



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

PIGMENTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO BASIDIOMICETO *Pisolithus tinctorius*:
DESREPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E ESTUDO DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO

FORTALEZA

2022

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

PIGMENTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO BASIDIOMICETO *Pisolithus tinctorius*:
DESREPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.
Coorientadora: Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes.

FORTALEZA

2022

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

C172p Camara, Ana Gabrielle do Nascimento.

Pigmentos produzidos pelo fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius*: desreplicação, isolamento e estudo do potencial biotecnológico / Ana Gabrielle do Nascimento Camara. – 2023.
91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

Coorientação: Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes.

1. Pigmentos naturais. 2. *Pisolithus tinctorius*. 3. Derivados do ácido pulvínico. 4. Desreplicação. 5. Potencial biotecnológico. I. Título.

CDD 540

ANA GABRIELLE DO NASCIMENTO CAMARA

PIGMENTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO BASIDIOMICETO *Pisolithus tinctorius*:
DESREPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes (coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira
Universidade Federal de Goiás (UFG)

“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da minha vida.

À minha família, pelo apoio e pelo amor.

À minha tia Fátima, pela paciência, compreensão, apoio, amor e por me ensinar a enfrentar os desafios de todos os dias com perseverança e da melhor maneira possível.

À Professora Fátima, pela orientação, pelo ensinamento, pelo apoio e compreensão. Pelas risadas, pela amizade. Obrigada pela atenção, principalmente nos momentos mais difíceis, sempre com ricos conselhos. Obrigada por me mostrar que é incrível trabalhar com o que se gosta.

À Professora Conceição, pela orientação, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pela oportunidade que me deu de desenvolver uma pesquisa que, apesar das dificuldades, me trouxe muita felicidade e aprendizado. Agradeço por me fazer me apaixonar pela química orgânica.

Às Professoras Cecília e Lucília, da Universidade Federal de Goiânia, pelas análises de espectrometria de massas, por todo o apoio, pela atenção e carinho.

Ao Professor Jair Mafezoli, pela atenção e ajuda na caminhada.

Ao professor Daniel Esdras, pela ajuda com as análises experimentais do RMN e à todos os professores do departamento pelo apoio na caminhada.

Ao CENAUREM, pela aquisição dos espectros. Em especial ao Gledson, pelos espectros, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, pela amizade e por estarem comigo nos momentos felizes e tristes. Obrigada por todo o apoio. Em especial a todos os amigos do LABS, por tudo.

Ao Monilson e Gabriel, pela ajuda com os experimentos e pela amizade.

À Raquel e ao tio César, pela amizade e pelas risadas toda semana no laboratório.

A todos os que ajudaram no desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* (ordem Boletales) se caracteriza como um fungo micorriza, desenvolvendo-se em simbiose com plantas dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Os pigmentos derivados do ácido pulvínico são um dos principais metabólitos secundários produzidos por esse fungo, sendo responsáveis pela coloração amarela, laranja e marrom características dessa espécie. Os metabólitos norbadiona A, badiona A, bisnorbadioquinona A e pisoquinona são exemplos de pigmentos produzidos pelo *P. tinctorius*. Neste contexto, este trabalho descreve o estudo do perfil químico de pigmentos da classe derivados do ácido pulvínico no fungo *P. tinctorius*, coletado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como a investigação do potencial biotecnológico das frações H₂O-MeOH e MeOH obtidas. As análises de absorção na região UV-Vis e infravermelho apresentaram sinais característicos do esqueleto básico dos derivados do ácido pulvínico. Além disso, análises termogravimétrica e de fluorescência foram usadas para caracterização das frações, indicando estabilidade térmica e propriedade fluorescente das amostras. A análise de desreplicação das frações H₂O-MeOH e MeOH foi realizada por cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e pelo estudo de redes moleculares, usando a plataforma online GNPS. Foi possível propor a presença de 7 derivados do ácido pulvínico já relatados na literatura, dentre os quais 4 são identificados pela primeira vez em *P. tinctorius*, além de moléculas pertencentes à outras classes de compostos. O estudo também permitiu sugerir a presença de 7 novos compostos. Norbadiona A, conhecida como um dos principais compostos responsáveis pela pigmentação de *P. tinctorius*, foi isolada da fração H₂O-MeOH e identificada através de FTIR, UV-Vis, EM e RMN ¹H e ¹³C. As frações H₂O-MeOH e MeOH apresentaram capacidade antioxidante, com IC₅₀ de 22 e 105 µg mL⁻¹, respectivamente. O fator de proteção solar de ambas as frações também foi investigado, sendo 23,19 para a fração H₂O-MeOH, e 20,34 para a MeOH. Além disso, a fração H₂O-MeOH não apresentou citotoxicidade frente à linhagens de células normais. Esses resultados indicam um grande potencial biotecnológico das frações, possibilitando sua aplicação em produtos de consumo humano, como cosméticos.

Palavras-chave: Pigmentos naturais; *Pisolithus tinctorius*; derivados do ácido pulvínico; desreplicação; potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Basidiomycete *Pisolithus tinctorius* (order Boletales) is a mycorrhizal fungus, which grows in symbiosis with Eucalyptus and Pinus trees. Pulvinic acid derivatives are major secondary metabolites produced by this fungus, responsible for its yellow, orange and brown colors. Norbadione A, badione A, bisnorbadioquinone A and pisolquinone are examples of pigment molecules produced by *P. tinctorius*. In this context, this work describes the chemical profile of pulvinic acid derivatives pigments in *Pisolithus tinctorius* collected in Campus do Pici, at Ceara Federal University, as well as the investigation of the biotechnological potential of fractions H₂O-MeOH and MeOH. The UV-vis and infrared absorption analysis showed characteristic signals of the basic skeleton of pulvinic acid derivatives. Furthermore, the thermogravimetric and fluorescence analysis were used for characterization of fractions, which presented thermal stability and fluorescence properties. Dereplication analysis of fractions was developed using high performance liquid Chromatography coupled with mass Spectrometry (HPLC-MS) and molecular networking, at GNPS online platform. That was possible to propose the presence of 7 pulvinic acid derivatives already reported in the literature, among which 4 were identified for the first time in *P. tinctorius*, besides other molecules belonging to different class of compounds. This study also allowed the proposition of 7 novel compounds. Norbadione A, known as the major pigment of *P. tinctorius*, was isolated from fraction H₂O-MeOH and identified by FTIR, UV-Vis, MS and NMR ¹H and ¹³C. Fractions H₂O-MeOH and MeOH showed antioxidant capacity, with EC₅₀ 22 e 105 µg mL⁻¹, respectively. The solar protection factor of fractions was also investigated, with 23,19 for fraction H₂O-MeOH and 20,34 for MeOH. Besides that, fraction H₂O-MeOH had no cytotoxicity against normal cells. This results indicate the great biotechnological potential of fractions, enabling its application in human consumption products, such as cosmetics.

Key-words: Natural pigments; *Pisolithus tinctorius*; pulvinic acid derivatives; dereplication; biotechnological potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pigmentos isolados de plantas.....	19
Figura 2 – Pigmentos isolados de insetos.....	19
Figura 3 – Pigmentos isolados de fungos.....	19
Figura 4 – Estruturas moleculares dos derivados do ácido pulvínico	22
Figura 5 – Estrutura molecular da atromentina (36)	25
Figura 6 – Metabólitos secundários biossintetizados a partir dos ácidos arilpirúvicos.....	25
Figura 7 – Biossíntese de norbadiona A, badiona A, bisnorbadioquinona A e 27 pisoquinona, sugerida por Gill e Kiefel	27
Figura 8 – Cromatograma da fração H ₂ O	36
Figura 9 – Cromatograma da fração H ₂ O-MeOH	37
Figura 10 – Cromatograma da fração MeOH	37
Figura 11 – Espectros de absorção UV-vis da fração H ₂ O-MeOH (A) e MeOH (B)	38
Figura 12 – Espectros de fluorescência das frações H ₂ O-MeOH (C) e MeOH (D)	39
Figura 13 – Espectro de infravermelho da fração H ₂ O-MeOH	40
Figura 14 – Espectro de infravermelho da fração MeOH	40
Figura 15 – Curvas de TGA e primeira derivada das frações H ₂ O-MeOH (E) MeOH (F)..	41
Figura 16 – Redes moleculares de dados EM/EM das frações H ₂ O-MeOH e MeOH 43 obtidos na plataforma GNPS	43
Figura 17 – Cromatograma de íon totais da fração H ₂ O-MeOH (A) e MeOH (B) obtido 47 por CLAE-DAD-ESI-EM/EM	47
Figura 18 – Espectro de íon produto e estrutura molecular da pisoquinona (33)	46
Figura 19 – Mecanismo de fragmentação proposto para pisoquinona (33)	47
Figura 20 – Espectro de íon produto e possível estrutura molecular para D-P (39)	48
Figura 21 – Mecanismo de fragmentação proposto de D-P (39)	48

Figura 22 – Espectro de íons produto e estruturas moleculares de aspulvinona E (44) e isoaspulvinona E (45)	49
Figura 23 – Fragmentação proposta para aspulvinona E (44) e isoaspulvinona E (45)	49
Figura 24 – Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-I (37)	50
Figura 25 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-I (37)	50
Figura 26 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de ácido xerocômico (20)	51
Figura 27 – Fragmentação proposta para o ácido xerocômico (20)	51
Figura 28 – Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-NBA1 (38)	52
Figura 29 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-NBA1 (38)	53
Figura 30 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de bisnorbadioquinona A (30)	54
Figura 31 – Mecanismo de fragmentação proposto para bisnorbadioquinona A (30)	54
Figura 32 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de ácido atromêntico (16)	55
Figura 33 – Mecanismo de fragmentação proposto para o ácido atromêntico (16)	55
Figura 34 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de xerocomorubina (19)	56
Figura 35 – Mecanismo de fragmentação proposto para xerocomorubina (19)	56
Figura 36 – Espectro íon produto e estrutura molecular do D-NBA2 (40)	57
Figura 37 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-NBA2 (40)	58
Figura 38 – Espectro íon produto e estrutura molecular da norbadiona A (31)	59
Figura 39 – Mecanismo de fragmentação proposto para norbadiona A (31)	59
Figura 40 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de D-OMP1 (41)	60
Figura 41 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP1 (41)	60
Figura 42 – Espectro de íon produto e estrutura molecular da atromentina (37)	61
Figura 43 – Mecanismo de fragmentação proposto para atromentina (37)	62
Figura 44 – Espectro íon produto e estrutura molecular da O-metil pulviquinona A (26) ..	62

Figura 45 – Mecanismo de fragmentação proposto para o-metil pulviquinona A (26)	63
Figura 46 – Espectro de íon produto e estrutura molecular de D-OMP2 (42)	63
Figura 47 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP2 (42)	64
Figura 48 – Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-OMP3 (43)	64
Figura 49 – Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP3 (43)	65
Figura 50 – Espectro de absorção na região UV-visível de norbadiona A (31)	66
Figura 51 – Espectro de absorção na região do infravermelho de norbadiona A (31)	66
Figura 52 – Espectro de emissão de norbadiona A (31)	67
Figura 53 – Espectro de Massas de Norbadiona A (31)	68
Figura 54 – Mecanismo de fragmentação de norbadiona A (31)	68
Figura 55 – Espectro de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de norbadiona A (31) e marcações de acordo com a Tabela 2	69

LISTA DE FLUOXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Obtenção das frações em SPE.	31
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Íons $[M-H]^-$ observados, tempo de retenção (t_r) de acordo com figura 17, $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm), fragmentos EM/EM e compostos identificados	45
Tabela 2 – Dados de RMN de 1H e ^{13}C da norbadiona A (31).....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ESTADO DA ARTE	17
2.1	Importância dos pigmentos	17
2.2	Pigmentos naturais	18
2.3	Pigmentos derivados do ácido pulvínico	20
2.3.1	<i>Biossíntese de metabólitos secundários derivados do ácido pulvínico</i>	24
2.4	<i>Pisolithus tinctorius</i> como fonte de pigmentos derivados do ácido pulvínico	28
2.5	GNPS: uma ferramenta para desreplicação de compostos	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
4.1	Análises cromatográficas	30
4.1.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada Analítica</i>	30
4.1.2	<i>Extração em Fase Sólida</i>	30
4.1.3	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	30
4.1.4	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE-IES-EM)</i>	30
4.2	Solventes	31
4.3	Análises espectroscópicas	31
4.3.1	<i>Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	31
4.3.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho (IV)</i>	31
4.3.3	<i>Análise de Fluorescência</i>	31
4.4	Análise Termogravimétrica (TGA)	31

4.5	Coleta do fungo	32
4.6	Preparação do extrato acetona	32
4.7	Partição líquido-líquido do extrato acetona	32
4.8	Fracionamento do extrato AcA por SPE	32
4.8.1	<i>Análise das frações obtidas em SPE por CLAE</i>	33
4.9	Análise das frações H ₂ O-MeOH e MeOH em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE-IES-EM/EM)	33
4.10	Identificação dos compostos	33
4.10.1	<i>Parâmetros utilizados na análise de redes moleculares na plataforma GNPS</i>	34
4.11	Fracionamento cromatográfico de H ₂ O-MeOH: isolamento de norbadiona A	34
4.12	Análise de atividade antioxidante das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	34
4.13	Determinação do fator de proteção solar (FPS) das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	35
4.14	Análise de atividade citotóxica da fração H ₂ O-MeOH	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Análise das frações obtidas em SPE por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)	36
5.2	Análise das frações H ₂ O, H ₂ O-MeOH e MeOH por CLAE	36
5.3	Análise dos espectros de UV-vis das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	37
5.4	Análise dos espectros de fluorescência das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	38
5.5	Análise dos espectros de infravermelho das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	39
5.6	Resultado da Análise Termogravimétrica (TGA) das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	41
5.7	Desreplicação das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	42
5.8	Isolamento de norbadiona A (31)	65

5.8.1	<i>Identificação de norbadiona A (31)</i>	65
5.9	Análise de atividade antioxidante das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	72
5.10	Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) das frações H ₂ O-MeOH e MeOH	72
5.11	Análise de atividade citotóxica da fração H ₂ O-MeOH	73
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA FRAÇÃO H₂O-MeOH	80
	ANEXO B – CROMATOGRAMAS DE ÍONS PRODUTO	82

1 INTRODUÇÃO

Os pigmentos naturais têm atraído a atenção de diversos ramos industriais devido ao seu alto potencial biotecnológico, principalmente como antioxidantes, antitumorais e fotoprotetores (PEREIRA; VALENTÃO; ANDRADE, 2014, DUDÁS et al., 2013, VAROL, 2018). Na natureza são produzidos por uma variedade de espécies de insetos, plantas e fungos. As pterinas são moléculas de pigmento produzidas por algumas espécies de borboletas, como a borboleta branca da couve. As betalainas são encontradas nas flores e frutos e conferem uma coloração lilás intensa. Alguns fungos são caracterizados por apresentar pigmentação. Esses pigmentos podem atuar em diversas funções, como antibióticos ou como protetores contra radiação solar. Os fungos do gênero *Fusarium* produzem a aurofusarina, responsável por sua cor vermelha (SHAMIM et al., 2014; POLTURAK; AHARONI, 2018; HANSON, 2008).

O basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* é um fungo cosmopolita que pertence à ordem Boletales. É caracterizado como uma micorriza, ou seja, se desenvolve em simbiose com espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*, sendo esta associação benéfica para ambos. Seus corpos de frutificação possuem uma pigmentação amarela intensa, devido a presença de moléculas derivadas do ácido pulvínico, que é um dos principais metabólitos secundários de *P. tinctorius*. (KNIGHT; PATTENDEN, 1976; DE SOUZA, 2000).

Os derivados do ácido pulvínico são moléculas biossintetizadas pela via do ácido chiquímico e estão presentes principalmente em espécies de fungos da ordem Boletales, conferindo coloração amarela e laranja aos seus basidiocarpos (HANSON, 2008). Até o presente momento, quatro derivados do ácido pulvínico foram relatados para *Pisolithus tinctorius*: norbadiona A, badiona A, bisnorbadioquinona A e pisoquinona (GILL, KIEFEL, 1994; GILL, LALLY, 1985). Apesar das diversas pesquisas sobre *P. tinctorius*, estudos relacionados aos derivados de ácido pulvínico nesta espécie são limitados.

A identificação de pigmentos utilizando técnicas cromatográficas clássicas pode ser um processo lento e caro em função da complexidade dos extratos obtidos a partir da extração com solventes. A desrepliação é uma técnica de identificação de compostos que permite a comparação entre moléculas conhecidas e compostos novos, sem a necessidade de isolamento. Técnicas hífenadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN), são amplamente utilizadas nas metodologias de desrepliação. Com o avanço destas tecnologias, a desrepliação se torna uma poderosa

ferramenta para busca de novas substâncias bioativas e no direcionamento para o isolamento de substâncias de interesse (GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

A espectrometria de massas (EM), em particular a realização da fragmentação de íons específicos (EM/EM), pode ser usada na desreplicação associada a base de dados específicas. Dentre as diversas bases de dados utilizadas em estudos de desreplicação destaca-se a *Global Natural Product Social Networking* (GNPS), uma plataforma online e de livre acesso, para o cálculo de redes moleculares a partir de dados de espectrometria de massas.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Importância dos pigmentos

Desde a antiguidade a cor está presente na vida do homem e, através de relatos históricos, é possível perceber sua influência no desenvolvimento humano. No período pré-histórico, o homem utilizava pinturas como forma de comunicação com os membros de seu grupo ou de outros. Atravavam plantas e pedaços de rochas nas paredes das cavernas como forma de marcar seu território ou para indicar uma fonte de alimento. Essas pinturas eram feitas com os ocre, que eram misturas de óxido de ferro com argila e sílica, de cor marrom (PEARSE, MILLER, BARNETT; 2017). Antraquinonas também foram evidenciadas na Era Glacial e seus tons de vermelho e púrpura foram usados no antigo Egito e em obras do notável pintor holandês Vincent van Gogh (MELO; CLARO, 2010).

A história narra a importância dos pigmentos, porém esta vai muito além de estética e arte, desenvolvendo importantes papéis em diversos organismos. Os insetos produzem pigmentação em determinadas partes de seu corpo com diversas funções, como se comunicar com membros da mesma espécie (um tipo de reconhecimento intraespecífico) ou de espécies distintas (camuflagem usada contra predadores), além de ser importante em processos fisiológicos como fotoproteção e termorregulação (WITTKOPP; BELDADE, 2009). As clorofilas são os pigmentos mais abundantes em plantas e estão diretamente ligadas a absorção de luz, para realização da fotossíntese, essencial à sobrevivência (STREIT et al., 2005). Alguns fungos possuem pigmentos em seus corpos de frutificação com o objetivo de atrair vetores para disseminar seus esporos e também como proteção contra radiação solar (HANSON, 2008).

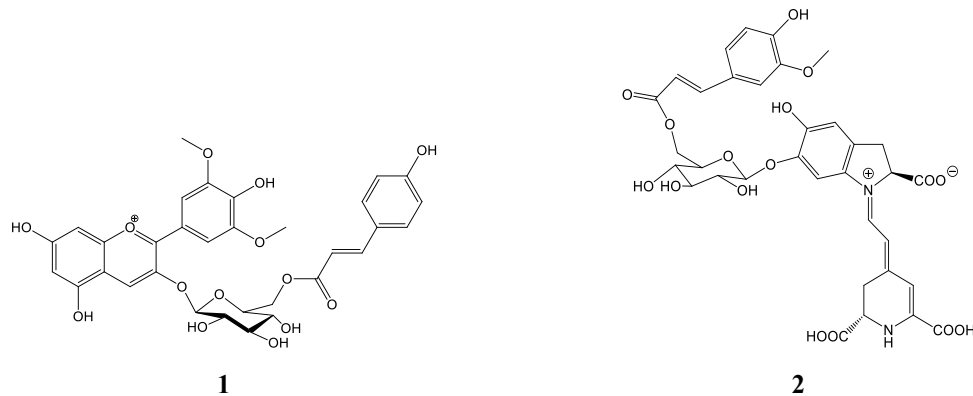
Os pigmentos naturais têm ganhado nos últimos anos a atenção das indústrias têxtil, alimentícia e farmacêutica. A curcumina, pigmento amarelo-alaranjado produzido pela planta *Curcumina longa*, apresenta diversas propriedades medicinais, como anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e antitumoral. Esses estudos revelaram que a curcumina tem atividade contra células tumorais através da inibição ou diminuição do crescimento celular (DUDÁS et al., 2013). Os carotenóides, um grupo de pigmentos amarelos, laranja e vermelhos encontrados principalmente em plantas, são amplamente utilizados para conferir cor à alimentos, são moléculas precursoras da vitamina A e possuem propriedades antioxidantes (SCHIOZER; BARATA, 2007). Além disto, os pigmentos naturais têm sido uma alternativa de agentes corantes em indústrias de papel, plástico e de impressão (ARULDASS; DUFOSSÉ; AHMAD, 2018).

2.2 Pigmentos naturais

Os pigmentos naturais são moléculas que possuem grupos cromóforos em sua estrutura molecular, responsável pela característica da cor (PEREIRA; VALENTÃO; ANDRADE, 2014). Os cromóforos se caracterizam por absorver energia nas regiões UV e visível e essa absorção ocasiona transições eletrônicas que ocorrem do orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) para o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO). Uma absorção na região do ultravioleta implica em transições eletrônicas entre orbitais π (ligante) para π^* (antiligante) ou de n (orbital não ligante) para π^* , por isso muitos dos grupos cromóforos de compostos orgânicos apresentam insaturações. Além disso, a presença de heteroátomos como halogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre pode ocasionar transições eletrônicas entre orbitais n e σ^* e entre n e π^* quando estes estão em associação à ligações duplas, formando sistemas conjugados (NGUYEN et al, 2013).

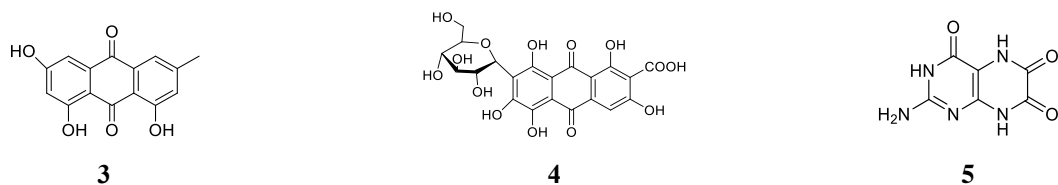
O reino vegetal é um grande produtor de pigmentos, podendo ser encontradas variações de verdes, amarelos, vermelhos, laranja e rosa nas folhas, frutos, flores e outros tecidos vegetais. Diversas classes de moléculas naturais destacam-se como pigmentos, entre elas estão os flavonoides. São amplamente encontrados em plantas, flores e frutos e constituem a classe de pigmentos que promovem uma coloração mais atrativa aos tecidos vegetais. Nas flores são atribuídos à função de atrair insetos polinizadores e dispersores de suas sementes, papel importante no ciclo de vida. As antocianinas são um exemplo desta classe de moléculas e conferem uma pigmentação lilás, estando presente também na uva (**1**, Figura 1, Pág. 19) (UPADHYAY, 2018). Diversas pesquisas desenvolvidas a fim de observar as propriedades das antocianinas revelaram atividades antioxidantes e preventivas contra doenças cardiovasculares e câncer. Sua forte pigmentação, além de seu potencial nutritivo, desperta o interesse da indústria alimentícia, a qual tem utilizado as antocianinas para corar alimentos e bebidas (HE; GIUSTI, 2010).

As betalainas, como a gromfenina V (**2**, Figura 1, Pág. 19) são outra classe de pigmentos naturais encontrados em plantas, conferindo colorações vermelha, lilás e amarela às flores e frutos. Participa de funções biológicas funcionando como atrativo para polinizadores e frugívoros, auxiliando assim na dispersão de suas sementes. Suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer e antidiabética demonstram grande potencial biotecnológico, sendo uma opção de pigmento natural utilizado em indústrias alimentícias (POLTURAK; AHARONI, 2018).

Figura 1. Pigmentos isolados de plantas.

O reino Animalia é também uma fonte importante de pigmentos naturais. As antraquinonas são uma classe de compostos presentes em algumas espécies de insetos, atribuindo-lhes colorações amarela, carmesim e vermelha. São moléculas de defesa química contra predadores, especificamente formigas, além de possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas. A emodina (**3**, Figura 2) é um exemplo desta classe de pigmentos, encontrada em insetos do gênero *Eriococcus* (SHAMIM et al., 2014). Outro exemplo de antraquinona é o ácido carmínico (**4**, Figura 2), pigmento vermelho extraído das fêmeas do inseto cochonilha (*Dactylopius coccus*), extensivamente utilizado na indústria alimentícia como corante de alimentos e bebidas (SHAMIM et al., 2014).

Pterinas são compostos cíclicos nitrogenados responsáveis pela pigmentação de muitas espécies de borboletas. A pigmentação branca característica da *Pieris brassicae*, borboleta branca da couve, é atribuída à molécula leucopterina (**5**, Figura 2), a primeira desta classe de compostos a ser elucidada estruturalmente (SHAMIM et al., 2014).

Figura 2. Pigmentos isolados de insetos.

Algumas espécies de fungos apresentam uma pigmentação característica, muitas vezes utilizada como uma forma de identificação das espécies. Os pigmentos produzidos por estes microorganismos, principalmente os macrofungos, apresentam funções específicas, como absorção de luz UV, protegendo seus corpos contra os danos causados pelos raios solares.

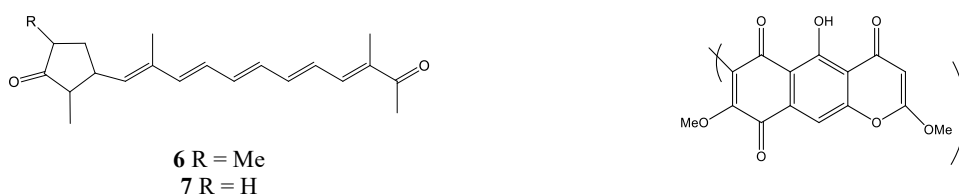
Outros pigmentos atuam como antibacterianos e antifúngicos, evitando o ataque de predadores. A maioria dos pigmentos fúngicos são quinonas ou moléculas semelhantemente conjugadas e a maioria são derivadas das vias metabólicas do acetato e do ácido chiquímico (HANSON, 2008).

A falconensonas A (**6**, Figura 3) e B (**7**, Figura 3), dois pigmentos amarelos, foram extraídos de extratos metanólicos de espécimes de *Emericella falconensis* isolado do solo. Ambos os compostos apresentaram atividade apoptótica contra células de leucemia HL60 e outras linhagens de células tumorais. Estudos posteriores levaram ao desenvolvimento de derivados de falconensonas com maior atividade biológica (TAMAGAWA et al., 2001).

Fungos do gênero *Fusarium* são característicos por apresentarem coloração vermelha. A aurofusarina (**8**, Figura 3), uma naftopirona, é a molécula responsável pela pigmentação do fungo *Fusarium graminearum*, aparecendo na forma de dímero (HANSON, 2008).

No fungo *Suillus grevillei* (ordem Boletales) foram reportados 11 pigmentos em seu corpo de frutificação. As moléculas desses pigmentos são derivadas do ácido pulvínico (**9**, Figura 4, Pág. 22) que representam a maioria dos pigmentos presentes em fungos da ordem Boletales. O derivado descarboxilado do ácido pulvínico, 3,4,4-trihidroxipulvinona (**14**, Figura 4, Pág. 22), é o pigmento majoritário neste fungo (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011).

Figura 3. Pigmentos isolados de fungos.



8

2.3 Pigmentos derivados do ácido pulvínico

O ácido pulvínico e seus derivados (**9 – 35**, Figura 4, Pág. 22) são pigmentos produzidos pela via metabólica do ácido chiquímico. Encontrados principalmente em espécies de fungos pertencentes às famílias Boletaceae e Gomphidiaceae, são responsáveis pela pigmentação amarela e laranja de seus corpos de frutificação (KNIGHT; PATTENDEN, 1976).

O ácido pulvínico (**9**, Figura 4, Pág. 22) é a molécula base não substituída desta classe de compostos. O seu derivado éster metílico, ácido vulpínico (**15**, Figura 4, Pág. 22), é

comumente encontrado em diversas espécies de líquens, e ficou conhecido na história por ser usado como um veneno contra lobos. Katawa *et al* isolaram o ácido vulpínico de espécimes de *Letharia vulpina* e ensaios com mitocôndrias oriundas de fígado de camundongo revelaram que esta molécula age como desacoplador da fosforilação oxidativa (ABO-KHATWA; AL-ROBAI; AL-JAWHARI, 1996). Outras atividades biológicas também foram atribuídas ao ácido vulpínico, como atividade antibiótica contra algumas bactérias aeróbicas e anaeróbicas e potencial anti-inflamatório em ratos com artrite. Apesar de apresentar-se como uma molécula promissora, sua alta citotoxicidade impediu o desenvolvimento de novos estudos para fins medicinais (VIEWEG *et al.*, 2014).

Os derivados mais simples desta classe de compostos apresentam substituições nos anéis aromáticos, geralmente hidroxilas. Os ácidos variegático (**23**, Figura 4, Pág. 22), xerocômico (**20**, Figura 4, pág. 22), e atromêntico (**16**, Figura 4, Pág. 22) foram isolados de *Suillus bovinus* e *Boletus calopus*, cogumelos comestíveis pertencentes a ordem Boletales. Testes revelaram que os três derivados apresentam efeito inibitório não específico em Citocromo P450, sendo os ácidos variegático e xerocômico os que apresentaram maior potencial (HUANG *et al.*, 2009).

Outros derivados são formados por mais de uma unidade de ácido pulvínico, como por exemplo a badiona A (**34**, Figura 4, pág. 22) e a norbadiona A (**31**, Figura 4, pág. 22). Estes derivados naftalenóides são encontrados na sua forma de sal, geralmente de sódio e potássio, e apresentam propriedade de quelar íons metálicos (ZHOU; LIU, 2010). O fungo *Xerocomus badius*, pertencente a ordem Boletales, é caracterizado por apresentar estes pigmentos como principais responsáveis pela sua coloração marrom-alaranjada. Basidiocarpos do fungo coletado em áreas próximas a Chernobyl, após o acidente nuclear, apresentaram concentrações significantes de césio-137. Experimentos revelaram que o nuclídeo radioativo encontrava-se complexado com moléculas de badiona A e norbadiona A. Estes resultados levaram a novos testes de complexação com derivados mais simples, ácido xerocômico e ácido atromêntico, os quais revelaram um poder complexante muito menor que os derivados naftalenóides. A presença de duas unidades de ácido pulvínico nas moléculas de badiona A e norbadiona A contribuíram espacialmente para a melhor complexação com o íon metálico (AUMANN *et al*, 1989).

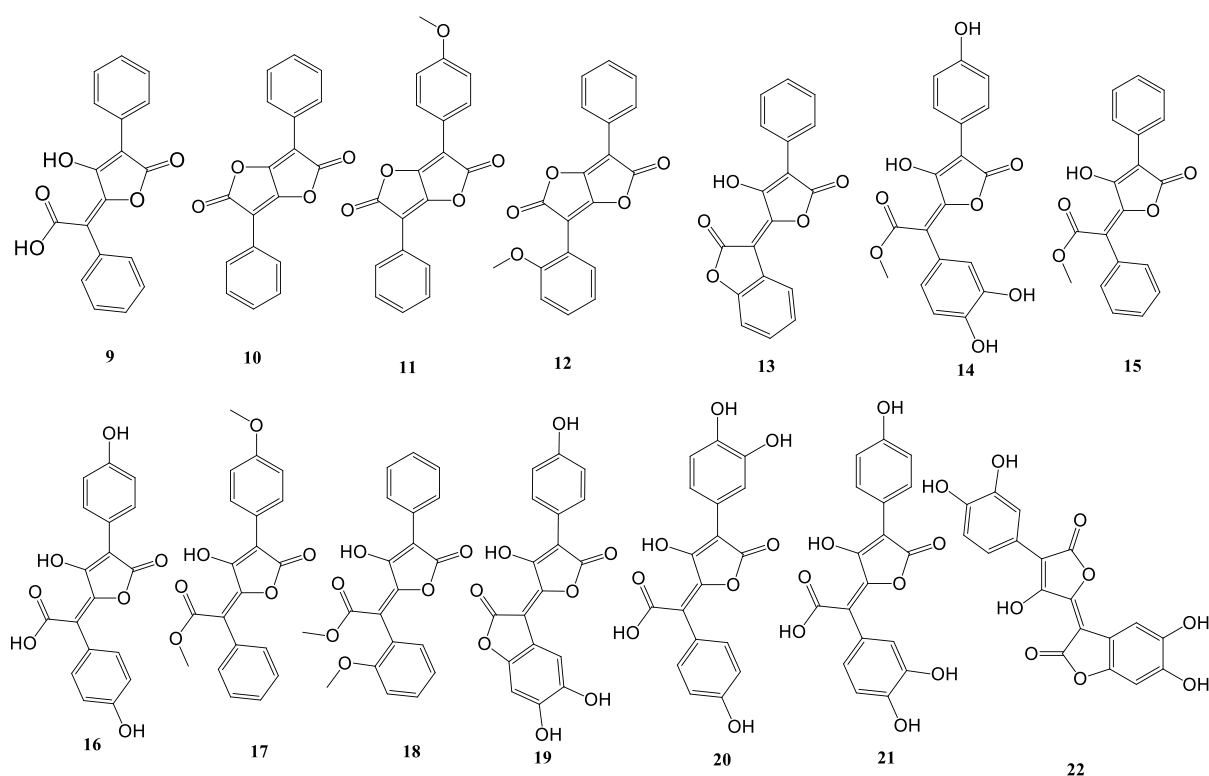
Os derivados do ácido pulvínico apresentam também propriedades fotoquímicas interessantes. Suas unidades cromóforas permitem a absorção de radiação UV com bandas de absorção de alto coeficiente. A produção desses pigmentos nos corpos de frutificação de fungos e líquens está concentrada nas regiões onde há maior incidência de luz solar, assim atuam como

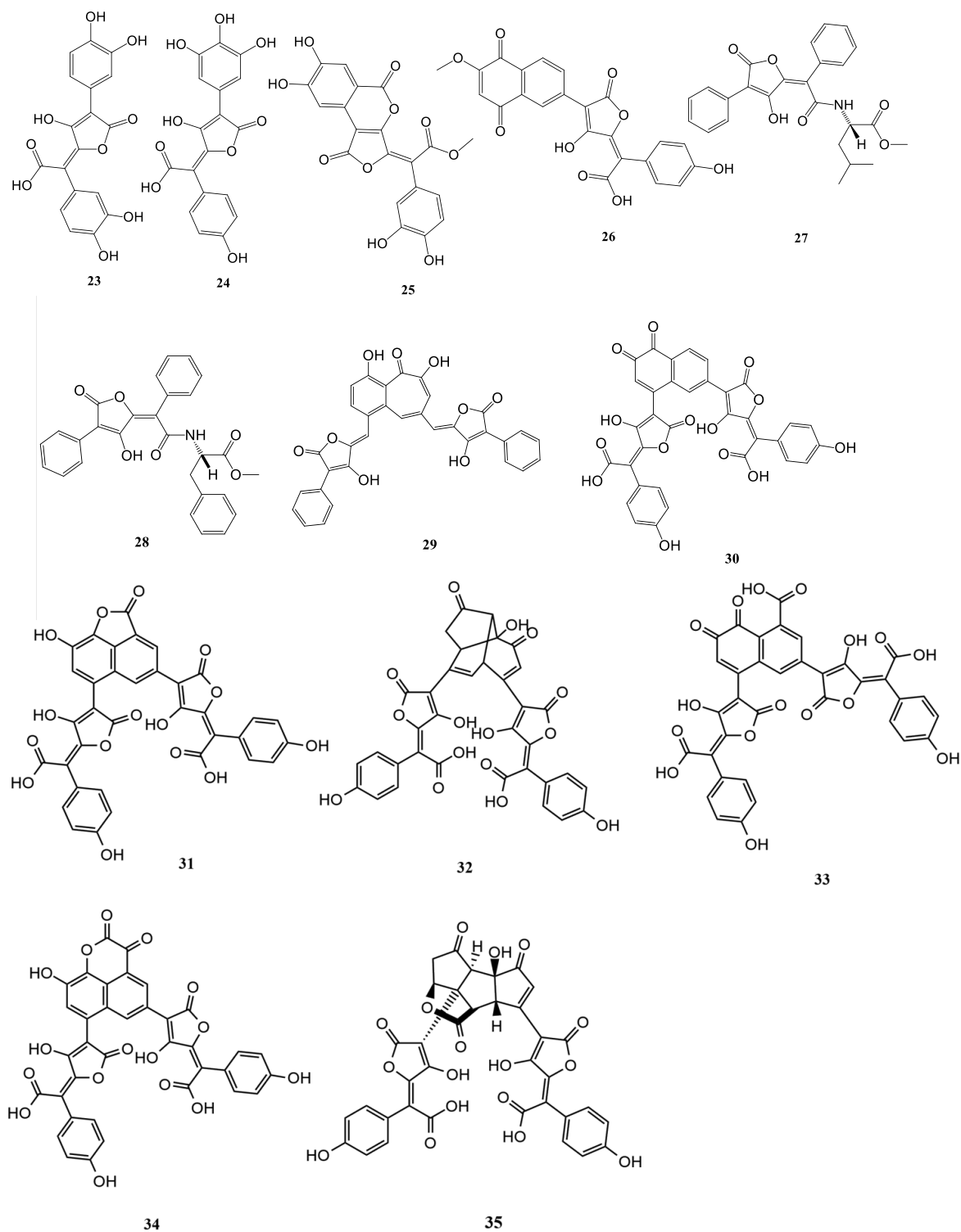
protetores contra possíveis danos provocados pela radiação. Desta forma, entende-se que esses pigmentos são biossintetizados como uma estratégia de proteção, para melhor sobrevivência dos organismos em locais extremos. (NGUYEN et al., 2013). Estes compostos demonstram grande potencial biotecnológico, uma vez que apresentam diversas propriedades físico-químicas que permitem a sua utilização e abre o leque de possibilidades de aplicações.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos no isolamento de compostos provenientes de fungos e líquens, os quais revelaram uma riqueza em pigmentos desta classe. A Figura 4 exemplifica as estruturas moleculares destes compostos.

A epanorina (**27**, Figura 4) é um derivado de ácido pulvínico que contém nitrogênio em sua estrutura molecular. Palacios-Moreno et al. demonstraram o potencial antineoplástico deste composto, utilizando nos ensaios a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 e de fibroblastos humanos. A sua capacidade em inibir a proliferação das células tumorais e não provocar mutação no DNA tornam a epanorina um candidato a drogas anti-câncer (PALACIOS-MORENO et al., 2019).

Figura 4. Estruturas moleculares dos derivados do ácido pulvínico.





O derivado naftalenóide norbadiolona A apresentou potencial protetivo contra radiação ionizante, o que levantou hipóteses do uso deste composto em tratamento de radioterapia. Células linfóticas pré-tratadas com norbadiolona A mostraram pequena redução na morte celular induzida por radiação. O estudo *in vivo* em células de camundongo corroborou

com este resultado. Desta forma, o estudo de análogos de norbadiolona A pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de compostos menos tóxicos (LE ROUX et al., 2011). Outras propriedades como antioxidante e capacidade de proteção de DNA contra radiação γ (Meunier et al, 2004) demonstradas pelo composto evidencia o seu potencial promissor para estudos e aplicações futuras.

A radiação ultravioleta, proveniente dos raios solares, é dividida em 3 regiões: UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) e UVC (100 – 280 nm). Os raios UVC são absorvidos pela camada de ozônio na estratosfera, mas os raios UVB e UVA atingem a superfície da Terra. A absorção desta radiação pela pele desencadeia uma série de reações que prejudicam a saúde e estão diretamente relacionadas ao envelhecimento precoce e câncer de pele. Os protetores solares ajudam a diminuir esses danos e têm sido cada vez mais utilizados em produtos como cremes, shampoos, maquiagem e loções para *skin care* (DUTRA et al, 2004; YANG et al, 2018). O constante uso de protetores solares a base de óxido de zinco e dióxido de titânio tem causado prejuízos à saúde. Por isso, é cada vez mais intensa a busca por compostos naturais capazes de atuarem como fotoprotetores (SHARMA et al, 2020). As propriedades fotoprotetivas de alguns derivados do ácido pulvínico foram investigadas por Varol (2018) através de um estudo *in silico* visando aplicação em produtos cosméticos para proteção solar. O ácido pinástico (**17**, Figura 4, pág. 22) e outros 5 derivados apresentaram os resultados mais promissores (VAROL, 2018). Um estudo *in vitro* mostrou que os ácidos pinástrico e vulpínico atuam como antioxidantes e bloqueadores de radiação UVA e UVB. Além disso, apresentaram-se estáveis e não citotóxicos, o que revela o potencial promissor destes dois derivados para utilização em produtos de consumo humano (LEGOUIN et al., 2017).

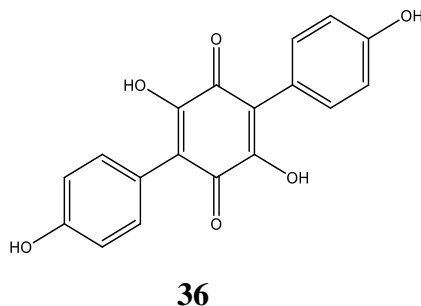
2.3.1 *Biossíntese de metabólitos secundários derivados do ácido pulvínico*

A via do ácido chiquímico está presente em plantas e microorganismos, mas não em animais, e é responsável pela produção de aminoácidos e diversos metabólitos secundários como antraquinonas, chalconas, flavonoides, e os ácidos arilpirúvicos, os quais são precursores de diversos pigmentos presentes em macrofungos (SANTOS-SÁNCHEZ et al., 2019).

Através de reações e rearranjos, os ácidos arilpirúvicos dão origem a moléculas de terfenilquinonas, grevellins, precursores do ácido cromapédico, de retipolides e da involutina (Figura 6). O ácido polipórico e a atromentina (**36**, Figura 5) são terfenilquinonas precursoras dos derivados de ácido pulvínico, pigmentos característicos da maioria dos fungos basidiomicetos (HANSON, 2008), em associação com o aminoácido fenilalanina, que atua

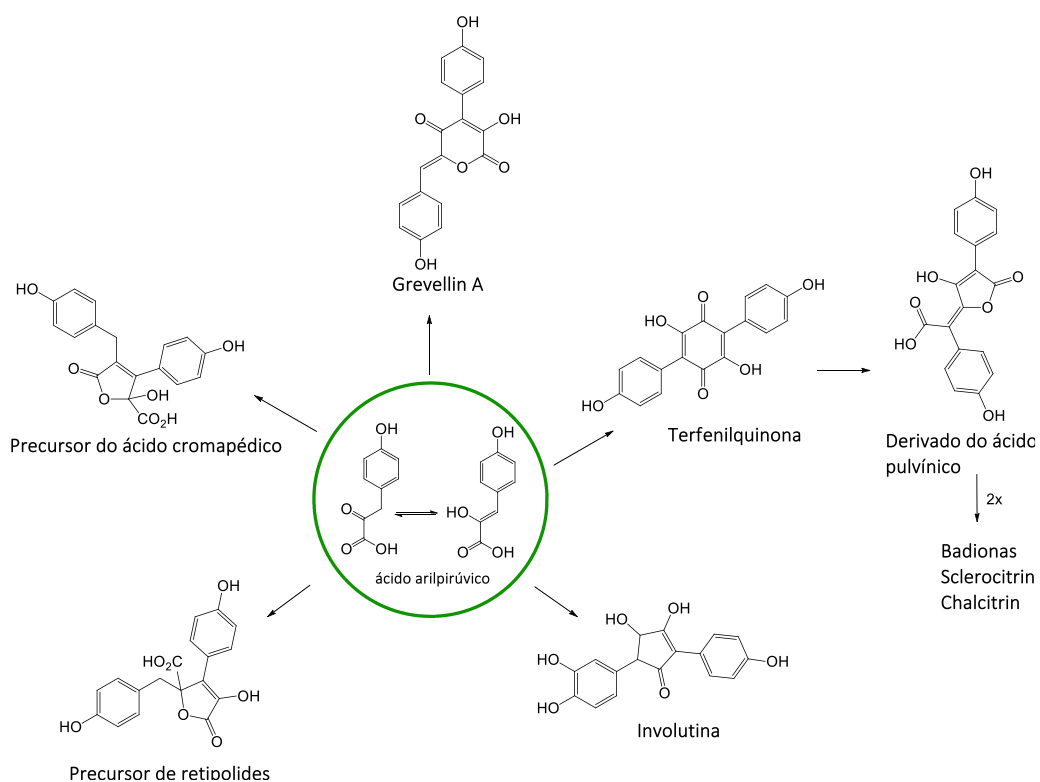
como um intermediário na biossíntese desses compostos (RUNDEL, 1978).

Figura 5. Estrutura molecular da atromentina (**36**).



A Figura 6 mostra as diversas classes de metabólitos secundários produzidos pelos ácidos arilpirúvicos.

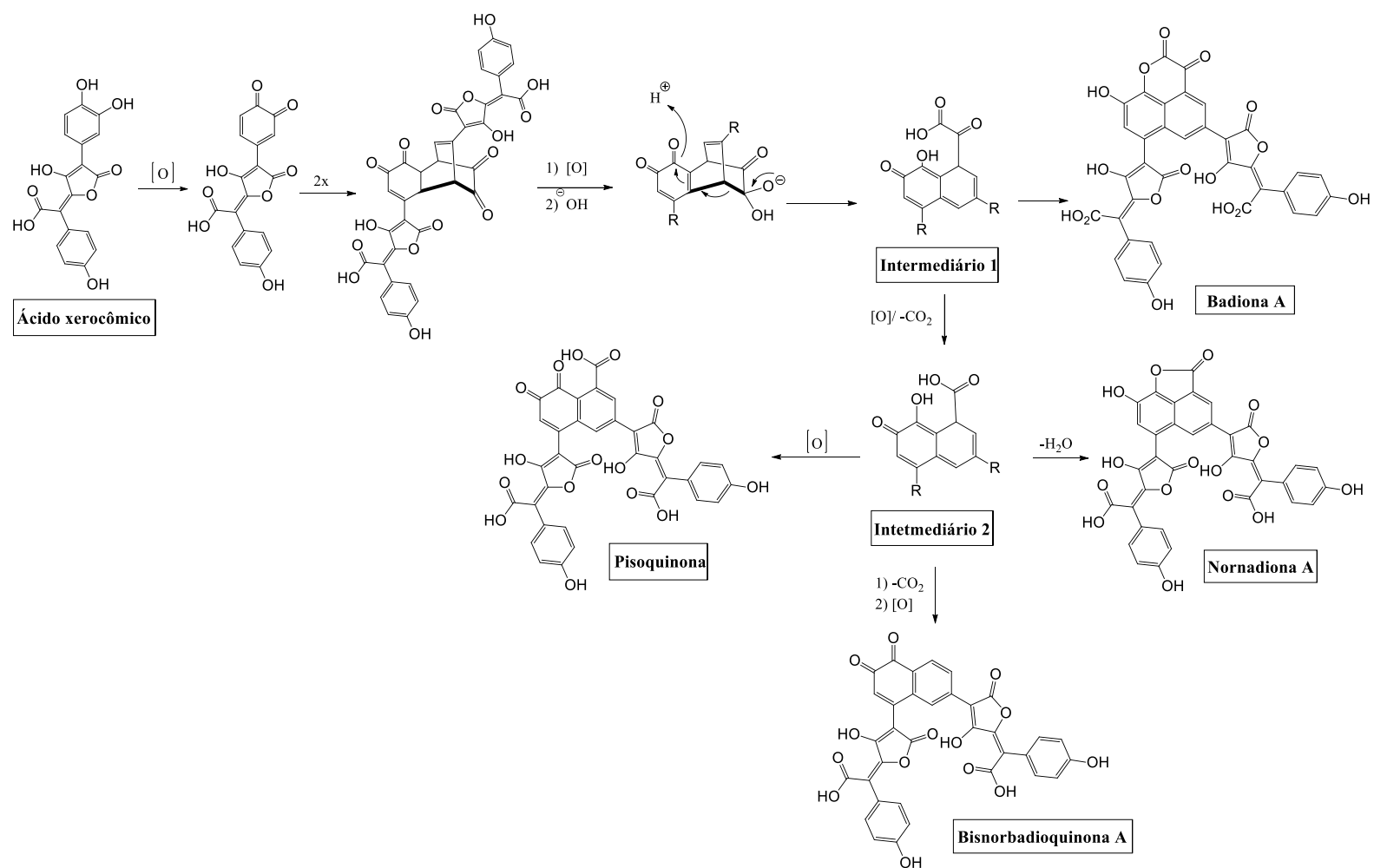
Figura 6. Metabólitos secundários biossintetizados a partir dos ácidos arilpirúvicos.



Estudos realizados por Gill e Kiefel (1994) sugeriram uma rota biossintética para os derivados naftalenóides badiona A, norbadiona A, pisoquinona e bisnorbadioquinona A (Figura 7, Pág.27). A molécula de badiona A é originada através da oxidação e subsequente acoplamento Diels-Alder nos anéis catecol de duas moléculas de ácido xerocômico, seguido de

tautomerização e lactonização do intermediário 1. Já a molécula de norbadiona A é formada a partir do intermediário 1, formando o ácido carboxílico correspondente (intermediário 2), seguido de tautomerização e perda de água. Ainda, a descarboxilação seguida de oxidação do intermediário 2 dará origem à molécula de bisnorbadioquinona A. De modo análogo, a tautomerização seguida de oxidação do intermediário 2 formará a molécula de pisoquinona (GILL; KIEFEL, 1994).

Figura 7. Biossíntese de norbadiona A, badiona A, bisnorbadioquinona A e pisoquinona, sugerida por Gill e Kiefel.



2.4 *Pisolithus tinctorius* como fonte de pigmentos derivados do ácido pulvínico

O fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* pertence à ordem Boletales e se caracteriza como uma micorriza, ou seja, desenvolve-se em simbiose com plantas, no Brasil preferencialmente as do gênero *Eucalyptus*. (DE SOUZA, 2000).

Uma micorriza é caracterizada por sua associação simbiótica benéfica com seu hospedeiro. Essa associação é formada através da interação intercelular do micélio fúngico com o córtex da raiz da planta, formando um manto fúngico. A colonização das raízes da hospedeira traz modificações fisiológicas e bioquímicas, que provocam a melhor absorção de água e nutrientes, aumento da tolerância à acidez e a metais pesados, contribuindo assim para o melhoramento do sistema radicular da planta. Essa característica faz da micorriza uma excelente opção para o processo de reflorestamento (DE SOUZA, 2000).

Gill et al. estudaram espécimes de *P. tinctorius* e relataram a presença abundante de norbadiona A, badiona A, pisoquinona e bisnorbadioquinona A, pigmentos derivados do ácido pulvínico. Essas moléculas constituem a coloração marrom e amarela intensa dos corpos de frutificação de espécies deste fungo (GILL, KIEFEL, 1994; GILL, LALLY, 1985).

2.5 GNPS: uma ferramenta para desreplicação de compostos

Devido à complexidade de amostras como extratos de produtos naturais, o isolamento e a identificação de compostos se tornam uma tarefa difícil. A desreplicação é uma técnica rápida de identificação e comparação de moléculas conhecidas ou novas, sem a necessidade de isolamento e surge como uma alternativa eficaz para análise de metabólitos secundários em matrizes complexas (CALDAS; ZIED; SARTORELLI, 2022).

Com o avanço da tecnologia, diversas técnicas têm sido usadas para a desreplicação. Dentre elas se destacam as técnicas hífenadas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN). Em associação a estas técnicas, plataformas online para tratamento de dados tem atuado como importante ferramenta na desreplicação. A *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) é uma plataforma online de livre acesso, baseada em dados de espectrometria de massas para identificação de compostos e formação de redes moleculares. Na plataforma, os dados inseridos são analisados e os espectros de massas semelhantes são conectados, formando redes moleculares. Além disso, dispõe de uma biblioteca virtual para identificação de moléculas a partir da semelhança espectral com o banco de dados (WANG et al, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer o perfil de pigmentos derivados do ácido pulvínico no fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* e avaliar o seu potencial biotecnológico.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a desreplicação dos extratos do fungo e analisar os compostos presentes;
- Isolar os pigmentos dos extratos do fungo;
- Caracterizar estruturalmente os pigmentos isolados;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos do fungo;
- Determinar o Fator de Proteção Solar (FPS) dos extratos do fungo;
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos do fungo frente a linhagens de células normais e tumorais.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Análises cromatográficas

4.1.1 *Cromatografia em camada delgada analítica*

As análises cromatográficas em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica de fase reversa C₁₈ F₂₅₄ - MACHEREY-NAGEL[®] com espessura de 0,15 mm. A revelação das substâncias nas placas foi feita com gás amônia.

4.1.2 *Extração em Fase Sólida*

A extração em fase sólida foi realizada utilizando cartucho de fase reversa (Supelclean[™] ENVI[™]-18 SPE Tube bedwt. 10 g e volume 60 mL) da Supelco Sigma-Aldrich[®]. O cartucho foi previamente ativado com metanol e em seguida acondicionado com água.

4.1.3 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um equipamento SHIMADZU LC[®] com detector DAD. A coluna empregada e as condições de injeção estão descritas no item 4.8.1.

4.1.4 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CLAE-IES-EM)*

Nas análises dos extratos foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, ThermoScientific, com coluna Zorbax Eclipse Plus fenil hexil – Agilent (4,6 x 100mm; 3,5 µm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, ThermoScientific, com fonte H-ESI, operando em modo negativo. As condições do espectrômetro de massas e o método cromatográfico estão descritos no Item 4.9.

4.2 Solventes

Os solventes utilizados nas extrações e separações, assim como nas análises cromatográficas foram de procedências PA - SYNTH[®] e NEON[®]. As análises por CLAE foram feitas com solventes grau CLAE - TEDIA[®].

4.3 Análises espectroscópicas

4.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros no UV-VIS foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5000 Varian[®]. As soluções foram analisadas em uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, utilizando metanol como solvente. As análises foram feitas em temperatura de 25°C.

4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do IV foram obtidos em um espectrômetro ABB Bomem FTLA 2000-102, com transformada de Fourier para conversão dos espectros. Foram utilizadas pastilhas de KBr para dispersão das amostras e uma varredura de 400 a 4500 cm^{-1} . Os experimentos foram realizados em temperatura de 25°C.

4.3.3 Análise de Fluorescência

As análises de fluorescência foram realizadas em equipamento Fluorímetro Estacionário QM-40 (PTI). As amostras foram dissolvidas em metanol e analisadas em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, em temperatura de 25°C.

4.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em um instrumento TGA Q50 (TA Instruments) numa faixa de temperatura de 25 – 800 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} , sob atmosfera inerte. Taxa de purga da amostra (nitrogênio) de 60 mL min^{-1} e taxa de gás de equilíbrio (nitrogênio) de 40 mL min^{-1} .

4.5 Coleta do fungo

O fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* foi coletado na Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, em Fortaleza (3° 44' 20,9" de latitude Sul, 38° 34' 19,1" de longitude Oeste), próximo a plantações de Eucalyptus.

4.6 Preparação do extrato acetona

O fungo coletado (1,51 Kg) foi submetido a extração com 2 litros de acetona PA por 30 dias. O extrato acetona obtido foi filtrado a vácuo e concentrado sob pressão reduzida obtendo-se 152,31 g (10,10% de rendimento).

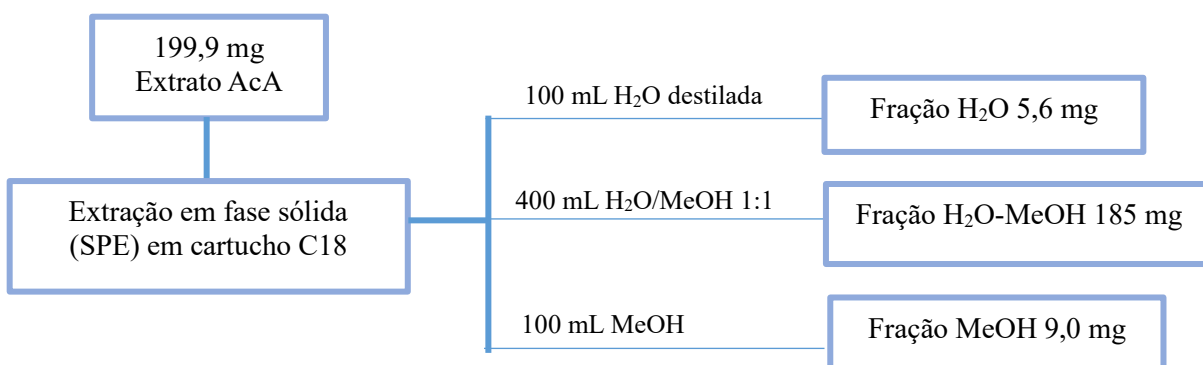
4.7 Partição líquido-líquido do extrato acetona

Uma amostra de 1,0073g do extrato acetona foi solubilizada em 100 mL de água destilada e submetida a partição líquido-líquido com AcOEt (3x50 mL). A fase orgânica foi reservada e a fase aquosa remanescente foi acidificada com HCl 10% até pH próximo de 2. A fase aquosa acidificada foi submetida a uma nova partição líquido-líquido com AcOEt (7x50 mL), o que levou a obtenção do extrato acetato ácido (492,9 mg), após a evaporação do solvente, denominado AcA.

4.8 Fracionamento do extrato AcA por SPE

199,9 mg do extrato AcA foi fracionado em cartucho cromatográfico de fase reversa, utilizando água destilada, água/metanol 1:1 e metanol como eluentes resultando em três frações descritas no Fluxograma 1.

Fluxograma 1. Obtenção das frações em SPE.



4.8.1 Análise das frações obtidas em SPE por CLAE

Alíquotas das frações H₂O, H₂O-MeOH e MeOH, provenientes do fracionamento em cartucho C18, foram dissolvidas em CH₃CN grau HPLC de forma a se obter soluções com concentração de 1,0 mg/mL. Essas amostras foram analisadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - Shimadzu[®] utilizando coluna cromatográfica Luna C18, Phenomenex[®], de 5 μ e 100 A e dimensões de 250 por 4,6 mm, na temperatura de 40°C. Os eluentes utilizados para a análise foram CH₃CN e uma solução de H₃PO₄ 0,085% com fluxo de 1,00 mL/min. O método utilizado foi iniciado com 10% de CH₃CN e em 25 minutos atingiu 50%. Em 45 minutos alcançou 100% de CH₃CN voltando a 10% quando chega ao término da análise, em 60 minutos. O volume de injeção foi de 20 μ L.

4.9 Análise das frações H₂O-MeOH e MeOH em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-IES-EM/EM)

Amostras das frações H₂O-MeOH e MeOH foram enviadas a Universidade Federal de Goiás (UFG) para análise em CLAE-IES-EM/EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray). Os eluentes da fase móvel foram água e metanol e o fluxo foi de 0,3 mL/min. O método cromatográfico iniciou com 10% de metanol, atingindo 70% em 40 minutos. Em 42 minutos a concentração de metanol aumenta para 95%, permanecendo até 47 minutos, término da corrida. Os comprimentos de onda utilizados na análise foram 254, 365 e 480 nm. Foi utilizada voltagem do spray 3,5 kV, gás de bainha 15, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 320°C, temperatura de gás auxiliar 250 °C, tube lens 55 e faixa de massas m/z 290 – 900. Para as fragmentações foram utilizadas energias de colisão de 15 e 30 NCE.

4.10 Identificação dos compostos

Os dados obtidos foram processados na plataforma GNPS (Global Natural Product Social Molecular Networking) a fim de agrupar em redes moleculares os espectros de massas e assim auxiliar na identificação dos compostos. Os mesmos dados de EM/EM foram tratados no software Xcalibur[®] e a identificação dos compostos foi feita através da análise dos íons *quasi*-moleculares [M-H]⁻, padrões de fragmentação dos espectros EM/EM, absorções no UV

e dados da literatura.

4.10.1 Parâmetros utilizados na análise de redes moleculares na plataforma GNPS

As redes moleculares foram criadas a partir da análise do perfil químico das frações H₂O-MeOH e MeOH, na plataforma online de livre acesso *Global Natural Product Social Molecular Networking* (<https://gnps.ucsd.edu>). Os arquivos brutos da análise em CLAE-IES-EM/EM foram convertidos para formato mzXML, usando o programa MSConvert ProteoWizard[®] 2.1 e exportados para a plataforma GNPS, usando o software WinSCP[®].

As tolerâncias de massa do íon precursor e de fragmento de íon EM/EM foram de 0.02 Da. O mínimo valor de cosseno foi fixado em 0.7 e a correspondência de picos entre os espectros similares de no mínimo 4. Esses parâmetros foram usados para formação da rede molecular e para a comparação com os espectros contidos na biblioteca da plataforma. As redes moleculares formadas foram visualizadas através do programa Cytoscape 3.9.1[®].

4.11 Fracionamento cromatográfico de H₂O-MeOH: isolamento de norbadiona A

A fração H₂O-MeOH foi cromatografada em coluna Sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente. Um sólido amarelo puro foi obtido, e após análises de UV-vis, IV, EM, RMN ¹H e ¹³C, foi identificado como o composto Norbadiona A.

4.12 Análise de atividade antioxidante das frações H₂O-MeOH e MeOH

A atividade antioxidante das amostras H₂O-MeOH e MeOH foi avaliada através de ensaio com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A análise foi feita em espectrofotômetro SHIMADZU[®] UV mini-1240, utilizando comprimento de onda de 515 nm. As frações foram solubilizadas em metanol (4mg/mL) e diluídas nas concentrações 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL, 0,01563 mg/mL, 0,00781 mg/mL, 0,0039 mg/mL e 0,00195 mg/mL. O experimento consistiu na adição de 2mL de cada solução à 2mL de solução de DPPH 60µM. As soluções finais foram armazenadas em local escuro por 30 minutos para posterior leitura das absorbâncias. Ácido ascórbico e Trolox foram usados como controle positivo e a atividade antioxidante foi calculada através da equação:

$$\text{Atividade antioxidante} = \frac{\text{Abs}_{515\text{nm}}(\text{DPPH}) - \text{Abs}_{517\text{nm}}(\text{amostra})}{\text{Abs}_{515\text{nm}}(\text{DPPH})} \times 100$$

4.13 Determinação do fator de proteção solar (FPS) das frações H₂O-MeOH e MeOH

As frações H₂O-MeOH e MeOH foram solubilizadas em etanol e uma curva de calibração foi feita com as concentrações 35,29 µg mL⁻¹, 33,33 µg mL⁻¹, 34,58 µg mL⁻¹, 30,0 µg mL⁻¹, 28,57 µg mL⁻¹, 27,27 µg mL⁻¹, 26,09 µg mL⁻¹, 25 µg mL⁻¹ e 24 µg mL⁻¹, a fim de se obter a absorvância relativa de cada fração. Com este resultado, obteve-se a absorvância de cada fração na concentração de 0,2mg/mL, para os comprimentos de onda de 290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm. Os valores de FPS para cada fração foram então calculados, de acordo com a equação desenvolvida por Mansur *et al* (1986):

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE_{\lambda} \times I_{\lambda} \times Abs_{\lambda}$$

Onde EE: espectro de efeito eritematoso;

I: espectro de intensidade solar;

CF: fator de correção (igual a 10);

Abs: absorvância da amostra;

CF e a multiplicação de EE x I são constantes predeterminadas para os comprimentos de onda de 290 a 320 nm (SHARMA; BANSAL, 2020).

As absorvâncias foram obtidas em espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5000 Varian®.

4.14 Análise de atividade citotóxica da fração H₂O-MeOH

Amostra de 5,0mg da fração H₂O-MeOH foi submetida a ensaio de atividade citotóxica pelo método MTT, no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Os ensaios foram realizados frente a linhagens de células normais L929 (fibroblasto murino não tumoral), HACAT (queratinócito humano não tumoral), e tumorais humanas SBN-19 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HCT-116 (cólon), HL-60 (leucemia).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das frações obtidas em SPE por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

O fracionamento do extrato AcA em cartucho de fase reversa (Item 4.8, Pág. 32) resultou em 3 frações, as quais foram analisadas em CCDA de fase reversa, utilizando vapor de amônia como revelador. Os derivados do ácido pulvínico são pigmentos fúngicos caracterizados pela cor amarela e laranja, (VELÍŠEK; CEJPEK, 2011), e ao avaliar as manchas desenvolvidas nas placas cromatográficas após eluição apenas as frações H₂O-MeOH e MeOH apresentaram manchas amarelo-alaranjado, enquanto que a fração H₂O apresentou uma mancha amarelo-clara bem discreta. Dessa forma, os derivados de ácido pulvínico devem estar majoritariamente presentes nas frações H₂O-MeOH e MeOH.

5.2 Análise das frações H₂O, H₂O-MeOH e MeOH por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise dos cromatogramas das frações H₂O, H₂O-MeOH e MeOH por CLAE (Item 4.8.1, Pág. 33), mostrou certa semelhança entre os picos observados, no que se refere a faixa do tempo de retenção que eluem. O pico com tempo de retenção 25 min está presente em todas as frações, o que pode indicar a presença de um composto comum entre as amostras, porém na fração H₂O a intensidade é muito mais baixa que nas demais frações. A fração H₂O-MeOH (Figura 9) apresentou 7 picos, enquanto as frações H₂O e MeOH apresentaram 5 e 4 picos em seus cromatogramas, respectivamente (Figuras 8 e 10).

Figura 8. Cromatograma da fração H₂O.

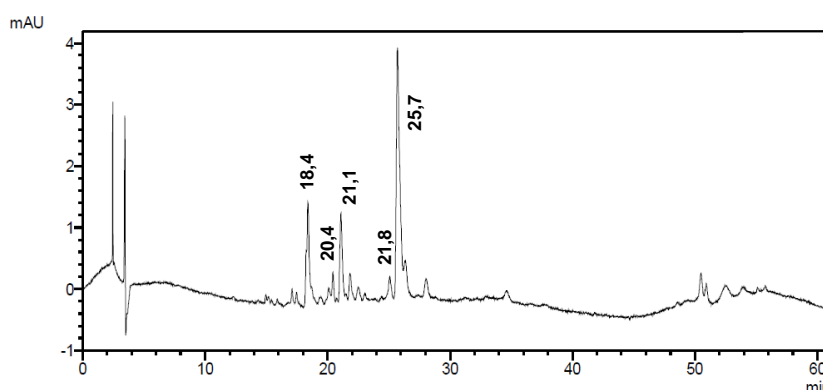
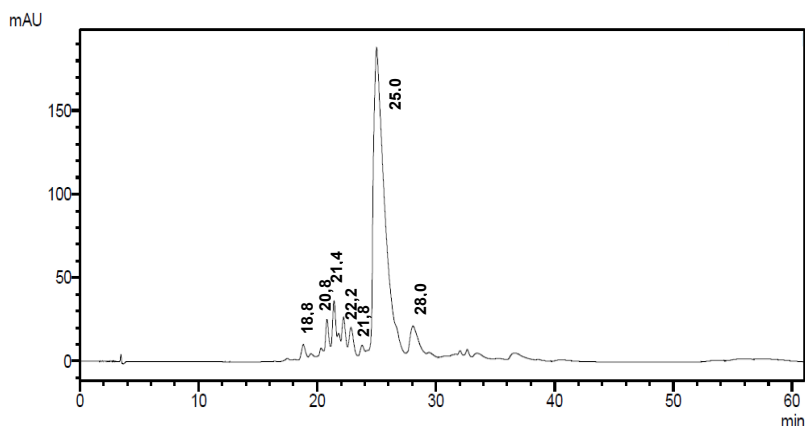
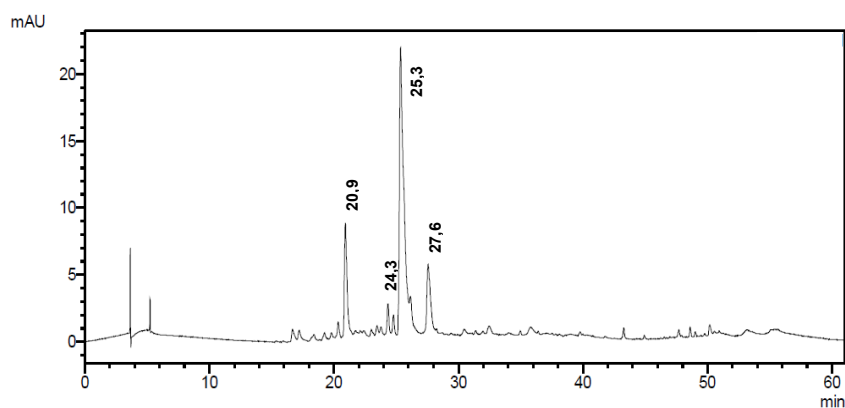


Figura 9. Cromatograma da fração H₂O-MeOH.**Figura 10.** Cromatograma da fração MeOH.

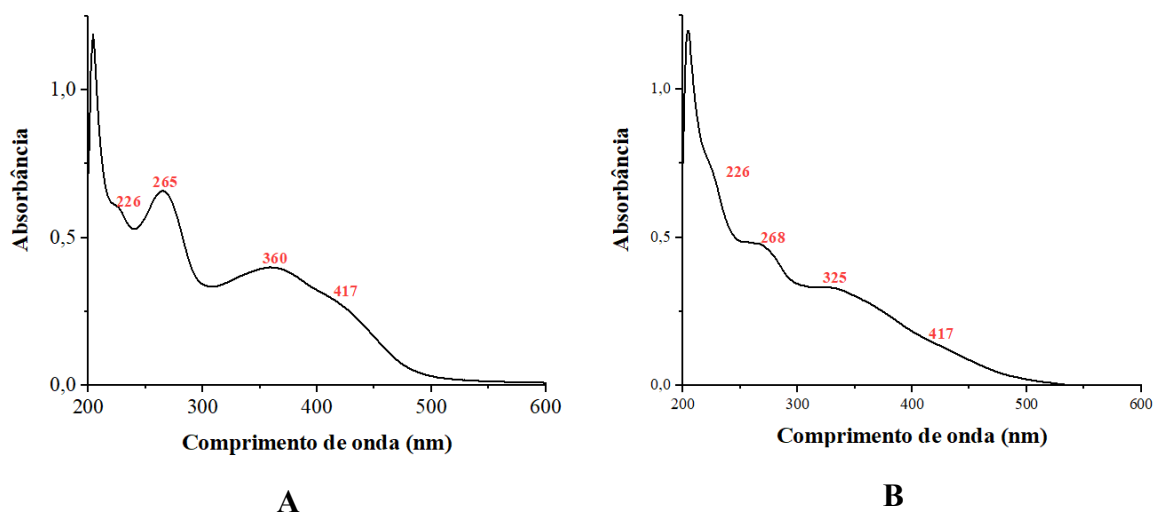
5.3 Análise dos espectros de UV-vis das frações H₂O-MeOH e MeOH

O espectro UV-vis da fração H₂O-MeOH (Figura 11, Pág. 38), apresentou bandas em 226, 265, 360 e 417 nm. Já o espectro de absorção na região UV-vis da fração MeOH (Figura 11, Pág. 38), apresentou bandas em 226, 268, 325 e 417 nm. Segundo Gill e Lally (1985), o derivado norbadiona A apresentou bandas em 268, 368 e 416 nm, valores próximos aos observados para as duas frações. Os derivados do ácido pulvínico apresentam bandas características na região do UV e visível que compreende as faixas de 236 – 291 nm e 316 – 389 nm, com elevados coeficientes de absorção, dessa forma pode-se inferir que as absorções observadas indicam a presença desses derivados (NGUYEN et al., 2013).

Moléculas que apresentam boa absorção nas regiões UVA e UVB possuem sistemas conjugados em sua estrutura molecular. As transições eletrônicas responsáveis por esta absorção de luz ocorrem entre orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$, típicos de compostos que contém

insaturações, e ainda $n \rightarrow \sigma^*$, para o caso de compostos que possuem heteroátomos (NGUYEN et al., 2013). Os derivados do ácido pulvínico apresentam sistemas conjugados e átomos de oxigênio em sua estrutura molecular, permitindo assim a ocorrências dessas transições eletrônicas.

Figura 11. Espectros de absorção UV-vis da fração H₂O-MeOH (A) e MeOH (B).



5.4 Análise dos espectros de fluorescências das frações H₂O-MeOH e MeOH.

Para as análises de fluorescência (Item 4.3.3, Pág. 31), os comprimentos de onda de excitação foram escolhidos de acordo com o espectro de absorção UV-vis das amostras.

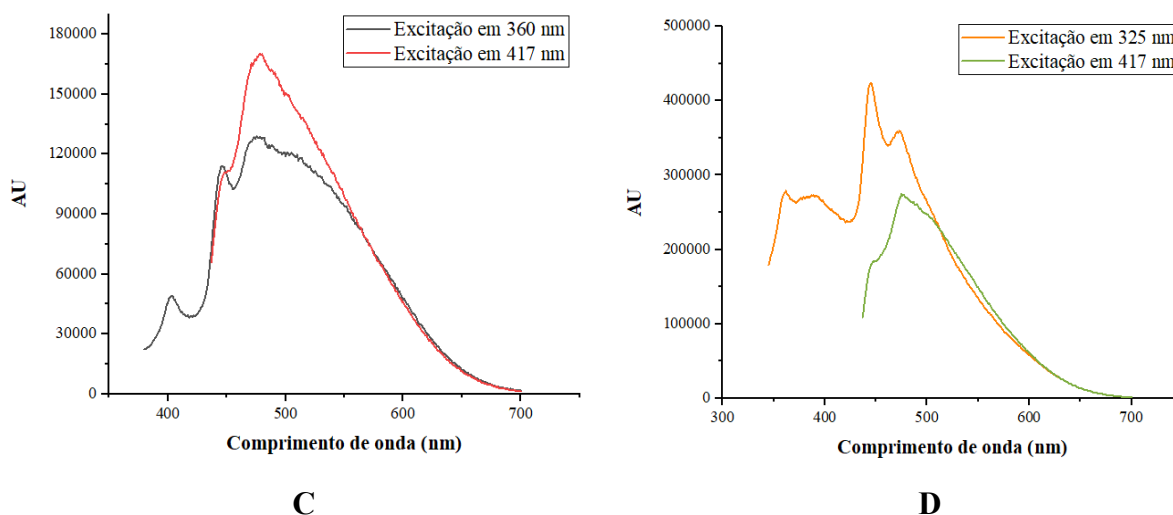
A figura 12 (Pág. 39) apresenta os espectros de emissão da fração H₂O-MeOH. A excitação da amostra em 417 nm gerou uma banda de emissão em 478 nm e a excitação em 360 nm, originou duas bandas de emissão, em 446 e 474 nm com intensidades menores.

A excitação de amostra da fração MeOH em 325 nm, apresentou 3 bandas de emissão em 361, 444 e 472 nm (Figura 12, Pág. 39). Já a excitação em 417 nm, originou uma banda de emissão em 476 nm, apresentando o mesmo perfil da fração H₂O-MeOH. Este resultado indica que existe semelhança na composição da fração H₂O-MeOH e MeOH. A banda de emissão de máximo em 444 nm foi a mais intensa observada para a fração MeOH.

O composto norbadiona A, descrito como um dos principais pigmentos do fungo *P. tinctorius*, apresenta um máximo de absorção em 417 nm (GILL; LALLY, 1985). O grupo naftaleno presente em sua estrutura molecular a torna rígida, fazendo com que a molécula apresente menos níveis vibracionais e tenha mais chances de emitir fluorescência. Desta forma,

pode-se propor que o espectro de emissão em 478 nm pode indicar a presença de derivados desta classe nas amostras.

Figura 12. Espectros de fluorescência das frações H₂O-MeOH (C) e MeOH (D).



5.5 Análise dos espectros de infravermelho das frações H₂O-MeOH e MeOH

O espectro de absorção na região de infravermelho da fração H₂O-MeOH (Figura 13, Pág. 40) apresentou uma banda intensa e larga em 3400 cm⁻¹, característica de estiramento O-H (ν_{OH}). Sinais próximos a este foram encontrados por Gill e Lally (GILL; LALLY, 1985) para o composto norbadiona A. Além disso, este resultado corrobora com a estrutura molecular dos derivados de ácido pulvínico que contém grupamentos hidroxila fenólicos e de ácidos carboxílicos. A banda em 1750 cm⁻¹ pode ser atribuída a estiramento de ligação C=O ($\nu_{C=O}$) de éster. As bandas em 1607, 1507 e 1441 cm⁻¹ podem ser atribuídas a estiramento C=C ($\nu_{C=C}$) de aromáticos. A banda em 1274 cm⁻¹ indica estiramento de ligação C-O (ν_{C-O}). A banda em 1057 cm⁻¹ pode indicar a vibração de estiramento da ligação C-O (ν_{C-O}) do fenol. Já a banda em 839 cm⁻¹ pode ser proposta como vibração de dobramento C-H fora do plano, indicando uma *para*-substituição em anel aromático.

O espectro de absorção na região do infravermelho da fração MeOH (Figura 14, Pág. 40) apresentou uma banda larga em 3426 cm⁻¹, característica de estiramento O-H (ν_{OH}). A presença de bandas intensas em 2925 e 2854 cm⁻¹ indica estiramento da ligação C_{sp³}-H ($\nu_{C_{sp^3}-H}$). Os sinais em 2925 e 2854 cm⁻¹ estão associados a estiramentos de ligação C-H de carbono sp³ ($\nu_{C_{sp^3}-H}$), indicando assim a presença de compostos que contém carbono saturado em sua estrutura molecular. A banda em 1716 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento de ligação C=O ($\nu_{C=O}$)

de ácido carboxílico. As bandas em 1607, 1457 e 1365 cm^{-1} foram atribuídas a estiramentos C=C ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) de aromático e a banda em 1232 cm^{-1} indica estiramento C–O ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$).

Figura 13. Espectro de infravermelho da fração H₂O-MeOH.

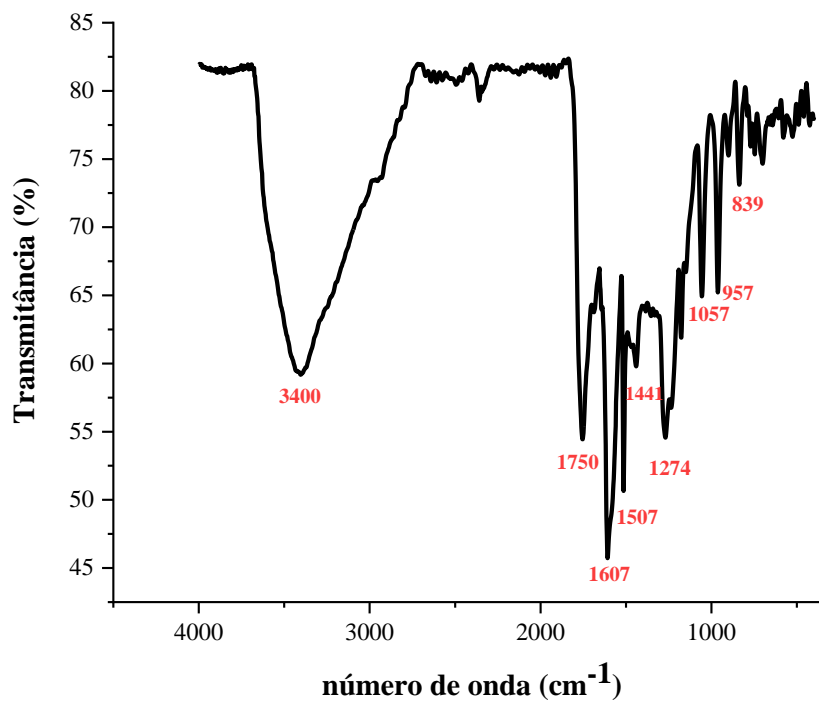
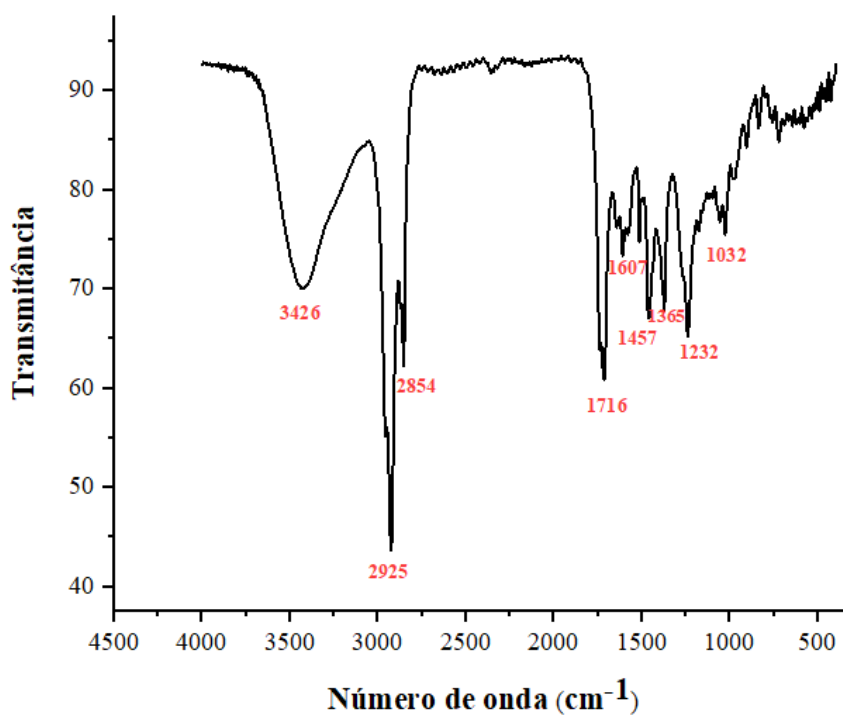


Figura 14. Espectro de infravermelho da fração MeOH.

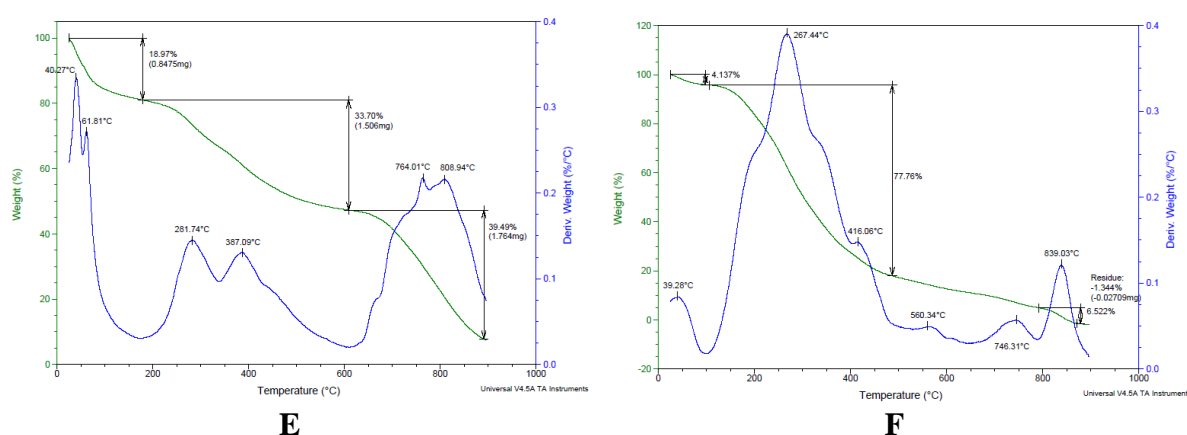


5.6 Resultado da Análise Termogravimétrica (TGA) das frações H₂O-MeOH e MeOH

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das frações H₂O-MeOH e MeOH, foi realizada a análise termogravimétrica. De acordo com a curva de TGA da fração H₂O-MeOH e a sua primeira derivada (Figura 15 (E)), a amostra apresentou 3 estágios de decomposição. O primeiro ocorre de 40°C a aproximadamente 100°C, com perda de 18,97% de sua massa, indicando perda de água residual da amostra. O segundo estágio de decomposição é lento e ocorre na faixa de 200°C a 600°C, com perda de massa de 33,70%. Por fim, o terceiro estágio ocorre entre 600 e 900 °C, com perda de 39,49% de massa. Desta forma, é possível constatar que a fração H₂O-MeOH apresenta estabilidade térmica, podendo ser aplicada em condições de até 200°C, sem sofrer degradação.

Já para a fração MeOH, a curva de TGA e sua primeira derivada (Figura 15 (F)) apresentam 3 estágios de decomposição, sendo a temperatura de 267,44°C onde ocorre a maior perda de massa. O primeiro estágio é semelhante ao da fração H₂O-MeOH, ocorrendo entre 39°C e 100°C, ocasionado pela perda de água residual da amostra (consumo de 4,14% de sua massa inicial). O segundo estágio é lento e ocorre de aproximadamente 150°C a 450°C, com perda de 77,76% de sua massa. O terceiro estágio ocorre entre 800°C e 900°C, com perda de 6,52% de massa e gerando um resíduo de 0,027mg. Assim, a fração MeOH apresenta estabilidade térmica até 150°C, onde inicia seu processo de decomposição.

Figura 15. Curvas de TGA e primeira derivada das frações H₂O-MeOH (E) MeOH (F).



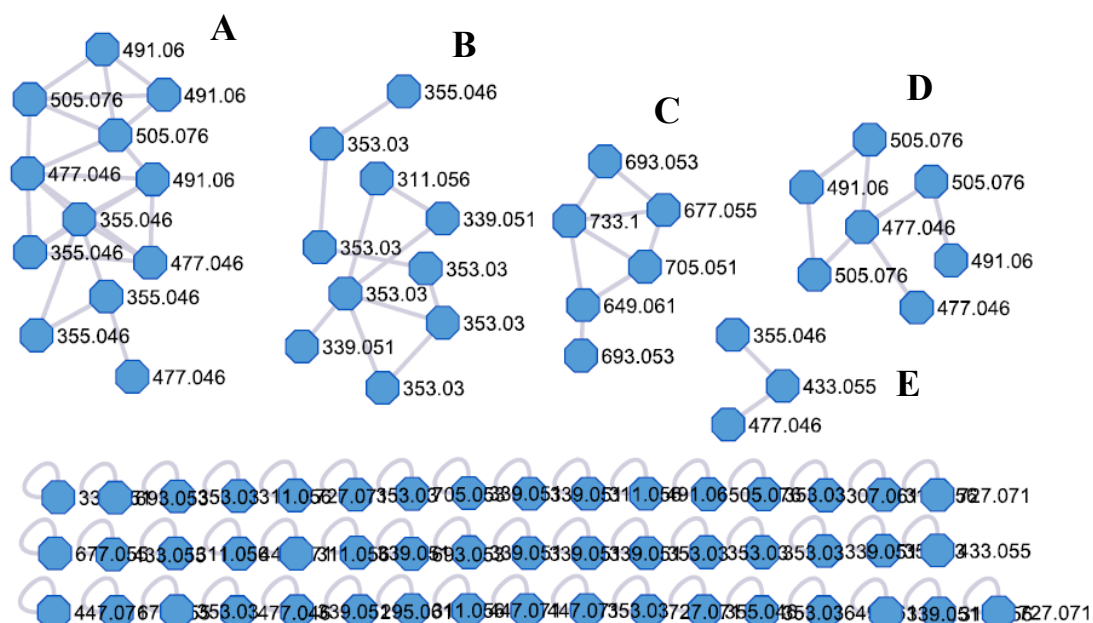
5.7 Desreplicação das frações H₂O-MeOH e MeOH

As frações H₂O-MeOH e MeOH foram submetidas a desreplicação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (Item 4.9, Pág. 33). As energias de ionização para a obtenção dos espectros de EM/EM foram de 15 e 30 NCE e a faixa de massa detectada no experimento foi de 200,0000 – 900,0000 Da, obtendo-se o cromatograma de íons totais apresentado na Figura 17 (Pág. 44).

A identificação dos compostos foi feita através da análise dos íons *quasi*-molecular [M-H]⁻, dos padrões de fragmentação, dados de UV-vis, dados da literatura e análise na plataforma GNPS. A Tabela 1 (Pág. 45) apresenta os compostos identificados em ordem de eluição, de acordo com o cromatograma de íons totais obtido no experimento, para cada fração. A análise dos espectros UV-vis de cada pico mostrou absorções máximas na faixa de 226–420, o que, segundo a literatura, está de acordo com o encontrado para derivados do ácido pulvínico (NIGUYEN et al, 2013). Foram tentativamente identificados 7 derivados do ácido pulvínico, dentre os quais norbadiona A (**31**), bisnorbadioquinona A (**30**) e pisoquinona (**33**) já são relatados para *P. tinctorius* e *o*-metil pulviquinona A (**26**), ácido xerocômico (**20**), ácido atromêntico (**16**) e xerocomorubina (**19**) são relatados pela primeira vez para a espécie. Também foi possível identificar compostos de outras classes: a atromentina (**36**), uma terfenilquinona precursora dos derivados do ácido pulvínico, e duas pulvinonas (**44** e **45**). Através da desreplicação ainda foi possível propor 7 novas moléculas (**37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **42** e **43**).

Os dados obtidos pela análise em CLAE-EM/EM foram tratados na plataforma GNPS para análise de redes moleculares (Item 4.10.1, Pág. 34). As redes moleculares são formadas por nós, que correspondem aos espectros EM/EM, e por linhas, que os ligam. Os nós são conectados de acordo com a semelhança entre eles, que é expressa pelo valor do cosseno. Quanto mais próximo de 1 for o cosseno, mais semelhante são os espectros EM/EM conectados. Além disso, o valor do cosseno também é um parâmetro utilizado para comparação com a biblioteca da plataforma, sendo 0.7 o valor mínimo para uma combinação satisfatória. Os resultados do fluxo de trabalho mostraram a formação de 5 redes e 49 nós individuais foram observados (Figura 16, Pág. 43).

Figura 16. Redes moleculares de dados EM/EM das frações H₂O-MeOH e MeOH obtidos na plataforma GNPS.



Nenhum composto foi anotado por semelhança espectral na biblioteca do GNPS, o que pode significar a falta de dados relacionados à classe dos derivados do ácido pulvínico na plataforma. Apesar disto, as 5 redes moleculares formadas permitiram agrupar os compostos e auxiliar na identificação. Cada nó ou anotação indica um espectro de EM/EM e todas as ligações entre eles se deu com cosseno igual ou acima de 0,7.

As redes A e B, formadas por 12 e 10 nós, respectivamente, mostraram a semelhança entre os espectros dos íons m/z 311, m/z 339, m/z 353, m/z 355, m/z 491 e m/z 505. A análise dos fragmentos de massa permitiram a identificação desses compostos como sendo derivados do ácido pulvínico, com exceção do 311 [M-H]⁻, que foi proposto como um derivado da involutina. É importante ressaltar que a involutina é uma molécula formada na mesma via metabólica que os derivados do ácido pulvínico.

A rede C apresentou 6 nós e permitiu agrupar os íons precursores m/z 677, m/z 649 e m/z 693, os quais, através da análise de fragmentos de massas, foram identificados como norbadiona A, bisnorbadioquinona A e pisoquinona. Esses compostos são denominados derivados naftalenóides do ácido pulvínico e foram detectados em espécies de *Pisolithus*, sendo os principais pigmentos produzidos por este fungo. A rede molecular sugeriu a semelhança de espectro do íon m/z 705 com os derivados naftalenóides e através do padrão de fragmentação foi proposto que o íon se trata de um derivado da norbadiona A.

A rede E apresentou 3 nós. Através do padrão de fragmentação, o íon m/z 433 foi identificado como *o*-metil pulviquinona A e o íon m/z 355, como o ácido xerocômico. Já o íon m/z 447 que apresenta semelhança com o m/z 433, também é agrupado com os íons m/z 491 e m/z 505 (rede D). A análise dos fragmentos de massa destes íons permitiu a proposição de 3 estruturas moleculares derivadas da *o*-metil pulviquinona A, ainda não relatadas na literatura.

Figura 17. Cromatograma de íon totais da fração H₂O-MeOH (A) e MeOH (B) obtido por CLAE-DAD-ESI-EM/EM.

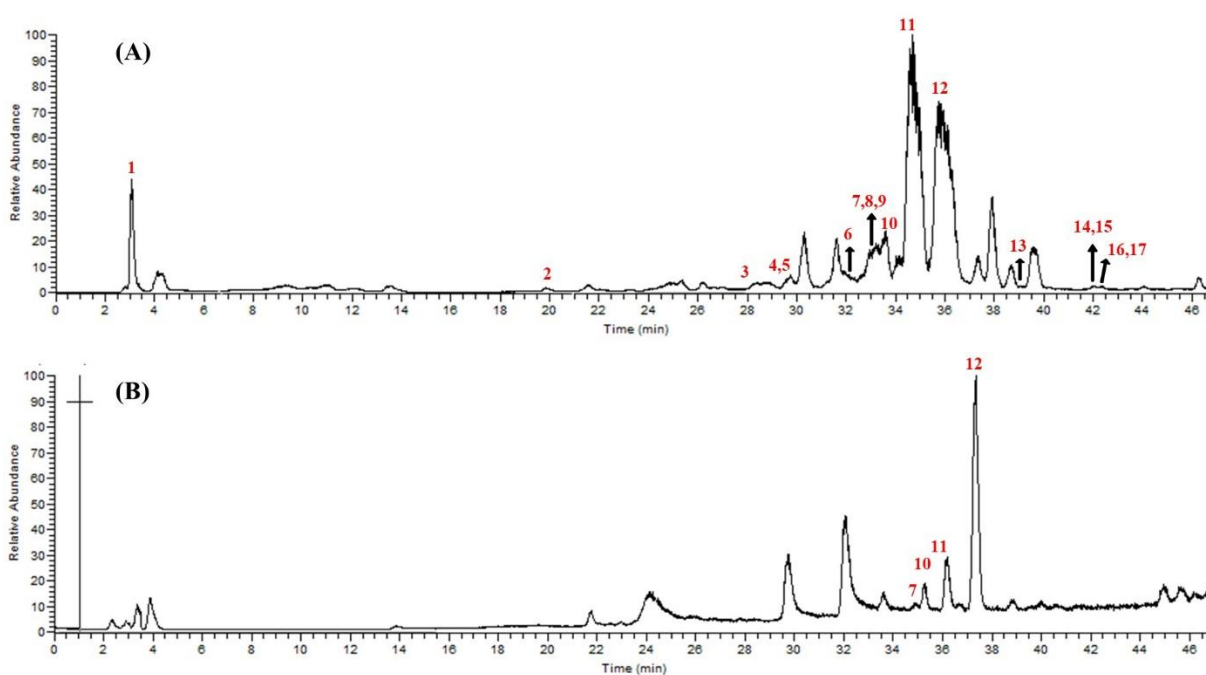


Tabela 1. Íons $[M-H]^-$ observados, tempo de retenção (t_r) de acordo com figura 17, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm), fragmentos EM/EM e compostos identificados.

Pico	$t_r(\text{min})$ A	$t_r(\text{min})$ B	$[M-H]^-$ observado	$[M-H]^-$ teórico	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	EM/EM	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Composto identificado
1	3,07	-----	693,0530	693,0521	226, 318, 470	675,0424; 649,0632; 631,0525; 605,0731; 577,0783; 559,0672; 533,0880; 443,0409	$C_{35}H_{18}O_{16}$	1,2502	Pisoquinona (33)
2	20,12	-----	721,0831	721,0834 3	224, 269, 326, 374	703,0728; 689,0573; 677,0933; 645,0674; 617,0721; 589,0775; 573,0826; 411,0508	$C_{37}H_{22}O_{16}$	0,5041	D-P (39)
3	27,98	-----	295,0614	295,0612	266, 346	133,0285	$C_{17}H_{12}O_5$	0,7675	Isoaspulvinona E (45)
4	29,76	-----	311,0563	311,0561	266, 350	149,0235	$C_{17}H_{12}O_6$	0,6959	D-I (37)
5	29,79	-----	355,0464	355,0459	266, 350	311,0564; 149,0235	$C_{18}H_{12}O_8$	0,2916	Ácido xerocômico (20)
6	32,73	-----	691,0735	691,0735	262, 318	673,0627; 647,0834; 615,0569; 619,0881; 587,0622	$C_{36}H_{20}O_{15}$	0,9065	D-NBA1 (38)
7	33,03	34,99	649,0634	649,0623	262, 318	631,0526; 605,0732; 587,0630; 561,0834; 533,0890; 443,0415; 399,0512	$C_{34}H_{18}O_{14}$	1,6739	Bisnorbadioquinona A (30)
8	33,13	-----	339,0513	339,0510	262, 326	295,0613; 133,0285	$C_{18}H_{12}O_7$	0,8154	Ácido atromêntico (16)
9	33,16	-----	295,0613	295,0612	258, 326	133,0285	$C_{17}H_{12}O_5$	0,7675	Aspulvinona E (44)
10	33,53	35,31	353,0307	353,0302	258, 322	309,0408; 133,0285	$C_{18}H_{10}O_8$	1,2647	Xerocomorubina (19)
11	34,59	36,13	705,0887	705,0885	226, 270, 354, 420	673,0627; 617,1089; 589,1141; 571,1035	$C_{37}H_{22}O_{15}$	0,2503	D-NBA2 (40)
12	35,75	37,35	677,0574	677,0572	224, 269, 351, 417	659,0481; 589,0776; 615,0568; 561,0826; 543,0723; 517,0928; 427,0458	$C_{35}H_{18}O_{15}$	0,2163	Norbadiona A (31)
13	39,12	-----	491,0619	491,0619	226, 270, 326	447,0721; 419,0772; 404,0536; 359,0561; 285,0404	$C_{25}H_{16}O_{11}$	0,0683	D-OMP1 (41)
14	41,70	-----	323,0565	323,0561	270, 350	295,0622; 161,0236	$C_{18}H_{12}O_6$	1,2891	Atromentina (36)
15	41,78	-----	433,0562	433,0565	224, 267, 323, 369	389,0667; 361,0717; 374,0430; 346,0482; 227,0345	$C_{23}H_{14}O_9$	0,2853	<i>o</i> -metil pulviquinona A (26)
16	42,34	-----	505,0777	505,0776	226, 266, 326	433,0927; 446,0644; 418,0694; 285,0404	$C_{26}H_{18}O_{11}$	0,2899	D-OMP2 (42)
17	43,03	-----	447,0720	447,0721	226, 270, 314	403,0819; 388,0585; 375,0871; 360,0639; 227,0344	$C_{24}H_{16}O_9$	0,2763	D-OMP3 (43)

O método cromatográfico desenvolvido (Item 4.9, Pág. 33) apresentou uma separação razoável dos picos, no qual foi possível observar compostos de diferentes classes. Os cromatogramas dos íons produtos se encontram no Anexo B.

O pico 1 ($t_r = 3,07$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 693,0530, compatível com a fórmula molecular $C_{35}H_{18}O_{16}$, atribuído ao composto pisoquinona (**33**). Através da investigação de espécies de *Pisolithus* em áreas distintas na Austrália ocidental, Gill e colaboradores isolaram pela primeira vez este derivado (GILL; KIEFEL, 1994). O espectro de íon produto (Figura 18) do pico apresentou fragmentos m/z 675,0424 $[M-H_2O-H]^-$ e m/z 649,0632 $[M-CO_2-H]^-$, justificados respectivamente pela perda de 18 e 44 Da da molécula. Também foi possível observar os fragmentos m/z 605,0731 e m/z 443,0409, originados do fragmento m/z 649,0632 pela perda de uma molécula de CO_2 (43,9902 Da) e um grupo $C_{10}H_6O_5$ (206,0223 Da), respectivamente. Ainda, o fragmento m/z 577,0783 foi formado a partir da perda de uma molécula de CO (27,9948 Da) do fragmento m/z 605,0731. A Figura 19 apresenta o mecanismo de fragmentação para pisoquinona.

Figura 18. Espectro de íon produto e estrutura molecular da pisoquinona (**33**).

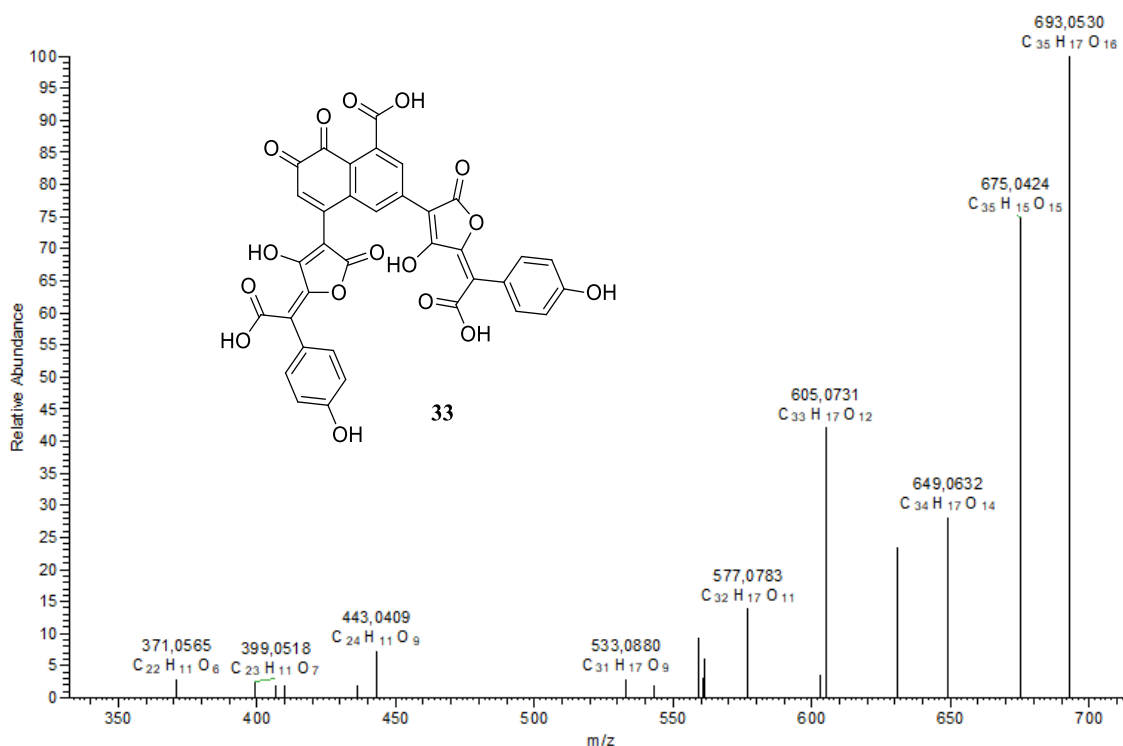
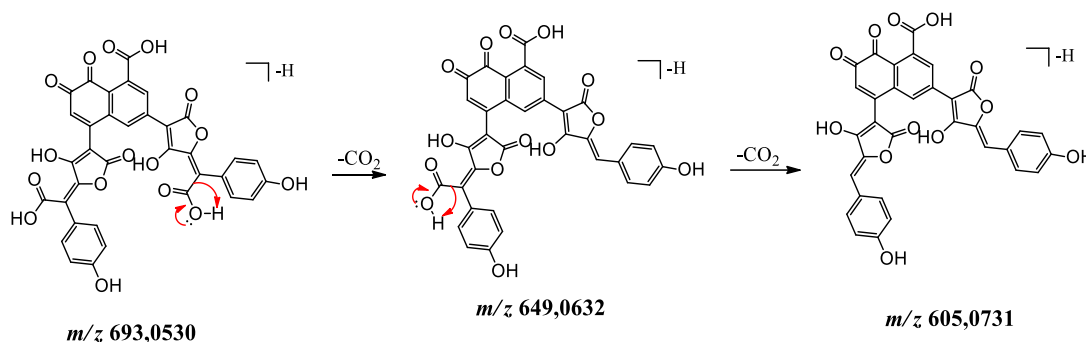


Figura 19. Mecanismo de fragmentação proposto para pisoquinona (**33**).



O pico **2** ($t_r = 20,12$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 721,0831, compatível com a fórmula molecular C₃₇H₂₂O₁₆. O espectro íon produto (Figura 20) do pico apresentou os fragmentos m/z 703,0728 $[M-H_2O-H]^-$, m/z 689,0573 $[M-CH_4O-H]^-$ e m/z 677,0933 $[M-CO_2-H]^-$, justificados pela perda de 18, 32 e 44 Da da molécula. Outro fragmento também foi observado, m/z 645,0674, originado pela perda de CO₂ (43,9899 Da) do fragmento m/z 689,0573. É importante notar que a perda de uma molécula de H₂O e uma de CO₂ do íon *quasi*-molecular também foi observada para a molécula de pisoquinona. Já o fragmento m/z 617,0721 advém do fragmento m/z 645,0674 pela perda de CO (27,9952 Da). O pico de maior intensidade no espectro de massa, de m/z 573,0826 é originado pela perda de CO₂ (43,9895 Da) do fragmento m/z 617,0721. Ainda foi possível observar o fragmento m/z 411,0508, originado do fragmento m/z 573,0826 através da perda de um grupamento C₉H₆O₃ (162,0319 Da). Através da análise do padrão de fragmentação foi proposta uma estrutura molecular inédita derivada da pisoquinona, ácido 3-((E)-5-(carboxi(4-hidroxifenil)metileno)-4-hidroxi-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-5-((E)-4-hidroxi-5(2-metoxi-1-(4-metoxifenil)-2-oxoetilideno)-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-7,8-dioxo-7,8-dihidronaftaleno-1-carboxílico, a qual recebeu o código D-P (**39**, Figura 20). A Figura 21 apresenta o mecanismo de fragmentação para este composto.

Figura 20. Espectro de íon produto e possível estrutura molecular para D-P (39).

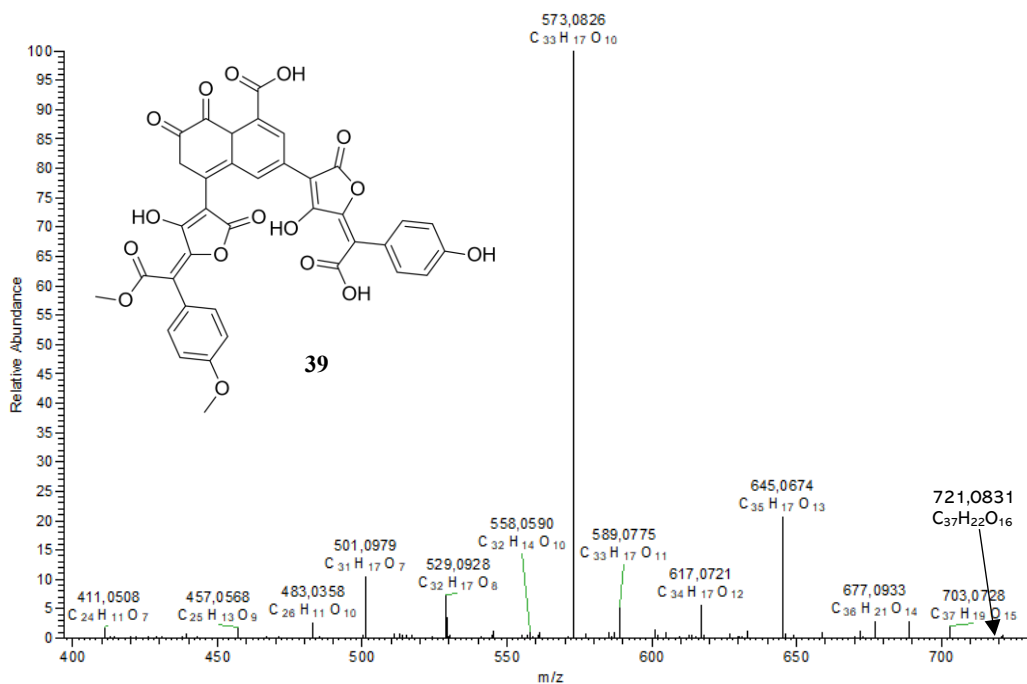
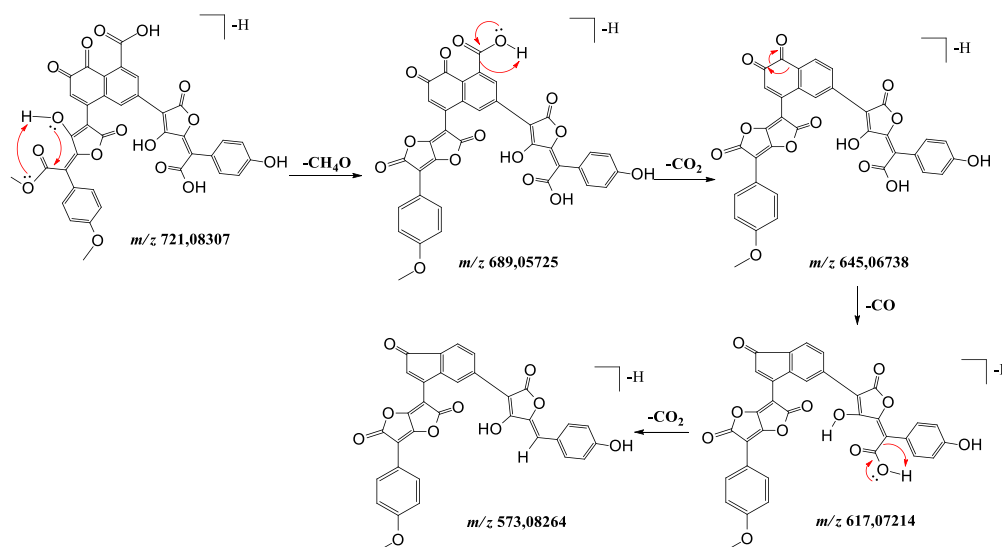


Figura 21. Mecanismo de fragmentação proposto de D-P (39).



Os picos **3** ($t_r = 27,98$ min) e **9** ($t_r = 33,16$ min) apresentaram um íon *quasi*-molecular [M-H]⁻ de m/z 295,0614, compatível com a fórmula molecular C₁₇H₁₂O₅. O espectro de íon produto (Figura 22) dos picos apresentou o fragmento m/z 133,0285 [M-C₉H₆O₃-H]⁻, justificado pela perda de 162 Da da molécula. De acordo com a fórmula molecular e o padrão de fragmentação observados, é possível propor a presença de duas pulvinonas diastereoisoméricas: aspulvinona E (**44**) e isoaspulvinona E (**45**). A Figura 23 apresenta o mecanismo de

fragmentação proposto para os dois diastereoisômeros.

Figura 22. Espectro de íons produto e estruturas moleculares de aspulvinona E (**44**) e isoaspulvinona E (**45**).

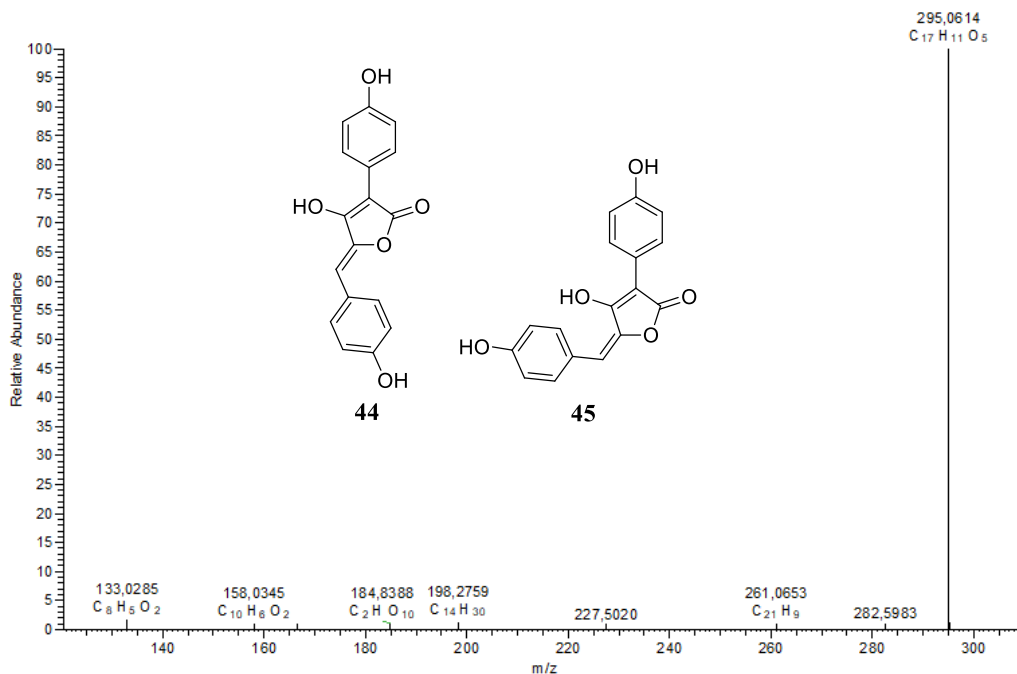
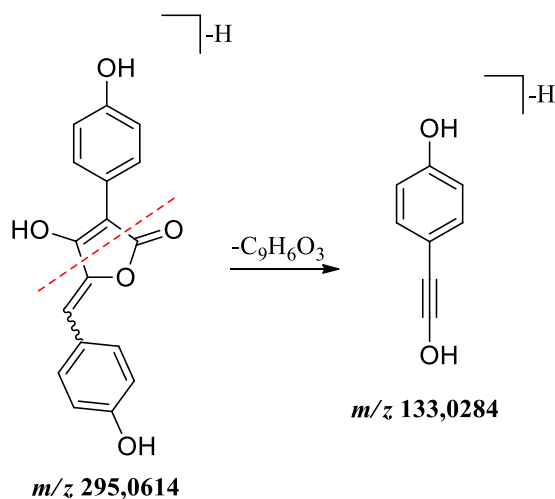


Figura 23. Fragmentação proposta para aspulvinona E (**44**) e isoaspulvinona E (**45**).



O pico 4 ($t_r = 29,76$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[\text{M-H}]^-$ de m/z 311,0563, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$. O espectro de íon produto (Figura 24) do pico apresentou um fragmento com m/z 149,0235 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3-\text{H}]^-$, justificado pela perda de 162 Da na molécula. Conforme discutido no Item 2.3.1 (Pág. 24), o ácido arilpulvinílico é um

precursor importante não só na biossíntese do ácido pulvínico e seus derivados, mas também de moléculas precursoras do Involutin (Figura 6). Assim, foi possível sugerir que o pico 2 trata-se também de um derivado inédito do involutin, 5-(3,4-dihidroxifenil)-4-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)ciclopent4-ene-1,3-diona, o qual recebeu o código D-I (**37**, Figura 24). A Figura 25 apresenta o mecanismo de fragmentação proposto para este metabólito secundário.

Figura 24. Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-I (**37**).

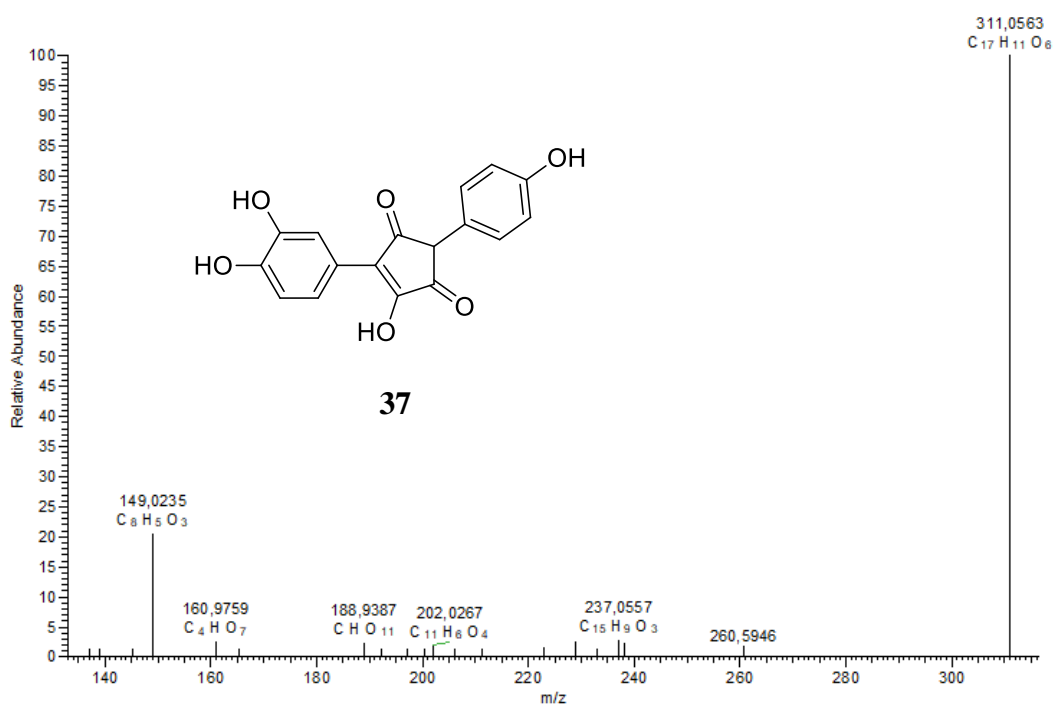
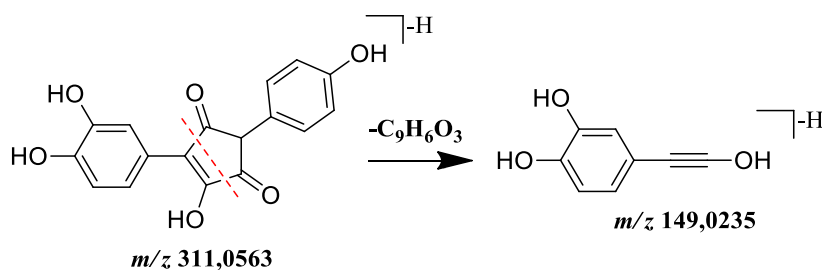


Figura 25. Mecanismo de fragmentação proposto para D-I (**37**).



O pico **5** ($t_r = 29,79$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 355,0464, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{12}O_8$, o qual foi atribuído ao ácido xerocômico (**20**). O espectro íon produto (Figura 26) do pico apresentou os fragmentos m/z 311,0565 $[M-CO_2-H]^-$ e m/z 149,0234 $[M-C_{10}H_6O_5-H]^-$, justificados pela perda de 43 e 206 Da,

respectivamente. Cabe ressaltar que, o primeiro fragmento corresponde ao pico base do espectro de massas. Davoli e Weber (2002) isolaram o ácido xerocômico do basidiomiceto *Xerocomus parasiticus*, cujo espectro de massas para esse composto também apresentou o fragmento m/z 311 como pico base. Este foi justificado pela perda de uma molécula de CO_2 (DAVOLI; WEBER, 2002). Curiosamente, o espectro de massas relatado por esses autores se restringiu ao pico m/z 311, não sendo observados outros fragmentos. A Figura 27 apresenta o mecanismo de fragmentação proposto para o ácido xerocômico.

Figura 26. Espectro de íon produto e estrutura molecular de ácido xerocômico (20).

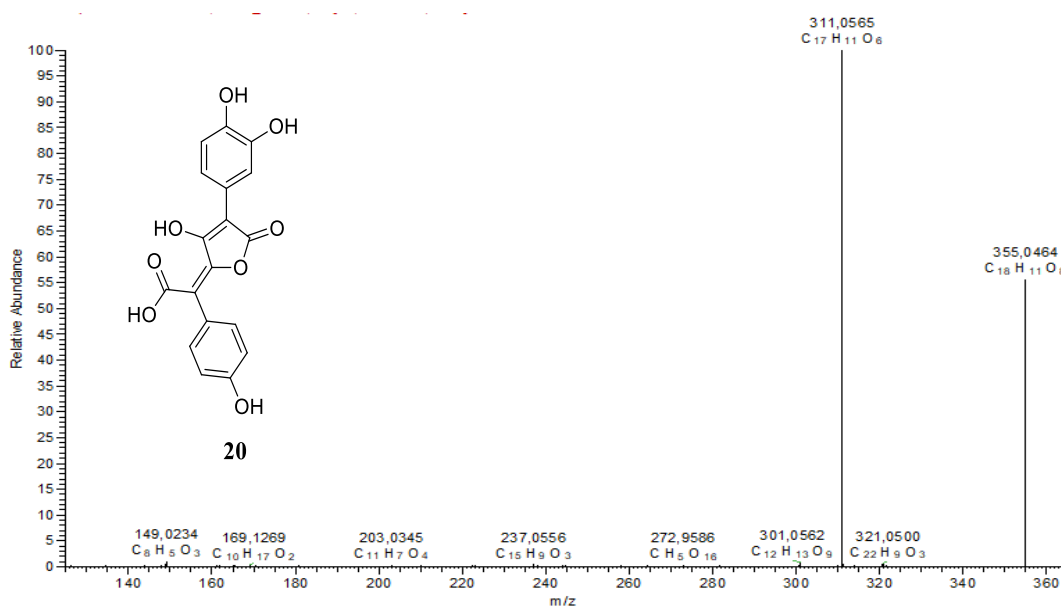
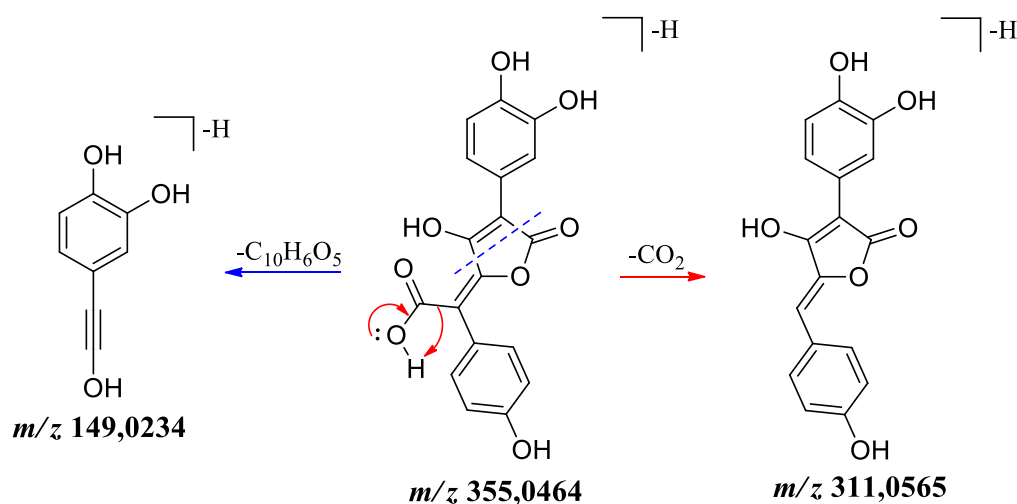


Figura 27. Fragmentação proposta para o ácido xerocômico (20).



O pico **6** ($t_r = 32,76$ min) apresentou um íon quasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 691,0735, compatível com a fórmula molecular $C_{36}H_{20}O_{15}$. O espectro de íon produto (Figura 28) do pico apresentou fragmentos m/z 673,0627 $[M-H_2O-H]^-$ e m/z 647,0834 $[M-CO_2-H]^-$ justificados pela perda de 18 e 44 Da da molécula. Também foi possível observar os fragmentos m/z 615,0569, m/z 619,0881 e m/z 587,0622, originados do fragmento m/z 647,0834 através da perda de uma molécula de CH_4O (32,0265 Da), uma molécula de CO (27,9954 Da) e um grupo $C_2H_4O_2$ (60,0212 Da), respectivamente. A partir da fórmula molecular e do padrão de fragmentação foi possível propor a estrutura molecular de um novo derivado da norbadióna A, ácido (E)-2-(3-hidroxi-4-(8-hidroxi-5-(1-(4-hidroxifenil)-2-metoxi-2-oxoetilideno)-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-2-oxo-2H-nafto[1,8-bc]furan-4-il)-5-oxofuran-2(5H)-lideno)-2-(4-hidroxifenil) acético, o qual recebeu o código de D-NBA1 (**38**, Figura 28). Vale ressaltar que o fragmento m/z 615,0569 é o pico base do espectro de massas, justificado pela perda de uma molécula de CO_2 seguida da perda de uma molécula de CH_4O , o qual auxiliou na proposta da estrutura molecular para o íon observado (Figura 28). A Figura 29 mostra a fragmentação para este composto.

Figura 28. Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-NBA1 (**38**).

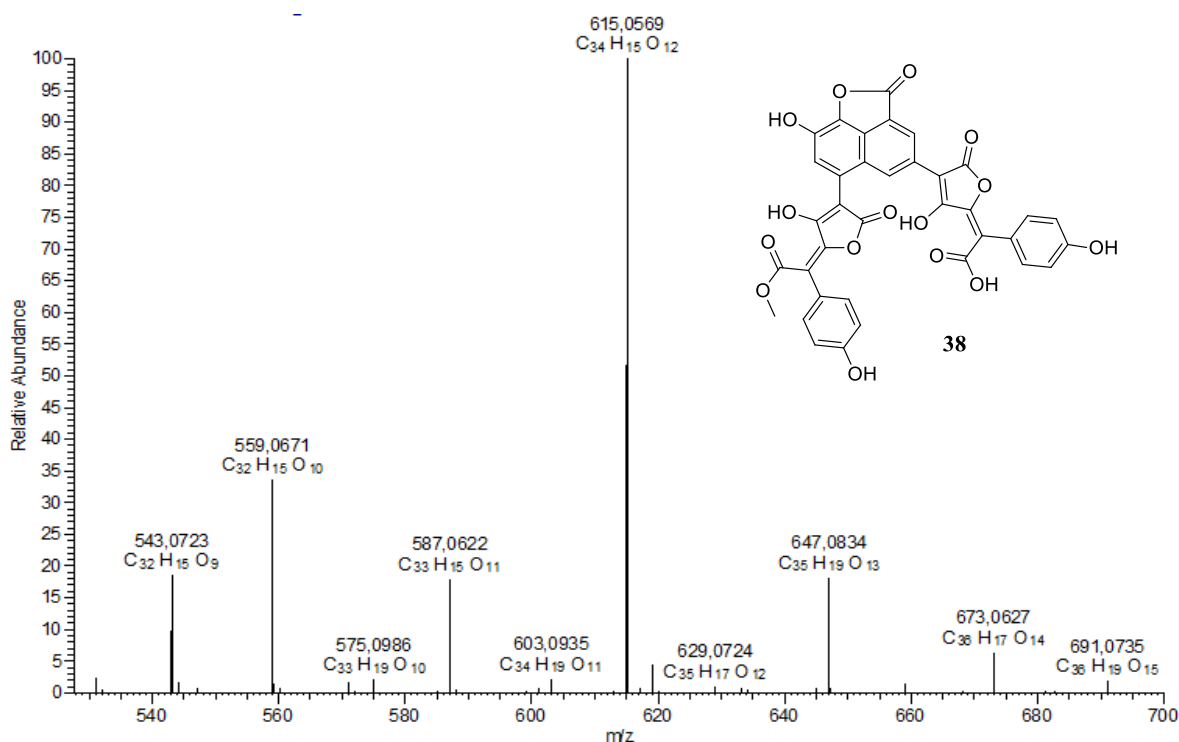
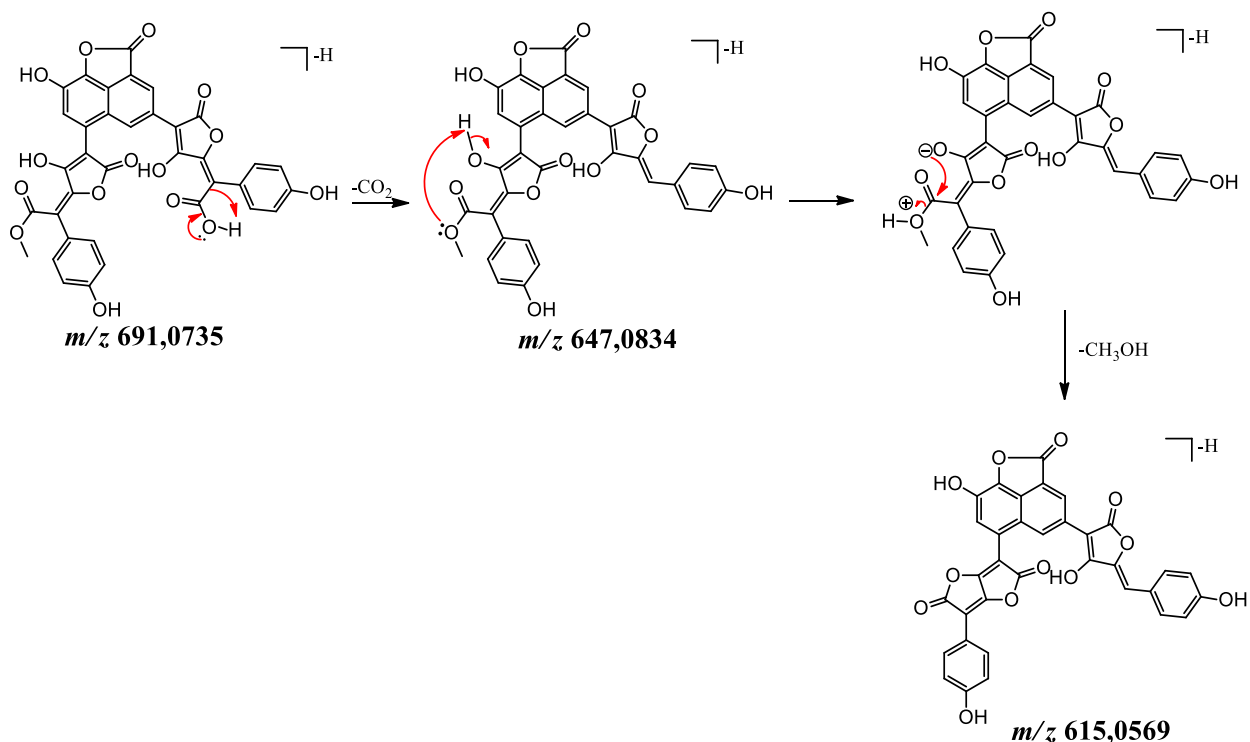


Figura 29. Mecanismo de fragmentação proposto para D-NBA1 (**38**).



O pico 7 ($t_r = 33,03$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 649,0634, o qual foi tentativamente identificado como bisnorbadioquinona A (**30**). O espectro de íon produto (Figura 30) do pico apresentou os fragmentos m/z 631,0526 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, m/z 605,0732 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ e m/z 443,0415 $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_5-\text{H}]^-$, justificados pela perda de 18, 44 e 206 Da da molécula. Já os fragmentos m/z 587,0630 e m/z 561,0834 são originados do fragmento m/z 605,0732 a partir da perda de uma molécula de H_2O (18,0109 Da) e de uma molécula de CO_2 (43,9899 Da), respectivamente. Ainda foi possível observar os fragmentos m/z 533,0890 e m/z 399,0512, que advêm do fragmento m/z 561,0834, pela perda de uma molécula de CO (27,9944 Da) e um grupamento $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ (162,0322 Da), respectivamente. A Figura 31 apresenta os mecanismos de fragmentação propostos para bisnorbadioquinona A.

Figura 30. Espectro de íon produto e estrutura molecular de bisnorbadioquinona A (**30**).

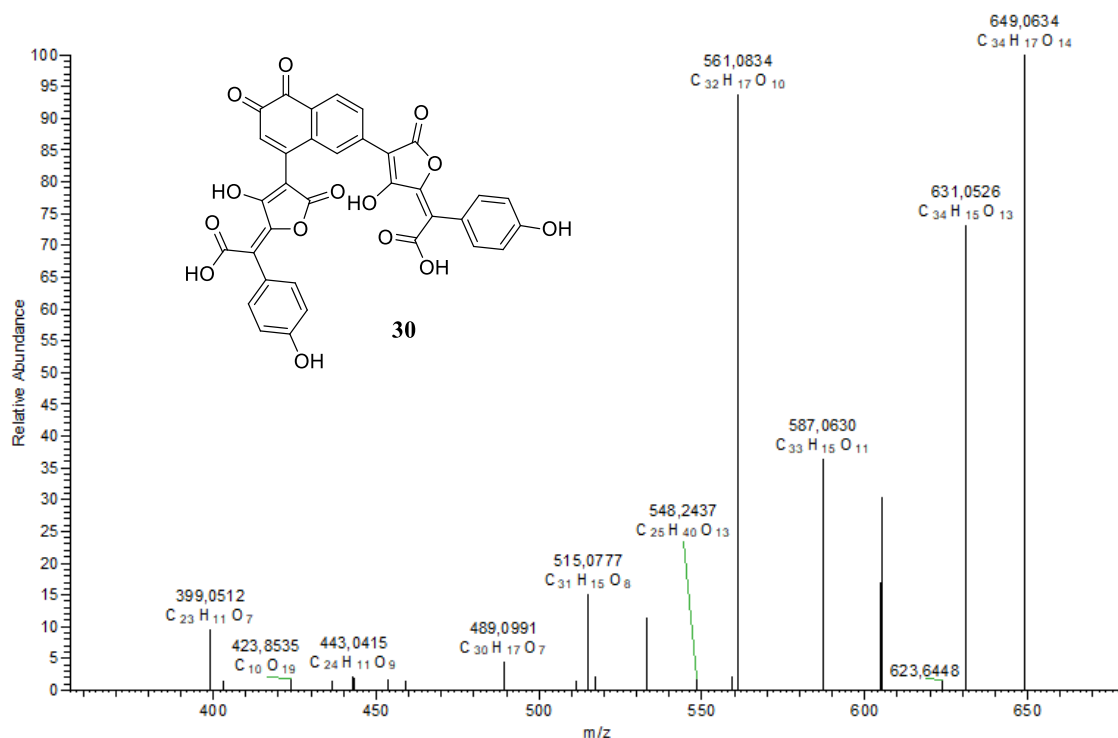
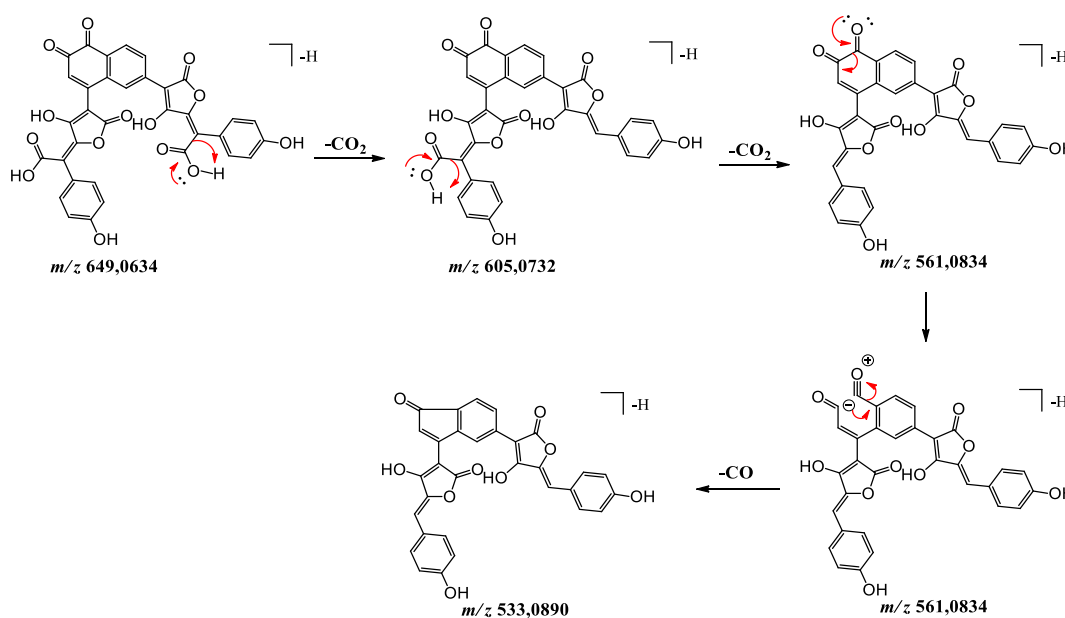


Figura 31. Mecanismo de fragmentação proposto para bisnorbadioquinona A (**30**).



O pico **8** ($t_r = 33,13$ min) apresentou um íon quasi-molecular $[M-H]^-$ de m/z 339,0513, compatível com a fórmula molecular C₁₈H₁₂O₇, indicando a presença do composto ácido atômico (**16**). No espectro de íon produto (Figura 32) do pico foram observados os

fragmentos m/z 295,0614 $[M-CO_2-H]^-$, como pico base, e m/z 133,0283 $[M-C_{10}H_6O_5-H]^-$, justificados pela perda de 44 e 133 Da da molécula. O fragmento m/z 295, originado pela perda de CO_2 , também foi observado por Davoli e Weber, como pico base para a molécula de ácido atromêntico (DAVOLI; WEBER, 2002). Além disto, o mesmo padrão de fragmentação foi encontrado para o derivado ácido xerocômico (Figura 26), o que auxiliou na identificação estrutural. A Figura 33 apresenta o mecanismo de fragmentação para este composto.

Figura 32. Espectro de íon produto e estrutura molecular de ácido atromêntico (16).

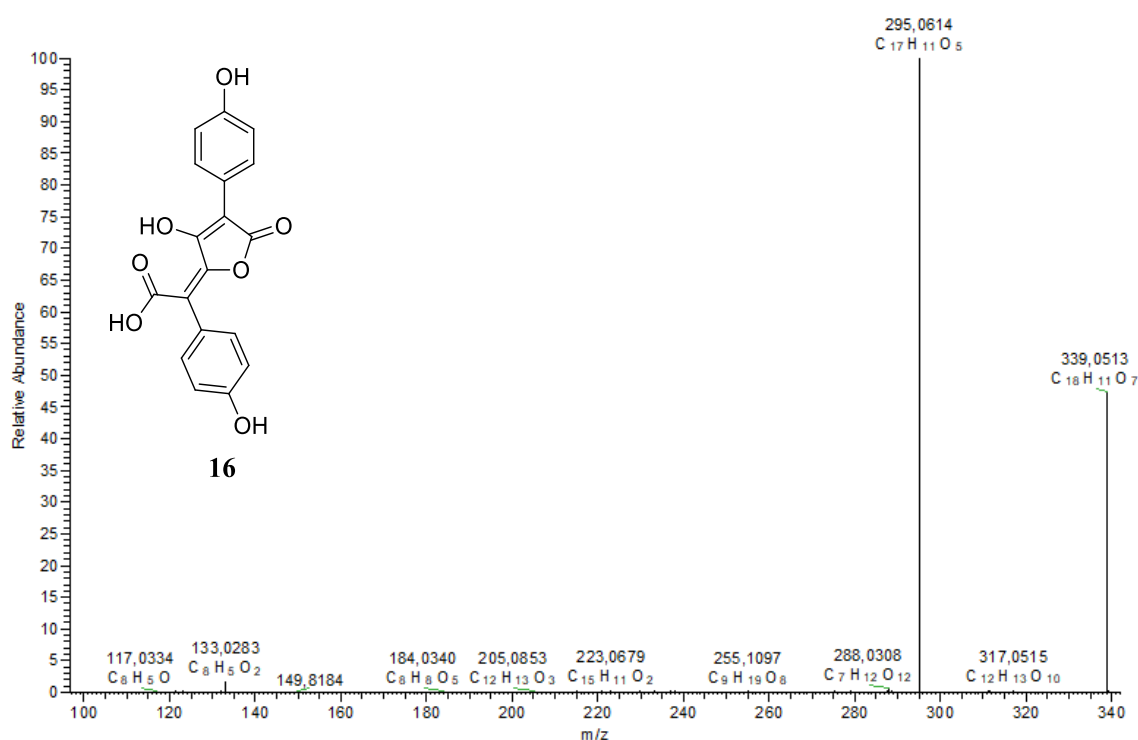
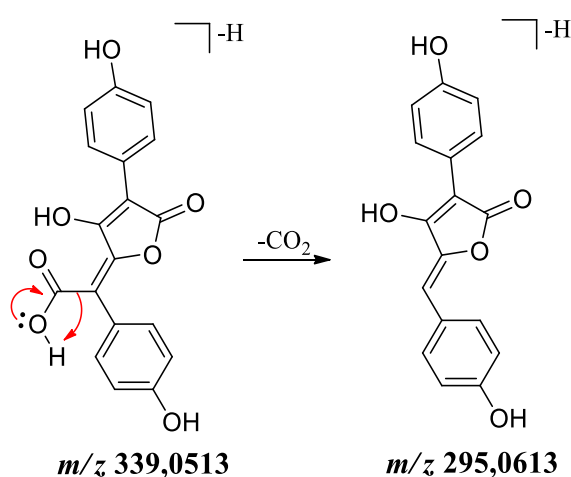


Figura 33. Mecanismo de fragmentação proposto para o ácido atromêntico (16).



O pico **10** ($t_r = 33,53$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 353,0307, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{10}O_8$, o qual foi atribuído ao composto xerocomorubina (**19**). No espectro de íon produto (Figura 34) do pico foi possível observar os fragmentos m/z 309,0408 $[M-CO_2-H]^-$ e m/z 133,0285 $[M-C_{10}H_4O_6-H]^-$, justificados pela perda de 44 e 220 Da da molécula. A Figura 35 apresenta a fragmentação para o composto.

Figura 34. Espectro de íon produto e estrutura molecular de xerocomorubina (**19**).

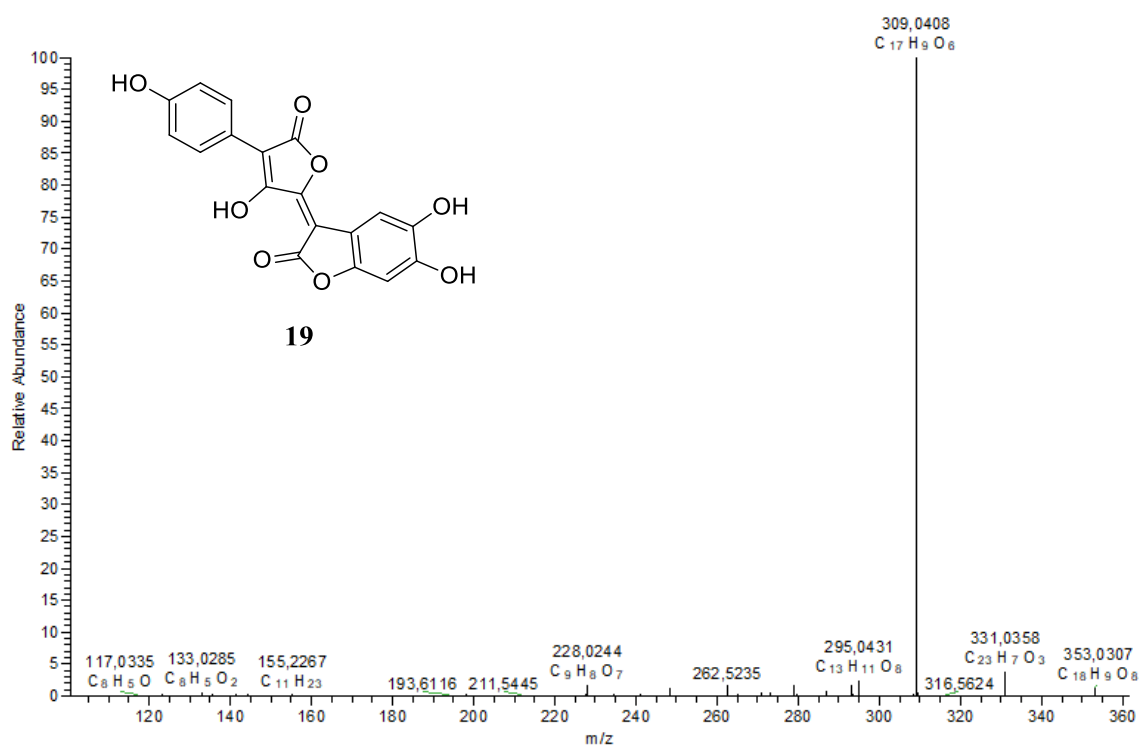
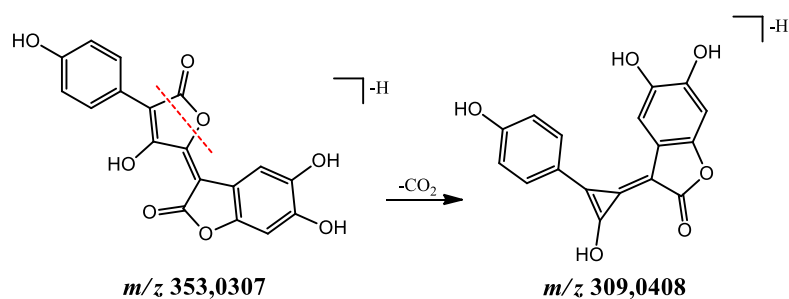


Figura 35. Fragmentação proposto para xerocomorubina (**19**).



O pico **11** ($t_r = 34,59$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 705,0887. No espectro de íon produto (Figura 36) do pico foram observados os fragmentos m/z 673,0627 $[M-CH_4O-H]^-$ e m/z 617,1089 $[M-2CO_2-H]^-$, justificados pela perda de 32 e 89 Da da molécula. Além desses, observou-se os fragmentos m/z 589,1141 e m/z 455,0774, originados do fragmento m/z 617,1089 através das perdas de uma molécula de CO (27,9948 Da) e um grupo $C_9H_6O_3$ (162,0316 Da), respectivamente. Vale ressaltar que a perda de duas moléculas de CO_2 seguida da perda de um grupamento $C_9H_6O_3$ também foi observada para a molécula de norbadiona A (**31**, Figura 38). Desta forma, através do padrão de fragmentação e da fórmula molecular encontrados, foi possível propor uma estrutura molecular derivada da norbadiona A, até o presente momento não descrita na literatura, ácido (2E, 2'E)-2,2'-(4,4'-(8-hidroxi-2-oxo-2H-nafto[1,8-bc]furan-4,6-diil)bis(3-metoxi-5-oxofuran-4(5H)-il-2(5H)-ilideno))bis(2-(4-hidroxifenil) acético, atribuída ao código D-NBA2 (**40**, Figura 36). A Figura 37 apresenta o mecanismo de fragmentação proposto para a molécula.

Figura 36. Espectro íon produto e estrutura molecular do D-NBA2 (**40**).

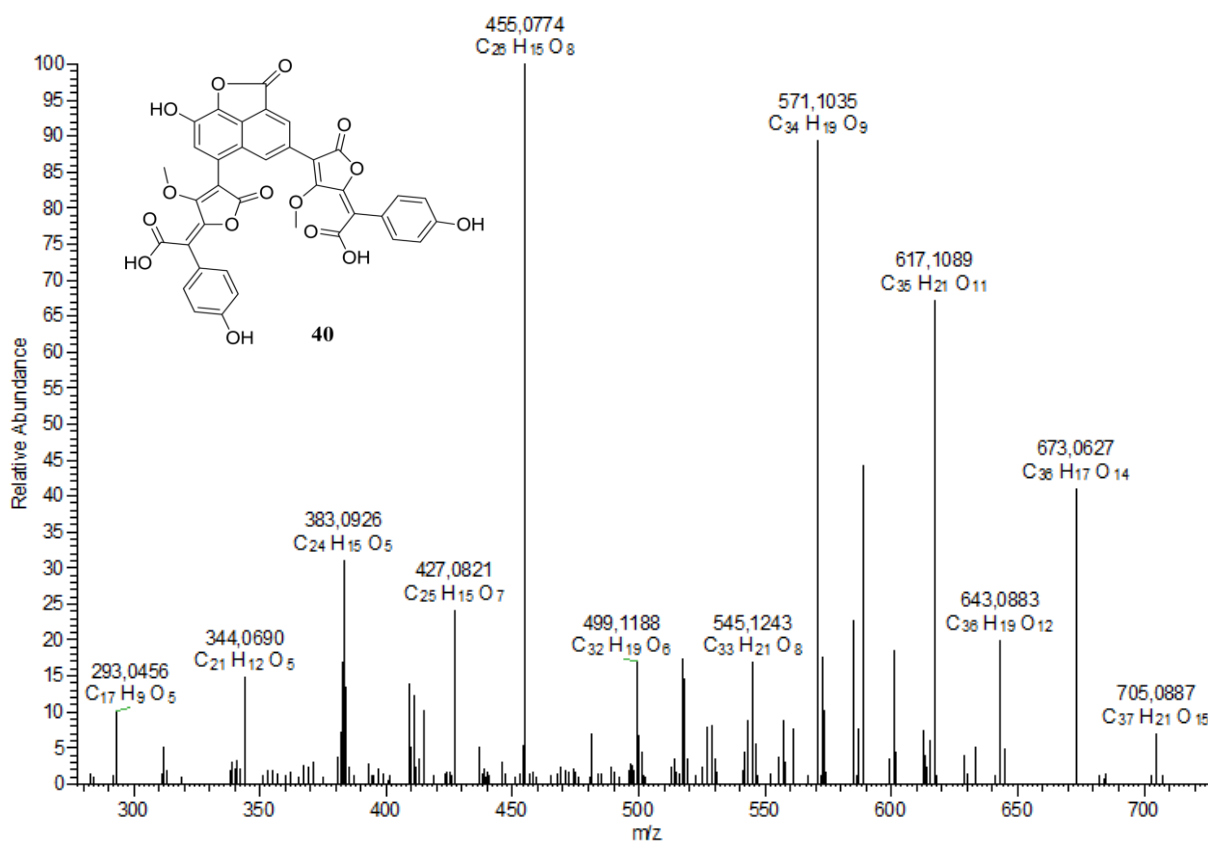
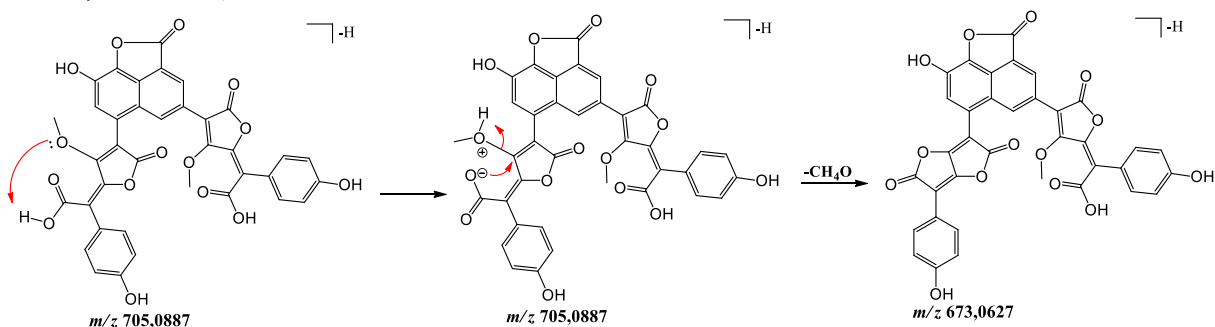
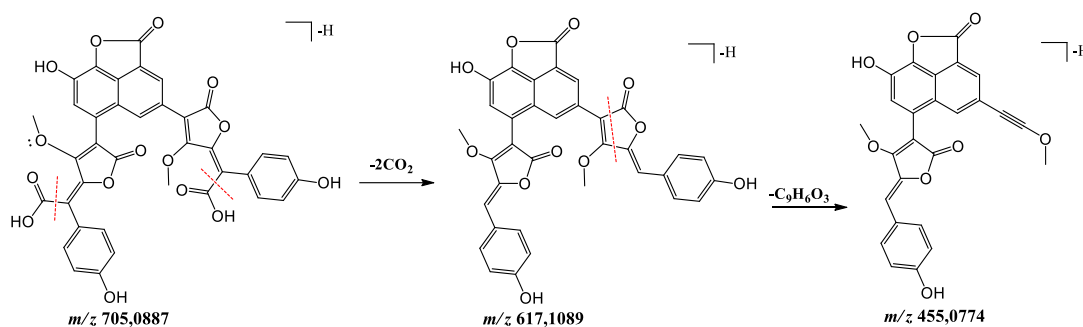


Figura 37. Mecanismo de fragmentação proposto para D-NBA2 (**40**).**Formação do m/z 673,0627****Formação do m/z 455,0774 (pico base)**

O pico **12** ($t_r = 35,75$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 677,0574, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{35}\text{H}_{18}\text{O}_{15}$, o qual foi atribuído ao composto norbadiona A (**31**). No espectro íon produto (Figura 38) do pico são observados os fragmentos m/z 659,0481 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ e m/z 589,0776 $[\text{M}-2\text{CO}_2-\text{H}]^-$, justificados pela perda de 18 e 89 Da da molécula. Outro fragmento observado, m/z 615,0568, foi originado do fragmento m/z 659,0481 pela perda de uma molécula de CO_2 (43,9913 Da). Pode-se ainda propor que os fragmentos m/z 561,0826 e m/z 427,0458 são originados do fragmento m/z 589,0776 pela perda de CO (27,9951 Da) e de um grupo $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ (162,0319 Da), respectivamente. Já os fragmentos m/z 543,0723 e m/z 517,0928 são originados do fragmento m/z 561,0826 pelas perdas de H_2O (18,0103 Da) e CO_2 (43,9898 Da), respectivamente. A Figura 39 apresenta a proposta de fragmentação.

Figura 38. Espectro íon produto e estrutura molecular da norbadiona A (**31**).

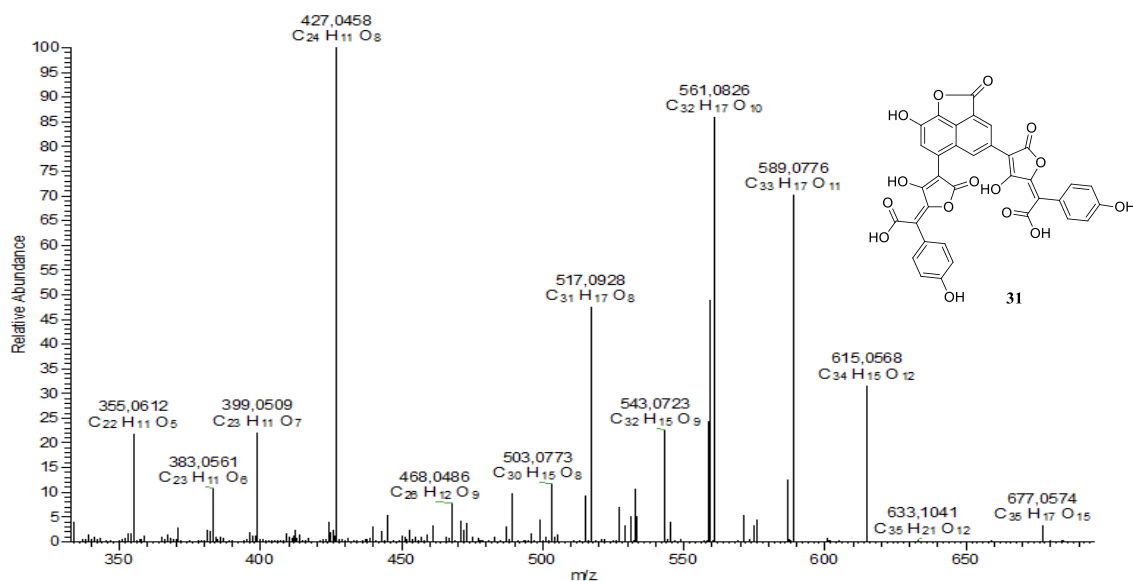
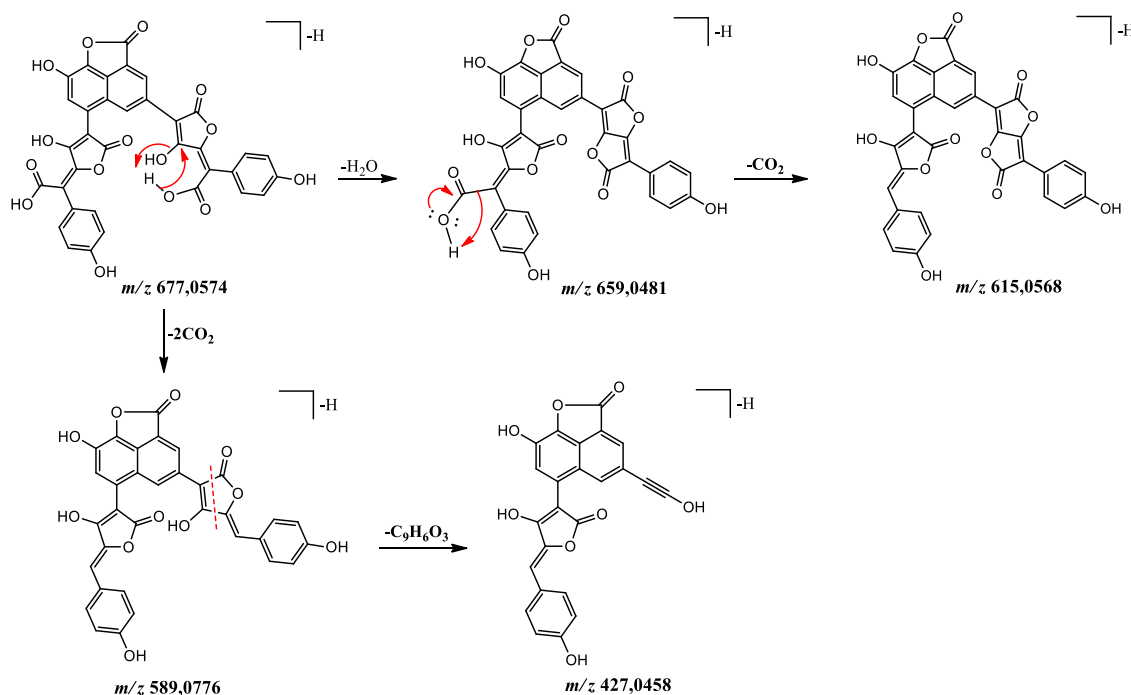


Figura 39. Mecanismo de fragmentação proposto para norbadiona A (**31**).



O pico **13** ($t_r = 39,12$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 491,0619, compatível com a fórmula molecular $C_{25}H_{16}O_{11}$. O espectro íon produto (Figura 40) do pico apresentou fragmentos m/z 447,0721 $[M-CO_2-H]^-$ e m/z 285,0404 $[M-C_{10}H_6O_5-H]^-$, justificados pela perda de 44 e 206 Da da molécula. Além destes, também foram observados os fragmentos m/z 419,0772, originado a partir do fragmento m/z 447,0721 pela perda de CO

(27,9949 Da), e m/z 404,0536, originado do fragmento m/z 419,0772, pela perda de um radical CH_3 (15,0235 Da). É possível ainda observar um fragmento m/z 359,0561, originado do fragmento m/z 419,0772 através da perda de um grupo $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (60,0211 Da). O padrão de fragmentação permitiu a proposta de uma estrutura inédita, derivada da *o*-metil pulviquinona A, ácido 2-(3-hidroxi-4-(6-metoxi-4-(metoxicarbonil)-5,8-dioxo-5,8-dihidronaftalen-2-il)-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)-2-(4-hidroxifenil) acético, a qual recebeu o código D-OMP1 (**41**, Figura 40). A Figura 41 apresenta o mecanismo de fragmentação para o composto.

Figura 40. Espectro de íon produto e estrutura molecular de D-OMP1 (**41**).

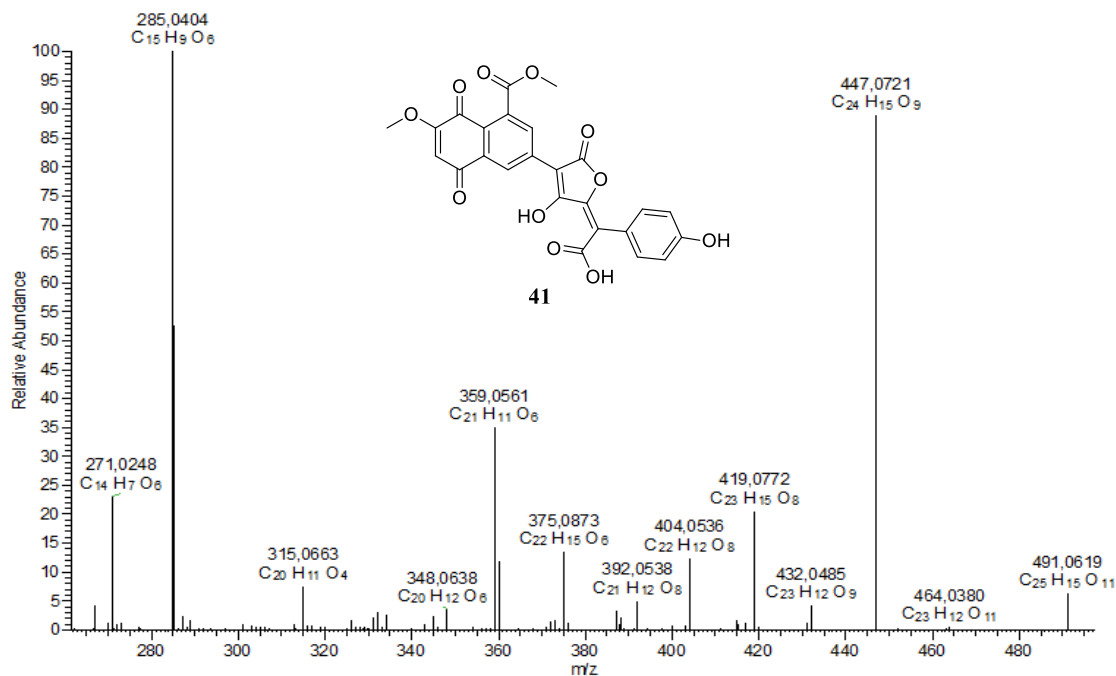
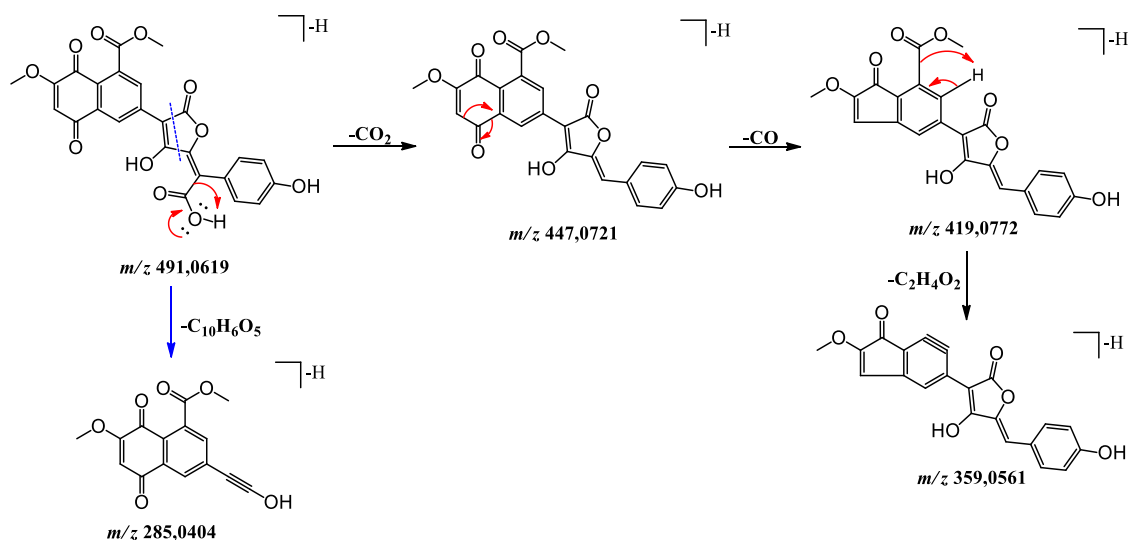


Figura 41. Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP1 (**41**).



O pico 14 ($t_r = 41,70$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 323,0565, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{12}O_6$, o qual foi tentativamente identificado como atromentina (37). No espectro de íon produto (Figura 42) do pico foram observados os fragmentos m/z 295,0622 $[M-CO-H]^-$ e m/z 161,0236 $[M-C_9H_6O_3-H]^-$, justificados pela perda de 28 e 162 Da da molécula. Vale ressaltar que o fragmento m/z 295, justificado pela perda de uma molécula de CO, também foi observado por Gaylord e Brady (1971), para este composto (GAYLORD; BRADY, 1971). A Figura 43 apresenta o mecanismo de fragmentação. O composto atromentina pertence a classe das terfenilquinonas, compostos biossintetizados na via do ácido chiquímico. Estudos mostraram que a atromentina está associada na biossíntese dos derivados do ácido pulvínico, atuando como precursora de algumas moléculas (VELISEK; CEJPEK, 2011).

Figura 42. Espectro de íon produto e estrutura molecular da atromentina (37).

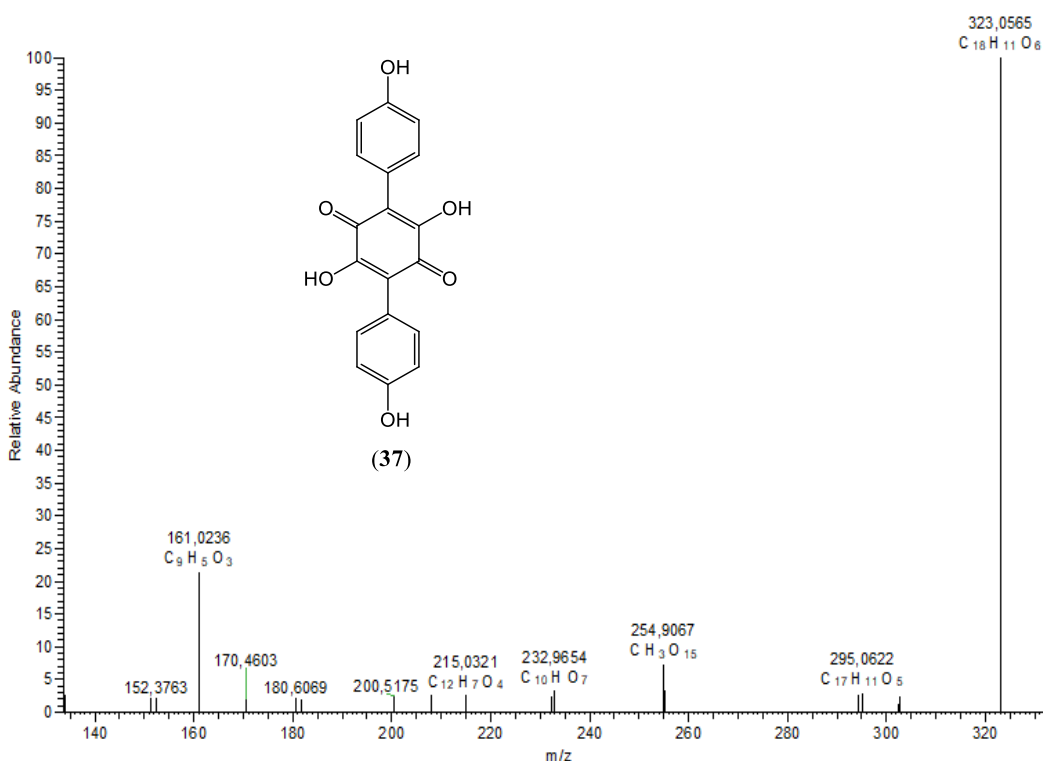
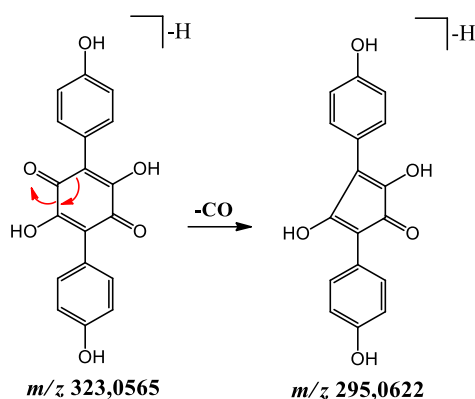


Figura 43. Mecanismo de fragmentação proposto para atromentina (**37**).

O pico **15** ($t_r = 41,95$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 433,0562, compatível com a fórmula molecular $C_{23}H_{14}O_9$, o qual foi tentativamente identificado como *o*-metil pulviquinona A (**26**). O espectro íon produto (Figura 44) do pico apresentou m/z 389,0667 $[M-CO_2-H]^-$ como pico base, justificado pela perda de 44 Da da molécula. Os fragmentos m/z 374,0430 e m/z 361,0717 são originados do fragmento m/z 389,0667 pela perda de um radical CH_3 (15,0235 Da) e uma molécula de CO (27,9949 Da), respectivamente. Outro fragmento, m/z 346,0482, advém do fragmento m/z 374,0430 através da perda de uma molécula de CO (27,9950 Da). Pode-se ainda observar o fragmento m/z 227,0345, que também é originado do fragmento m/z 389,0667 pela perda de um grupo $C_9H_6O_3$. A Figura 45 apresenta o mecanismo de fragmentação para o composto. Vale ressaltar que o composto *o*-metil pulviquinona A não foi descrito para espécies de *Pisolithus* até o momento.

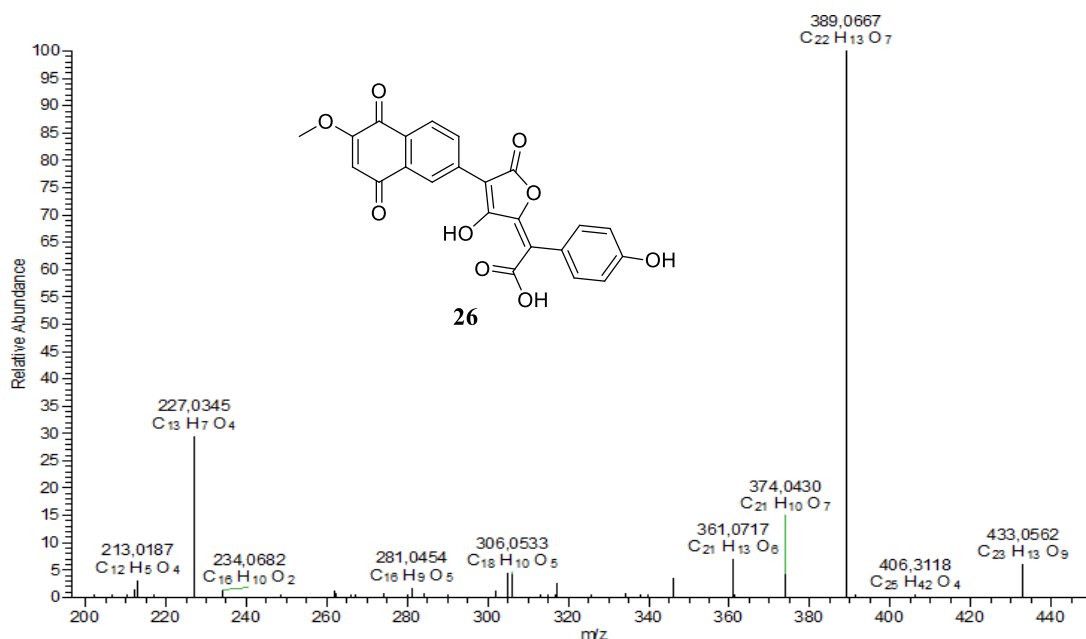
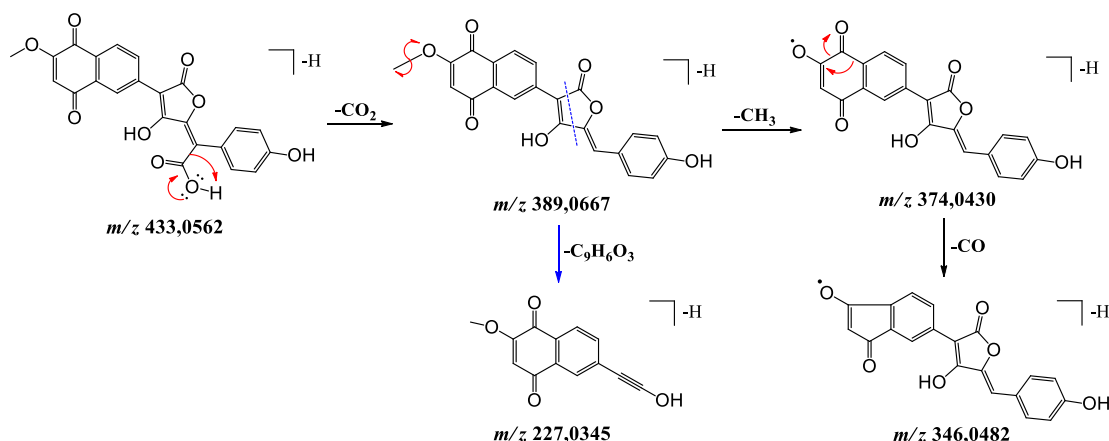
Figura 44. Espectro íon produto e estrutura molecular da *o*-metil pulviquinona A (**26**).

Figura 45. Mecanismo de fragmentação proposto para o-metil pulviquinona A (**26**).



O pico **16** ($t_r = 42,34$ min) apresentou um íon $[M-H]^-$ de m/z 505,0777. O espectro de íon produto (Figura 46) do pico apresentou fragmentos m/z 446,0644 $[M-C_2H_3O_2-H]^-$ e m/z 285,0404 $[M-C_{11}H_8O_5-H]^-$, justificados pela perda de 59 e 220 Da da molécula. O fragmento m/z 433,0927 também é originado do íon *quasi*-molecular justificado pela saída de uma molécula de CO, seguida da saída de uma molécula de CO₂. Outro fragmento observado, m/z 418,0694, advém do fragmento m/z 446,0644 pela perda de uma molécula de CO (27,9950 Da). De acordo com o perfil de fragmentação, foi proposta outra molécula inédita, metil 3-(4-hidroxi-5-(1-(4-hidroxifenil)-2-metoxi-2-oxoetil)-2-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-7-metoxi-5,8-dioxo-5,8-dihidronaftaleno-1-carboxilato, a qual recebeu o código D-OMP2 (**42**, Figura 46). A Figura 47 apresenta um mecanismo de fragmentação para este composto.

Figura 46. Espectro de íon produto e estrutura molecular de D-OMP2 (**42**).

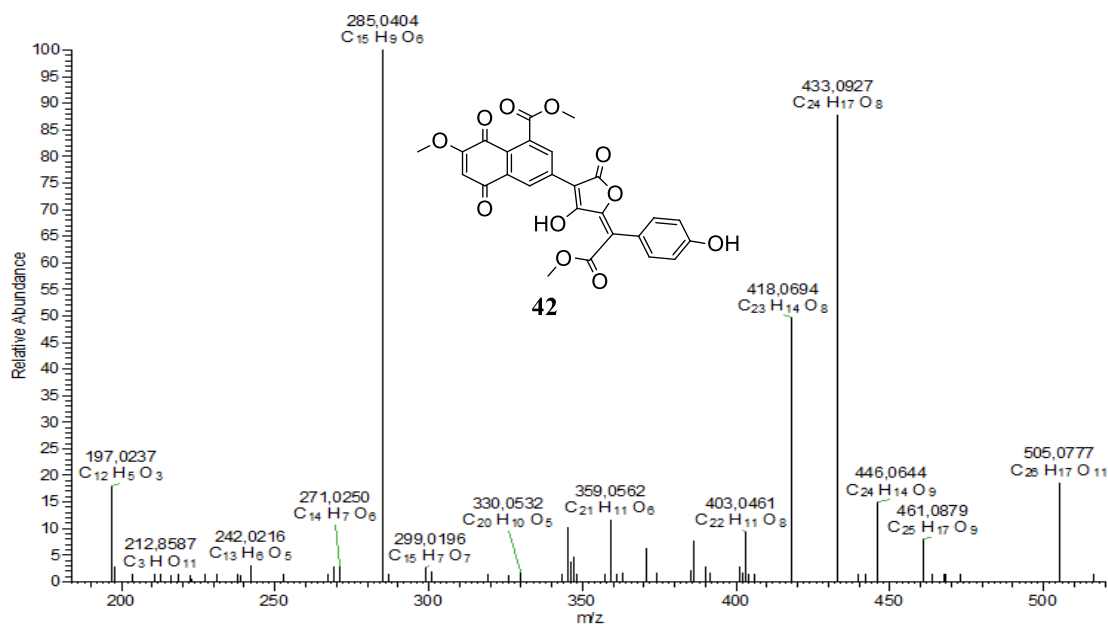
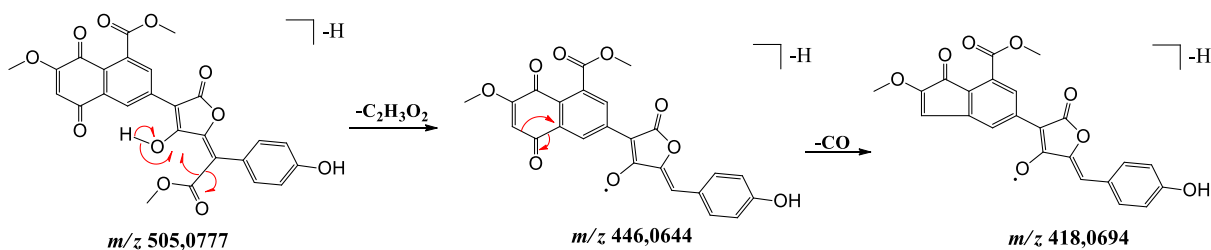


Figura 47. Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP2 (42).

O pico 17 ($t_r = 40,76$ min) apresentou um íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ de m/z 447,0720. O espectro íon produto (Figura 48) do pico apresentou os fragmentos m/z 388,0585 $[M-C_2H_3O_2-H]^-$ e m/z 227,0344 $[M-C_{11}H_8O_5-H]^-$, justificados pela perda de 59 e 220 Da da molécula. O fragmento m/z 375,0871 também é originado do íon *quasi*-molecular, através da perda de uma molécula de CO, seguida da perda de uma molécula de CO₂. Vale ressaltar que este padrão de fragmentação também foi observado para o derivado VI, mostrando a semelhança entre os compostos e auxiliando na elucidação estrutural. Observou-se ainda o fragmento m/z 360,0639, proveniente do fragmento m/z 388,0585 através da perda de outra molécula de CO (27,99546 Da). De acordo com a análise da fórmula molecular e do padrão de fragmentação, pode-se propor outra molécula inédita derivada do composto *o*-metil pulviquinona A, metil 2-(3-hidroxi-4-(6-metoxi-5,8-dioxo-5,8-dihidronaftalen-2-il)-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)-2-(4-hidrofenil) acetato, a qual recebeu o código D-OMP3 (43, Figura 48). A Figura 49 apresenta o mecanismo de fragmentação para este composto.

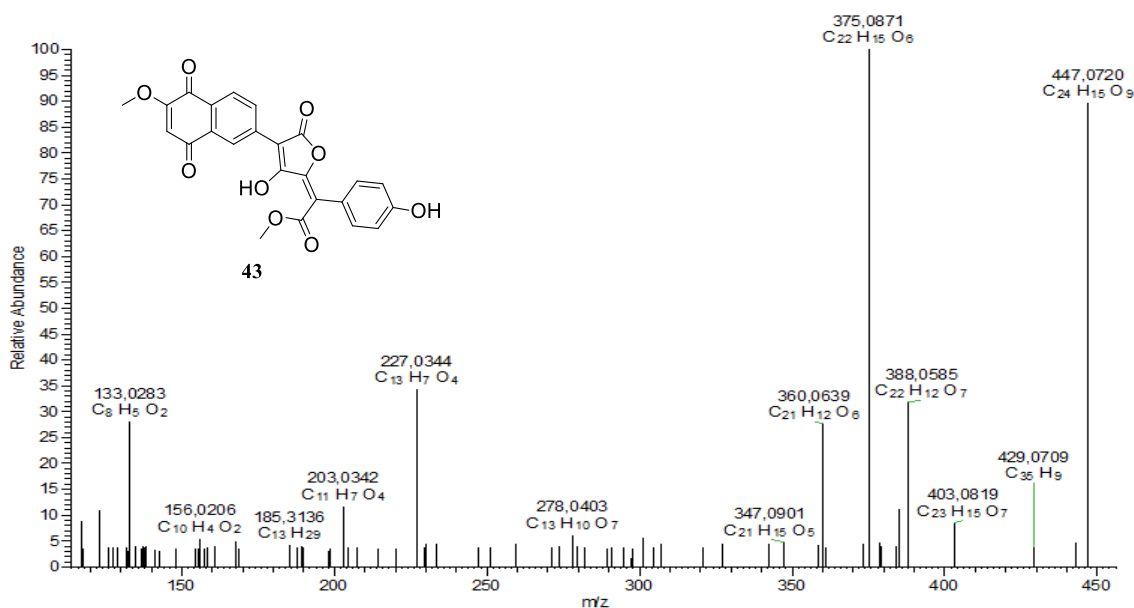
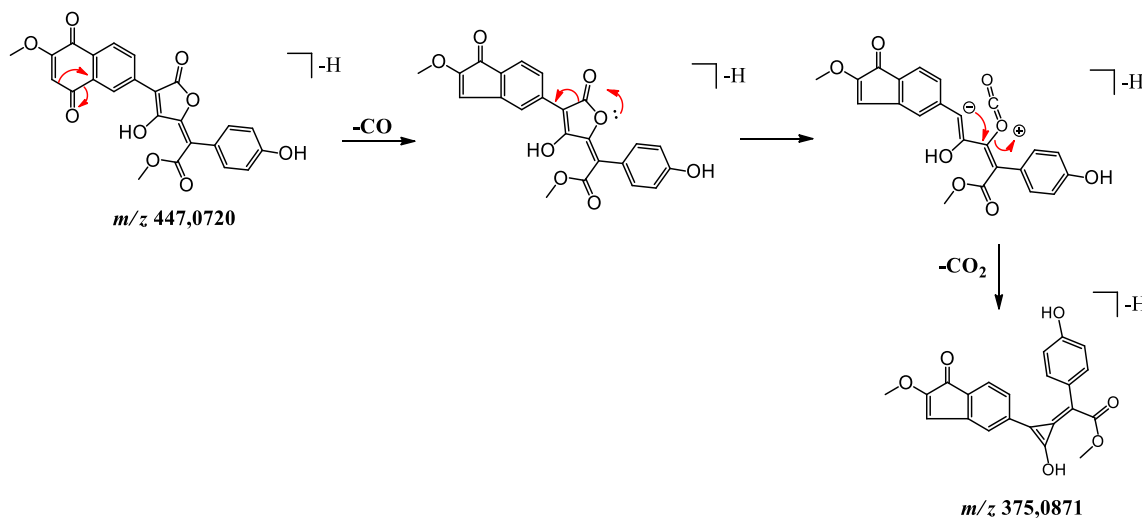
Figura 48. Espectro de íon produto e estrutura molecular do D-OMP3 (43).

Figura 49. Mecanismo de fragmentação proposto para D-OMP3 (43).



É importante notar que até o momento apenas os derivados naftalenóides do ácido pulvínico foram relatados para *P. tinctorius*, sendo os compostos responsáveis pela pigmentação do fungo. Porém, através da análise de desreplicação do extrato do fungo pela técnica de CLAE-EM/EM foi possível identificar a presença de derivados mais simples do ácido pulvínico (ácido xerocômico, ácido atromêntico, xerocomorubina e o-metil pulviquinona A) e ainda de compostos precursores na rota biossintética.

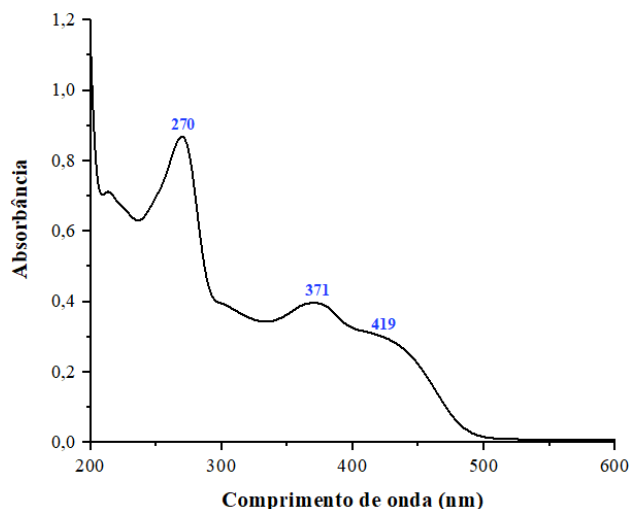
5.8 Isolamento de norbadiona A (31)

O fracionamento por exclusão de tamanho da fração H₂O-MeOH (42,1 mg), em Sephadex LH20, utilizando metanol como eluente, possibilitou o isolamento de norbadiona A (5,7 mg) como um sólido amarelo.

5.8.1 Identificação de norbadiona A (31)

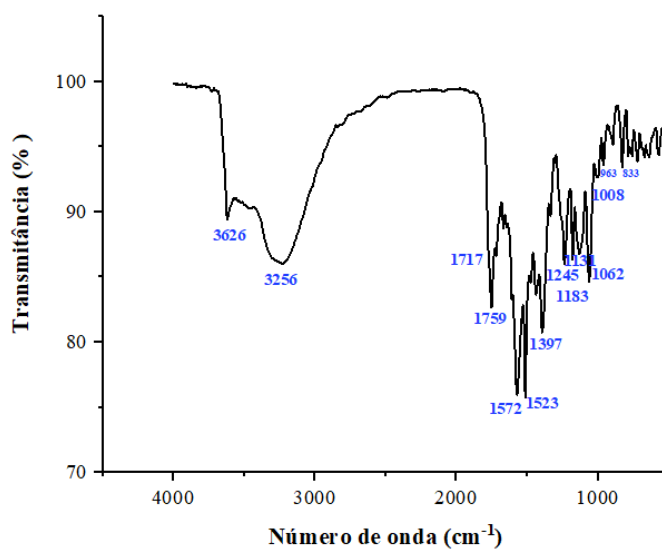
O espectro de absorção na região do UV-visível (Figura 50) de norbadiona A foi obtido em temperatura de 25°C, utilizando acetonitrila como solvente. Foi possível observar bandas em 270, 371 e 419 nm. Bandas muito próximas a estas, em 268, 368 e 416 nm, foram observadas para o mesmo composto (GILL; LALLY, 1985).

Figura 50. Espectro de absorção na região UV-visível de norbadiona A (31).



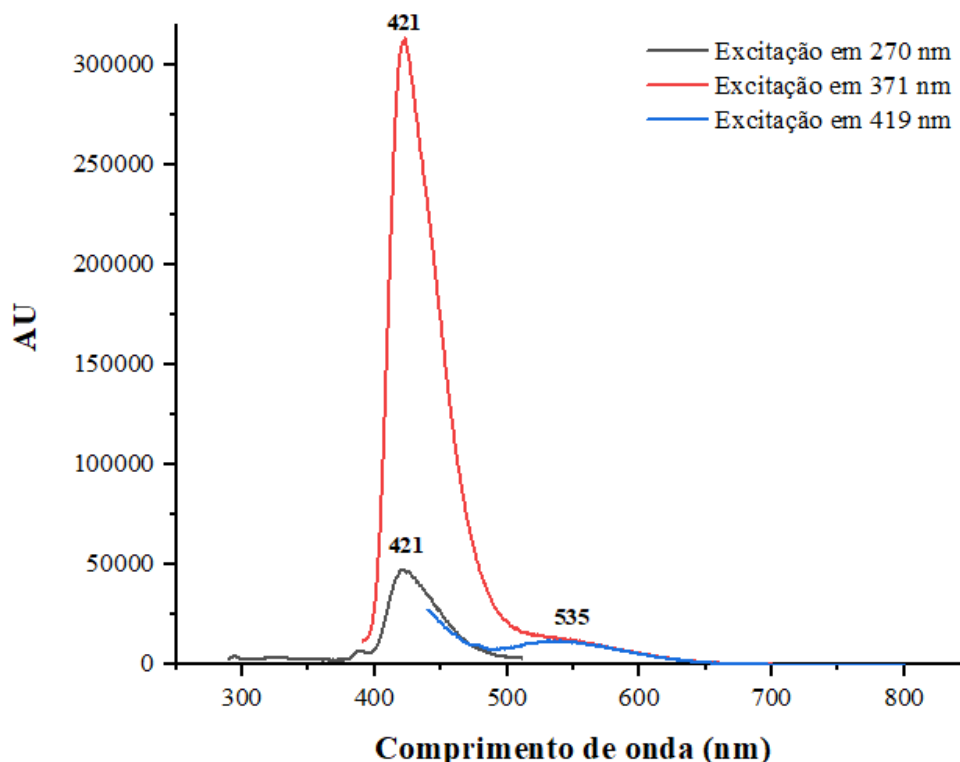
O espectro de absorção da região do infravermelho (Figura 51) apresentou uma banda intensa e larga em 3256 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação O–H (ν_{OH}) de ácido carboxílico. Já a banda em 3626 cm^{-1} pode indicar estiramento O–H (ν_{OH}) de fenol. Também foi possível observar uma banda de intensidade média em 1759 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída a estiramento C=O ($\nu_{\text{C=O}}$), juntamente com as duas bandas observadas em 1183 e 1131 cm^{-1} , indicando o estiramento C–O ($\nu_{\text{C-O}}$). Três bandas intensas em 1572 , 1523 e 1397 cm^{-1} indicam a presença de estiramento C=C ($\nu_{\text{C=C}}$) de aromáticos. A banda em 1717 cm^{-1} é característica de estiramento C=O de ácido carboxílico ($\nu_{\text{C=O}}$) e a banda de intensidade média em 1245 cm^{-1} é gerada pelo estiramento C–O($\nu_{\text{C-O}}$).

Figura 51. Espectro de absorção na região do infravermelho de norbadiona A (31).



O espectro de emissão de norbadiona A (Figura 52) confirmou o padrão de fluorescência da molécula. É interessante notar que tanto a excitação em 270 nm quanto em 371 nm originaram uma banda de emissão em 421 nm, sendo a última mais intensa. Já a excitação em 419 nm, originou uma banda de emissão em 535 nm, menos intensa que as demais.

Figura 52.Espectro de emissão de norbadiona A (31).



O espectro de massas da norbadiona A (Figura 53) mostra o pico do íon *quasi*-molecular $[M-H]^-$ em m/z 677,0573, compatível com a fórmula molecular $C_{35}H_{18}O_{15}$. É possível observar os fragmentos m/z 659,0469 $[M-H_2O-H]^-$ e m/z 633,0673 $[M-CO_2-H]^-$, justificados pela perda de 18 e 44 Da da molécula. Já os fragmentos m/z 615,0568 e m/z 589,0778 são originados do fragmento m/z 633,0673 pela perda de uma molécula de H_2O (18,0105 Da) e uma molécula de CO_2 (43,9899 Da), respectivamente. Ainda foi possível observar os fragmentos m/z 561,0824 e m/z 427,0461, formados pelo fragmento m/z 589,077 através da perda de uma molécula de CO (27,9954 Da) e um grupo $C_9H_6O_3$ (162,0317 Da), respectivamente. A Figura 54 apresenta o mecanismo de fragmentação para a norbadiona A (31).

Figura 53. Espectro de Massas de Norbadiona A (31).

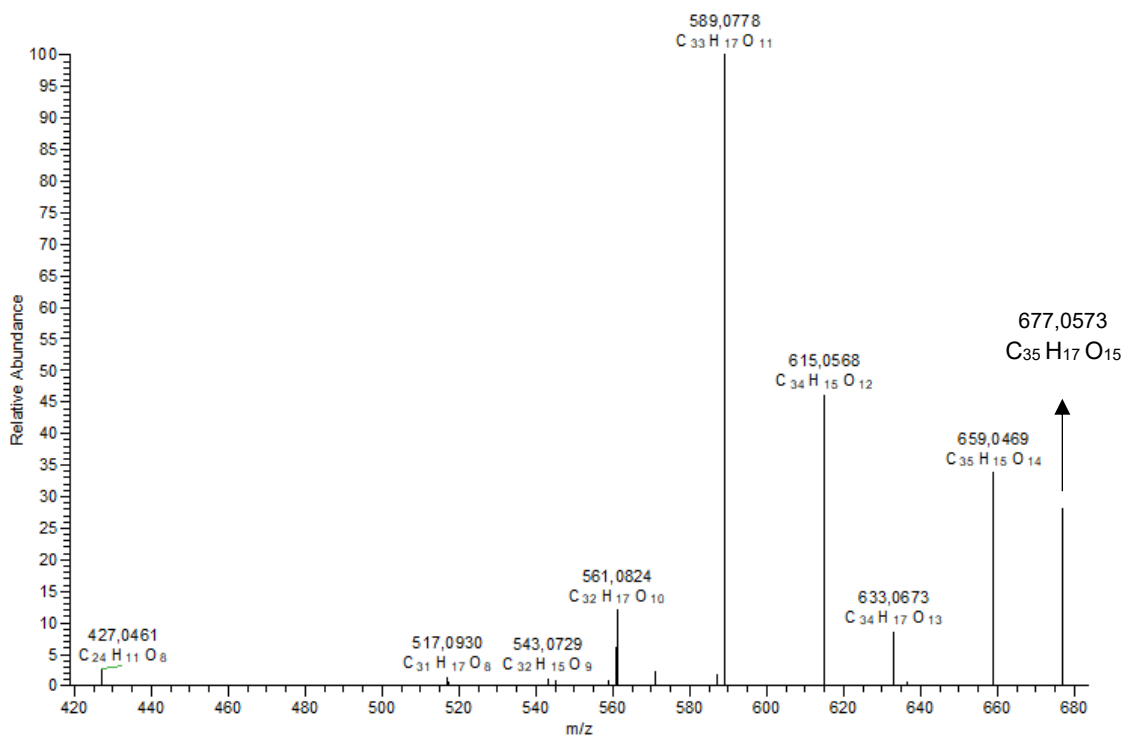
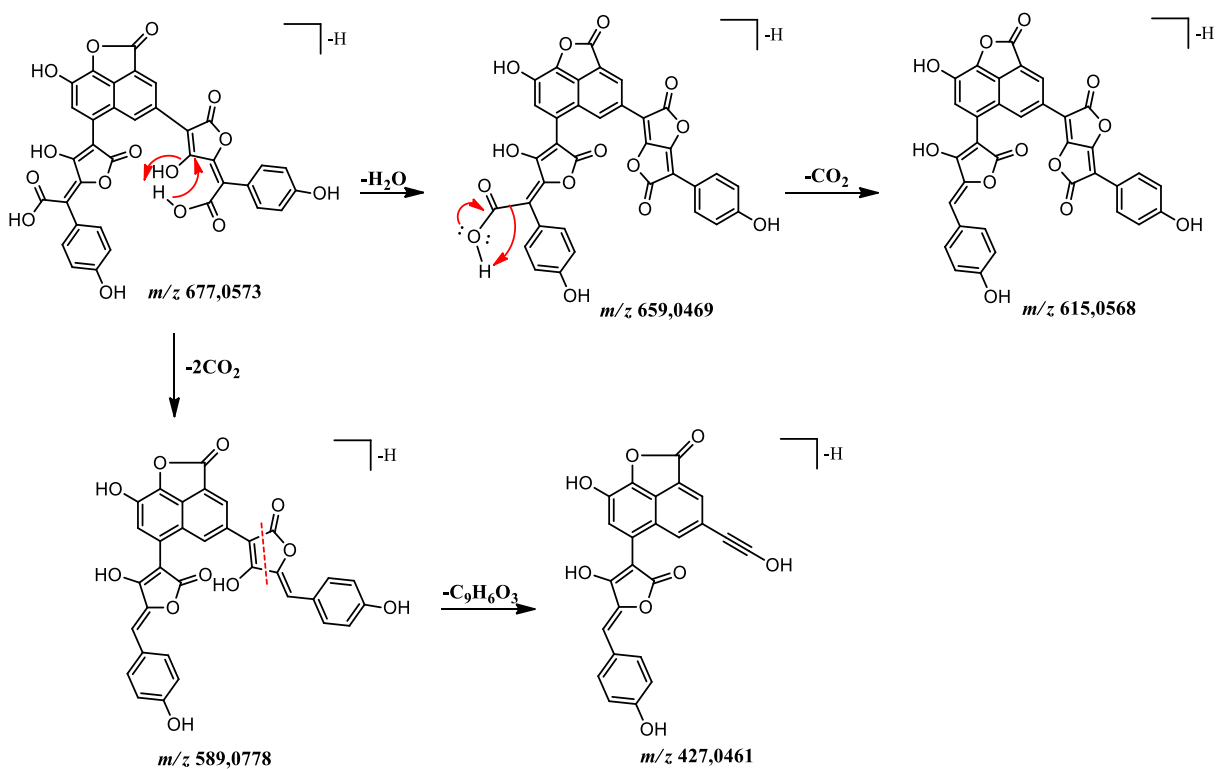


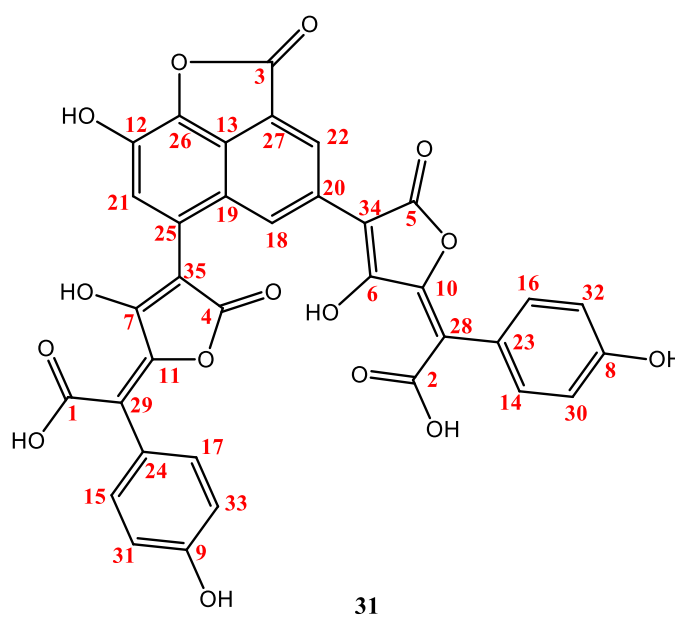
Figura 54. Mecanismo de fragmentação de norbadiona A (31).



A Figura 55 apresenta os resultados da análise de RMN ^1H . O espectro de RMN ^1H da norbadiona A mostrou a presença de hidrogênios de anel aromático *para*-substituído em δ 7,11 (*d*, $J = 8,5$, 2H), δ 7,07 (*d*, $J = 8,5$ Hz, 2H), δ 6,80 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H) e δ 6,78 (*d*, $J = 8,6$ Hz, 2H). Os sinais δ 8,95 (*s*, 1H), δ 8,86 (*s*, 1H) e δ 7,29 (*s*, 1H) foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos do anel naftalênico da molécula.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 55) da norbadiona A apresentou 28 sinais, sendo δ 170,70 e δ 170,50 associados às carbonilas do ácido carboxílico. Já os sinais em δ 170,26, δ 169,89 e δ 169,11 são referentes às três carbonilas de lactona da molécula. Os carbonos insaturados ligados à OH foram detectados em δ 156,23, δ 156,19 e δ 136,98. Os carbonos 10 e 11 (Figura 55), carbonos insaturados ligados à oxigênio, foram detectados em δ 152,56 e δ 152,30. Já os carbonos 34 e 35 (Figura 55) também são carbonos insaturados, mas ligados à carbonila do éster cíclico, sendo detectados em δ 97,36 e δ 97,31. Os carbonos dos anéis aromáticos *para*-substituídos foram associados aos sinais em δ 131,92, δ 131,19, δ 115,05 e δ 115,02. Já os sinais em δ 130,47, δ 129,72, δ 127,20, δ 125,99, δ 131,95, δ 120,39, δ 126,31 e δ 123,96 foram associados aos carbonos do anel naftalênico da molécula. Os carbonos insaturados ligados ao carbonila do ácido foram associados ao sinal em δ 118,93.

Figura 55. Espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C de norbadiona A (**31**) e marcações de acordo com a Tabela 2.



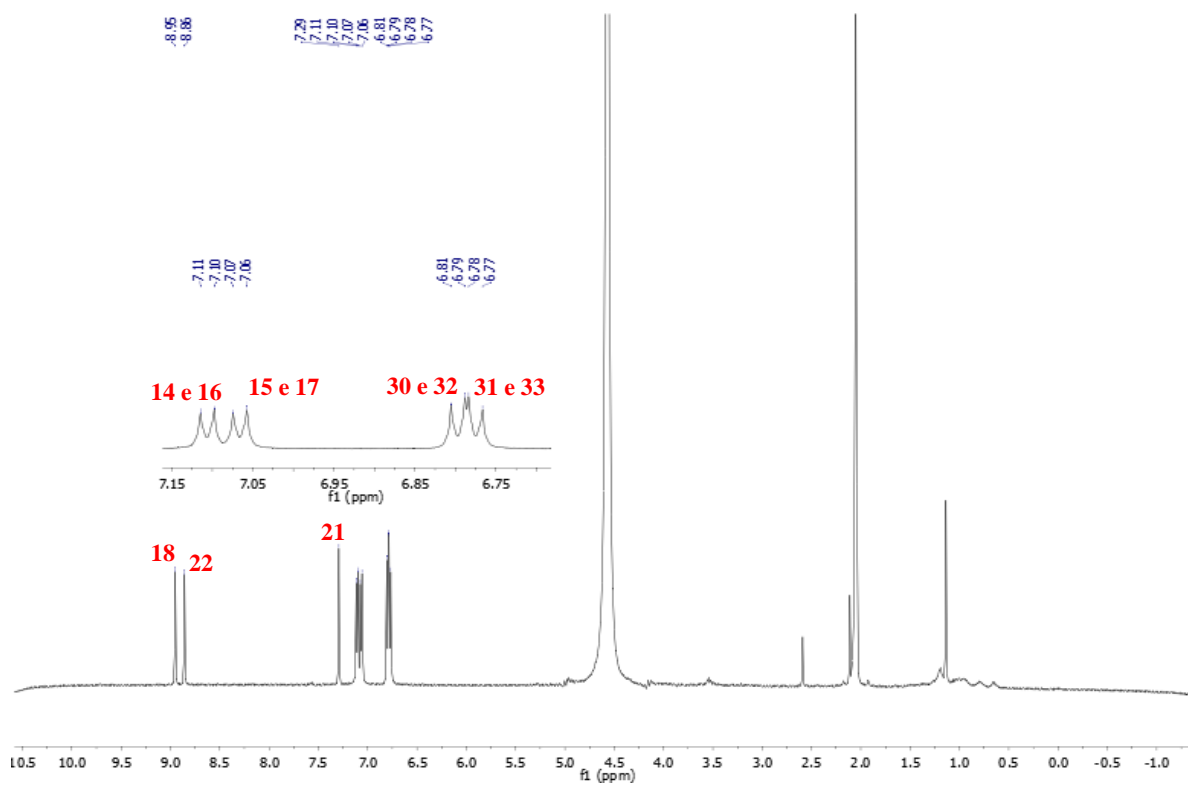
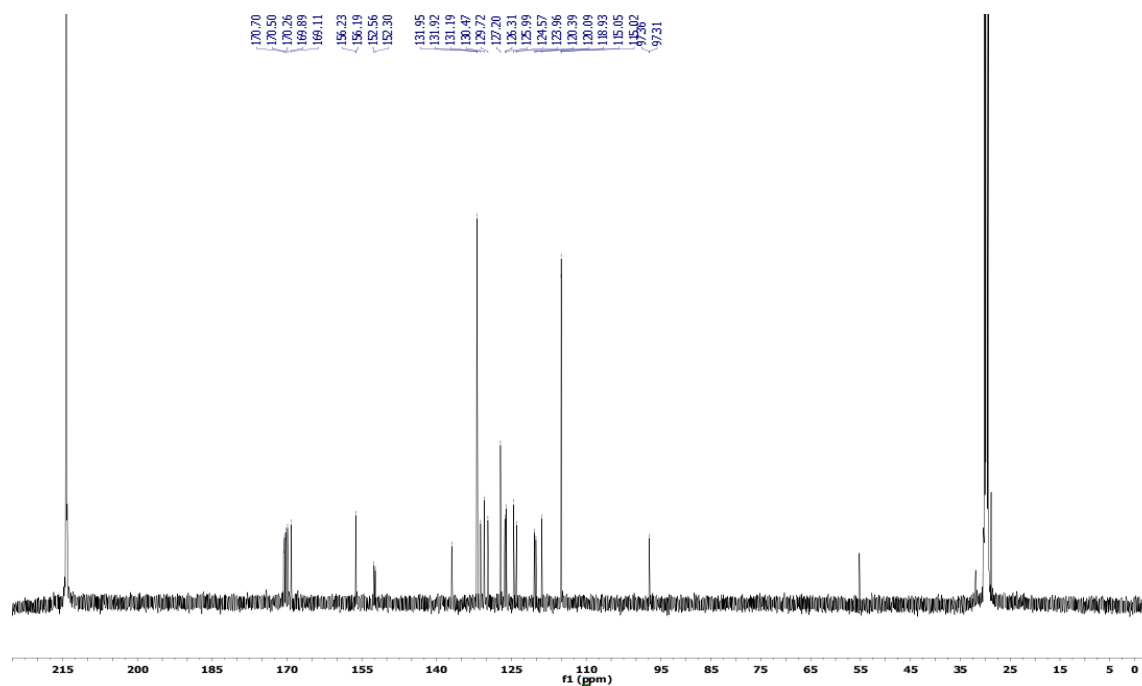
Espectro de RMN ^1H de norbadiona A (**31**)Espectro de RMN ^{13}C de norbadiona A (**31**)

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da norbadiona A (**31**).

	δ $^1\text{H}^a$	δ $^1\text{H}_{\text{lit}}^b$	δ $^{13}\text{C}^a$	δ $^{13}\text{C}_{\text{lit}}^b$
1			170,70	174,2
2			170,50	173,3
3			170,26	167,2
4			169,89	166,8
5			169,11	166,7
6			156,23	163,2
7			156,23	162,6
8 e 9			156,19	158,5
10			152,56	154
11			152,30	154,4
12			136,98	138,1
13			131,95	133,6
14 e 16	7,11 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)	7,37 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)	131,92	132,6
15 e 17	7,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H)	7,32 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)	131,19	132,6
18	8,95 (s, 1H)	9,08 (d, 1H)	130,47	131,9
19			129,72	131,0
20			127,20	129,3
21	7,29 (s, 1H)	7,56 (s, 1H)	126,31	126,6
22	8,86 (s, 1H)	8,92 (d, 1H)	125,99	126,6
23 e 24			124,57	124,8
25			123,96	124,3
26			120,39	123,8
27			120,09	120,5
28 e 29			118,93	118,6
30 e 32	6,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H)	6,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)	115,05	115,5
31 e 33	6,78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H)	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)	115,02	115,5
34			97,36	103,7
35			97,31	103,7

^aCD₃COCD₃/D₂O, 500 MHz^bCD₃COCD₃/D₂O, 99,55 MHz.

5.9 Análise de atividade antioxidante das frações H₂O-MeOH e MeOH

As frações H₂O-MeOH e MeOH foram submetidas a ensaio de atividade antioxidante (Item 4.11, Pág. 34), através do método do DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil). A molécula de DPPH é um radical livre estável devido à deslocalização de elétrons em toda sua estrutura molecular, a qual confere uma coloração violácea. O teste se baseia na capacidade da amostra em doar um átomo de H ao DPPH, que é convertido à hidrazina, mudando sua cor de violeta para amarela. Esta mudança é observada pela diminuição da banda de absorção do DPPH na faixa de 515 a 528 nm (SOUSA, 2012). A quantificação da atividade antioxidante é obtida a partir do cálculo da quantidade de amostra necessária para consumir 50% da concentração de DPPH inicial (IC₅₀).

Os resultados do ensaio mostraram que as frações H₂O-MeOH e MeOH são capazes de reagir com o DPPH, ou seja, têm capacidade antioxidante, apresentando IC₅₀ = 22 µg mL⁻¹ e 105 µg mL⁻¹, respectivamente. Os valores de IC₅₀ são moderados quando comparados aos controles positivos ácido ascórbico (IC₅₀ = 2,1 µg mL⁻¹) e Trolox (IC₅₀ = 3 µg mL⁻¹). Legouin *et al.* analisaram a atividade antioxidante pelo método do DPPH dos ácidos vulpínico e pinástrico, dois derivados do ácido pulvínico, encontrando os valores IC₅₀ = 55,0 µg mL⁻¹ e IC₅₀ = 80,0 µg mL⁻¹, respectivamente (LEGOUIN *et al.*, 2017). Com isto, pode-se inferir que a capacidade antioxidante das frações analisadas é próxima as de alguns derivados do ácido pulvínico relatados como substâncias antioxidante.

Além da análise de atividade antioxidante, é importante ressaltar que as duas frações também apresentaram estabilidade térmica. Estes dois resultados apontam um potencial uso das frações como aditivos em biodiesel, atuando na retardação dos processos oxidativos.

5.10 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) das frações H₂O-MeOH e MeOH

O teste de FPS indica quantitativamente a efetividade de uma formulação de protetor solar, podendo ser realizado *in vivo* ou *in vitro*. Os testes *in vivo*, apesar de apresentarem alta precisão, são dispendiosos e requerem um longo tempo de análise. Já os métodos *in vitro* geralmente são rápidos e baratos, além de evitar os problemas com a ética de testes em humanos e animais. A determinação do FPS *in vitro* é realizada através de medidas espectroscópicas das soluções amostra e uso da equação desenvolvida por Mansur *et al* (DUTRA *et al*, 2004).

As frações H₂O-MeOH e MeOH foram submetidas a teste de determinação de Fator de Proteção Solar (item 4.13, Pág. 35), apresentando valores de FPS 23,19 e 20,34,

respectivamente. Este resultado está de acordo com o FPS indicado para média proteção (LIONETTI; RIGANO, 2017). Além disto, o resultado de não citotoxicidade das frações em conjunto com o valor FPS evidencia o seu potencial para aplicação como agentes fotoprotetores em formulações cosméticas.

5.11 Análise de atividade citotóxica da fração H₂O-MeOH

O método do MTT é uma análise colorimétrica que se baseia na conversão do MTT em azul de formazan, através de enzimas presentes somente em células metabolicamente ativas. A fração H₂O-MeOH foi submetida a ensaio de citotoxicidade, mostrando-se não citotóxica, tanto para as células tumorais quanto para as células normais testadas (Anexo A). Este resultado implica que a fração não apresenta potencial antitumoral, porém confirma um grande potencial biotecnológico para uso em produtos de consumo humano, uma vez que não apresenta citotoxicidade em células normais.

6 CONCLUSÃO

As análises espectroscópicas (FTIR, UV-Vis, Fluorescência) e espectrométricas (CLAE-EM/EM) indicaram a presença dos compostos derivados do ácido pulvínico nas frações H₂O-MeOH e MeOH, apresentando sinais característicos desta classe de compostos. Ambas as frações apresentaram máximos de absorção nas regiões UVB e UVA, na faixa de 220 – 420 nm e os espectros de absorção na região do infravermelho mostraram sinais de ácido carboxílico, fenol e compostos aromáticos, corroborando com as estruturas moleculares dos derivados do ácido pulvínico. As frações apresentaram propriedades fluorescentes compatíveis com o esperado, devido à presença de pigmentos derivados do ácido pulvínico. Além disso, apresentaram elevada estabilidade térmica, com temperatura de degradação acima de 200°C.

Através da desreplicação das frações H₂O-MeOH e MeOH, foi possível propor a presença de 13 derivados do ácido pulvínico. Dentre eles a norbadiona A (**31**), pisoquinona (**33**) e bisnorbadioquinona A (**30**), chamados derivados naftalenóides, já foram relatados para *P. tinctorius*. Xerocomorubina (**19**), ácido atomêntico (**16**), *o*-metil pulviquinona A (**26**) e ácido xerocômico (**20**) foram relatados pela primeira vez na espécie, além dos novos derivados propostos (**38**, **39**, **40**, **41**, **42** e **43**). Além destes, outros compostos da mesma via biossintética foram tentativamente identificados (**36**, **44** e **45**) e um novo derivado do involutin foi proposto (**37**). Desta forma, a técnica CLAE-EM/EM, através da fragmentação de íons específicos, em conjunto com o estudo de redes moleculares, permitiu enriquecer o conhecimento acerca do perfil de derivados do ácido pulvínico no fungo, mostrando a presença dos derivados mais simples, antes não relatados para espécies de *Pisolithus*, e possibilitou a proposta de compostos inéditos. Além disso, a partir da fração H₂O-MeOH foi isolada a molécula norbadiona A, descrita como o principal pigmento produzido por *P. tinctorius*

Os testes de Fator de Proteção Solar (FPS), citotoxicidade e atividade antioxidante, além do fácil acesso ao fungo, mostram o grande potencial biotecnológico das duas frações, representando uma possibilidade de aplicação em produtos para consumo humano. As frações H₂O-MeOH e MeOH apresentaram atividade antioxidante, com IC₅₀ de 22 µg mL⁻¹ e 105 µg mL⁻¹ respectivamente, e fator FPS moderado, de 23,19 e 20,34. A fração H₂O-MeOH apresentou-se não citotóxica frente à linhagens de células normais, tornando-a ótima candidata para uso em cosméticos, promovendo cor e proteção solar.

REFERÊNCIAS

- 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, p. 96-102, 1996.
- ALBURAE, N. A.; MOHAMMED, A.; ALORFI, H. S.; TURKI, A. J.; ASFOUR, H. Z.; ALARIF, W. M.; ABDEL-LATEFF, A. Nidulantes of aspergillus (*Formerly emericella*): A treasure trove of chemical diversity and biological activities. **Metabolites**, v. 10, p. 1-28, 2020.
- ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A.. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 168-182, 2018.
- BELS, H.; BRESINSKY, A.; KILPERT, C.; MARSCHNER, W.; SCHMIDT, H.; STEGLICH, W.. Isolation and Synthesis of Methyl Bovinate, an Unusual Pulvinic Acid Derivative from *Suillus bovinus* (Basidiomycetes). **Z. Naturforsch.**, v. 63b, p. 887-893, 2008.
- CALDAS, L. A.; ZIED, D. C.; SARTORELLI, P.. Dereplication of extracts from nutraceutical mushrooms *Pleurotus* using molecular networking approach. **Food Chemistry**, v. 370, p.131019, 2022.
- CASQUEIRA, R. DE G.; SANTOS, S. F. Pigmentos inorgânicos: propriedades, métodos de síntese e aplicações. **Série Rochas e Minerais Industriais**, v. 12, p. 1-43, 2008.
- 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, p. 129-135, 2002.
- De SOUZA, A. M. **Diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *pisolithus* spp.** 2000. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2000.
- DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 367-524, 2016.
- DUDÁS, J.; FULLAR, A.; ROMANI, A.; PRITZ, C.; KOVALSZKY, I.; SCHARTINGER, V. H.; SPRINZL, G. M.; RIECHELMAN, H. Curcumin targets fibroblast-tumor cell interactions in oral squamous cell carcinoma. **Experimental Cell Research**, v. 319, p. 800-809, 2013.
- EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; LEWIS-SMITH, R. I. Non-destructive analysis of pigments and other organic compounds in lichens using Fourier-transform Raman spectroscopy: A study of Antarctic epilithic lichens. **Spectrochimica Acta - Part A**, v. 59, p. 2301-2309, 2003.
- SANTOS-SÁNCHEZ, F. N. SALAS-CORONADO R. HERNÁNDEZ-CARLOS, B.

VILLANUEVA-CANONGO, C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/anaga/Downloads/Shikimic_Acid_Pathway_in_Biosynthesis_of_Phenolic_.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2022.

GAO, H.; GUO, W.; WANG, Q.; ZHANG, L.; ZHU, M.; ZHU, T.; GU, Q.; WANG, W.; LI, D. Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, v. 23, p. 1776-1778, 2013.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **Natural product reports**, v. 32, p. 779-810, 2015.

GAYLORD, M. C.; BRADY, L. R. Comparison of pigments in carpophores and saprophytic cultures of *Paxillus panuoides* and *Paxillus atrotomentosus*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 1503-1508, 1971.

GILL, M.; KIEFEL, M. Pigments of Fungi. XXXVII. Pisoquinone, a New Naphthalenoid Pulvinic Acid From the Fungus *Pisolithus arhizus*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 1967-1977, 2010.

GILL, M.; LALLY, D. A. A naphthalenoid pulvinic acid derivative from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 24, 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, p. 225-236, 1986.

HANSON, J. R. Pigments and Odours of Fungi. **The Chemistry of Fungi**, v. 1, p. 1-204, 2008.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.

HUANG, Y.-T.; ONOSE, J.; ABE, N.; YOSHIKAWA, K. 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, p. 855-860, 2009.

KAHNER, L.; DASENBROCK, J.; SPITELLER, P.; STEGLICH, W.; MARUMOTO, R.; SPITELER, M. Polyene pigments from fruit-bodies of *Boletus laetissimus* and *B. rufo-aureus* (Basidiomycetes). **Phytochemistry**, v. 49, p. 1693-1697, 1998.

KNIGHT, D. W.; PATTENDEN, G. Synthesis of the pulvinic acid pigments of lichen and fungi. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 16, p. 660-661, 1976.

LEGOUIN, B.; DEVEHAT, F. L.; FERRON, S.; ROUNAUD, I.; POGAM, P. L.; CORNEVIN, L.; BERTRAND, M.; BOUSTIE, J. Specialized Metabolites of the Lichen

Vulpicida pinastri Act as Photoprotective Agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, p. 1-17, 2017.

LE ROUX, A.; JOSSET, E.; BENZINA, S.; NADAL, B.; MURR, M. D. E.; HEURTAUX, B.; TARAN, F.; DENIS, J. M.; GALL, T. L.; MEUNIER, S.; BISCHOFF, P. Evaluation of the Radioprotective Potential of the Polyphenol Norbadione A. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, p. 48-53, 2012.

LETCHER, R. M. Chemistry of lichen constituents-vii: mass spectra of some pulvinic acid derivatives. **Organic mass spectrometry**, v. 1, p. 805-817, 1968.

LIONETTI, N.; RIGANO, L. The new sunscreens among formulation strategy, stability issues, changing norms, safety and efficacy evaluations. **Cosmetics**, v. 4, p. 1-11, 2017.

MELO, M. J.; CLARO, A. Bright light: Microspectrofluorimetry for the characterization of lake pigments and dyes in works of art. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, p. 857-866, 2010.

MEUNIER, S.; MURR, M. D.; NOWACZYK, S.; GALL, T. L.; PIN, S.; RENAULT, J. P.; BOQUET, D.; CREMINON, C.; SAINT-AMAN, E.; VALLEIX, A.; TARAN, F.; MIOSKOWSKI, C. A powerful antiradiation compound revealed by a new high-throughput screening method. **ChemBioChem**, v. 4, p. 832-840, 2004.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, M. S.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W. T.; CRUSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, p. 828-837, 2016.

NGUYEN, K. H.; CHOLLET-KRUGLER, M.; GOUAULT, N.; TOMASI, S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 1490-1508, 2013.

PALACIOS-MORENO, J.; RUBIO, E.; QUILHOT, W.; CAVIERES, M. F.; DE LA PENA, E.; QUINONES, N. V.; DIAZ, H.; CARRION, F.; HENRIQUEZ-ROLDAN, C. F.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C. R. Epanorin, a lichen secondary metabolite, inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells. **Biological Research**, v. 52, p. 1-11, 2019.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Marine natural pigments: Chemistry, distribution and analysis. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 124-134, 2014.

POLTURAK, G.; AHARONI, A. "La Vie en Rose": Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. **Molecular Plant**, v. 11, p. 7-22, 2018.

RAO, A. A. N.; PRABHAKAR, M. C. Pharmacological actions of leprapinic acid, a lichen metabolite. **Fitoterapia**, v. 58, p. 221-228, 1987.

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.
- SHAMIM, G.; RANJAN, S. K.; PANDEY, D. M.; RAMANI, R. Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. **European Journal of Entomology**, v. 111, p. 149-164, 2014.
- SHARMA, T.; TYAGI, V.; BANSAL, M. Determination of sun protection factor of vegetable and fruit stracts using UV-visible spectroscopy: a green approach. **Sustainable chemistry and pharmacy**, v. 18, p. 100347, 2020.
- SINGH, P.; ANCHEL, M. Atromentic acid from *Clitocybe illudens*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3259-3262, 1971.
- STEFFAN, B.; STEGLICH, W. Pigments from the Cap Cuticle of the Bay Boletus (*Xerocomus badius*). **Angew. Chem. Int. Ed. Eng**, v. 23, p. 445-447, 1984.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748-755, 2005.
- AUMANN, D. C.; CLOOTH, G.; STEFFAN, B.; STEGLICH, W. Complexation of Cesium 137 by the Cap Pigments of the Bay Boletus (*Xerocomus badius*). **Angew. Chem. Int. Ed. Eng**, v. 28, p. 453-454, 1989.
- TAMAGAWA, K.; SHIMIZU, K.; EBINE, T.; MAITANI, Y.; FUKUI, T.; KAWAI, K.; TAKAHASHI, N. Antitumor efficacy in vitro and in vivo of falconensones, a new type of polyene. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3551-3558, 2001.
- TAUBER, J. P.; GALLEGOS-MONTERROSA, R.; KOVACS, A. T.; SHELEST, E.; HOFFMEISTER, D. Dissimilar pigment regulation in *Serpula lacrymans* and *Paxillus involutus* during inter-kingdom interactions. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, p. 65-77, 2018.
- UPADHYAY, R. K. Plant pigments as dietary anticancer agents. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 12, p. 93-107, 2018.
- VAROL, M. Photoprotective Properties of Natural Pulvinic Acid Derivatives toward Ultraviolet-Induced Damages. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 5, p. 319-330, 2018.
- VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. Pigments of higher fungi: A review. **Czech Journal of Food Sciences**. 2011.
- VIEWEG, L. REICHAU, S. SCHOBERT, R. LEADLAY, P. F. SUSSMUTHR. D. Recent advances in the field of bioactive tetronates Natural Product Reports. **Royal Society of Chemistry**, v. 29, p. 87-102, 2014.
- WINNER, M. GIMENEZ, A. SCHMIDT, H. SONTAG, B. STEFFAN, B. STEGLICH, W. Unusual pulvinic acid dimers from the common fungi *Scleroderma citrinum* (common earthball) and *Chalciporus piperatus* (peppery bolete). **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, p. 1883-1886, 2004.

WITTKOPP, P. J.; BELDADE, P. Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, p.65-71, 2009.

ZHOU, Z. Y.; LIU, J. K. Pigments of fungi (macromycetes). **Natural Product Reports**, v. 20, p. 615-639, 2003.

ANEXO A

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DA FRAÇÃO H₂O-MeOH

Laboratório responsável: Laboratório de Oncologia Experimental (LOE)

Pesquisadores responsáveis: 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)

MATERIAL

Células: foram utilizadas as linhagens tumorais humanas SNB-19 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HCT-116 (cólon), HL-60 (leucemia), L929 (fibroblasto murino não tumoral) e HACAT (queratinócito humano não-tumoral), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI1640, 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

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens SNB-19, PC-3, L-929 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL HCT-116, $0,3 \times 10^6$ 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 xL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após a dissolução do precipitado com 150 xL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os resultados da análise estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Citotoxicidade (CI₅₀) da amostra H₂O-MeOH em quatro linhagens tumorais e duas não tumorais. Os valores são apresentados em µg/mL e respectivos intervalos de confiança.

Amostra	HL-60	HCT-116	SNB-19	PC-3	L-929	HACAT
H ₂ O-MeOH	>25	>25	>25	>25	>25	>25

CONCLUSÃO

A amostra não apresentou citotoxicidade frente as linhagens testadas.

ANEXO B
CROMATOGRAMAS DE ÍONS PRODUTO

Figura A1. Cromatograma de íon produto de m/z 693,0530 na fração H₂O-MeOH.

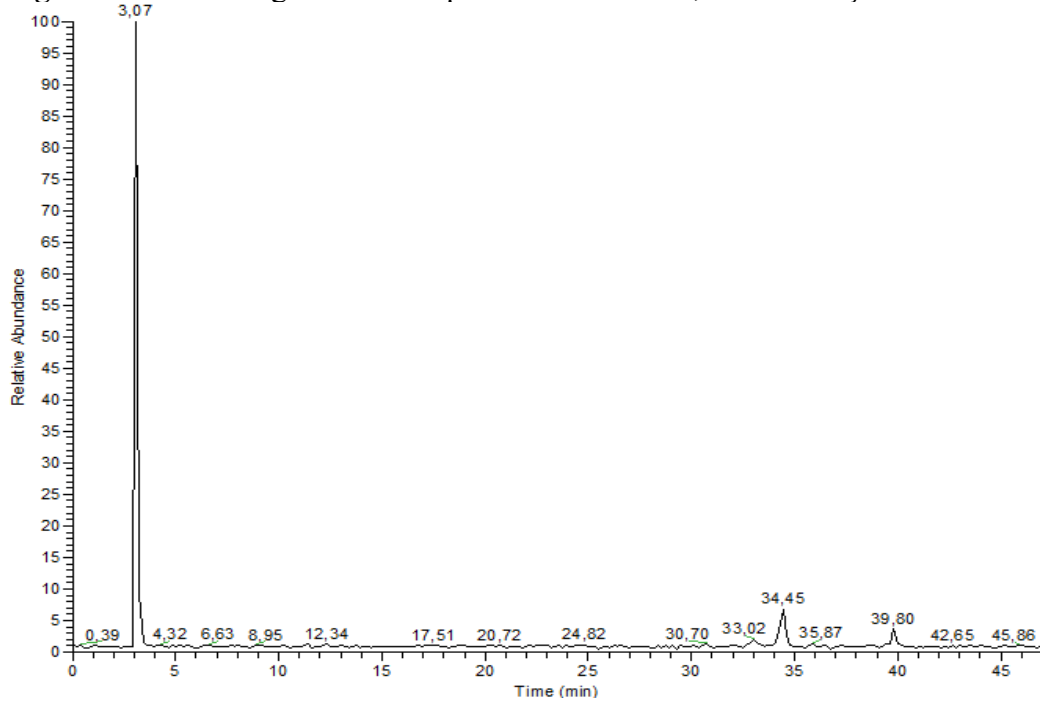


Figura A2. Cromatograma de íon produto de m/z 721,0831 na fração H₂O-MeOH.

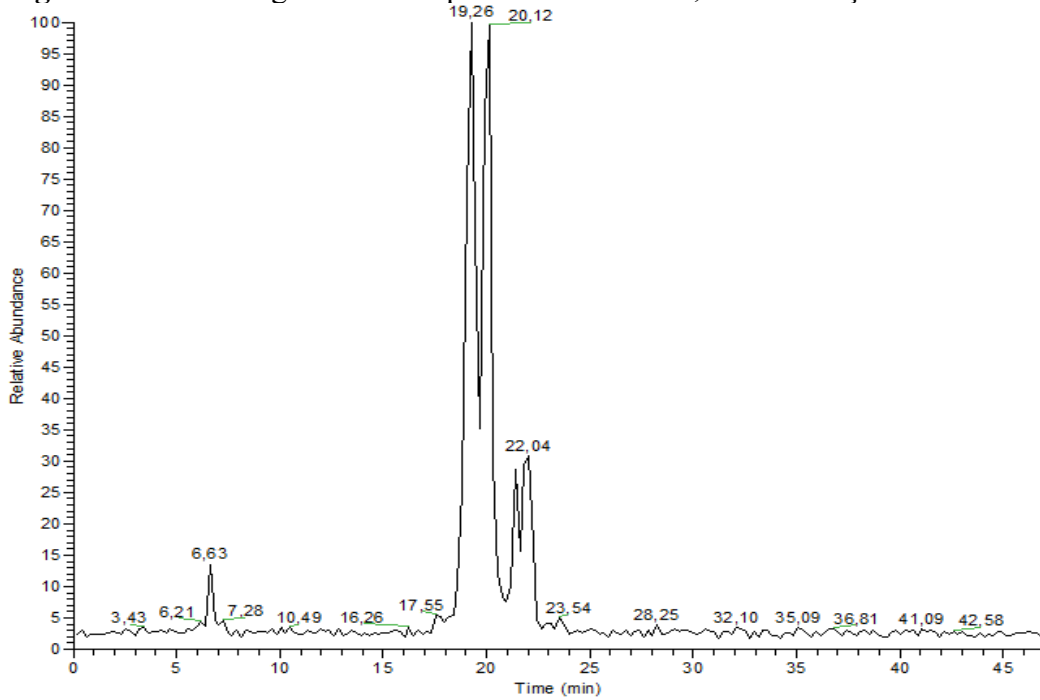


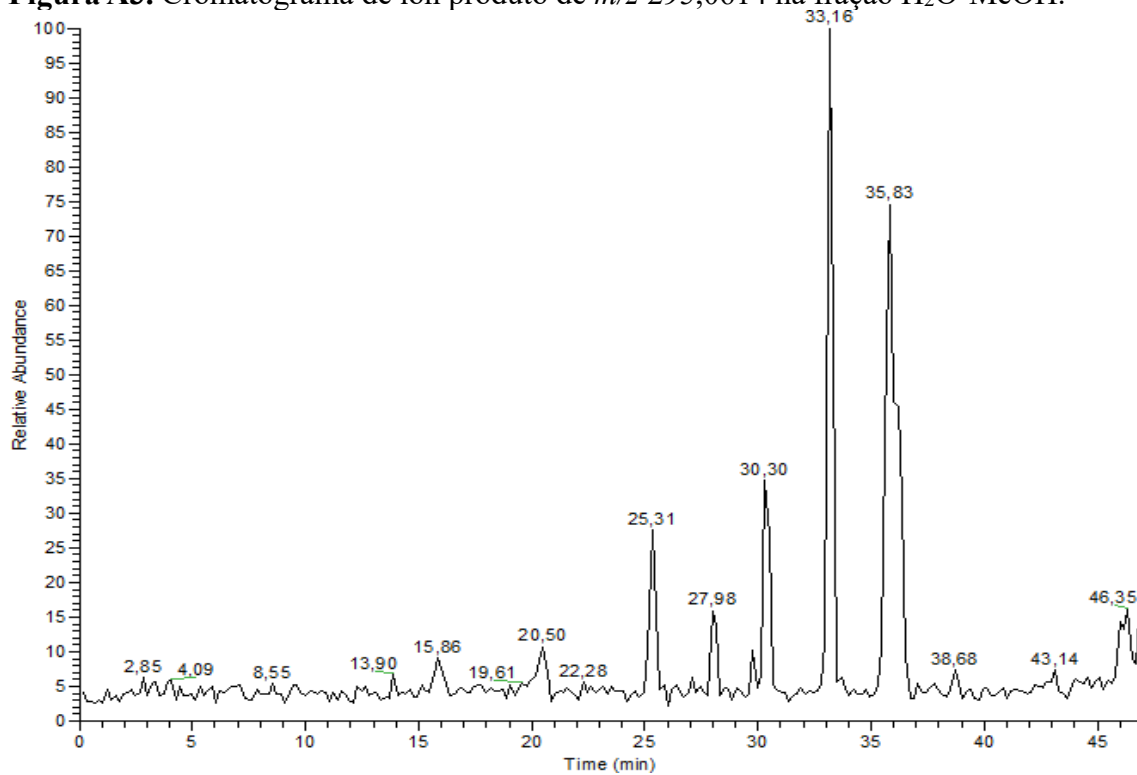
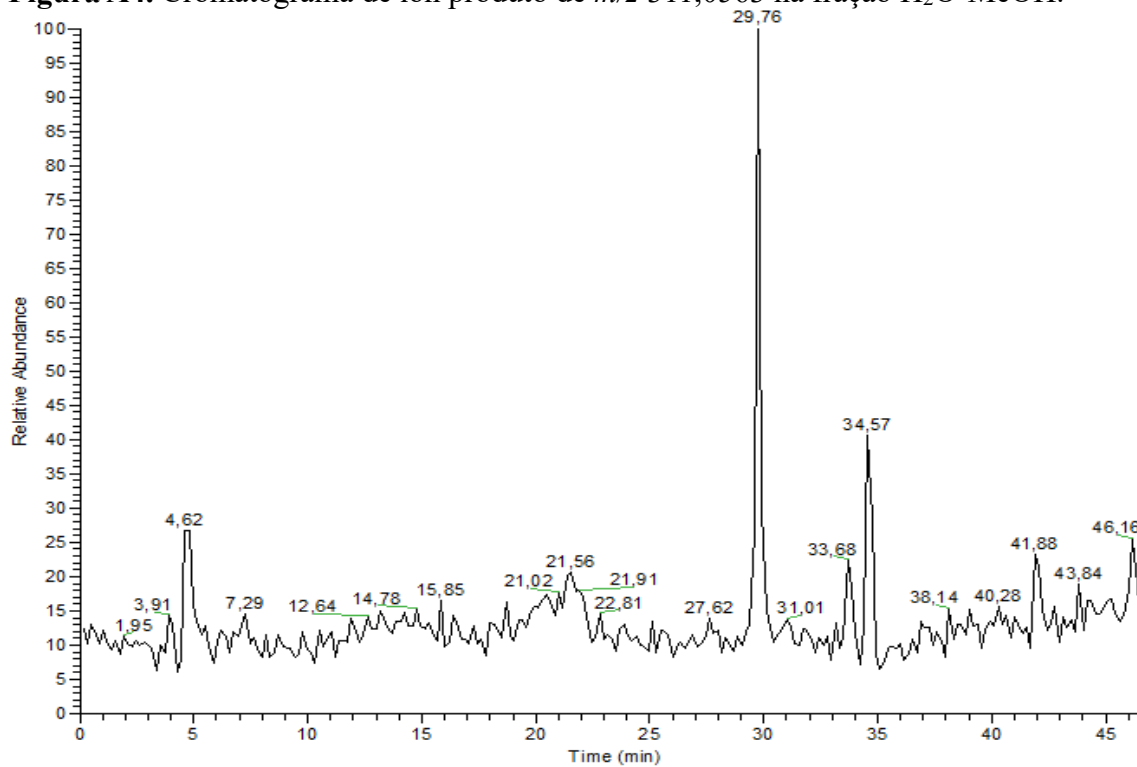
Figura A3. Cromatograma de íon produto de m/z 295,0614 na fração H₂O-MeOH.**Figura A4.** Cromatograma de íon produto de m/z 311,0563 na fração H₂O-MeOH.

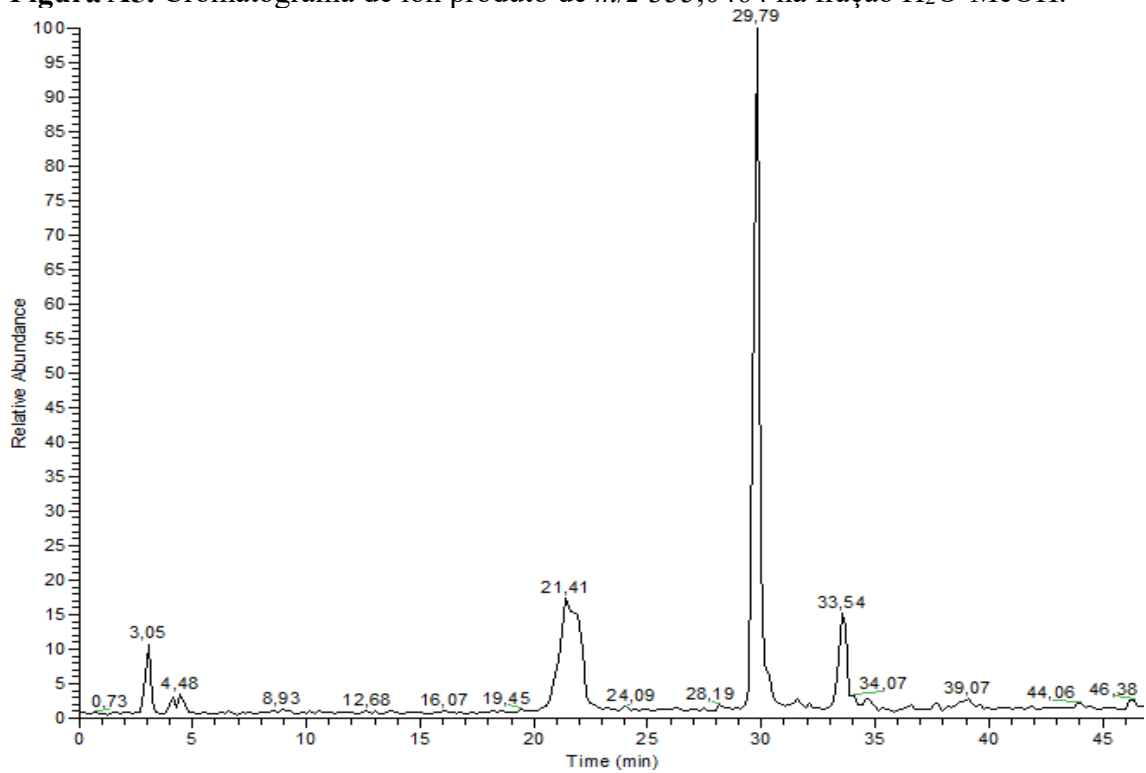
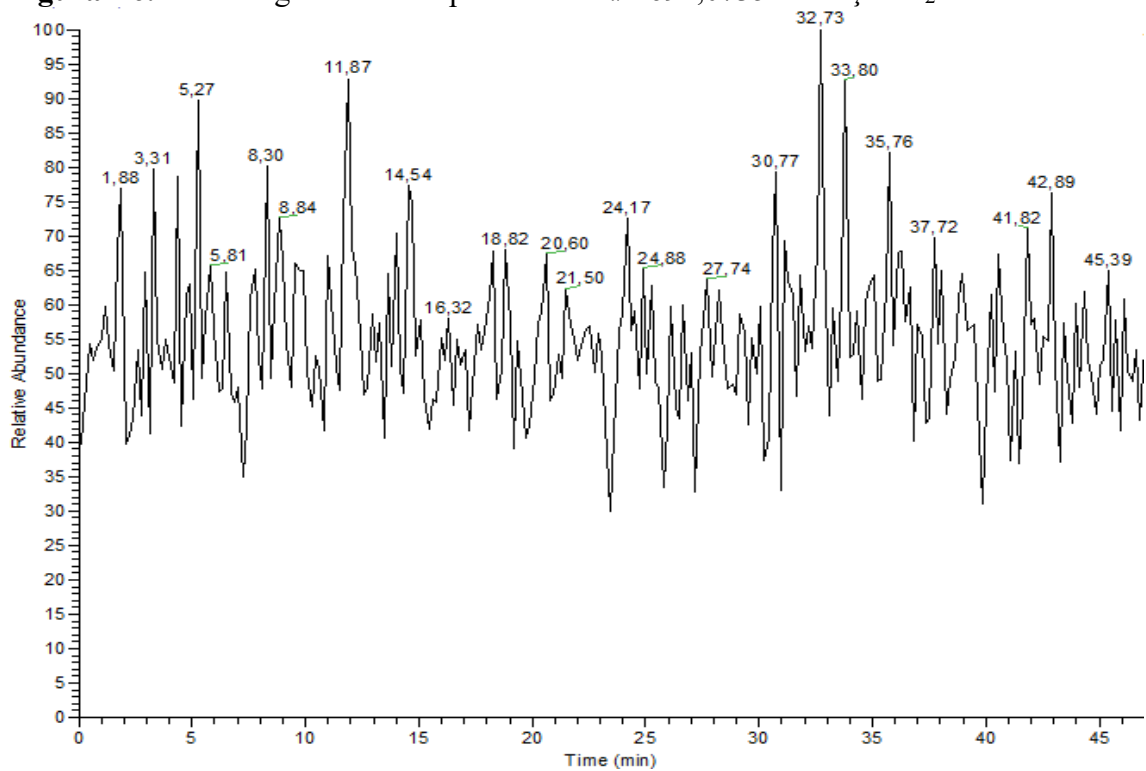
Figura A5. Cromatograma de íon produto de m/z 355,0464 na fração H₂O-MeOH.**Figura A6.** Cromatograma de íon produto de m/z 691,0735 na fração H₂O-MeOH.

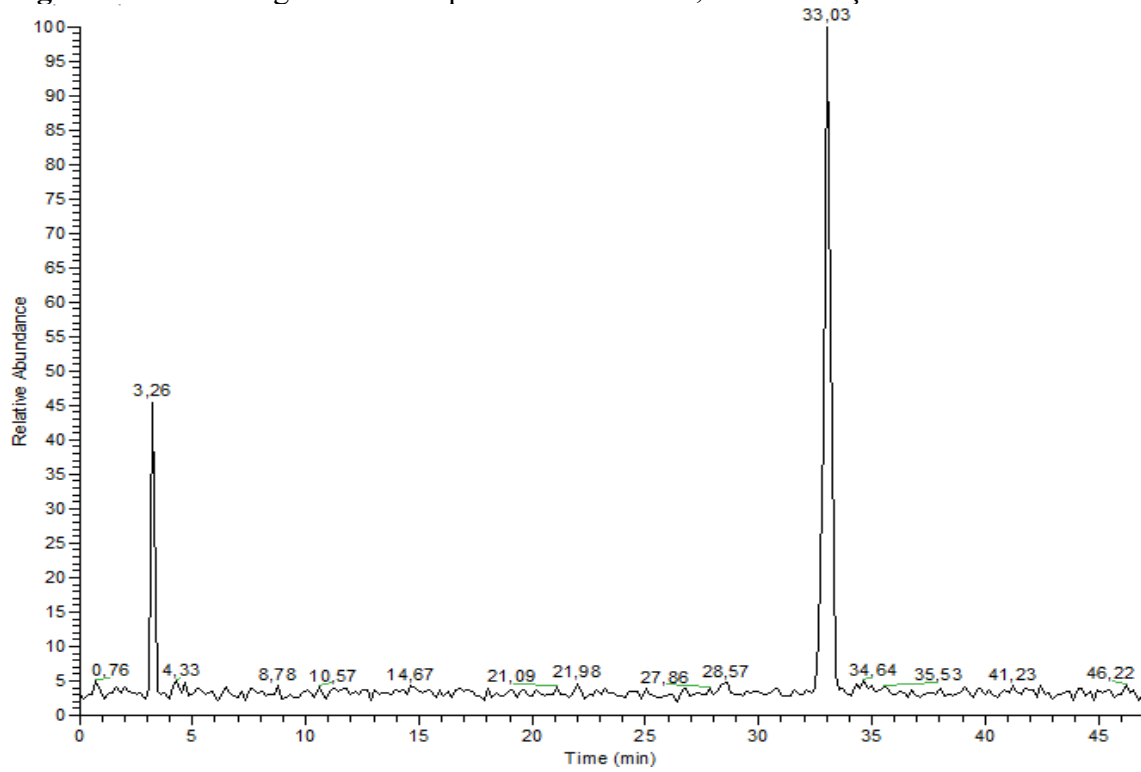
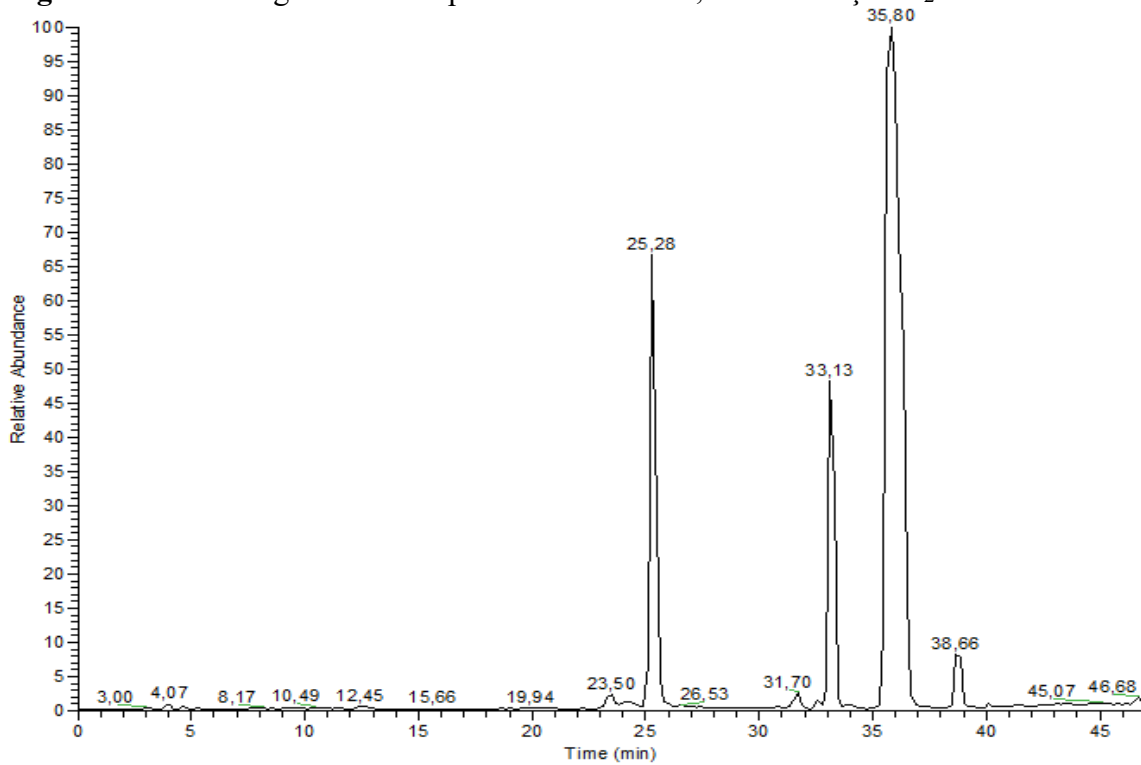
Figura A7. Cromatograma de íon produto de m/z 649,0634 na fração H₂O-MeOH.**Figura A8.** Cromatograma de íon produto de m/z 339,0513 na fração H₂O-MeOH.

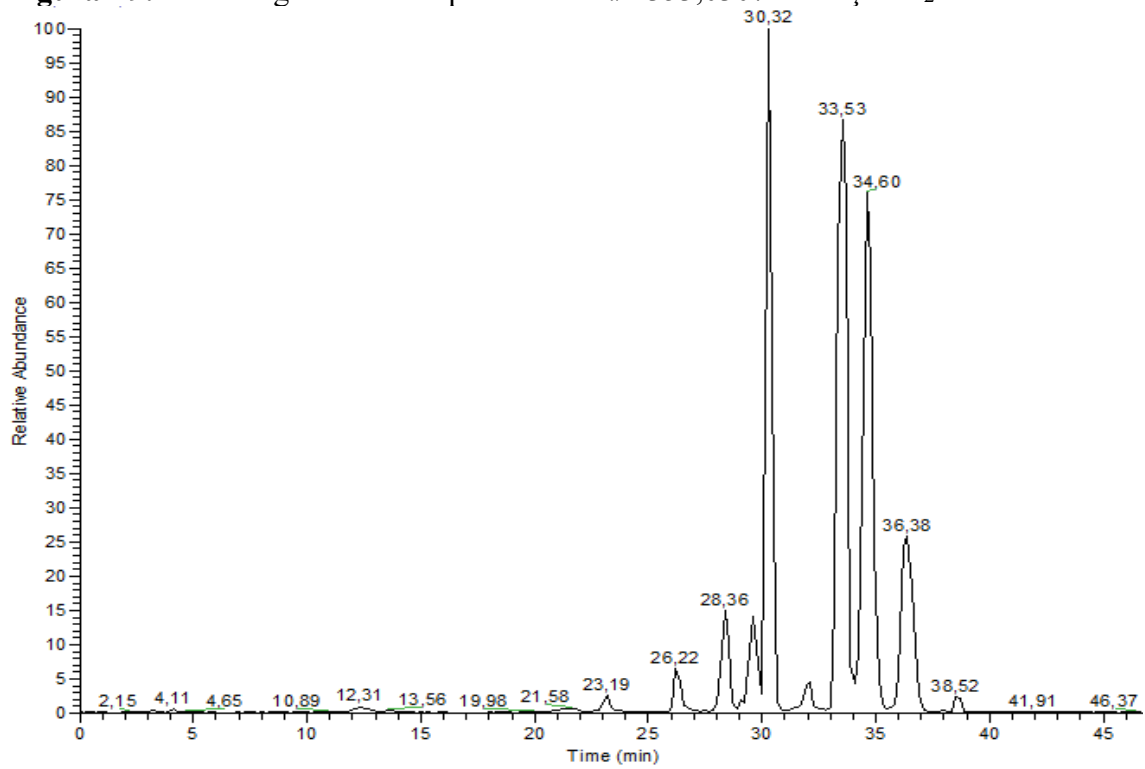
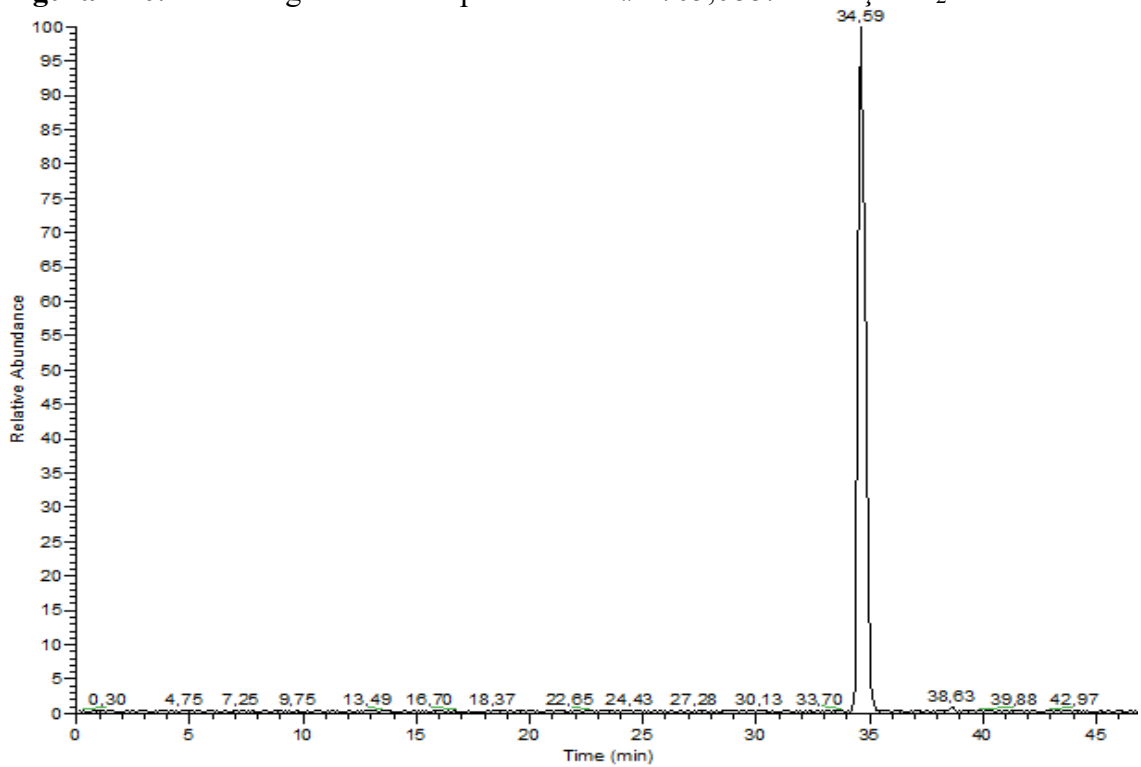
Figura A9. Cromatograma de íon produto de m/z 353,0307 na fração H₂O-MeOH.**Figura A10.** Cromatograma de íon produto de m/z 705,0887 na fração H₂O-MeOH.

Figura A11. Cromatograma de íon produto de m/z 677,0574 na fração H₂O-MeOH.

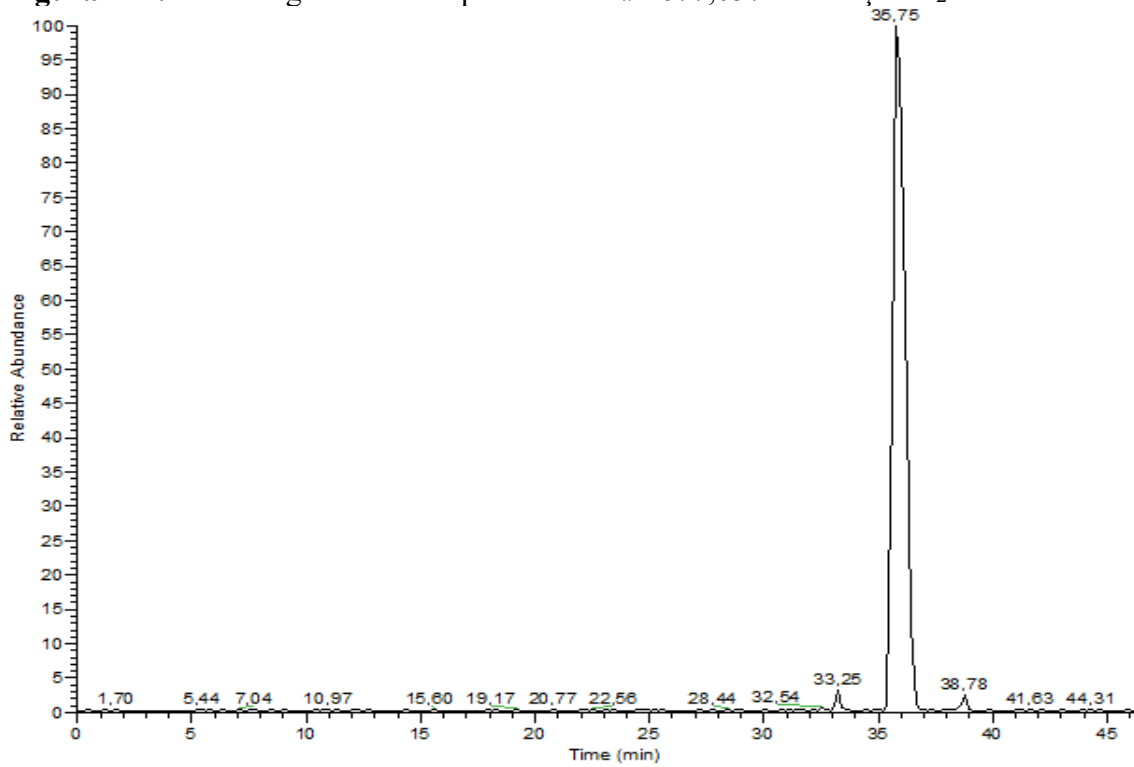


Figura A12. Cromatograma de íon produto de m/z 491,0619 na fração H₂O-MeOH.

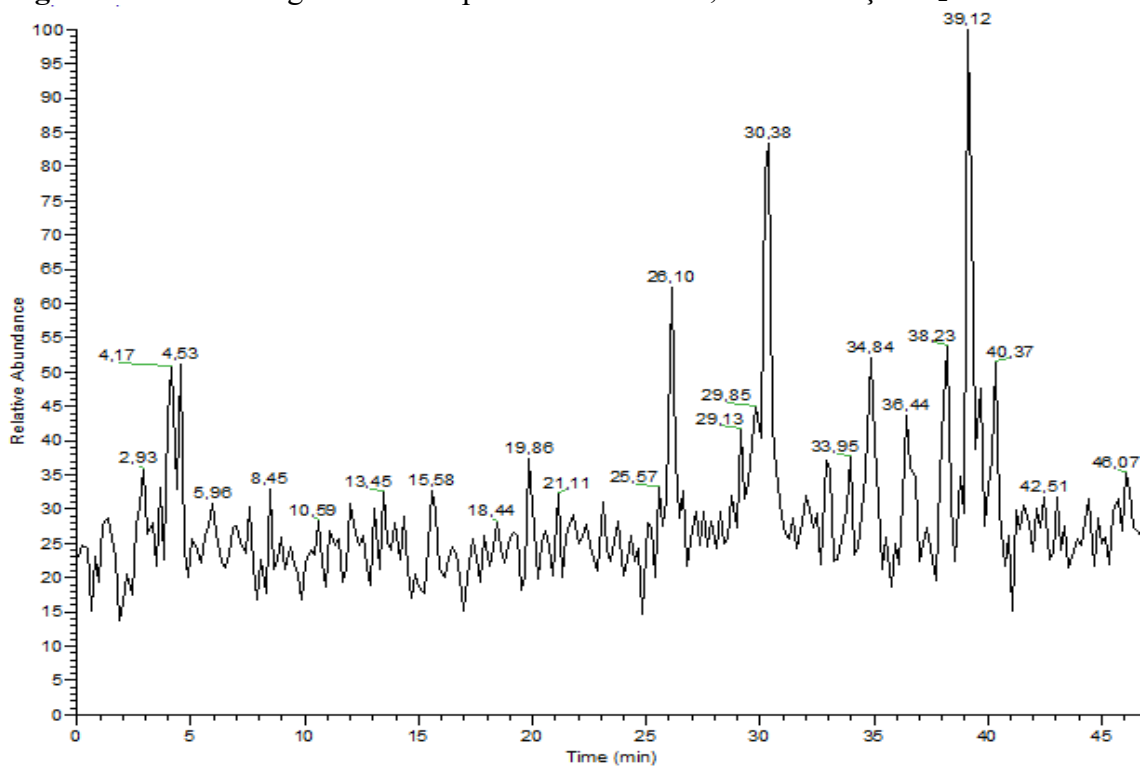


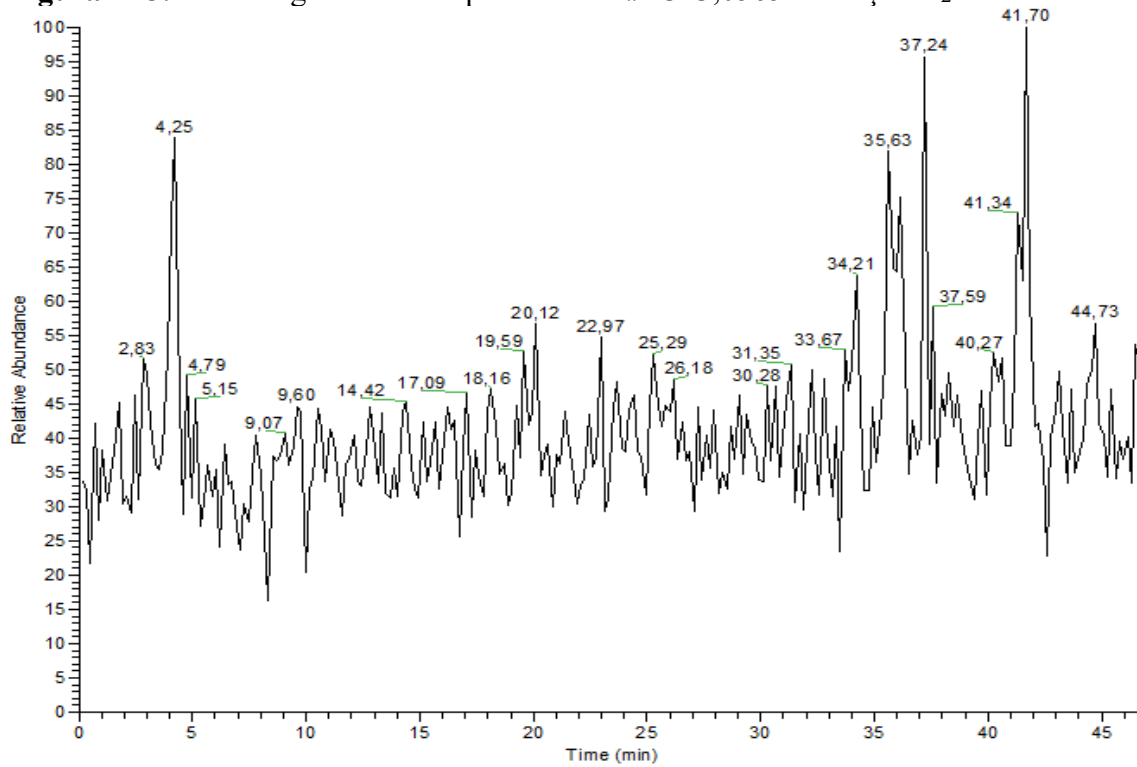
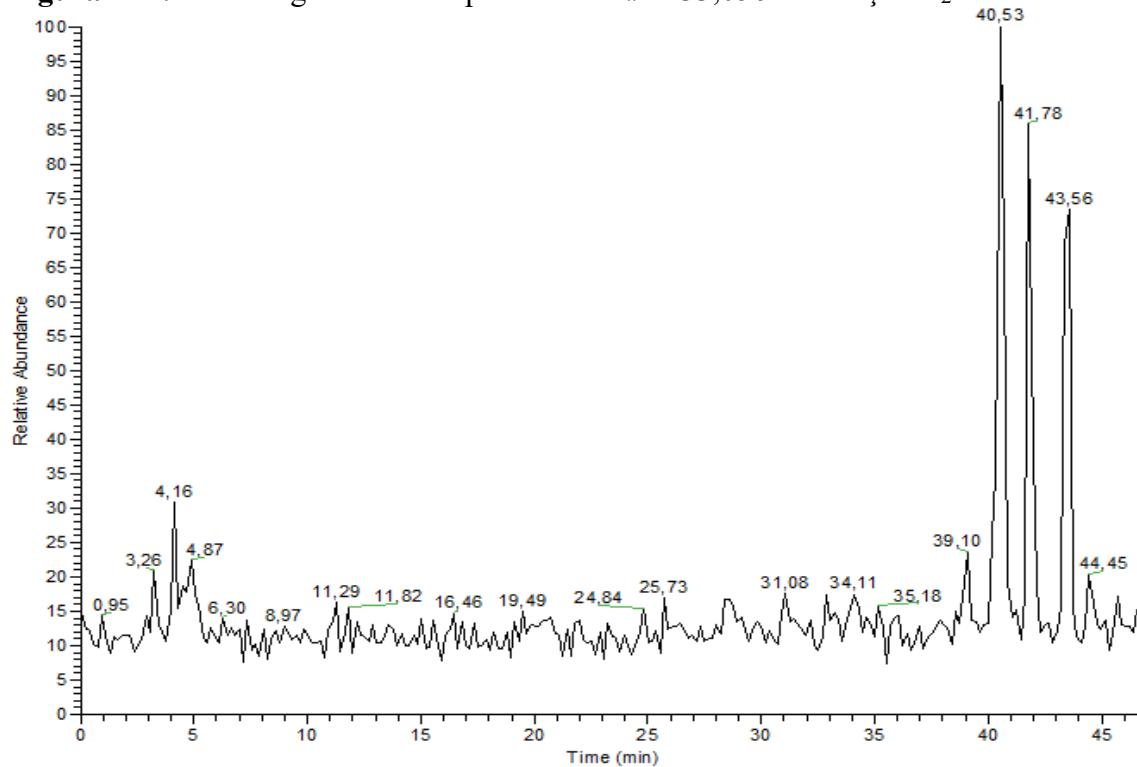
Figura A13. Cromatograma de íon produto de m/z 323,0565 na fração H₂O-MeOH.**Figura A14.** Cromatograma de íon produto de m/z 433,0562 na fração H₂O-MeOH.

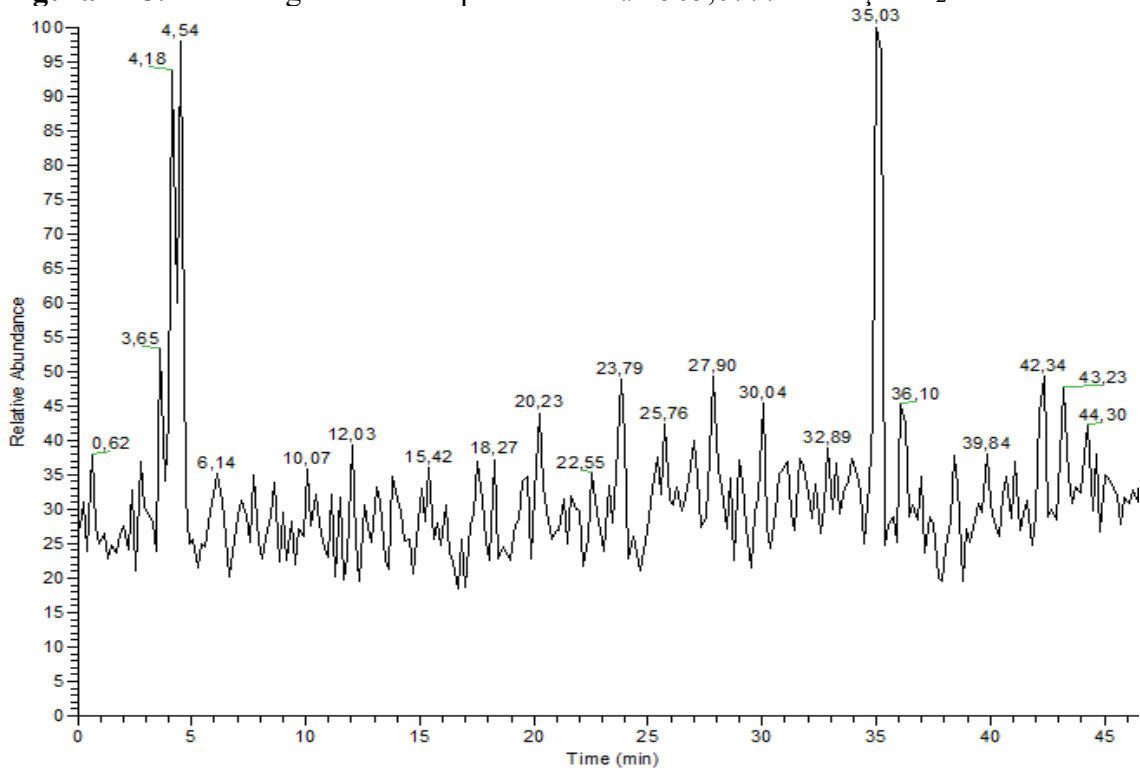
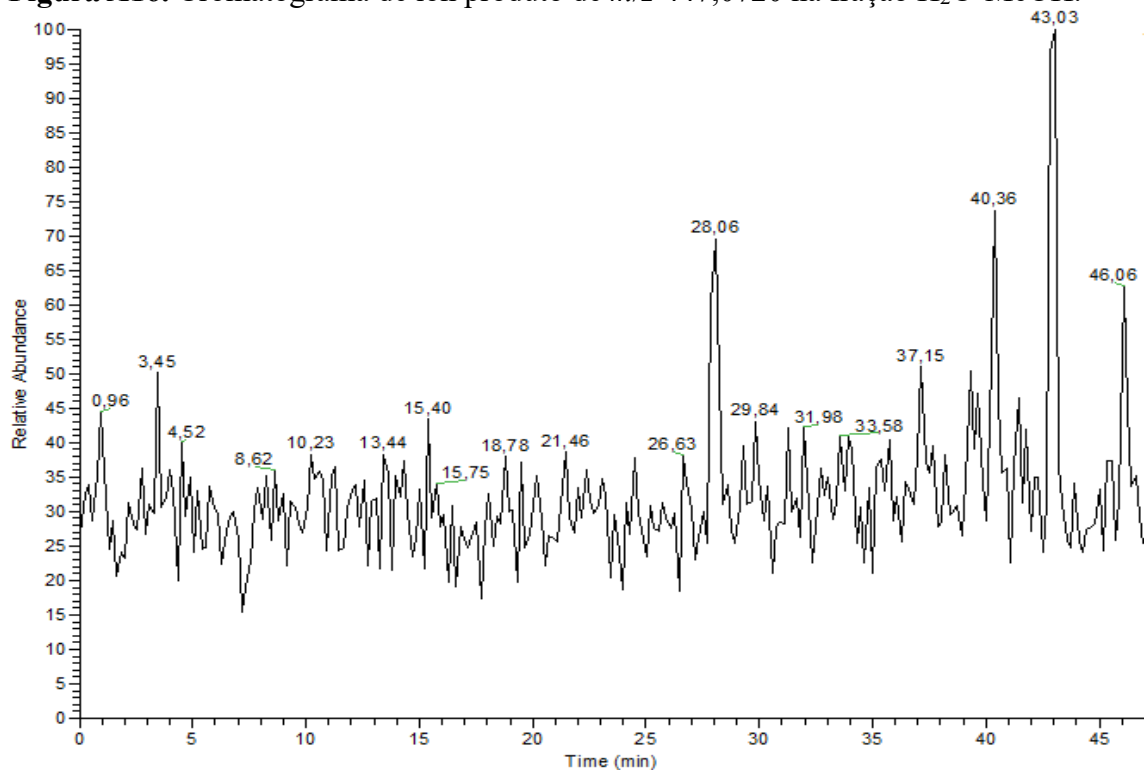
Figura A15. Cromatograma de íon produto de m/z 505,0777 na fração H₂O-MeOH.**Figura A16.** Cromatograma de íon produto de m/z 447,0720 na fração H₂O-MeOH.

Figura A 17. Cromatograma de íon produto de m/z 649,0634 na fração MeOH.

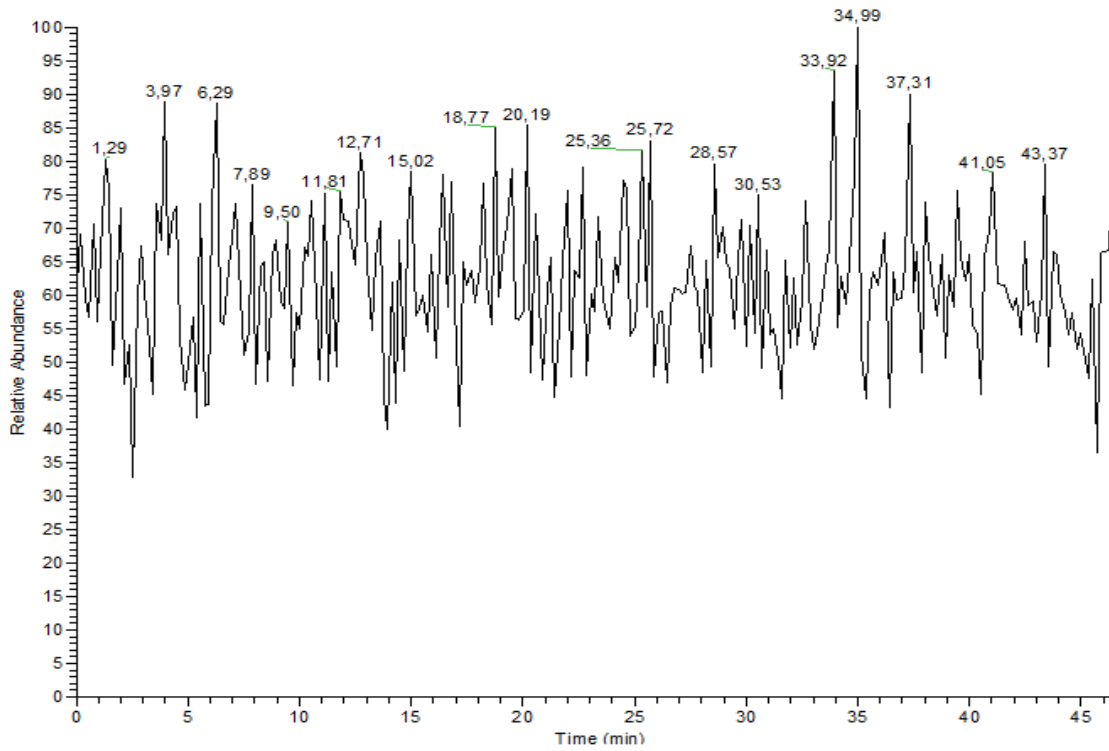


Figura A18. Cromatograma de íon produto de m/z 353,0307 na fração MeOH.

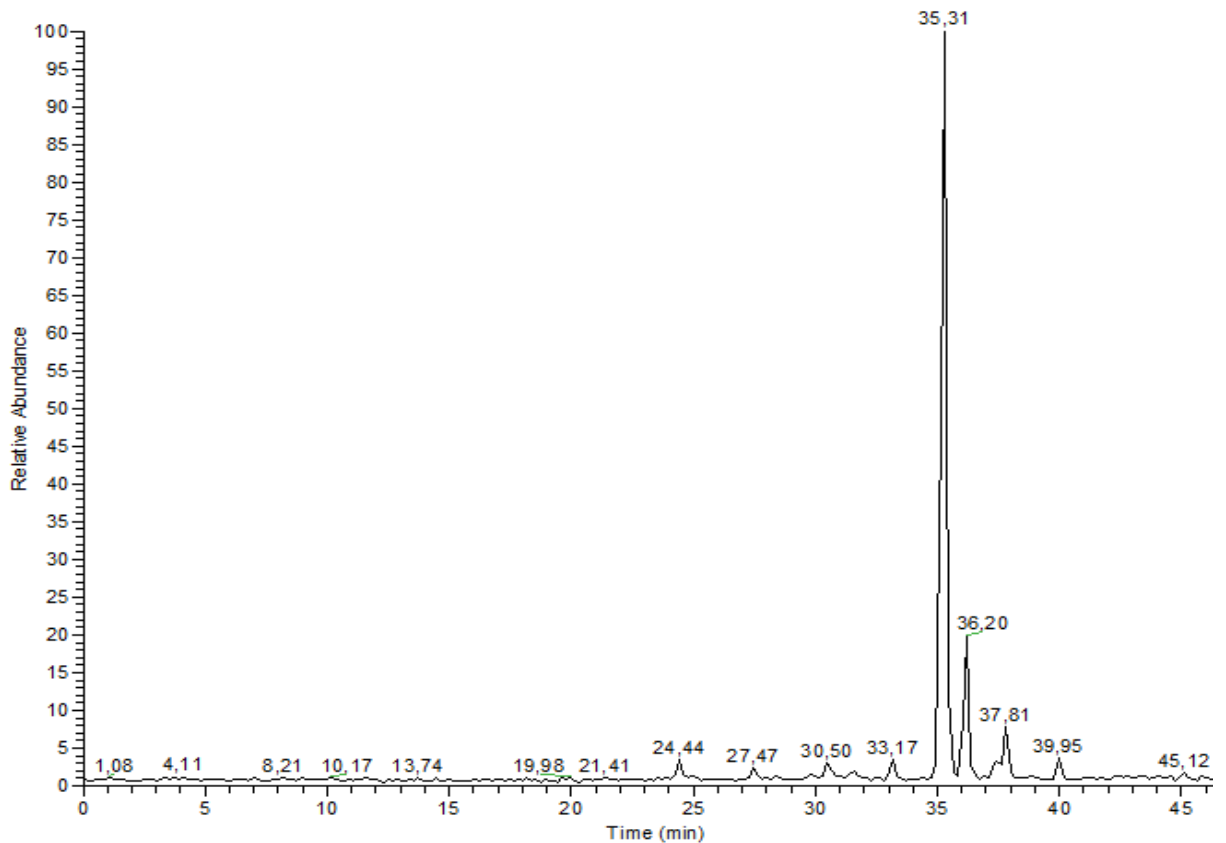


Figura A19. Cromatograma de íon produto de m/z 705,0887 na fração MeOH.

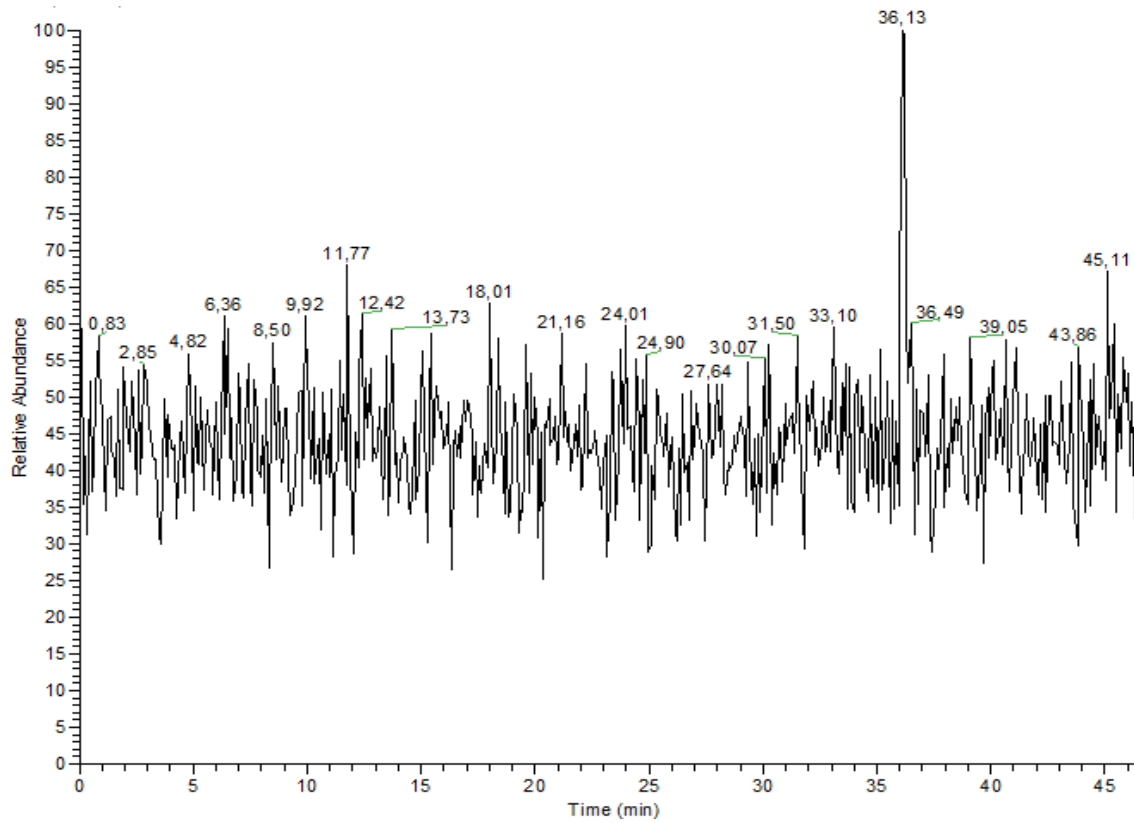


Figura A20. Cromatograma de íon produto de m/z 677,0574 na fração MeOH.

