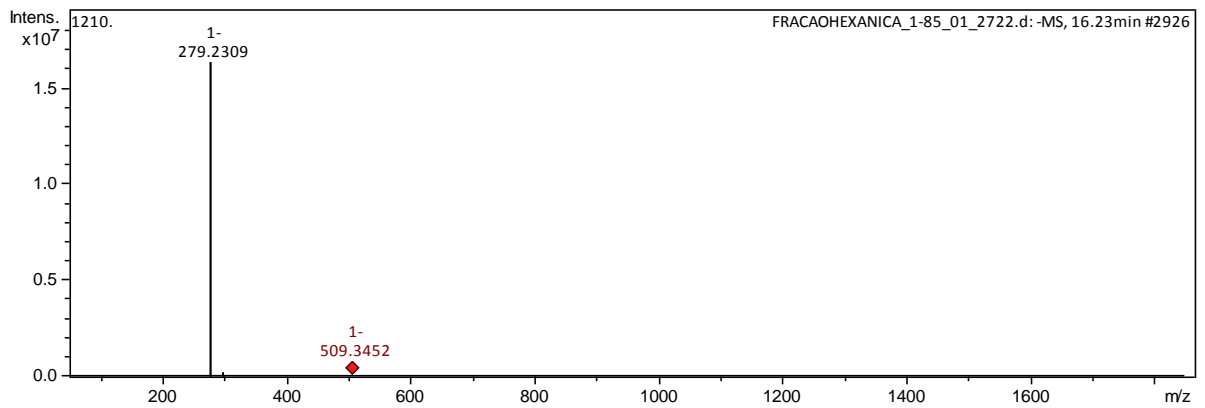


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis

Fonte: Do autor

Apêndice T- Espectro de EM do composto com m/z 277,2173

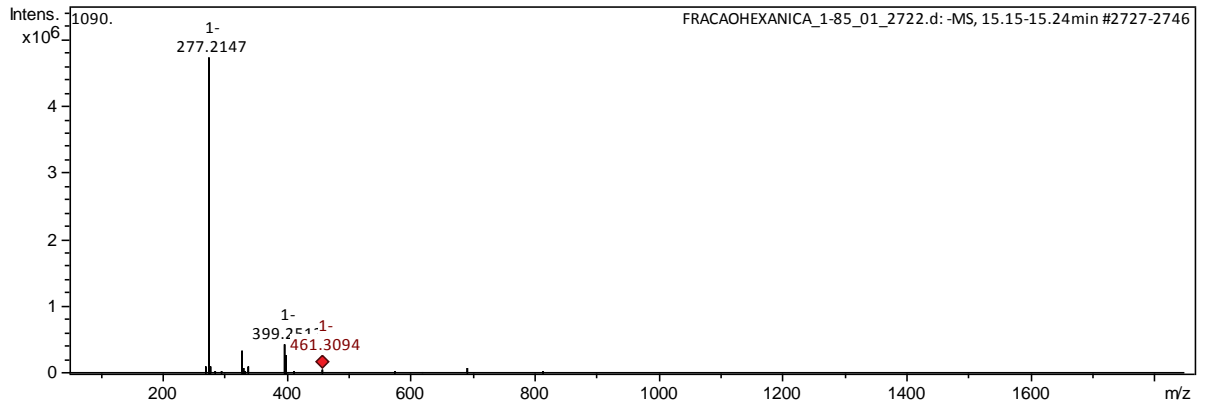


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
 Fonte: Do autor

Apêndice U- Cromatograma de EM da fração hexânica

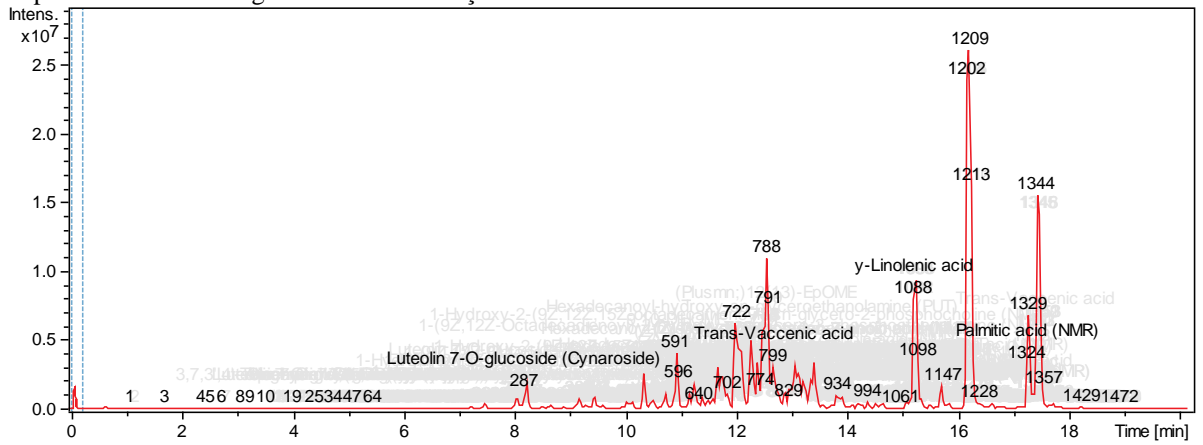


Figura obtida a partir do programa DataAnalysis
 Fonte: Do autor