



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE PIGMENTOS DO FUNGO *Pisolithus tinctorius* DE
DIFERENTES PROCEDÊNCIAS**

FORTALEZA

2019

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

ANÁLISE COMPARATIVA DE PIGMENTOS DO FUNGO *Pisolithus tinctorius* DE
DIFERENTES PROCEDÊNCIAS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química.

Orientador Pedagógico: Prof^ª. Dra. Fátima Miranda Nunes.

Orientador Profissional: Prof^ª. Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C172a Camara, Ana Gabrielle do Nascimento.
Análise comparativa de pigmentos do fungo *Pisolithus tinctorius* de diferentes procedências / Ana Gabrielle do Nascimento Camara. – 2020.
45 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira.
Coorientação: Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes.
1. Pigmentos. 2. *Pisolithus tinctorius*. 3. Derivados do ácido pulvínico. 4. CLAE. 5. RMN. I. Título.
CDD 570
-

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

ANÁLISE COMPARATIVA DE PIGMENTOS DO FUNGO *Pisolithus tinctorius* DE
DIFERENTES PROCEDÊNCIAS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Fátima Miranda Nunes (orientadora pedagógica)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira.

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Leandro Bezerra de Lima (Examinador)

Faculdade Terra Nordeste (FATENE)

A Deus.

À minha família e amigos, que estão sempre
comigo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir a vida e a realização deste sonho.

À minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

À minha tia, Maria de Fátima do Nascimento, por ser a maior incentivadora dos meus sonhos e tornar sua, a minha felicidade.

Aos meus amigos, pelas risadas, pela convivência fraterna e por sempre estarem comigo. Sou muito grata por vocês existirem em minha vida, me perdoem por não listar nomes, pois não caberiam em uma página e não seria justo se esquecesse algum, vocês são meus presentes de Deus. Saibam que cada um contribuiu para que eu me tornasse o que sou hoje.

À minha orientadora pedagógica, Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes, pela ótima orientação e pela paciência em me ensinar da melhor forma possível e, principalmente, pela amizade.

À minha orientadora profissional, Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira, pelo apoio, atenção e pela ótima orientação durante toda a minha passagem no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS).

À Profa. Dra. Maria das Graças Gomes, tutora do PET Química, que, além de professora, foi minha educadora durante boa parte da graduação, com quem aprendi muito e, certamente, levarei os ensinamentos comigo para toda a vida.

Ao Prof. Dr. Leandro Bezerra de Lima, por todo o acompanhamento no trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos por permitir meu voluntariado no LABS e pelo apoio.

Ao grupo PET Química, que me concedeu muito aprendizado profissional e pessoal, local onde conheci pessoas maravilhosas com quem dividi os melhores momentos da universidade.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica, pela amizade e pelo aprendizado.

“Muitos têm pernas saudáveis, mas não saem do lugar’. ‘Como assim?’, perguntei. Ele me explicou: ‘Eles andam com suas pernas, mas são prisioneiros em sua mente. Não sabem correr em seus pensamentos e voar em suas ideias. Uma pessoa livre não é quem tem pernas saudáveis, mas quem tem uma mente saudável e ousada”

Augusto Cury (O Homem mais feliz da História)

RESUMO

Pigmentos e corantes são compostos que dão cor a outras substâncias. A principal diferença entre essas duas classes de compostos é sua solubilidade no meio aplicado, uma vez que os corantes são solúveis enquanto os pigmentos são insolúveis. Os pigmentos podem ser classificados como naturais ou sintéticos de acordo com sua origem. Os pigmentos naturais são encontrados em plantas, insetos e micro-organismos, como bactérias e fungos, e têm sido alvo de pesquisas devido a seus valores nutricionais e potencial medicinal. *Pisolithus tinctorius* é um fungo basidiomiceto que pertence à ordem Boletales. Esse fungo cresce em simbiose com plantas de Eucaliptos e Pinus, formando micorrizas. Os derivados do ácido pulvínico, que são pigmentos responsáveis pelas cores marrom e amarela dos corpos frutíferos do fungo, são um dos principais metabólitos secundários produzidos por esse micro-organismo. Estudos revelaram a presença de três derivados do ácido pulvínico em *P. tinctorius*: norbadiona A, badiona A e pisoquinona. Este trabalho teve como objetivo comparar o perfil de pigmentos produzidos por *P. tinctorius* coletados em três locais diferentes, Urbano-Santos (MA), Marco (CE) e Fortaleza (CE), através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e avaliar a citotoxicidade dos pigmentos contra linhagens de células tumorais e normais. A comparação dos cromatogramas de CLAE obtidos para as frações nBuOH-2 de cada fungo revelou diferenças significativas em suas composições. A fração nBuOH-2 do fungo de Urbano Santos apresentou um pico intenso, indicando um composto majoritário em sua composição. A fração nBuOH-2 do fungo de Marco apresentou vários picos, sendo a fração com maior número de compostos. A fração nBuOH-2 do fungo de Fortaleza apresentou dois picos intensos. Essas frações mostraram alguma semelhança, uma vez que a comparação dos seus respectivos cromatogramas mostraram que os compostos detectados estão em regiões semelhantes de tempos de retenção. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o nBuOH-2 do fungo coletado em Urbano Santos apresentaram alguns sinais na região aromática, corroborando a presença de derivados do ácido pulvínico. Apesar disso, as análises por RMN não permitiram a elucidação de suas estruturas moleculares. As frações não apresentaram citotoxicidade contra nenhuma das linhas celulares testadas.

Palavras-chave: Pigmentos, *Pisolithus tinctorius*, Derivados do ácido pulvínico, CLAE, RMN.

ABSTRACT

Pigments and dyes are compounds that provide colors to other substances. The main difference between these two class of compounds is their solubility in the applied medium, since dyes are soluble while pigments are insoluble. Pigments can be classified as natural or synthetic according to their origin. Natural pigments are found in plants, insects and microorganisms, as bacteria and fungi, and have been target of researches due to their nutritional values and medicinal potential. *Pisolithus tinctorius* is a basidiomycete fungus that belongs to the Boletales order. It grows in symbiosis with Eucalyptus and Pinus plants, forming mycorrhiza. Pulvinic acid derivatives, which are pigments responsible for the brown and vivid yellow colors of the fruit bodies of the fungus, are one of the principal secondary metabolites produced by this micro-organism. Studies revealed the presence of three pulvinic acid derivatives in *P. tinctorius*: norbadione A, badione A and pisoquinone. This work aimed to compare the profile of pigments produced by *P. tinctorius* collected in three different locations, Urbano-Santos (MA), Marco (CE) and Fortaleza (CE), through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and evaluate the pigments cytotoxicity against tumor and normal cell lines. Comparison of the HPLC chromatograms obtained for the nBuOH-2 fractions of each fungus revealed significant differences in their compositions. The nBuOH-2 fraction of the fungus from Urbano Santos showed an intense peak, indicating a major compound in its composition. The nBuOH-2 fraction of the fungus from Marco showed several peaks, being the fraction with a greater number of compounds. The nBuOH-2 fraction of the fungus from Fortaleza showed two intense peaks. These fractions showed some similarity, since comparison of their respective chromatograms showed that the detected compounds are in similar regions of retention times. The ^1H and ^{13}C NMR spectra obtained for the nBuOH-2 from the fungus collected in Urbano Santos showed some signals in aromatic region, corroborating the presence of pulvinic acid derivatives. Despite of this, the NMR analyses did not allow the elucidation of their molecular structures. The fractions did not present cytotoxicity against any of the cell lines tested.

Keywords: Pigments, *Pisolithus tinctorius*, Pulvinic acid derivatives, HPLC, NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias de plantação de <i>Eucalyptus</i> sp., do fungo <i>P tinctorius</i> e estruturas dos pigmentos norbadiona A (1), badiona A (2) e PISOQUINONA (3) isolados do fungo	14
Figura 2 – Estrutura molecular da curcumina (4)	16
Figura 3 – Estrutura molecular do ácido carmínico (5)	16
Figura 4 – Esquema de rota metabólica do ácido chiquímico	17
Figura 5 – Estruturas moleculares dos ácidos pulvínico (6) e vulpínico (7)	18
Figura 6 – Estruturas moleculares do ácido pulvínico e alguns derivados	19
Figura 7 – Análise das frações nBuOH-2 por CCDA	32
Figura 8 – Cromatograma da fração nBuOH-2 - Urbano-Santos	33
Figura 9 – Cromatograma da fração nBuOH-2 –Marco	33
Figura 10 – Cromatograma da fração nBuOH-2 –Fortaleza	34
Figura 11 – Sobreposição dos cromatogramas das frações nBuOH-2	34
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-300 MHz)	35
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C-BB de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-75 MHz).	36
Figura 14 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-75 MHz)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa de fungo, volume de solvente utilizado para extração e massa de extrato acetona	27
Tabela 2 – Massas dos extratos acetona utilizados na partição e dos extratos <i>n</i> -butanol obtidos	28
Tabela 3 – Massas dos extratos <i>n</i> -butanol utilizados e das frações nBuOH-2	29

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Fracionamento das amostras de extrato <i>n</i> -butanol	28
Fluxograma 2 – Resumo dos procedimentos experimentais	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Pigmentos naturais	16
2.1.1 Derivados de Ácido Pulvínico	17
2.1.2 Derivados do ácido pulvínico encontrados no <i>Pisolithus tinctorius</i>	23
2.2 Técnicas de análise	24
2.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	24
2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Coleta do fungo	27
4.2 Preparação dos extratos acetona de <i>P. tinctorius</i>	27
4.3 Partição líquido-líquido dos extratos acetona	27
4.4 Fracionamento dos extratos n-butanol por extração em fase sólida (SPE)	28
4.5 Análises Cromatográficas	29
4.5.1 Análises por CCDA (Cromatografia em Camada Delgada)	29
4.5.2 Preparação das amostras das frações n-BuOH-2 para análise em CLAE	29
4.5.3 Análise das frações nBuOH-2 por CLAE	29
4.6 Atividades Biológicas	30
4.6.1 Análise de citotoxicidade das frações nBuOH-2	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Comparação das massas dos extratos acetona	31
5.2 Análise dos extratos do fracionamento em SPE por Cromatografia em Camada Delgada (CCDA)	31
5.3 Análise por CLAE das frações nBuOH-2	32
5.4 Análise da fração nBuOH-2 - Urbano Santos por RMN ¹H e ¹³C	34
5.5 Ensaios de atividade citotóxica das frações nBuOH-2 – Urbano Santos	37
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE PIGMENTOS FÚNGICOS (UFC)	43

1 INTRODUÇÃO

As cores são importantes em vários aspectos na vida de uma pessoa e tem certa influência na sua tomada de decisões, como por exemplo, na escolha de um alimento mais colorido, ou ainda de um produto de beleza com uma cor mais intensa. Pigmentos e corantes são compostos capazes de conferir cor à outras substâncias e são utilizados desde a antiguidade no tingimento de roupas, em cosméticos e na medicina (SCHIOZER; BARATA, 2007). A principal diferença entre corante e pigmento é que o primeiro é solúvel no meio no qual é aplicado, já o segundo é insolúvel. Os pigmentos geralmente são sólidos (na forma de pó) e opacos, podendo-se dividir em relação à sua origem: natural ou sintética (CRUZ; IN ALEXANDRA SOVERAL DIAS, 2007).

Os pigmentos naturais são encontrados na natureza, em plantas, insetos e micro-organismos, como bactérias e fungos. Os pigmentos sintéticos, por sua vez, são produzidos pelo homem (SCHIOZER; BARATA, 2007). Os primeiros pigmentos naturais utilizados pelo homem foram os ocre, óxidos de ferro monohidratado ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que conferiam cor amarela. O primeiro pigmento de origem sintética foi o azul da Prússia, produzido na Alemanha, por Heinrich Diesbach (GASQUEIRA; SANTOS, 2008).

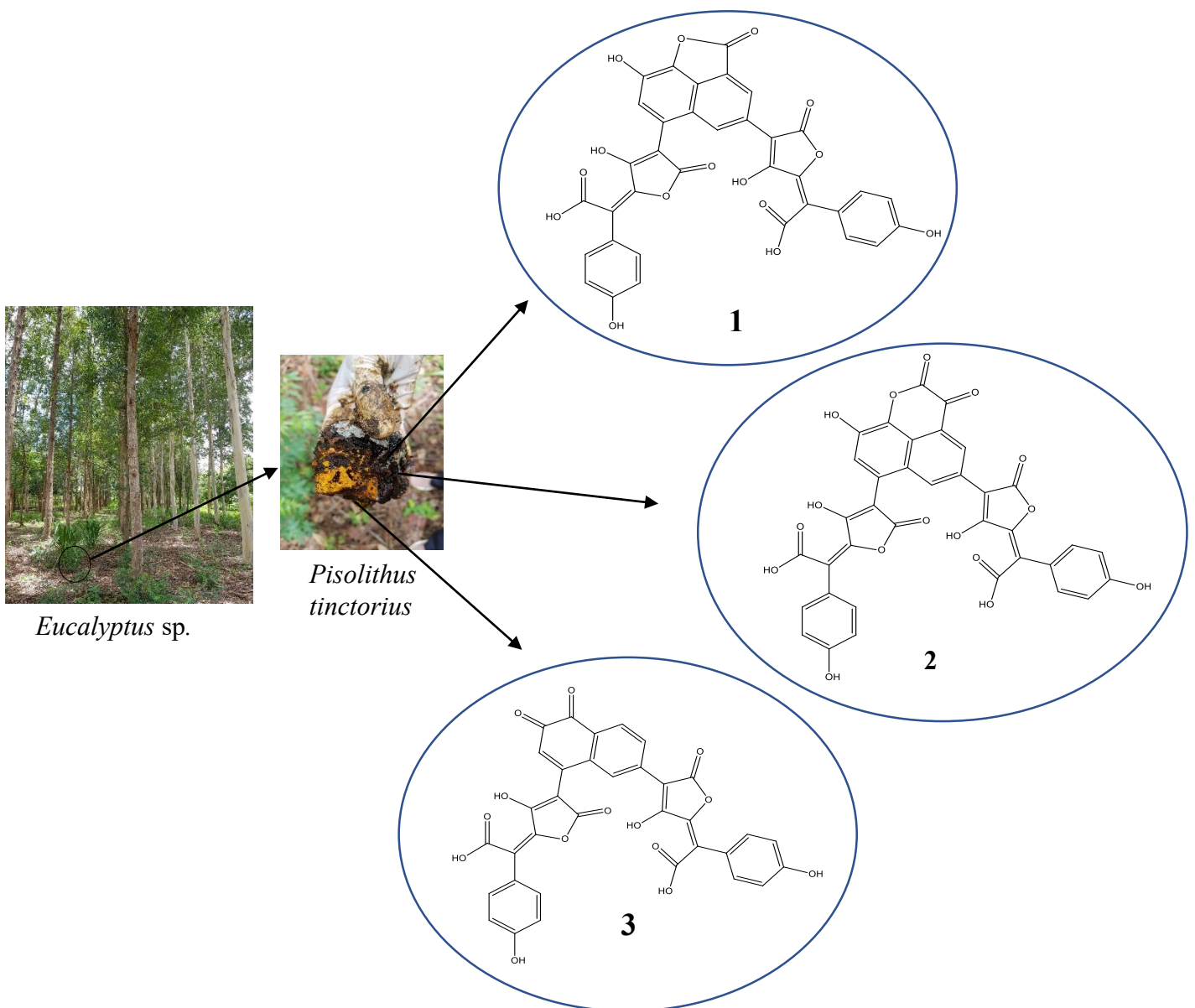
Nas últimas décadas, os pigmentos naturais ganharam atenção das indústrias, principalmente alimentícia e farmacêutica, devido aos seus valores nutritivos e potencial medicinal. Dentre eles, destacam-se os carotenoides, que são uma classe de pigmentos encontrados em plantas, frutas e verduras, responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha destes alimentos. Além de conferir cor, atuam no organismo através da transformação da vitamina A e como preventivo contra doenças, tais como câncer e problemas cardiovasculares. Como exemplo de carotenóide amplamente utilizado na indústria de alimentos, pode-se citar o betacaroteno (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

O *Pisolithus tinctorius*, pertencente ao filo Basidiomycota, é um fungo micorrízico, ou seja, se desenvolve em simbiose com algumas espécies de plantas, principalmente dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (BERBARA; SOUZA; FONSECA, 1968). Essa associação simbiótica é benéfica tanto para o fungo quanto para a planta hospedeira, tendo como principal característica a troca de nutrientes (COLLI, 2018).

Dentre os principais metabólitos secundários produzidos pelo *P. tinctorius* destacam-se os derivados de ácido pulvínico, que são considerados responsáveis pela pigmentação característica de fungos da ordem boletales. São secretados extracelularmente e, geralmente, possuem coloração amarela e laranja (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011). Análises dos

basidiocarpos do fungo *P. tinctorius*, proveniente da Austrália, revelaram um derivado naftalenóide de ácido pulvínico, a norbadiona A (**1**; Figura 1), que é responsável pela coloração amarela dos corpos de frutificação do fungo. Em estudos posteriores, dois outros pigmentos da mesma fonte tiveram suas estruturas elucidadas, badiona A (**2**; Figura 1) e pisoquinona (**3**; Figura 1) (GILL; WATLING, 1986). Vale ressaltar que, até o momento, estes foram os únicos pigmentos descritos para *P. tinctorius*.

Figura 1. Fotografias de plantação de *Eucalyptus* sp., do fungo *P. tinctorius* e estruturas dos pigmentos norbadiona A (**1**), badiona A (**2**) e pisoquinona (**3**) isolados do fungo.



Fonte: Autor.

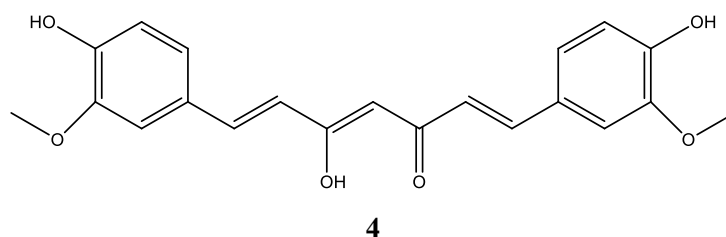
Desta forma, este trabalho visou comparar o perfil cromatográfico de pigmentos presentes nos corpos de frutificação de três amostras do fungo *Pisolithus tinctorius* coletadas nos municípios de Urbano-Santos (MA), Marco (CE) e Fortaleza (CE), a fim de avaliar o perfil de derivados de ácidos pulvínicos produzidos pelo fungo, além da atividade citotóxica dos mesmos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pigmentos naturais

A natureza apresenta uma rica diversidade de cores. As plantas, os insetos, algumas bactérias e fungos são fontes naturais de corantes e pigmentos, cuja função é específica para cada organismo. De fato, as plantas são grandes produtoras de pigmentos naturais. As moléculas de pigmento mais importantes no reino vegetal são das classes da clorofila, carotenoides e flavonoides, e estão distribuídas nas folhas, frutos e flores. Os pigmentos naturais têm propriedades farmacológicas que os torna de grande interesse comercial e por isso têm sido alvo de pesquisas. Por exemplo, a curcumina (**4**; Figura 2), pigmento amarelo-alaranjado encontrado na planta *Curcumina longa* (DUVAL; DUPLAIS, 2017), apresenta atividades antioxidantes, anti-inflamatória e analgésicas e desde a antiguidade é utilizado na medicina popular para tratar diversas doenças. Estudos demonstraram que a curcumina inibe crescimento de células tumorais, sendo um aliado potencial na medicina (DUDÁS et al., 2013).

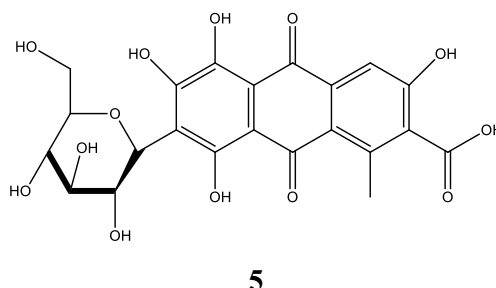
Figura 2. Estrutura molecular da curcumina (**4**).



Fonte: autor.

O carmim de cochonilha é um pigmento de cor vermelha, amplamente utilizado em alimentos e cosméticos e tem como principal componente o ácido carmínico (**5**; Figura 3). Sua fonte natural são as fêmeas do inseto Cochonilha, da espécie *Dactylopius coccus*, encontrada principalmente no Peru (TAKEO et al., 2018).

Figura 3. Estrutura molecular do ácido carmínico (**5**).



Fonte: autor.

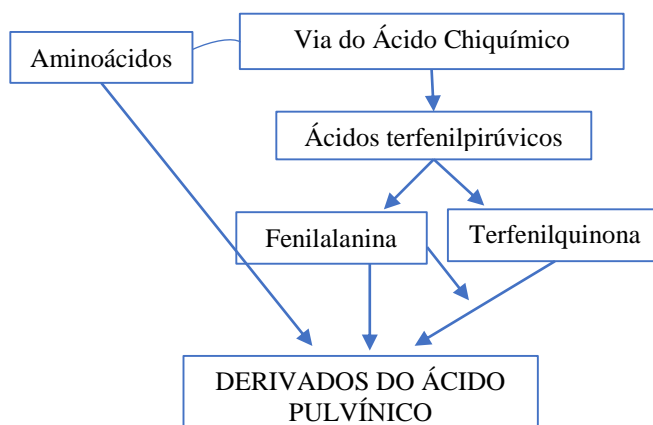
Os fungos também são grandes produtores de pigmentos. Alguns cogumelos os produzem para proteger-se da radiação UV e de patógenos. Sua cor intensa afasta os predadores, protegendo-os contra ataques de bactérias e insetos (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011). Estes microorganismos não possuem pigmentos comuns em plantas, como clorofilas e antocianinas. A maior parte de seus pigmentos são moléculas de quinona ou estruturas similares (HANSON, 2008).

Dentre as rotas biossintéticas presentes nos fungos, existem duas responsáveis pela produção da maior parte de seus pigmentos. A primeira é a rota do policetídeo, na qual são produzidas moléculas de quinonas, como as hidroxiantraquinonas, xantonas e naftopironas, que conferem coloração vermelha e laranja em fungos do gênero *Fusarium*. Outra rota é a via do ácido chiquímico, a qual produz moléculas de terfenil e derivados do ácido pulvínico, pigmentos presentes em fungos da ordem boletales (HANSON, 2008).

2.1.1 Derivados de Ácido Pulvínico

A via do ácido chiquímico (Figura 4) é uma rota metabólica específica de fungos, bactérias, líquens, algas e algumas plantas, sendo responsável pela produção dos aminoácidos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano. A fenilalanina e a tirosina, através de uma série de reações, originam ácidos arilpirúvicos, cinâmicos e benzoicos, os quais são moléculas precursoras de diversos pigmentos fúngicos. A condensação de dois ácidos arilpirúvicos dão origem as terfenilquinonas, compostos de coloração vermelha e marrom. A partir da clivagem destas moléculas, seguida de reações de oxidação e rearranjo, são formadas lactonas, geralmente de cor amarela e laranja, denominadas de derivados de ácido pulvínico (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011).

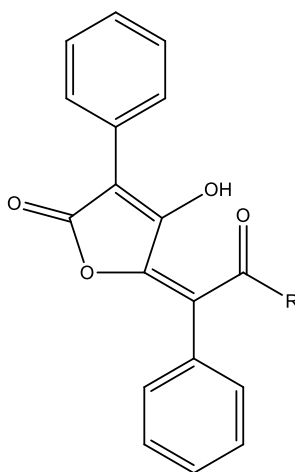
Figura 4. Esquema de rota metabólica do ácido chiquímico.



Fonte: EDWARDS; NEWTON; WYNN-WILLIAMS, 2003 (Adaptado).

O ácido pulvínico (**6**; Figura 5) é a molécula base, não-substituída, desta classe de pigmentos. O seu derivado éster metílico, denominado ácido vulpínico (**7**; Figura 5), apresenta atividade antimicrobiana para microrganismos aeróbicos e anaeróbicos (MÜLLER, 2001). Abo-Kathawa et al, provaram através de experimentos com mitocôndrias de fígado de ratos, que esta molécula pode atuar como um desacoplador da fosforilação oxidativa (ABO-KHATWA; AL-ROBAI; AL-JAWHARI, 1996). Além disto, estudos demonstraram um potencial anti-inflamatório do ácido pulvínico em ratos, porém apresentou toxicidade (VIEWEG et al., 2014).

Figura 5. Estruturas moleculares dos ácidos pulvínico (**6**) e vulpínico (**7**).



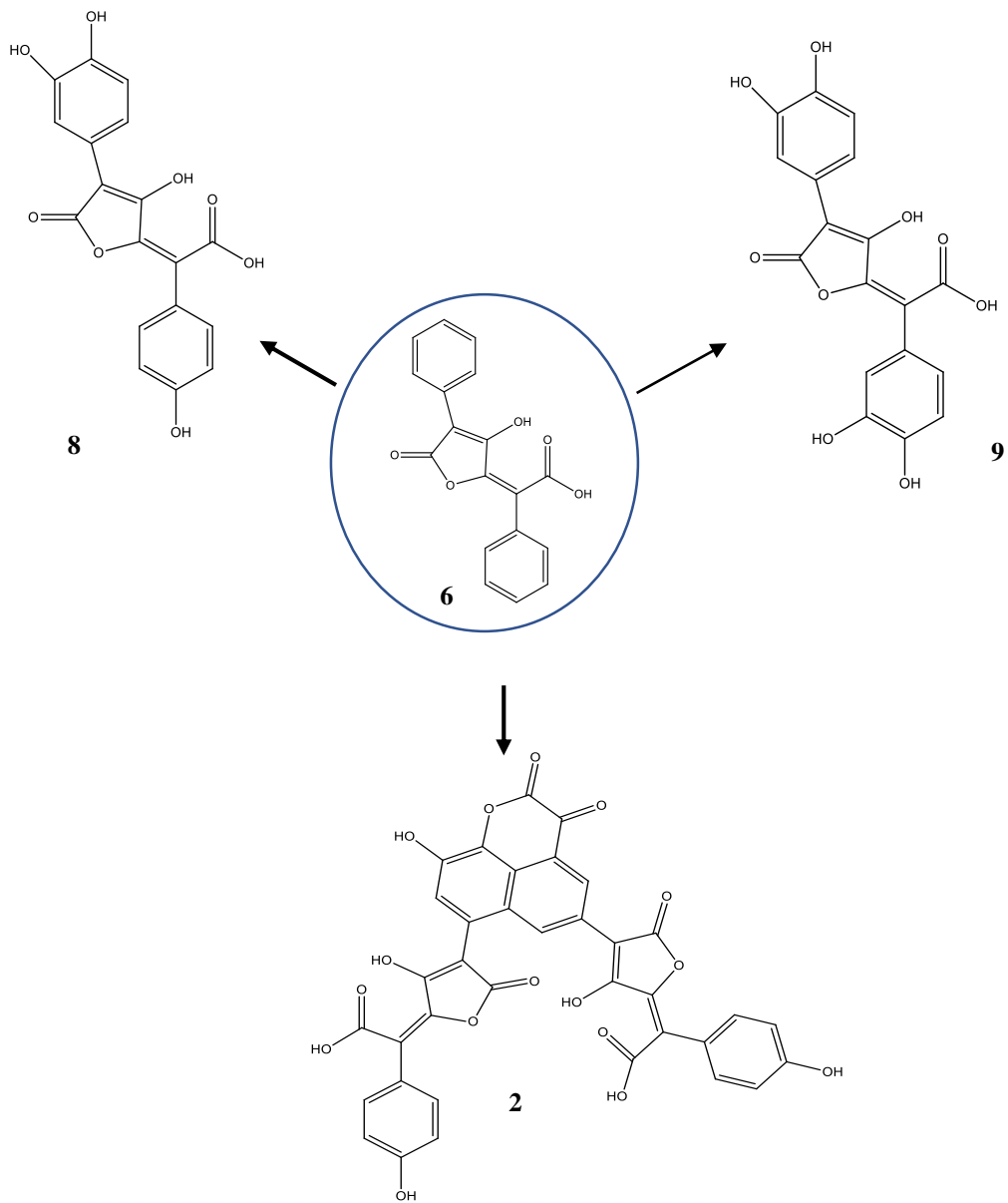
6 R = OH

7 R = OCH₃

Fonte: autor.

Alguns derivados possuem uma unidade de ácido pulvínico com substituições nos anéis benzênicos, como por exemplo o ácido xerocômico (**8**; Figura 6) e o ácido variegático (**9**; Figura 6). Outros, possuem duas ou mais unidades de ácido pulvínico em sua estrutura, como a Badiona A (**2**; Figura 1).

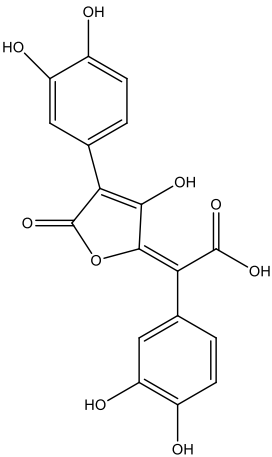
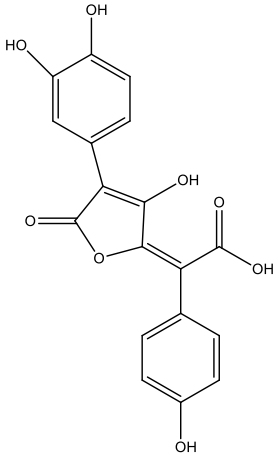
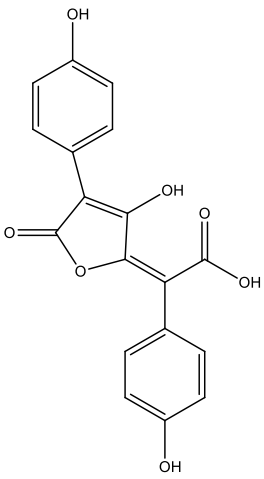
Figura 6. Estruturas moleculares do ácido pulvínico e alguns derivados.

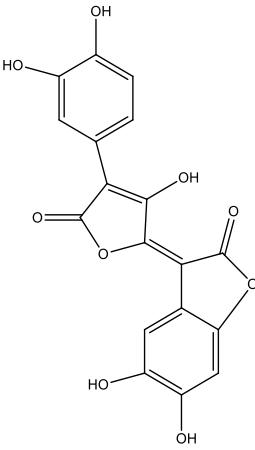
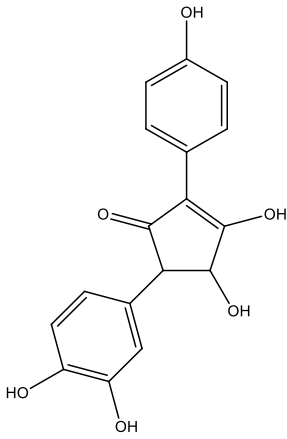
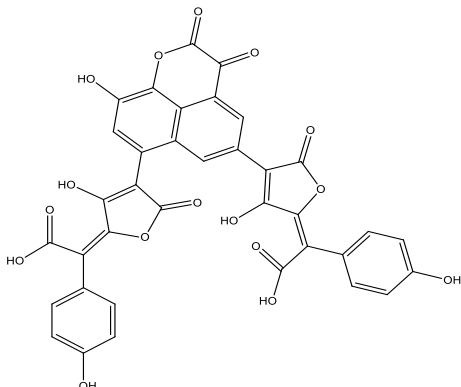


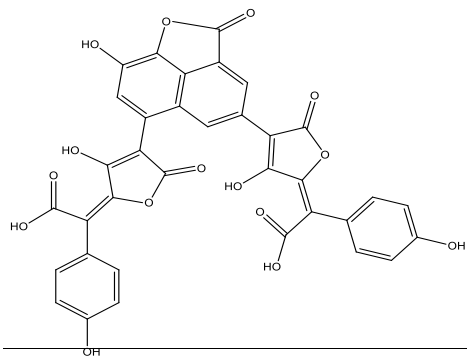
Fonte: autor.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos para isolamento de pigmentos produzidos por fungos e líquens, os quais revelaram a presença de derivados de ácido pulvínico nestes micro-organismos. O Quadro 1 mostra alguns exemplos destes pigmentos e sua respectiva fonte natural.

Quadro 1. Estruturas moleculares de derivados de ácido pulvínico e suas fontes naturais.

Estrutura	Nome comum	Fonte natural	Referência
	Ácido Variegático	<i>Boletus permagnificus</i> e <i>Xerocomus parasiticus</i>	DAVOLI; WEBER, 2002
		<i>Boletus laetissimus</i>	KAHNER et al., 1998
		<i>Boletus calopus</i> <i>Suillus bovinus</i>	HUANG et al., 2009
		<i>Serpula lacrymans</i>	TAUBER et al., 2018
	Ácido xerocômico	<i>Boletus permagnificus</i> e <i>Xerocomus parasiticus</i>	DAVOLI; WEBER, 2002
		<i>Boletus laetissimus</i>	KAHNER et al., 1998
		<i>Boletus calopus</i> e <i>Suillus bovinus</i>	HUANG et al., 2009
		<i>Serpula lacrymans</i>	TAUBER et al., 2018
	Ácido Atromêntico	<i>Boletus permagnificus</i> e <i>Xerocomus parasiticus</i>	DAVOLI; WEBER, 2002
		<i>Suillus bovinus</i>	HUANG et al., 2009
		<i>Serpula lacrymans</i>	TAUBER et al., 2018
		<i>Clitocybe illudens</i>	SINGH; ANCHEL, 1971

	Variegatorubin	<i>Boletus permagnificus</i> e <i>Xerocomus parasiticus</i>	DAVOLI; WEBER, 2002
		<i>Boletus laetissimus</i>	KAHNER et al., 1998
	Involutin	<i>Paxillus involutus</i>	SHAH et al., 2015
	Badiona A	<i>Scleroderma citrinum</i>	WINNER et al., 2004
		<i>Pisolithus tinctorius</i>	GILL; WATLING, 1986
		<i>Xerocomus badius</i>	STEFFAN; STEGLICH, 1984



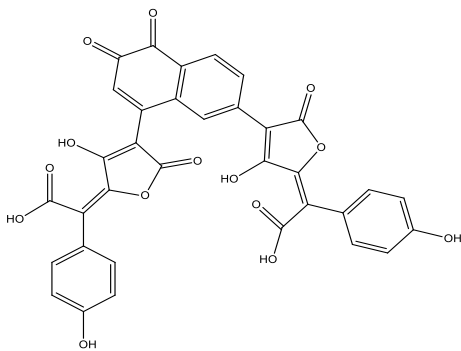
Norbadiona A

Pisolithus tinctorius

GILL; LALLY, 1985

*Xerocomus badius*STEFFAN; STEGLICH,
1984*Scleroderma citrinum*

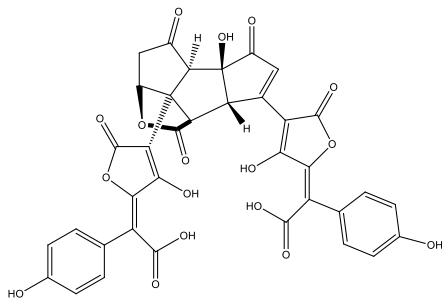
WINNER et al., 2004



Pisoquinona

Pisolithus tinctorius

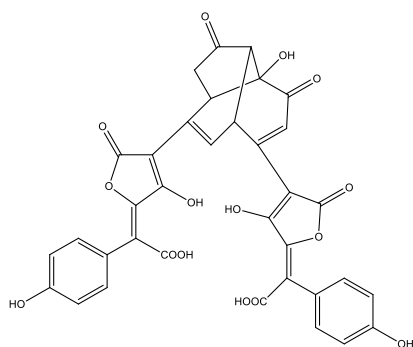
GILL; WATLING, 1986



Sclerocitrim

Scleroderma citrinum

WINNER et al., 2004

Chalciporus piperatus

Chalcitrim

Chalciporus piperatus

WINNER et al., 2004

Os derivados do ácido pulvínico apresentam papel importante no metabolismo de alguns fungos e participam de certos fenômenos, como a mudança de cor de seus corpos de frutificação. Alguns fungos, ao sofrerem estresse, apresentam uma cor azul intensa. Este fenômeno atraiu a atenção de muitos pesquisadores e, através de estudos, atribuiu-se esta mudança de coloração ao ácido variegático, pigmento amarelo presente na maioria dos fungos da ordem boletales. Quando tratado com uma solução alcalina diluída ou quando em contato com um extrato de batata, o pigmento, inicialmente amarelo, passava a apresentar uma coloração azul (BY; ELSWORTHY, 1968).

Estas moléculas de pigmento também atuam como protetores contra radiação solar. Uma vez que estão presentes nos corpos de frutificação de fungos e nos talos de líquens, as partes mais expostas destes organismos, se apresentam como substâncias fotoprotetoras (VAROL, 2018).

2.1.2 Derivados do ácido pulvínico encontrados no *Pisolithus tinctorius*

O *P. tinctorius* é um fungo basidiomiceto (Sclerodermataceae) pertencente à ordem boletales. É caracterizado como uma micorriza, ou seja, se associa simbioticamente às plantas, mais comumente as espécies de pinheiros e eucaliptos. Especificadamente, o *Pisolithus tinctorius* é uma ectomicorriza, isto significa que sua associação à planta ocorre intercelularmente, entre suas hifas e as raízes da hospedeira. As longas hifas do fungo permitem explorar um maior volume de solo e transportar nutrientes como fósforo, nitrogênio e água para a planta, que, em troca, o fornece carboidratos (SPITELLER, 2015). Além disto, o fungo protege a planta contra ataques de microrganismos patógenos química e fisicamente, através da produção de antibióticos e do seu manto fúngico (DE SOUZA, 2000).

Isolados deste fungo tem grande aplicabilidade em agricultura e em áreas de reflorestamento, uma vez que aumentam a capacidade de absorção de suas plantas hospedeiras e são resistentes a climas extremos (BAREA, 2016).

Uma classe de metabólitos secundários produzidos pelo *P. tinctorius* são os derivados naftalenóides do ácido pulvínico. Em 1984, Gill e Lally, isolaram um derivado naftalenóide de ácido pulvínico, o qual deram o nome de norbadiona A (**1**; Figura 1, pág. 14). A pesquisa foi realizada na Austrália, onde este fungo é predominante durante os meses de maio a agosto (GILL; LALLY, 1985).

Badiona A (**2**; Figura 1, pág. 14) e pisoquinona (**3**; Figura 1, pág. 14) foram descobertas com a continuação dos estudos de pigmentos do fungo (GILL; WATLING, 1986). Foi proposto que a molécula de pisoquinona teria sido formada através da combinação de duas

moléculas de ácido xerocômico e, em seguida, sofreria transformação para produzir a molécula de norbadiona A. Estas moléculas são responsáveis pela coloração marrom e amarelo intenso presente nos corpos de frutificação do *P. tinctorius* e comumente ocorrem na forma de sal de potássio ou de sódio.

Outra propriedade importante destes derivados de ácido pulvínico é a sua capacidade de complexação. Análises dos basidiocarpos do fungo *Xerocomus badius* (basidiomiceto), coletados após o acidente nuclear em Chernobyl, mostraram a presença de um nuclídeo radioativo, Cs¹³⁷. Estudos provaram que este nuclídeo se apresentava complexado com moléculas de norbadiona A, badiona A e ácidos xerocômico e atromêntico, presentes no fungo. O derivado norbadiona A apresentou maior poder complexante em comparação aos ácidos xerocômico e atromêntico, derivados mais simples. Este resultado foi atribuído à presença de duas unidades de ácido pulvínico na estrutura da norbadiona A, o que facilita espacialmente a formação do complexo com o Césio. Esta e outras características do fungo *P. tinctorius* o tornam um excelente potencial de uso em áreas de recuperação (AUMANN; et al., 1989).

2.2 Técnicas de análise

2.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), do inglês *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, é uma técnica de separação, isolamento e quantificação de misturas. Possui uma fase estacionária (coluna cromatográfica) e uma fase móvel (eluente). É uma técnica amplamente utilizada para determinação de compostos não-voláteis (LANÇAS, 2009).

O princípio da técnica se fundamenta na afinidade dos componentes da amostra com as fases móvel e estacionária. A amostra é inserida na fase estacionária (coluna) e logo em seguida é eluída com a fase móvel. De acordo com a interação dos componentes com as fases ocorre a separação. Se o componente tem mais afinidade com a fase móvel, este ficará retido por mais tempo na coluna, enquanto que o componente que tem mais afinidade com o eluente, passará menos tempo na coluna, ou seja, percorrerá o caminho da coluna mais rápido (SOUSA, 2018).

A CLAE pode ser classificada de duas formas quanto à sua fase estacionária: de fase normal ou de fase reversa. Na CLAE de fase normal, é utilizada uma fase estacionária polar, geralmente sílica, e um eluente apolar. Já na CLAE de fase reversa, é usada uma fase estacionária apolar e um eluente polar. Este último tipo de cromatografia é utilizado quando o analito tem características polares. A fase estacionária apolar é composta de sílica modificada

com longas cadeias de hidrocarboneto, que conferem a sua característica apolar (ISABEL; SOUSA, 2018).

Os detectores utilizados em CLAE geralmente são sensíveis a algumas propriedades dos analitos, como por exemplo absorvância no UV-vis, fluorescência, índice de refração, entre outros, e possibilitam a análise quantitativa (LANÇAS, 2009).

2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica poderosa e não-destrutiva, amplamente utilizada para elucidação e quantificação de estruturas moleculares. Tem como princípio a absorção de ondas de radiofrequência por núclídeos quando expostos a um campo magnético. A sensibilidade do equipamento está relacionada com a força do campo magnético aplicado, quanto mais forte, maior a resolução espectral. As técnicas de RMN mais comuns são RMN de ^1H e ^{13}C , que quando aliadas, permitem a determinação de diversos parâmetros estruturais (DIEHL, 2008).

3 OBJETIVOS

Comparar o perfil cromatográfico de pigmentos produzidos pelo fungo *Pisolithus tinctorius*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de derivados do ácido pulvínico produzidos pelo fungo coletado em três locais diferentes: Urbano-Santos (MA), Marco (CE) e Fortaleza (CE);
- Avaliar a atividade citotóxica dos pigmentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do fungo

O fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* foi coletado em três diferentes localidades para realizar o estudo de comparação dos pigmentos produzidos pela espécie. A primeira coleta de *P. tinctorius* foi realizada em uma fazenda de exploração de eucalipto da Empresa Suzano Celulose e Papel no município de Urbano Santos - MA (3°12' 00" de latitude Sul, 43°23' 00" de longitude Oeste). Também foram coletados outros dois espécimes de *P. tinctorius* em região limítrofe dos municípios de Acaraú e Marco (3° 27' 06" de latitude Sul, 40° 08' 48" de longitude Oeste), região que fornece madeira para o polo moveleiro de Marco – CE, e no campus da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza (3° 44' 20,9" de latitude Sul, 38° 34' 19,1" de longitude Oeste).

4.2 Preparação dos extratos acetona de *P. tinctorius*

Os três espécimes de *P. tinctorius* coletados em Urbano-Santos (MA), Marco (CE) e Fortaleza (CE) foram pesados e extraídos exaustivamente com acetona PA por 30 dias. O extrato acetona foi obtido após filtração a vácuo e concentrado sob pressão reduzida. As massas utilizadas dos espécimes de *P. tinctorius* e dos extratos obtidos, assim como os volumes de solvente utilizados, estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Massa de fungo, volume de solvente utilizado para extração e massa de extrato acetona.

Origem	Massa do fungo (Kg)	Volume de solvente (L)	Extrato acetona (g)	Rendimento da extração (%)
Urbano-Santos	1,38	2,0	104,25	7,56
Marco	2,90	3,0	120,76	4,16
Fortaleza	1,51	2,0	152,31	10,10

Fonte: autor

4.3 Partição líquido-líquido dos extratos acetona

Alíquotas dos extratos acetona foram solubilizadas, cada uma, em 100,0 mL de água destilada e submetidas a partição líquido-líquido em funil de separação com acetato de etila (3x de 50 mL). As frações AcOEt foram reservadas e as frações aquosas particionadas com *n*-butanol (3x de 50 mL). As frações *n*-butanol foram concentradas sob pressão reduzida, obtendo-

se os respectivos extratos *n*-butanol. As massas dos extratos acetona utilizados na partição e dos extratos *n*-butanol obtidos estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Massas dos extratos acetona utilizados na partição e dos extratos *n*-butanol obtidos.

Origem	Extrato acetona (g)	Extrato <i>n</i> -butanol (g)	Rendimento da partição (%)
Urbano-Santos	1,35	0,35	26,30
Marco	4,93	0,30	6,10
Fortaleza	5,11	0,38	7,43

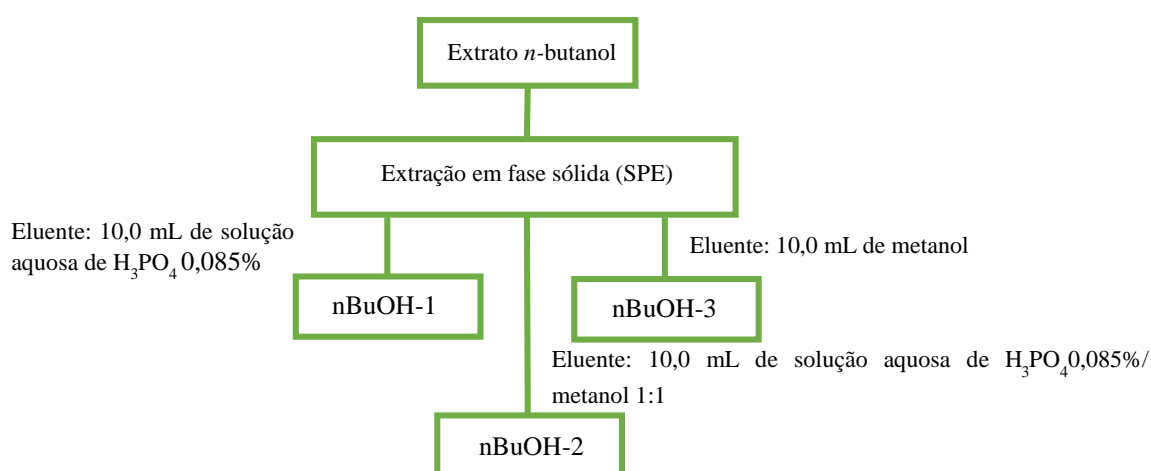
Fonte: autor.

Os derivados do ácido pulvínico apresentam em suas estruturas, diversos grupamentos hidroxila, os quais conferem características polares às moléculas. Desta forma utilizou-se o solvente polar *n*-butanol na partição líquido-líquido a fim de extrair esses pigmentos.

4.4 Fracionamento dos extratos *n*-butanol por extração em fase sólida (SPE)

Alíquotas dos extratos *n*-butanol foram fracionadas em cartucho cromatográfico de fase reversa, utilizando como eluentes uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,085% (v/v), uma mistura de H_3PO_4 0,085%/metanol 1:1 e metanol. O fluxograma 1 descreve a obtenção dessas três frações, que foram denominadas nBuOH-1, nBuOH-2 e nBuOH-3.

Fluxograma 1. Fracionamento das amostras dos extratos *n*-butanol.



As frações oriundas no fracionamento em SPE foram analisadas por CCDA e após análise dos resultados obtidos, as frações nBuOH-2 dos três extratos foram concentradas e submetidas a análises posteriores. A Tabela 3 apresenta as massas usadas e rendimentos obtidos.

Tabela 3. Massas dos extratos *n*-butanol utilizados e da fração nBuOH-2.

Origem	Extrato <i>n</i>-butanol (mg)	nBuOH-2 (mg)	Rendimento da purificação (%)
Urbano-Santos	46,7	28,8	61,8
Marco	48,4	9,8	20,3
Fortaleza	48,6	17,8	36,6

Fonte: autor.

4.5 Análises Cromatográficas

4.5.1 Análises por CCDA (*Cromatografia em Camada Delgada*)

Os processos de extração e fracionamento dos extratos foram acompanhados por análises em CCDA (*Cromatografia em Camada Delgada*), da Macherey-Nagel, feita de sílica gel C₁₈, 0,15 mm de espessura, com indicador fluorescente UV (254 nm), aderida em folha de alumínio.

4.5.2 Preparação das amostras das frações *n*-BuOH-2 para análise em CLAE

Amostras das frações *n*-BuOH-2 foram dissolvidas em metanol grau HPLC de forma a obter concentração final de 3mg/mL. As soluções foram filtradas e armazenadas em frascos de vidro.

4.5.3 Análise das frações *n*BuOH-2 por CLAE

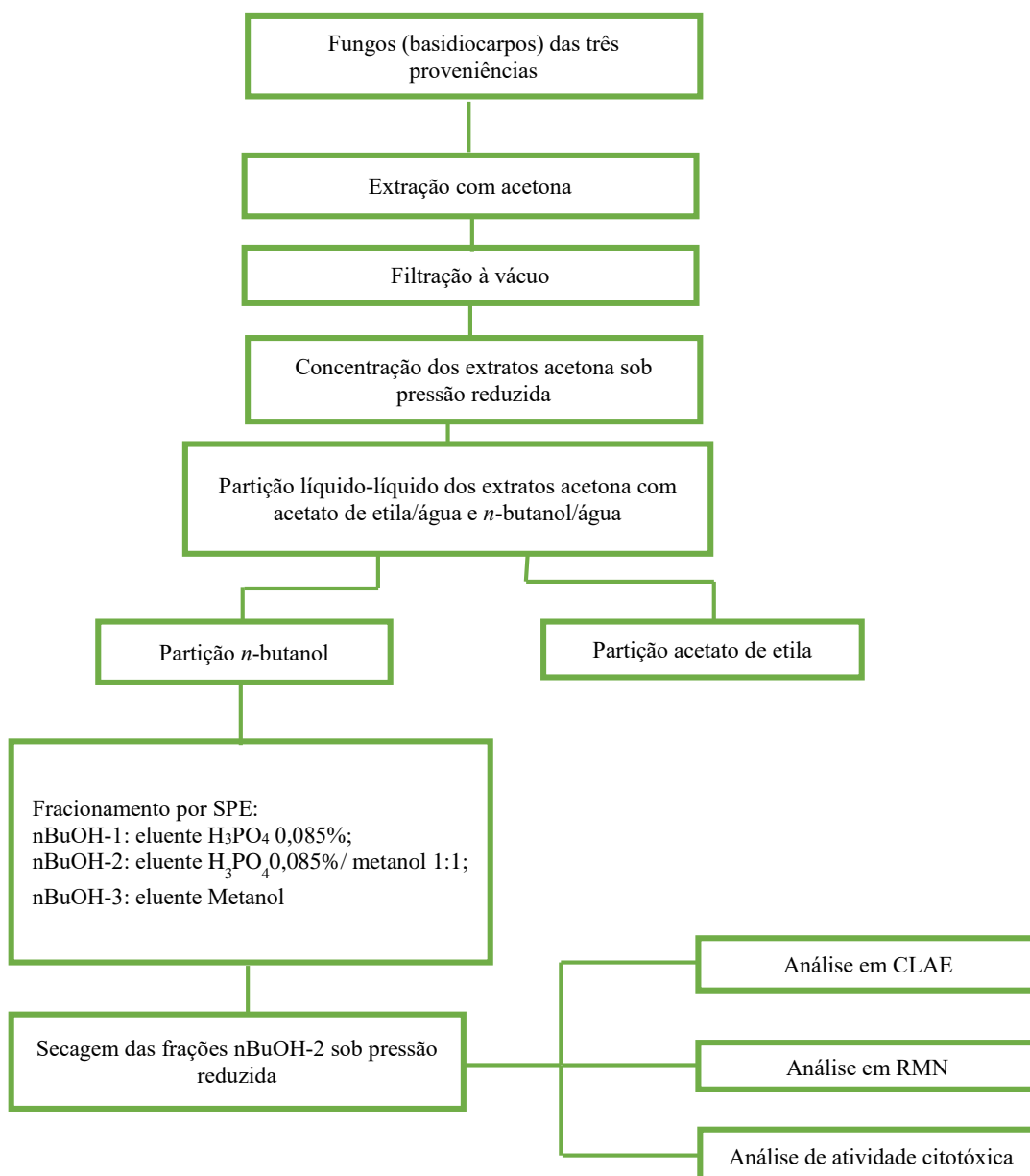
As análises das frações *n*BuOH-2 foram feitas em equipamento Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - Shimadzu® e coluna cromatográfica Coluna Luna C18, da marca Phenomenex, de 5μ e 100 A e dimensões de 250 por 4,6 mm, na temperatura de 40°C. Os eluentes constituintes da fase móvel foram: solução de ácido fosfórico 0,085% (v/v) e metanol grau HPLC, com um fluxo de 1,00mL/min. O método utilizado iniciou com 5% de metanol e em 47,50 minutos atingiu 100%, perfazendo uma taxa de 2mL/min. Em 52,50 minutos a concentração de metanol decresceu para 5%, condicionando a coluna cromatográfica até 60,00 minutos, término da análise. A detecção ocorreu por uma varredura do espectro UV-Vis, em detector de fotodiodo. O volume de amostra utilizado na injeção foi de 20 μL.

4.6 Atividades Biológicas

4.6.1 Análise de citotoxicidade das frações *n*BuOH-2

Amostras de 5,0 mg das frações *n*BuOH-2 foram submetidas a ensaios de atividades citotóxica e antitumoral, no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Estes ensaios foram realizados com as células tumorais humanas SNB-19 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HCT-116 (côlon), HL-60 (leucemia) e com as células não tumorais L929 (fibroblasto murino não tumoral) e HACAT (queratinócito humanos não-tumoral), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). A análise de atividade citotóxica foi feita pelo método MTT.

Fluxograma 2. Resumo dos procedimentos experimentais.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação das massas dos extratos acetona

A técnica de extração é muito utilizada nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia, para obtenção de produtos naturais de valor agregado. Porém a obtenção produtos naturais a partir de plantas e micro-organismos depende, além da escolha do solvente e condições do processo, da matriz da amostra. Plantas e micro-organismos são uma matriz bastante complexa, pois constituem-se de uma mistura de compostos e células, espaços intercelulares e poros, que influenciam na extração dos compostos de interesse (VEGGI, 2009).

É possível perceber que existem diferenças nos rendimentos dos extratos acetona obtidos (Tabela 1, Pág. 27). O fungo proveniente de Fortaleza (CE) apresentou maior rendimento de extração, seguido do fungo oriundo de Urbano-Santos (MA) e de Marco (CE). Os metabólitos secundários são compostos produzidos pelos organismos, com o objetivo de melhorar a interação deste com o ecossistema, a fim de suprir suas necessidades e manter sua sobrevivência. Desta forma, a produção de metabólitos secundários depende de diversos fatores associados ao produtor natural e o ambiente em que vive. O solo, o clima, a sazonalidade, os nutrientes disponíveis e também a idade do organismo são exemplos de fatores que afetam diretamente a produção destes metabólitos (CHAVES, 2012). Por exemplo, fungos e líquens produzem pigmentos para se proteger contra radiação solar quando se encontram em ambientes de clima extremo (NGUYEN et al., 2013). Desta forma, é esperado que os extratos dos fungos de diferentes locais tenham perfis distintos, uma vez que nenhum destes fatores (solo, clima, sazonalidade e nutrientes) foi analisado para cada fungo coletado.

5.2 Análise dos extratos do fracionamento em SPE por Cromatografia em Camada Delgada (CCDA)

Após o fracionamento dos extratos *n*-BuOH, do fungo *P. tinctorius* das três diferentes procedências, as frações nBuOH-1, nBuOH-2 e nBuOH-3 de cada extrato foram analisadas por CCDA de fase reversa (Figura 7).

Os derivados de ácido pulvínico são pigmentos geralmente amarelos e laranjas (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011). Todos os extratos nBuOH-2 continham coloração marrom-laranja, sendo forte indicativo da presença destas moléculas. A análise das placas mostrou que as frações nBuOH-2 apresentavam manchas de acordo com os pigmentos de interesse, levando em consideração a coloração das manchas nas placas. Dessa forma, somente as frações nBuOH-2 foram submetidas as análises posteriores.

Figura 7. Análise das frações nBuOH-2 por CCDA.



1: nBuOH-2 - Fortaleza; 2: nBuOH-2 - Marco; 3: nBuOH-2 – Urbano-Santos

Eluente: H₃PO₄ 0,085%/metanol 1:1

Fonte: autor

Após a análise por CCDA as frações nBuOH-2 foram comparadas entre si através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a fração nBuOH-2 - Urbano-Santos foi analisada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais, por ser a fração com maior grau de pureza.

5.3 Análise por CLAE das frações nBuOH-2

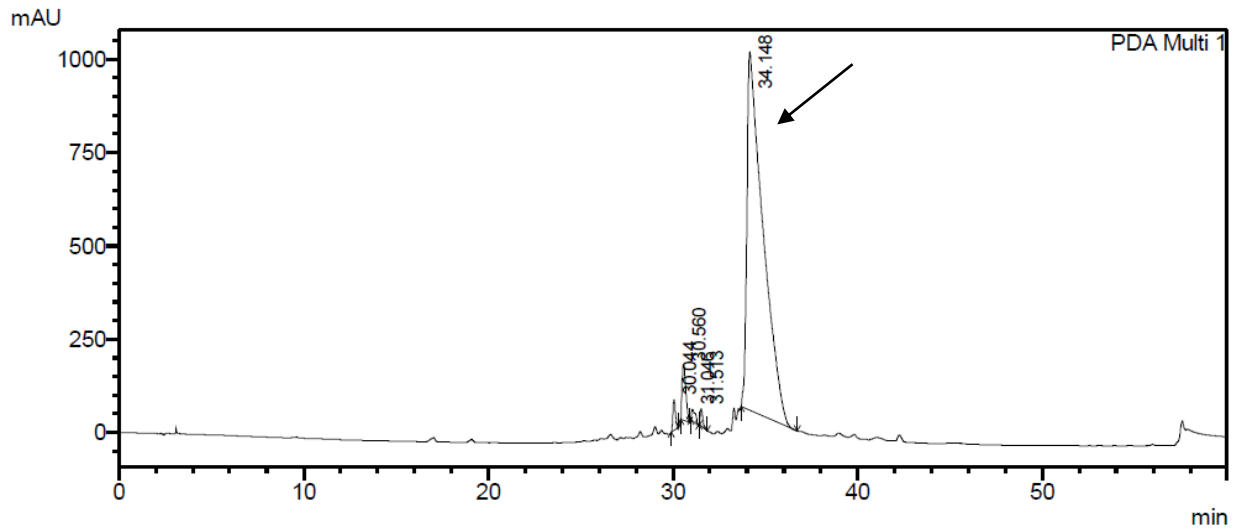
A análise dos cromatogramas (Figuras 8, 9 e 10) obtidos para as frações nBuOH-2 mostraram alguns picos em comum nas três amostras, indicando que, possivelmente, possuem moléculas semelhantes.

O cromatograma da fração nBuOH-2 - Urbano-Santos apresentou um pico de alta intensidade no tempo de retenção de 34 minutos (Figura 8). Este é pico mais intenso, sendo um indicativo de que, provavelmente, há um composto majoritário nessa fração, ou que por tratar-se de um pigmento apresenta maior absorção no detector de ultravioleta (detector do CLAE) que as demais moléculas presentes na fração.

A fração nBuOH-2 – Marco (Figura 9) apresentou cinco picos bastante significativos, na faixa de 30 a 40 minutos e três picos de baixa intensidade, dois com tempos de retenção entre 19 e 20 minutos e o outro com tempo de retenção de 40 minutos. A fração nBuOH-2 – Fortaleza (Figura 10), por sua vez, apresentou dois picos de alta intensidade em 37,8 e 38,6 minutos e alguns picos de baixa intensidade.

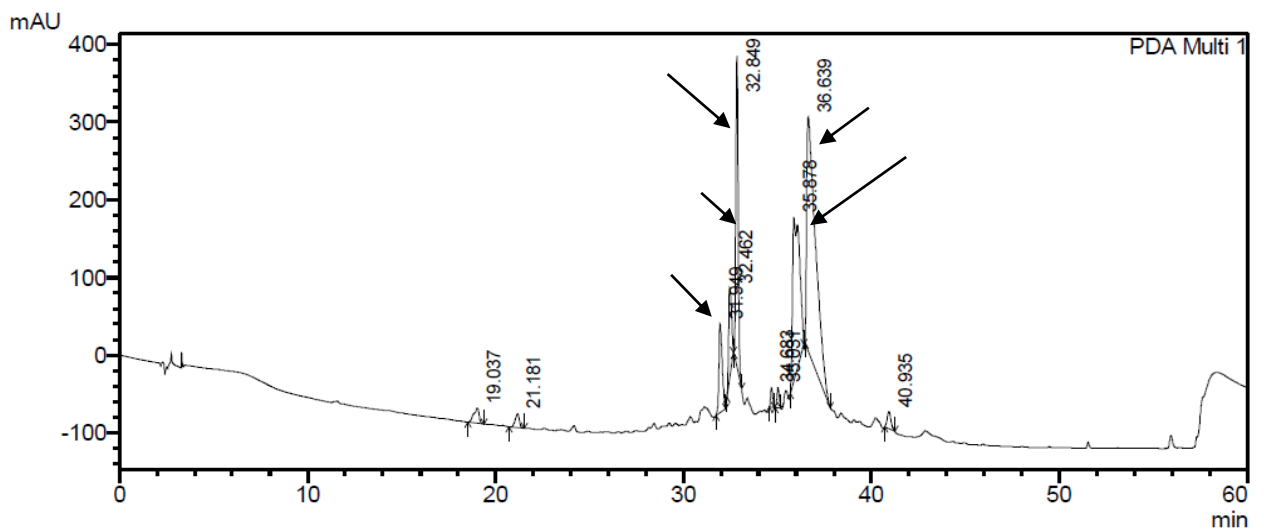
A sobreposição dos cromatogramas das três frações (Figura 11) mostra similaridade entre os sinais, uma vez que os tempos de retenção das espécies detectadas estão na mesma região. Apesar da similaridade é possível observar que a fração nBuOH -2 Marco possui uma variedade maior de compostos que os de Fortaleza e de Urbano-Santos.

Figura 8. Cromatograma da fração nBuOH-2 - Urbano-Santos.

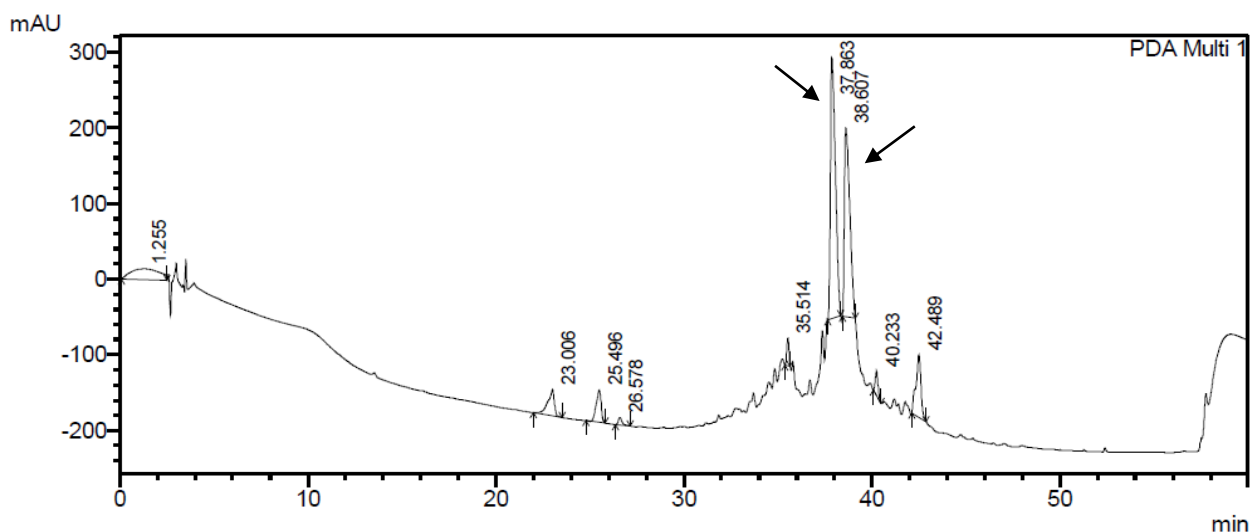


Fonte: autor.

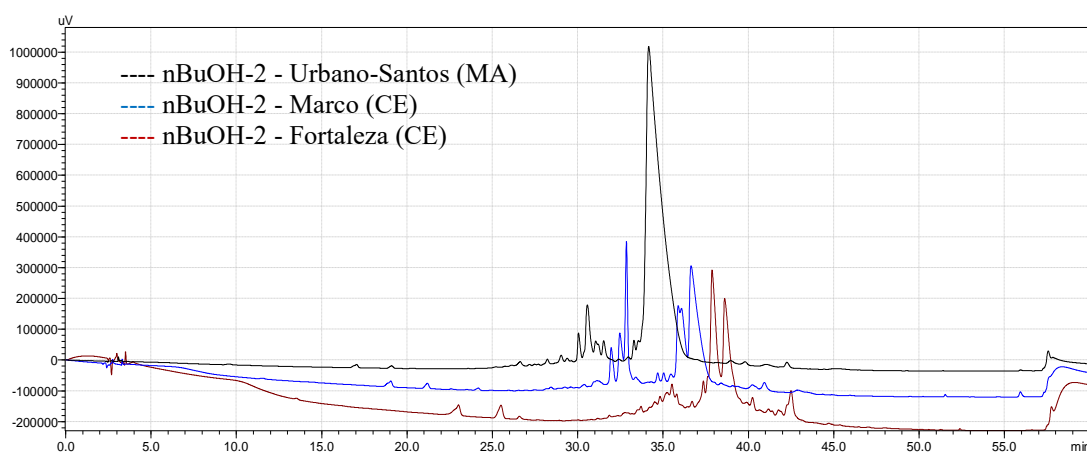
Figura 9. Cromatograma da fração nBuOH-2 -Marco.



Fonte: autor.

Figura 10. Cromatograma da fração nBuOH-2 -Fortaleza.

Fonte: autor.

Figura 11. Sobreposição dos cromatogramas das frações nBuOH-2.

Fonte: autor.

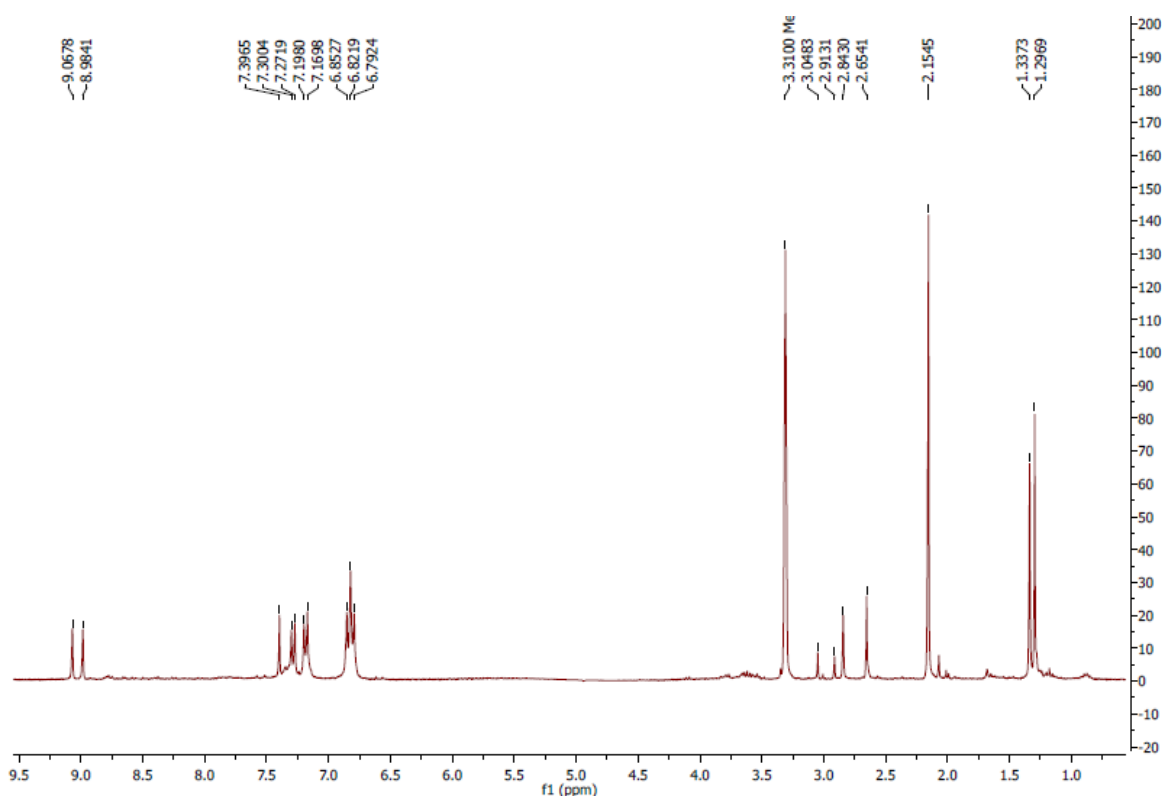
5.4 Análise da fração nBuOH-2 - Urbano Santos por RMN ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C -BB e DEPT 135 (Figuras 12 – 14) da fração nBuOH-2 – Urbano-Santos foram analisados e mostraram a presença de poucos sinais, tornando difícil a caracterização estrutural. A quantidade de amostra utilizada na análise talvez seja o fator limitante, porém mesmo com poucos sinais nos espectros é possível observar a presença de linhas nas regiões de carbonos e hidrogênios aromáticos. De acordo com a literatura os derivados do ácido pulvínico isolados do fungo *P. tinctorius*, a Badiona A, Pisoquinona (GILL

e WATLING,1986) e a Norbabiona A (GILL e LALLY, 1985), apresentam diversos sinais na região de aromáticos.

No espectro de RMN ^1H de nBuOH-2-Urbano-Santos (Figura 12) pode-se perceber a presença de hidrogênios aromáticos em $\delta = 7,40$ ppm (s), $\delta = 7,30$ ppm (d; $J = 8,5$ Hz), $\delta = 7,20$ ppm (d; $J = 8,5$ Hz). O sinal em 6,85 ppm que aparentemente aparece como um tripleto, apresenta constantes de acoplamento diferentes entre os dois picos do sinal, portanto pode se tratar de dois dubletos sobrepostos.

Figura 12. Espectro de RMN ^1H de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-300 MHz).



A presença desses poucos sinais nos espectros de nBuOH-2 – Urbano-Santos não indica que essa fração apresente algum derivado do ácido pulvínico, dessa forma se faz necessário a obtenção de uma maior quantidade de amostra além da realização de procedimentos que levem a um produto puro.

Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C -BB de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-75 MHz).

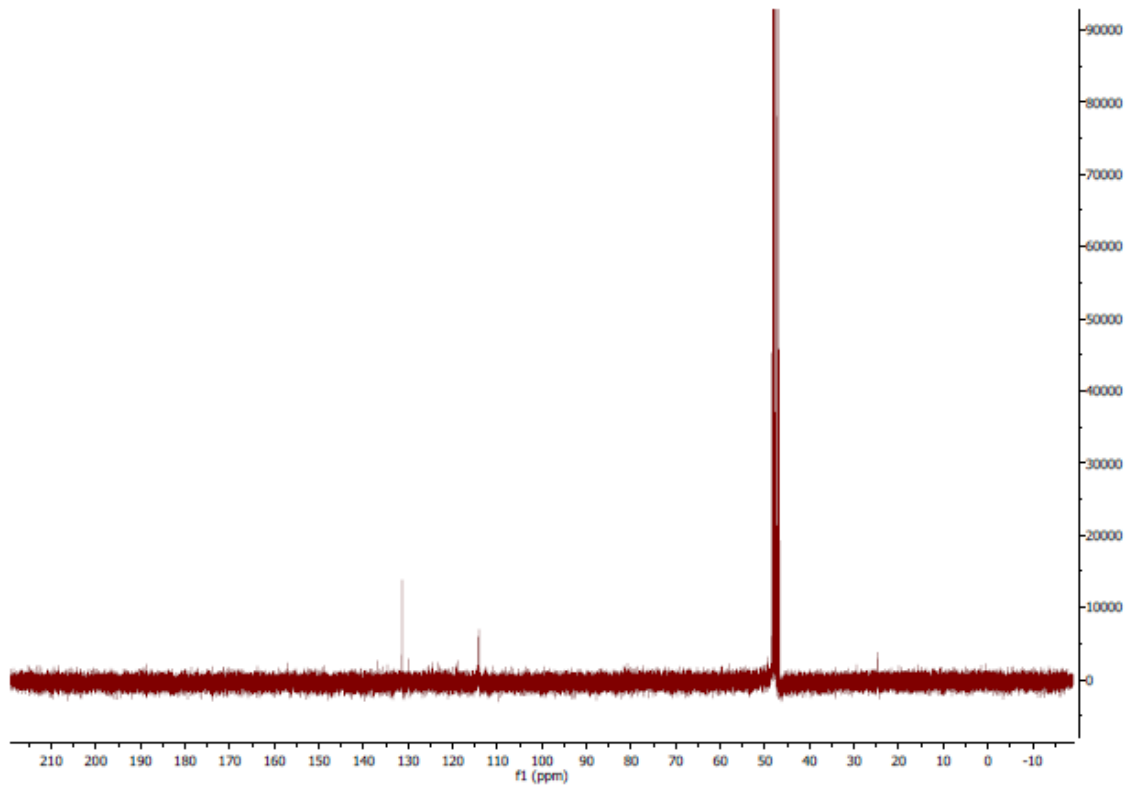
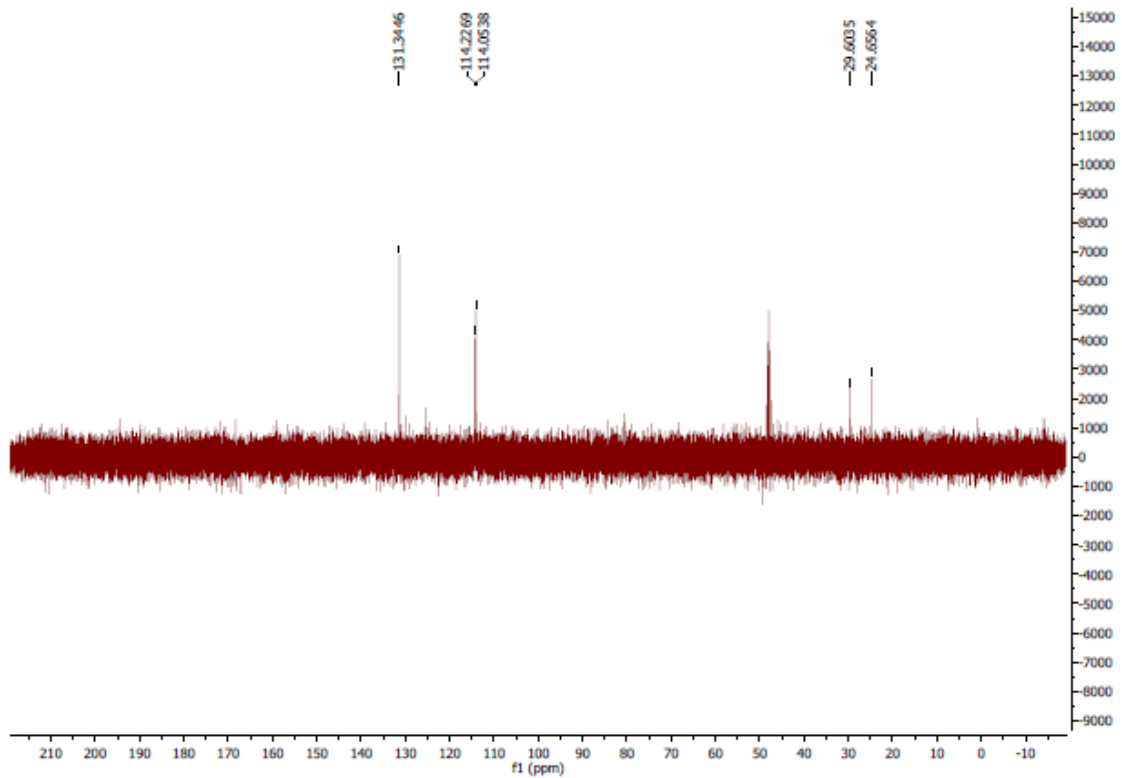


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 de nBuOH-2 – Urbano Santos (MeOD-75 MHz)



5.5 Ensaios de atividade citotóxica das frações nBuOH-2 – Urbano Santos

O MTT é um método de análise de citotoxicidade rápido e barato, por isso é amplamente utilizado. É uma análise colorimétrica que se baseia na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) no composto azul de formazan. Esta conversão ocorre através de enzimas presentes na mitocôndria de células metabolicamente ativas. A partir da análise espectrofotométrica é possível obter o valor de IC₅₀, que significa a concentração do analito capaz de reduzir 50% das células (ARAÚJO et al., 2008). De acordo com os resultados da análise de citotoxicidade pelo método MTT, as frações testadas não apresentaram atividade citotóxica nas quatro linhagens de células tumorais e nas duas linhagens de células não tumorais. Os resultados da análise são apresentados no Anexo A.

6 CONCLUSÃO

A análise dos perfis cromatográficos das frações nBuOH-2, obtidas a partir do fungo *Pisolithus tinctorius*, mostrou que existem diferenças na composição dessas frações. Os espectros de RMN obtidos para a fração nBuOH-2-Urbano-Santos apresentaram alguns sinais na região de H e C aromáticos, o que está de acordo com a literatura, porém não foram suficientes para elucidar a estrutura molecular das moléculas presentes na fração. A obtenção de poucos sinais de RMN pode ser atribuída a pouca quantidade de amostra disponibilizada para a análise. Apesar de os resultados obtidos oferecerem indícios da presença de derivados de ácido pulvínico, não foi possível confirmar a natureza das moléculas que constituem essas frações como sendo desta classe de pigmentos, fazendo-se necessário a continuação deste trabalho e a busca por novas metodologias para obtenção de um produto mais puro. Os ensaios de atividade biológica também mostraram que essas frações não são tóxicas para algumas linhagens de células tumorais e não-tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural Toxins**, v. 4, n. 2, p. 96–102, 1996.
- ARAÚJO, S. A. C. DE et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25–31, 2008.
- BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AGUILAR, C. A. Significado y aplicación de las micorrizas en agricultura. **Estación Experimentañ del Zaidín**. CSIC. Outubro. 2016.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. III-Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa. 2006.
- CHAVES, T. P. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.
- CRUZ, A. J.; IN ALEXANDRA SOVERAL DIAS, A. E. C. (ORG. . Os Pigmentos Naturais Utilizados em Pintura. **Pigmentos e Corantes Naturais. Entre as artes e as ciências, Évora, Universidade de Évora**, p. 5–23, 2007.
- DAVOLI, P.; WEBER, R. W. S. Simple method for reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of fungal pigments in fruit-bodies of Boletales (Fungi). **Journal of Chromatography A**, v. 964, n. 1–2, p. 129–135, 26 jul. 2002.
- DE SOUZA, A. M. **Diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *pisolithus* spp.** 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 2000.
- DIEHL, B. Principles in NMR spectroscopy. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**, p. 1–41, 2008.

DUDÁS, J. et al. Curcumin targets fibroblast-tumor cell interactions in oral squamous cell carcinoma. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 6, p. 800–809, 2013.

DUVAL, R.; DUPLAIS, C. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 2, p. 161–193, 2017.

EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Molecular structural studies of lichen substances II: Atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 27-37, 18 set. 2002.

GASQUEIRA, R. DE G.; SANTOS, S. F. Pigmentos inorgânicos: propriedades, métodos de síntese e aplicações. **Série Rochas e Minerais Industriais**. 2008.

GILL, M.; LALLY, D. A. A naphthalenoid pulvinic acid derivative from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1351-1354, 1985.

GILL, M.; WATLING, R. The relationships of *Pisolithus* (Sclerodermataceae) to other fleshy fungi with particular reference to the occurrence and taxonomic significance of hydroxylated pulvinic acids. **Plant Systematics and Evolution**, v. 154, n. 3–4, p. 225–236, set. 1986.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; SILVA, B. V. Using colors of nature to satisfy consumer desires: Natural substances as colorants in the food industry. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394–420, 2013.

HANSON, J. R. Pigments and Odours of Fungi. **The Chemistry of Fungi**, p. 127–146, 2008.

HUANG, Y.-T. et al. In Vitro Inhibitory Effects of Pulvinic Acid Derivatives Isolated from Chinese Edible Mushrooms, *Boletus calopus* and *Suillus bovinus*, on Cytochrome P450 Activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 855–860, 23 abr. 2009.

KAHNER, L. et al. Polyene pigments from fruit-bodies of *Boletus laetissimus* and *B. rufo-aureus* (Basidiomycetes). **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1693–1697, 20 nov. 1998.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 9-16, 2001.

NGUYEN, K. H. et al. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 12, p. 1490-1508, dez. 2013.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal Stability of Natural Pigments and Dyes. **Revista Fitos**, v. 3, p. 6–24, 2007.

SHAH, F. et al. Involutin is an Fe³⁺ reductant secreted by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* during Fenton-based decomposition of organic matter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 24, p. 8427–8433, 2015.

SINGH, P.; ANCHEL, M. Atromentic acid from *Clitocybe illudens*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 12, p. 3259–3262, 1971.

SOUSA, D. I. T. **Validação de Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. 2018.

SPITELLER, P. Chemical ecology of fungi. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 971–993, 2015.

STEFFAN, B.; STEGLICH, W. Pigments from the Cap Cuticle of the Bay Boletus (*Xerocomus badius*). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, n. 6, p. 445–447, 1984.

TAKEO, N. et al. Cochineal dye-induced immediate allergy: Review of Japanese cases and proposed new diagnostic chart. **Allergology International**, v. 67, n. 4, p. 496–505, 2018.

TAUBER, J. P. et al. Dissimilar pigment regulation in *Serpula lacrymans* and *Paxillus involutus*

during inter-kingdom interactions. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 1, p. 65–77, 1 jan. 2018.

VAROL, M. Photoprotective Properties of Natural Pulvinic Acid Derivatives toward Ultraviolet-Induced Damages. **International Journal of Secondary Metabolite**, p. 319–330, 22 nov. 2018.

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. Pigments of higher fungi: A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 2, p. 87-102, 2011.

VIEWEG, L. et al. Recent advances in the field of bioactive tetronates. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1554-1584, 2014.

WINNER, M. et al. Unusual pulvinic acid dimers from the common fungi *Scleroderma citrinum* (common earthball) and *Chalciporus piperatus* (peppery bolete). **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 14, p. 1883–1886, 26 mar. 2004.

ANEXO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE PIGMENTOS FÚNGICOS (UFC)

 <p>Laboratório de Oncologia Experimental</p>	<p align="center">Universidade Federal do Ceará Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos Laboratório de Oncologia Experimental</p>
<p align="center">LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DAS AMOSTRAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ</p>	
<p align="center">Avaliação do potencial citotóxico de pigmento fúngicos (UFC)</p>	
<p>Nº. de Páginas: 4 Versão: 01</p>	<p>Pesquisador responsável pela Amostra: Profa. Conceição Oliveira</p>
<p align="center">Pesquisadores Responsáveis (LOE): Manoel Odorico de Moraes, MD, MSc, PhD odorico@ufc.br* Cláudia do Ó Pessoa, MSc, PhD cpessoa@ufc.br Bruno Marques Soares, MSc, PhD brunomsoares@gmail.com</p> <p align="center">Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 Fortaleza – Ceará – Brasil C EP: 60.430-270 (85) 3366-8255</p>	

CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

OBJETIVO

Verificar a citotoxicidade *in vitro* de extratos em 4 linhagens de células tumorais e 2 linhagens de células não-tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral de compostos extraídos de fungo de 3 localidades diferentes (Marco, UFC e Maranhão).

MATERIAL

Células: As linhagens tumorais humanas utilizadas, SNB-19 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HCT-116 (côlon), HL-60 (leucemia), L929 (fibroblasto murino não tumoral) e HACAT (queratinócito humanos não-tumoral) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Para determinação da CI₅₀, as amostras foram testadas em concentrações crescentes em diluição seriada com maior concentração de 25 µg/mL para células tumorais.

MÉTODO

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens SNB-19, PC-3, L-929 e 0,7 x 10⁵ cél/mL HCT-116, 0,3 x 10⁶ para a linhagem HL-60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida

após dissolução do precipitado com 150 μ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

RESULTADOS

A concentração inibitória de 50% das células (CI₅₀) das substâncias ativas está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Citotoxicidade (CI₅₀) das amostras em quatro linhagens tumorais e duas linhagens não-tumorais. Os valores são apresentados em μ g/mL e respectivos intervalos de confiança.

	HL-60	HCT-116	SNB-19	PC-3	L-929	HACAT
MARCO	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
UFC	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
MARANHÃO	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25

CONCLUSÃO

As amostras testadas não apresentaram citotoxicidade frente as linhagens tumorais utilizadas.

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.