UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JULIANO SLIVINSKI

Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelos basidiomicetos
Auricularia sp. e *Aurantiopileus mayanensis*

São Carlos
2018

Juliano Slivinski

Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelos basidiomicetos
Auricularia* sp. e *Aurantiopileus mayanensis

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da vida, saúde, família e amigos.

Aos meus pais José Estevão Slivinski e Isanir Ema Felsinger Slivinski pelos ensinamentos que levo para a vida, por todos os conselhos, amor e carinho.

Ao meu orientador Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck pela orientação, paciência e principalmente pela confiança depositada para a realização deste trabalho. Agradeço pela amizade, conselhos e por toda contribuição intelectual.

A todos os colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela amizade, sugestões e pela companhia. Principalmente às técnicas Dra. Fabiana Tessari Rodrigues e a Dra. Karin Bandeira de Camargo por todo auxílio no laboratório.

Aos meus amigos que conheci antes do mestrado e muitos que tive a oportunidade de conhecer em São Carlos, e que com certeza vou levar para toda a minha vida. Em especial agradeço a Laura, Mirelle, Vítor, Jairo, Julie, Karen, Everton, Ariane, Renata, Raquel, Juliana, Luciane, Darlon, Pedro, Jonathan, Misael, André e Lívia, por todos os conselhos, ensinamentos, alegrias, aventuras, viagens e pela amizade sincera.

Aos professores Dr. Elisandro Ricardo Dreshler-Santos e Dr. André Rodrigues pela identificação dos basidiomicetos, e aos amigos Michael Brandon Schroder Spano e Dr. Mário Santos pelo auxílio na coleta dos basidiomicetos.

Aos professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira e Dr. Tiago Venâncio pelas análises de RMN, e à CAQI – USP pela infraestrutura e pelas análises realizadas.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro (BIOTA-BIOprospecTA grant 2013/50228-8).

Enfim, agradeço à todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

*“A vida é para nós o que concebemos nela.
Para o rústico cujo campo próprio lhe é tudo,
esse campo é um império. Para o César cujo
império lhe ainda é pouco, esse império é um
campo. O pobre possui um império; o grande
possui um campo. Na verdade, não possuímos
mais que as nossas próprias sensações; nelas,
pois, que não no que elas vêem, temos que
fundamentar a realidade da nossa vida.”*

Fernando Pessoa

SLIVINSKI, Juliano. **Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelos basidiomicetos *Auricularia* sp. e *Aurantiopileus mayanensis***. 2018, 148 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

RESUMO

O presente trabalho relata o estudo dos basidiomicetos *Auricularia* sp. e *Aurantiopileus mayanensis*. Extratos obtidos do corpo de frutificação dos basidiomicetos foram avaliados por CLAE-UV-ELSD-MS para análise do perfil químico e em ensaios de atividade biológica. O extrato do basidiomiceto *Auricularia* sp. apresentou atividade leishmanicida e tripanossomicida enquanto o extrato do *A. mayanensis* apresentou atividade antibacteriana, citotóxica e de inibição do proteassomo. Os extratos foram fracionados por processos cromatográficos. A partir do extrato do basidiomiceto *Auricularia* sp. foi isolado o Metil 8-((4-hidroxifenil)amino)-8-oxooctanoato, composto inédito na literatura designado com o nome comum de éster metílico do ácido brotásico. Foram isolados o ergosterol, além de dez derivados dos ácidos anacárdicos, sendo o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 inédito na literatura, a partir do extrato do basidiomiceto *A. mayanensis*. Todos os compostos foram identificados por análises de seus dados espectrométricos e espectroscópicos.

Palavras-Chave: Basidiomicetos, *Auricularia* sp., *Aurantiopileus mayanensis*, ácidos anacárdicos.

SLIVINSKI, Juliano. **Isolation and identification of secondary metabolites from basidiomycetes *Auricularia* sp. and *Aurantiopileus mayanensis***. 2018, 148 p. Dissertation (Master in Biological and Organic Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

ABSTRACT

The present investigation reports the study of basidiomycetes *Auricularia* sp. and *Aurantiopileus mayanensis*. Extracts obtained from the fruiting bodies of basidiomycetes were analyzed by HPLC-UV-ELSD-MS and in biological activity assays. The extract of the basidiomycete *Auricularia* sp. presented leishmanicidal and trypanosomicidal activities while the extract of *A. mayanensis* presented antibacterial, cytotoxic and proteasome inhibition activities. Chromatographic techniques were applied to fractionate the extracts. A new compound, Methyl 8-((4-hydroxyphenyl) amino)-8-oxooctanoate was isolated from the extract of *Auricularia* sp., which was designated with the common name methyl ester of brotasic acid. Anacardic acid (15:1) Δ^9 a compound unpublished in the literature along with nine derivatives of anacardic acids and ergosterol were isolated from the extract of the basidiomycete *A. mayanensis*. All compounds were identified by analyses of spectrometric and spectroscopic data.

Key words: Basidiomycetes, *Auricularia* sp., *Aurantiopileus mayanensis*, anacardic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de metabólitos secundários isolados de basidiomicetos.....	21
Figura 2 - Basidiomiceto <i>Auricularia</i> sp.	22
Figura 3 - Basidiomiceto <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	23
Figura 4 - Esquema de fracionamento do basidiomiceto CB.	36
Figura 5 - Fluxograma de separação da amostra CBM.	37
Figura 6 - Perfil cromatográfico da fração CBM1 (Condição: Figura 5 - Legenda B).	37
Figura 7 - Esquema de fracionamento do basidiomiceto CC.	39
Figura 8 - Fluxograma de separação da amostra CCM.	40
Figura 9 - Fluxograma de separação da amostra CCM12.	40
Figura 10 - Fluxograma de separação da amostra CCM12B.	41
Figura 11 - Perfil cromatográfico da fração CCM12B (Condição: Figura 10 - Legenda A). ..	41
Figura 12 - Fluxograma de separação da amostra CCM12B4.	41
Figura 13 - Perfil cromatográfico da fração CCM12B4 (Condição: Figura 12- Legenda A). ..	42
Figura 14 - Fluxograma de separação da amostra CCM12C.	42
Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração CCM12C (Condição: Figura 14- Legenda A). ...	42
Figura 16 - Reação geral de tiometilação de alcenos.	43
Figura 17 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) do éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	45
Figura 18 - Espectro no UV do éster metílico do ácido brotásico (17, Fração CBM1C, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).	45
Figura 19 - Espectro no IV do éster metílico do ácido brotásico (17, Fração CBM1C, pastilha de sílica).	46
Figura 20 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	47
Figura 21 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	48
Figura 22 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	49
Figura 23 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	49
Figura 24 - Estrutura do éster metílico do ácido brotásico (17, fração CBM1C).	50

Figura 25 - Espectro de massas de alta resolução (ESI-) do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3).....	52
Figura 26 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).....	52
Figura 27 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3, pastilha de sílica).....	53
Figura 28 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3).....	54
Figura 29 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3).....	54
Figura 30 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3).....	55
Figura 31 - Estrutura do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, Fração CCM12B3).	55
Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução (ESI-) do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, CCM12B4E).....	57
Figura 33 – Espectro no UV do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, CCM12B4E, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).....	58
Figura 34 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).....	59
Figura 35 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).....	59
Figura 36 - Correlações HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).....	60
Figura 37 - Correlações HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).....	60
Figura 38 - Estrutura do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).	60
Figura 39 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).....	62
Figura 40 - Espectro de massas de alta resolução (ESI-) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, CCM12B5).....	63
Figura 41 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5, pastilha de sílica).	63

Figura 42 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	64
Figura 43 - Espectro de massas GC-MS do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	65
Figura 44 - Proposta de fragmentação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5) por análises por GC-MS.	66
Figura 45 – Possível conformação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	67
Figura 46 - Estrutura do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	67
Figura 47 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).	69
Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	70
Figura 49 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7, pastilha de sílica).	70
Figura 50 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	71
Figura 51 - Espectro de massas GC-MS do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	72
Figura 52 – Proposta de fragmentação (GC-MS) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	72
Figura 53 - Estrutura do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	73
Figura 54 - Estrutura do ácido anacárdico (17:0) (22, fração CCM12B8).	74
Figura 55 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:0) (22, fração CCM12B8, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).	74
Figura 56 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) do ácido anacárdico (17:0) (22, fração CCM12B8).	75
Figura 57 - Espectro de fragmentação MS/MS para o íon m/z 375,29 (20 eV) do ácido anacárdico (17:0) (22, fração CCM12B8).	76
Figura 58 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 375,29 (40 eV) do ácido anacárdico (17:0) (22, fração CCM12B8).	76
Figura 59 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:0) (ESI ⁺) (22, fração CCM12B8).	77
Figura 60 - Estrutura do ácido anacárdico (15:0) (23, fração CCM12B8).	77

Figura 61 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁻) do ácido anacárdico (15:0) (23, fração CCM12B8).	78
Figura 62 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 371,26 (40 eV) do ácido anacárdico (15:0) (23, fração CCM12B8).	79
Figura 63 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 371,26 (40 eV) do ácido anacárdico (15:0) (23, fração CCM12B8).	79
Figura 64 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:0) (ESI ⁻) (23, fração CCM12B8).	80
Figura 65 - Estrutura do ácido anacárdico (14:0) (24, fração CCM12B5).	80
Figura 66 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁻) do ácido anacárdico (14:0) (24, fração CCM12B5).	81
Figura 67 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 333,21 (40 eV) do ácido anacárdico (14:0) (24, fração CCM12B5).	82
Figura 68 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 333,21 (40 eV) do ácido anacárdico (14:0) (24, fração CCM12B5).	82
Figura 69 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (14:0) (ESI ⁻) (24, fração CCM12B5).	83
Figura 70 - Estrutura do ácido anacárdico (13:0) (25, fração CCM12B3).	83
Figura 71 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁻) do ácido anacárdico (13:0) (25, fração CCM12B3).	84
Figura 72 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 319,18 (40 eV) do ácido anacárdico (13:0) (25, fração CCM12B3).	85
Figura 73 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (13:0) (ESI ⁻) (25, fração CCM12B3).	85
Figura 74 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 371,2585 (40 eV) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	86
Figura 75 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (ESI ⁻) (20, fração CCM12B5).	87
Figura 76 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 373,2731 (40 eV) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	88
Figura 77 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 373,24 (40 eV) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	88

Figura 78 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	89
Figura 79 - Estrutura do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (26, fração CCM12B3).	90
Figura 80 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (26, fração CCM12B3).	90
Figura 81 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 343,19 (40 eV) do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (26, fração CCM12B3).	91
Figura 82 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (26, fração CCM12B3).	92
Figura 83 - Estrutura do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27, fração CCM12B8).	92
Figura 84 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27, fração CCM12B8).	93
Figura 85 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 345,2428 (40 eV) do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27, fração CCM12B3).	94
Figura 86 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27, fração CCM12B3).	95
Figura 87 - Proposta de biossíntese para os ácidos anacárdicos.	97
Figura 88 - Representação da ligação entre enzima acetilcolinesterase e o composto (17:1).	100
Figura 89 - Curva de inibição de <i>B. subtilis</i> CCM12B5.	102
Figura 90 - Ensaio de inibição da PBP2x baseado em anisotropia de fluorescência para CCM12B5.	103
Figura 91 - Análise de microscopia de fluorescência para o composto CCM12B5.	104
Figura 92 -Atividade de inibição do proteassomo testado para CCM12B5 e CCM12B7.	105
Figura 93 - Espectros de GC-EM obtidos para o ergosterol (28, fração CCM12C5).	106
Figura 94 - Espectro no UV obtido para o ergosterol (28, fração CCM12C5, 1 mg.mL ⁻¹ , MeOH).	106
Figura 95 - Estrutura do ergosterol (28, fração CCM12C5).	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ficha de informações da coleta do basidiomiceto <i>Auricularia</i> sp.....	35
Tabela 2 - Ficha de informações da coleta do basidiomiceto <i>A. mayanensis</i>	38
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) (17, fração CBM1C).	50
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18, fração CCM12B3).	56
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19, fração CCM12B4E).	61
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20, fração CCM12B5).	68
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, MeOH- d_4) do ácido anacárdico (17:2) Δ^8 (21, fração CCM12B7).	72
Tabela 8 - Derivados dos ácidos anacárdicos detectados nas frações CCM12 obtidas do fracionamento do extrato metanólico do basidiomiceto <i>A. mayanensis</i>	96
Tabela 9 - Ensaio de Citotoxicidade.....	101
Tabela 10 - Ensaio Antibacteriano	101
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, piridina- d_5) do ergosterol (28, fração CCM12C5).	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE-UV-ELSD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Ultravioleta, <i>Evaporative light scattering detector and Mass spectrometry</i>
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Ultravioleta
UPLC-QToF-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time of Flight coupled with Mass spectrometry</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled with Mass spectrometry</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMDS	Dimetil dissulfeto
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IHD	Índice de Deficiência de Hidrogênios
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de Etila
CN	Cianopropila
CIM	Concentração inibitória mínima
RMN de ¹ H/ ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio/Carbono
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

APÊNDICES

Apêndice 1 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (17, CBM1C)	118
Apêndice 2 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (17, CBM1C)	118
Apêndice 3 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (17, CBM1C)	119
Apêndice 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (17, CBM1C)	119
Apêndice 5 - Espectro de COSY (17, CBM1C)	120
Apêndice 6 - Expansão um do espectro de COSY (17, CBM1C)	120
Apêndice 7 - Espectro de HMBC (17, CBM1C)	121
Apêndice 8 - Expansão um do espectro de HMBC (17, CBM1C)	121
Apêndice 9 - Expansão dois do espectro de HMBC (17, CBM1C)	122
Apêndice 10 - Espectro de HSQC (17, CBM1C)	122
Apêndice 11 - Expansão um do espectro de HSQC (17, CBM1C)	123
Apêndice 12 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (18, CCM12B3)	123
Apêndice 13 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (18, CCM12B3)	124
Apêndice 14 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (18, CCM12B3)	124
Apêndice 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (18, CCM12B3)	125
Apêndice 16 - Espectro de COSY (18, CCM12B3)	125
Apêndice 17 - Espectro de HMBC (18, CCM12B3)	126
Apêndice 18 - Espectro de HSQC (18, CCM12B3)	126
Apêndice 19 - Expansão um do espectro de HSQC (18, CCM12B3)	127
Apêndice 20 - Expansão dois do espectro de HSQC (18, CCM12B3)	127
Apêndice 21 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (19, CCM12B4E)	128
Apêndice 22 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (19, CCM12B4E)	128
Apêndice 23 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (19, CCM12B4E)	129
Apêndice 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (19, CCM12B4E)	129
Apêndice 25 - Espectro de COSY (19, CCM12B4E)	130
Apêndice 26 - Espectro de HMBC (19, CCM12B4E)	130

Apêndice 27 - Expansão um do espectro de HMBC (19, CCM12B4E)	131
Apêndice 28 - Expansão dois do espectro de HMBC (19, CCM12B4E).....	131
Apêndice 29 - Expansão três do espectro de HMBC (19, CCM12B4E).....	132
Apêndice 30 - Espectro de HSQC (19, CCM12B4E)	132
Apêndice 31 - Expansão um do espectro de HSQC (19, CCM12B4E)	133
Apêndice 32 - Expansão dois do espectro de HSQC (19, CCM12B4E).....	133
Apêndice 33 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (20, CCM12B5)	134
Apêndice 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (20, CCM12B5)	134
Apêndice 35 - Espectro de COSY (20, CCM12B5).....	135
Apêndice 36 - Espectro de HMBC (20, CCM12B5).....	135
Apêndice 37 - Expansão um do espectro de HMBC (20, CCM12B5).....	136
Apêndice 38 - Expansão dois do espectro de HMBC (20, CCM12B5)	136
Apêndice 39 - Espectro de HSQC (20, CCM12B5).....	137
Apêndice 40 - Expansão um do espectro de HSQC (20, CCM12B5).....	137
Apêndice 41 - Expansão dois do espectro de HSQC (20, CCM12B5)	138
Apêndice 42 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (21, CCM12B7)	138
Apêndice 43 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (21, CCM12B7)	139
Apêndice 44 - Espectro de COSY (21, CCM12B7).....	139
Apêndice 45 - Espectro de HMBC (21, CCM12B7).....	140
Apêndice 46 - Expansão um do espectro de HMBC (21, CCM12B7).....	140
Apêndice 47 - Expansão dois do espectro de HMBC (21, CCM12B7)	141
Apêndice 48 - Espectro de HSQC (21, CCM12B7).....	141
Apêndice 49 - Expansão um do espectro de HSQC (21, CCM12B7).....	142
Apêndice 50 - Expansão dois do espectro de HSQC (21, CCM12B7)	142
Apêndice 51 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (28, CCM12C5)	143
Apêndice 52 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (28, CCM12C5)	143
Apêndice 53 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (28, CCM12C5)	144
Apêndice 54 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (28, CCM12C5)	144
Apêndice 55 - Espectro de COSY (28, CCM12C5).....	145
Apêndice 56 - Expansão um do espectro de COSY (28, CCM12C5).....	145
Apêndice 57 - Espectro de HMBC (28, CCM12C5).....	146
Apêndice 58 - Expansão um do espectro de HMBC (28, CCM12C5).....	146

Apêndice 59 - Expansão dois do espectro de HMBC (28, CCM12C5)	147
Apêndice 60 - Expansão três do espectro de HMBC (28, CCM12C5)	147
Apêndice 61 - Espectro de HSQC (28, CCM12C5)	148
Apêndice 62 - Expansão um do espectro de HSQC (28, CCM12C5)	148

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.2 BASIDIOMICETO <i>Auricularia</i> sp.	22
1.3 BASIDIOMICETO <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	23
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Gerais.....	25
3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	25
3.1.2 Cromatografia em colunas cromatográficas (pré-empacotadas)	25
3.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	26
3.1.4 Análises por CLAE-UV-ELSD-MS	26
3.1.5 Análises por UPLC-QToF-MS	26
3.1.6 Análises por GC-MS	27
3.1.7 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)	27
3.1.8 Espectroscopia de IV e UV	28
3.1.9 Solventes.....	28
3.1.10 Bioensaios.....	28
3.2 Investigação química do basidiomiceto <i>Auricularia</i> sp.	35
3.2.1 Coleta do material.....	35
3.2.2 Identificação do basidiomiceto	35
3.2.3 Isolamento dos metabólitos do basidiomiceto <i>Auricularia</i> sp.	36
3.2.4 Fracionamento do extrato CBM	36
3.3 Investigação química do basidiomiceto <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	38
3.3.1 Coleta do material.....	38
3.3.2 Identificação do basidiomiceto	38
3.3.3 Isolamento dos metabólitos do basidiomiceto <i>A. mayanensis</i>	39
3.3.4 Fracionamento do extrato CCM	39
3.4 Derivatização dos ácidos anacárdicos com dimetil dissulfeto (DMDS)	43

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Isolamento e identificação dos metabólitos do basidiomiceto <i>Auricularia</i> sp.	44
4.1.1 Isolamento e identificação do éster metílico do ácido brotásico (17 , fração CBM1C) ...	44
4.2 Isolamento e identificação dos metabólitos do basidiomiceto <i>A. mayanensis</i>	51
4.2.1 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (18 , fração CCM12B3) .	51
4.2.2 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (19 , fração CCM12B4E)	57
4.2.3 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (20 , fração CCM12B5).....	62
4.2.4 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (21 , fração CCM12B7)	69
4.2.5 Identificação do ácido anacárdico (17:0) (22 , fração CCM12B8)	74
4.2.6 Identificação do ácido anacárdico (15:0) (23 , fração CCM12B8)	77
4.2.7 Identificação do ácido anacárdico (14:0) (24 , fração CCM12B5)	80
4.2.8 Identificação do ácido anacárdico (13:0) (25 , fração CCM12B3)	83
4.2.9 Identificação de derivados dos ácidos anacárdicos insaturados por UPLC-QToF-MS/MS	86
4.2.9.1 Identificação do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (26 , fração CCM12B3)	89
4.2.9.2 Identificação do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27 , fração CCM12B8).....	92
4.2.10 Ácidos anacárdicos	97
4.2.11 Bioatividade dos ácidos anacárdicos isolados do basidiomiceto <i>Aurantiopileus mayanensis</i>	100
4.3 Isolamento e identificação do ergosterol (28 , fração CCM12C5).....	105
5 CONCLUSÕES	109
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
7 APÊNDICES.....	118

1 INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos são conhecidos há séculos e sempre foram utilizados no tratamento de doenças degenerativas, além do seu sabor único e elevado valor nutricional (RATHEE *et al.*, 2012; RATHORE *et al.*, 2017). Estima-se que existam cerca de doze mil espécies de basidiomicetos, mas apenas duas mil são conhecidas. Dentre estas, somente trinta e cinco espécies comestíveis são comercialmente cultivadas e em torno de duzentas espécies selvagens são utilizadas para fins medicinais (BEULAH *et al.*, 2013; GARGANO *et al.*, 2017; RATHORE *et al.*, 2017).

Dentre a importância medicinal dos basidiomicetos conhecidos, destaca-se a prevenção e tratamento de doenças cardíacas, hipertensão, acidente vascular cerebral e alguns tipos de câncer por meio do fortalecimento do sistema imunológico. Além dessas, outras atividades são relatadas, como: antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, hepatoprotetora, antidiabética e antitrombóticas (RATHORE *et al.*, 2017).

Os basidiomicetos constituem uma importante classe de fungos superiores adaptados a diferentes condições climáticas, habitats e substratos. Apresentam um metabolismo secundário diversificado devido a exposição do micélio a um grande número de predadores, observando-se em seus tecidos o acúmulo de substâncias antibióticas, inseticidas e antifúngicas. Seus produtos naturais diferem-se notavelmente dos metabólitos de actinomicetos e mixobactérias, tanto em origem biogenética como em estrutura. No entanto, são verificadas algumas semelhanças com metabólitos produzidos por plantas, principalmente policetídeos e os sesquiterpenóides (SCHÜFFLER *et al.*, 2009).

Os terpenos estão entre os metabólitos secundários mais comumente isolados de basidiomicetos. A maioria dos terpenos de basidiomicetos apresentam estruturas únicas, não observadas em outras fontes na natureza, apresentando diversas atividades farmacológicas tais como anticâncer, antimalária, antiviral, antibacteriana e anti-inflamatória (DURU *et al.*, 2015). A partir do basidiomiceto *Ganoderma lucidum* foram isolados dois novos triterpenos, (**1-2**), ativos contra a enzima acetilcolinesterase, além de 16 compostos conhecidos (LEE *et al.*, 2011). Estudos com o basidiomiceto *Plebia uda* levaram ao isolamento de três novos sesquiterpenos, o udasterpurenol A (**3**), a udalactarana A (**4**) e B (**5**) (Figura 1). Os compostos **4** e **5** apresentaram potente atividade de inibição da germinação de esporos do fungo patogênico *Fusarium graminearum* (SCHÜFFLER *et al.*, 2012).

A partir do corpo de frutificação do basidiomiceto *Mycena rósea*, foram isolados os alcalóides mycenarubina A (**6**) e B (**7**), estruturalmente relacionados às damironas isoladas da

esponja marinha *Zyzzya fuliginosa* (PETERS *et al.*, 2007; UTKINA *et al.*, 2004). Estudo com o basidiomiceto *Mycena pelianthina*, forneceu dois alcalóides pirroloquinolínicos, a pelianthinarubina A (**8**) e B (**9**). Por apresentar uma unidade S-hercynina, **8** e **9** diferem de outros alcalóides pirroloquinolínicos isolados de organismos marinhos ou de outras espécies de *Mycena* sp. (PULTE *et al.*, 2016). O alcalóide β -carbolínico foi isolado a partir corpo de frutificação do basidiomiceto *Mycena metata*. A 6-hydroxymetatacarbolina-D (**10**) apresenta esqueleto carbônico β -carbolínico altamente substituído, provavelmente derivado de L-triptofano, ácido 2-oxoglutárico, L-treonina e L-prolina (JAEGER *et al.*, 2013).

A omaphalotina A (**11**), isolada a partir do basidiomiceto *Omaphalotus olearius*, apresentou potente atividade nematocida (MAYER *et al.*, 1997). As omaphalotinas B-D e as omaphalotinas E-I foram isoladas do mesmo basidiomiceto e apresentaram potente atividade nematocida contra *Meloidogyne incognita* (BÜCHEL *et al.*, 1998).(LIERMANN *et al.*, 2009).

Dezesseis novas vibrilactoximas foram isoladas a partir da cultura do basidiomiceto *Boreostereum vibrans* e apresentaram atividade inibitória da lipase pancreática e atividade citotóxica contra cinco linhagens de câncer. Estes compostos representam os primeiros éster de oximas encontrados na natureza, como a vibrilactoxima C (**12**) (CHEN *et al.*, 2016).

Cinco derivados terfenílicos nitrogenados foram isolados a partir de extratos do corpo de frutificação do basidiomiceto *Sarcodon scabrosus*, com atividade inibitória da 5-lipoxioxigenase, atividade antioxidante e citotóxica, como o composto **13** (MA *et al.*, 2005).

O primeiro isolamento de ciclohexanonas alquílicas foi realizado a partir do corpo de frutificação do basidiomiceto *Hygrophorus abieticola*. As pseudohygrophoronas A¹² (**14**), B¹² (**15**) e hygroporona B¹³ (**16**) apresentaram potente atividade fungicida (OTTO *et al.*, 2015).

Figura 1 – Exemplos de metabólitos secundários isolados de basidiomicetos.

Fonte: Autoria própria

1.2 BASIDIOMICETO *Auricularia* sp.

O basidiomiceto *Auricularia* sp. (Figura 2) é encontrado em zonas temperadas e tropicais em várias partes do mundo. Foi um dos primeiros cogumelos a serem cultivados por humanos. O corpo de fruto pode ser facilmente distinguido pela sua forma de orelha e sua coloração marrom (MILES; CHANG, 2004). Conhecido popularmente como orelha de judeu, orelha de madeira e/ou orelha da geléia, é um dos cogumelos mais populares na China, Coréia, Japão e Vietnã. Fungos do gênero *Auricularia* são utilizados desde o século XIX para tratar dor de garganta, dor nos olhos e icterícia (MILES *et al.*, 2004; MISAKI *et al.*, 1981; NGUYEN *et al.*, 2012; REZA *et al.*, 2011).

Figura 2 - Basidiomiceto *Auricularia* sp.

Fonte: <https://www.pinterest.com/pin/467811480022969307/>

Estudos de metabólitos secundários isolados de *Auricularia* sp. indicam ação anti-hipercolesterolemia (ZHAO *et al.*, 2015), proteção contra demência e Alzheimer (BENNETT *et al.*, 2013), diminuição do acúmulo de lipídeos e atividade antioxidante (CHIU *et al.*, 2014), atividade citotóxica para câncer de pulmão (A459) (YU *et al.*, 2014), anticoagulante (YOON *et al.*, 2003), atividade antitumoral (SONG *et al.*, 2012), diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos (ZENG *et al.*, 2013), e inibição contra a proliferação de carcinoma de células acinares (MA *et al.*, 2010).

1.3 BASIDIOMICETO *Aurantiopileus mayanensis*

O basidiomiceto *Aurantiopileus mayanensis* (Figura 3) é um basidiomiceto de cor de salmão descoberto em 2010 em um habitat remoto da floresta subtropical em Maya Mountain – Belize. Através de análises filogenéticas e de características morfológicas GINNS *et al.* (2010) propuseram a criação de um novo gênero para acomodar esta espécie. Este basidiomiceto tem conexão com duas espécies asiáticas já catalogadas como *Gloeoporous* (GINNS *et al.*, 2010).

Figura 3 - Basidiomiceto *Aurantiopileus mayanensis*.

Fonte: <http://mushroomobserver.org/274604>

Até o presente momento foram realizados apenas estudos filogenéticos e filogenômicos desta espécie (BINDER *et al.*, 2013; JUSTO *et al.*, 2017), assim como na deterioração de madeiras de igrejas históricas no Chile (ORTIZ *et al.*, 2014), sendo este o primeiro estudo químico da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar e identificar potenciais metabólitos secundários bioativos de extratos dos basidiomicetos *Auricularia* sp. e *Aurantiopileus mayanensis* coletados em mata atlântica.

2.2 Específicos

- Fracionar os extratos de dois basidiomicetos e selecionar compostos que apresentarem atividade biológica utilizando-se metodologia de desreplicação por CLAE-UV-ELSD-MS e análise dos bancos de dados SciFinder e DNP.
- Isolar por técnicas cromatográficas e identificar os compostos selecionados por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas.
- Avaliar as atividades biológicas dos metabólitos que foram isolados em quantidades suficientes para tal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Gerais

3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄, 20 x 20 cm (Aldrich). A avaliação foi realizada utilizando-se como eluentes CH₂Cl₂:MeOH nas proporções de 9:1 e 8:2 e Hex:AcOEt nas proporções 9:1, 8:2 e 7:3. As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV), com lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Foram utilizados como reveladores ninidrina (para aminoácidos e aminas primárias), ácido fosfomolibdico (para substâncias redutoras) e Dragendorff (para alcalóides).

Para a revelação as cromatofolhas foram borrifadas com a solução a, b ou c, e posteriormente foram aquecidas em chapa de aquecimento à 120°C por 5 minutos. Foram utilizadas:

a) solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH P.A. b) Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH P.A. c) solução do reagente de Dragendorff, preparado a partir da mistura 1:1 das soluções A (0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água) e B (8,0 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água) diluída na proporção de 1 mL da mistura para cada 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água sendo borrifada na placa sem aquecimento.

3.1.2 Cromatografia em colunas cromatográficas (pré-empacotadas)

As separações cromatográficas foram realizadas em colunas pré-empacotadas (Waters Sep-Pak[®] vac 35 cc ou Phenomenex Strata[®]) com diferentes dimensões (2, 5 e 10 g) contendo as fases estacionárias como: sílica-gel, sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), ou cianopropila, utilizadas de acordo com a polaridade de cada fração.

1. Para amostras com substâncias muito polares e solúveis em água, foram utilizadas colunas pré-empacotadas derivatizadas com grupos octadecilsilano (C₁₈) como fase estacionária.

2. Para amostras contendo substâncias polares e apolares, foram utilizadas colunas pré-empacotadas derivatizada com grupos cianopropila como fase estacionária.

3.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a separação dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizado sistema Waters®, modelo 2695, com sistema de controle e bombeamento Waters® Pump 600, acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível modelo Waters 2487, operado utilizando software Empower 3.0.

3.1.4 Análises por CLAE-UV-ELSD-MS

Para as análises por CLAE-UV-ELSD-MS, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Waters®, modelo Alliance 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-visível modelo Waters® 2996 com detector de arranjo de fotodiodos (varredura entre $\lambda_{\text{máx}}$ = 200 à 400 nm) acoplado em série com um detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 (*Evaporative light scattering detector* – ELSD) e com um Espectrômetro de massas (EM) modelo Waters Micromass ZQ.

Para as eluições cromatográficas foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ X-Terra® (50 × 2.1 mm, 3.5 mm) e a mistura de solventes (A) H₂O + 0,1% (v/v) de ácido fórmico, e (B) MeOH:MeCN (1:1, v/v) + 0,1% de ácido fórmico. A coluna foi eluída com vazão de 1 mL.min⁻¹ em gradiente linear com fase móvel composta por: 0 à 1 min manteve-se 10% de B em A; de 1 à 22 min, foi desenvolvido gradiente linear até 100% de B; de 22 a 30 min manteve-se 100% de B; de 30 à 40 min manteve-se 10% de B em A para reequilíbrio da coluna. O detector de arranjo de diodos foi ajustado para análise com varredura em λ = 200 à 400 nm. Para análise por EM utilizou-se as seguintes condições: voltagem do capilar: 3 kV; temperatura da fonte: 100°C, temperatura de dessolvatação; 350°C; modo IES positivo e negativo; faixa de aquisição: 100 à 1200 Da; vazão de gás (nitrogênio) no cone: 50 L.h⁻¹, vazão de dessolvatação: 350 L.h⁻¹.

3.1.5 Análises por UPLC-QToF-MS

As análises por UPLC-QToF-MS foram realizadas em equipamento Waters com interface *electrospray* (IES) acoplada a sistema *Acquity* UPLC. Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈

(dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 μm ; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H_2O ultrapura (Milli-Q) + 0,1% de ácido fórmico (Panreac) e MeCN (Sigma) + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado foi de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 9:1 por 6 minutos, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:1 por 3 minutos, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 1:49 por 0,1 minuto e $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 9:1 por 0,9 minuto; vazão de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume de injeção utilizado foi de 8 μL . A coluna foi mantida à uma temperatura de 40°C e as amostras foram mantidas à 10°C. A detecção das análises de MS^{E} *continuum* foram realizadas em modo positivo/negativo e sensibilidade, tempo de aquisição de 0 a 10 minutos, fonte IES, intervalo de massa de 100 à 1200 Da, *scan* time de 0,2 s; energia de colisão de 3 V com rampa de alta energia de 20 à 30 V. As condições do IES no modo positivo/negativo foram: voltagem do capilar: 1,2 kV; voltagem do cone: 30 V; temperatura da fonte: 100°C; temperatura de dessolvatação: 450°C; vazão do gás no cone de 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; vazão do gás de dessolvatação: 750 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, infundida pela sonda do *lock-mass* com vazão de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.1.6 Análises por GC-MS

As análises por GC-MS foram realizadas em um cromatógrafo à gás acoplado à um detector de massas GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu). Coluna capilar (Shimadzu - H-Rtx-5MS) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com vazão de 1,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Temperaturas do injetor e na zona de interface foram de 300°C. A programação da temperatura da coluna foi de 100°C durante 1 min, 100 - 310°C (10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) e mantida por 10 min à 310 $^{\circ}\text{C}$. O espectrômetro de massas utilizou um sistema de impacto eletrônico com uma energia de ionização de 70 eV. A injeção foi de 1 μL com sistema *split* 1:30. A detecção foi realizada no modo de varredura *scan* de 20 à 550 Da.

3.1.7 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC foram obtidos utilizando-se um aparelho Bruker AV-600 com criossonda de 5 mm, operando a 600 MHz para hidrogênio e a 150 MHz para carbono no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). As amostras para estas análises foram preparadas utilizando-se solventes deuterados de marca Cambridge Isotopes: ($\text{MeOH}-d_4$),

(DMSO-*d*₆) e (piridina-*d*₅). O padrão utilizado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

3.1.8 Espectroscopia de IV e UV

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity, sendo utilizado o MeOH para a solubilização das amostras. As soluções foram aplicadas em pastilhas de sílica e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso.

Os espectros de ultravioleta (UV) foram obtidos em equipamento Shimadzu UV-3600, as amostras foram solubilizadas em MeOH em concentrações de 0,1 a 1,0 mg. mL⁻¹.

3.1.9 Solventes

Os solventes utilizados nas análises por separação cromatográfica por permeação em gel, em colunas pré-empacotadas e nas análises por CCD foram de grau analítico (P.A.). Para as separações em CLAE foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J. T. Baker e Panreac). A água utilizada em todos os procedimentos foi purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

3.1.10 Bioensaios

Alíquotas de 1 à 2 mg de extratos e frações foram enviados para ensaios leishmanicida e tripanossomicida (Dr. Danilo Ciccone Miguel e Dra. Fernanda Gadelha – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP), de inibição do proteassomo (Dr. Daniela Trivella – LNBio, Campinas, SP), citotóxicidade (Dra. Raquel Santos -UNIFRAN, Franca, SP), antibacteriano (Dr. Carlos Martins - UNIFRAN, Franca, SP) e de inibição da PBP2x (Dra. Andrea Dessen – LNBio, Campinas, SP).

3.1.10.1 Protocolo do bioensaio de inibição do proteassomo

Os ensaios de inibição do proteassomo foram realizados pela equipe da Dra. Daniela B. B. Trivella no LNBio-CNPq (Campinas, SP). A partícula 20S do proteassomo foi purificada de células de *Saccharomyces cerevisiae*. O substrato fluorescente Suc-LLVY, específico para atividade tipo quimotripsina (subunidade β5), foi obtido comercialmente. Os ensaios foram

realizados em placas de 384 poços contendo 1 μL das frações-teste na concentração de 1 mg.mL^{-1} (extratos brutos, frações enriquecidas ou compostos puros) e 19 μL do proteassomo preparado na concentração de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução tampão (Tris 100 mmol.L^{-1} pH 7,5; EDTA 0.5 mmol.L^{-1} ; SDS 0.03%) A placa foi incubada à 37 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 5 μL do substrato suc-LLVY-AMC a 250 μM no mesmo tampão. A intensidade de fluorescência (IF, $\lambda_{\text{máx}}$ excitação = 355 nm; $\lambda_{\text{máx}}$ emissão = 460 nm) em cada poço foi medida após 1 h de incubação da enzima com o substrato. Um grupo controle na ausência de inibidor (DMSO) foi realizado para referência. A IF das amostras de proteassomo tratadas com as frações-teste foi normalizada pelos valores do controle em DMSO (o qual representou 100% da atividade enzimática) e expressos como porcentagem de atividade remanescente da enzima após incubação com a fração teste. Os melhores compostos identificados foram submetidos a experimentos em diferentes concentrações, a fim de se obter os seus valores de IC_{50} .

3.1.10.2 Protocolo do bioensaio de atividade Leishmanicida

Os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados pela equipe do Prof. Dr. Danilo C. Miguel no Instituto de Biologia (Unicamp, SP). O cultivo dos promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *L. (L.) infantum* foram mantidos em culturas estéreis 25 cm^2 à 26°C em meio 199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell). Às culturas de *L. (L.) infantum* foram adicionados 2% de urina humana masculina filtrada e mais 10% de soro fetal bovino. A sensibilidade de promastigotas frente aos diferentes compostos foi avaliada utilizando-se o método do MTT (Zauli-Nascimento *et al.*, 2010; Miguel *et al.*, 2011). A primeira fase dos testes consistiu na avaliação da atividade dos compostos a partir de duas concentrações: 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, por 24 h. Após este período, caso a viabilidade celular calculada com relação ao controle não tratado fosse igual ou inferior a 15%, seriam realizados ensaios com as seguintes concentrações do composto de interesse: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h. Foi acrescentado um grupo incubado com 1% DMSO como controle de diluente. Os ensaios para avaliação de sensibilidade *in vitro* foram realizados com promastigotas de fase logarítmica (2,5 a 5 x 10⁶ por orifício em placas de 96 orifícios) incubados com concentrações crescentes dos compostos por 24 h. A seguir, adicionou-se 30 μL de 5 mg.mL^{-1} de MTT (Sigma-Aldrich) preparado em PBS 1X estéril para incubação por 2 h à 26°C. Logo após, foram adicionados 30 μL de SDS 20% e o produto liberado teve sua absorbância medida através de um espectrofotômetro (MultiSkan Synergy). As curvas dose-resposta para obtenção das concentrações efetivas para inibição de 50 e 90% de crescimento

das culturas (EC50% e EC90% respectivamente), assim como as concentrações letais (100%), foram determinadas utilizando-se o software Origin (OriginLab Corp.). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente com o *software* GraphPad Prism 4.0 Software (San Diego, CA, USA), levando-se em conta o tipo de teste mais adequado para cada condição experimental. Os valores de concentração inibitória foram determinados para 50%, 90% e 100% das culturas. Apenas valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.1.10.3 Protocolo do bioensaio de atividade anti-*T. cruzi* in vitro

Os ensaios de atividade tripanossomicida foram realizados pela equipe da Prof. Dra. Fernanda R. Gadelha no Instituto de Biologia (Unicamp, SP). Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em meio de infusão de triptose de fígado suplementado com 20 mg.L⁻¹ de hemin e 10% de soro fetal de vitelo a 28°C (Peloso, *et al.*, 2016). Os parasitas transfectados foram cultivados no mesmo meio contendo 200 µg.L⁻¹ de G418. Após 5 dias de proliferação, as células foram recolhidas por centrifugação (1000 x g a 4°C, 5 min), lavadas e ressuspensas em solução salina com tampão fosfato (PBS pH 7,3). Para a contagem das células foi utilizada uma câmara de Neubauer. A atividade antiparasitária foi avaliada contra tripanosomatídeos utilizando um teste de viabilidade de MTT (Miguel, *et al.*, 2007) após 24 h de incubação. Os valores de concentração máxima efetiva (EC₅₀) para as populações de *T. cruzi* foram calculados a partir da regressão sigmoide das curvas concentração-resposta utilizando o Software Origin 5.0. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. Os experimentos citotóxicos foram realizados utilizando macrófagos de medula óssea a partir de camundongos BALB.c⁻¹. As células diferenciadas foram cultivadas em placas de 96 poços à 37°C para posterior incubação com concentrações crescentes das amostras ativas durante 24 h. O método MTT também foi realizado e os valores de IC₅₀ foram calculados em conformidade. Os experimentos com camundongos BALB.c⁻¹ foram aprovados pelo Comitê Ético de Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (4535-1/2017).

3.1.10.4 Protocolo do bioensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pela equipe do Prof. Dr. Carlos Martins no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (Universidade de Franca, SP). Para os ensaios foram utilizadas bactérias de coleção (cepas padrão) da *American Type Culture Collection* (ATCC/USA) e da *National Collection of Type Cultures* (NCTC/UK), bem como isolados clínicos (IC) de pacientes com infecções causadas por bactérias multirresistentes, cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de micro diluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para a obtenção do inóculo, cepas armazenadas em freezer a -80°C foram repicadas em meio de cultura Agar Sangue. Após isto, as bactérias foram incubadas em temperatura de 37°C em estufa bacteriológica durante 24 h. Após este período, as cepas foram utilizadas para os ensaios da determinação da CIM. A quantidade do inóculo foi padronizada a fim de assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Primeiramente, foi preparada a escala 0,5 de McFarland segundo Bier (1981), em seguida 500 μL foram transferidos para um tubo com 4,5 mL de solução salina e posteriormente 2 mL foram transferidos para um tubo com 10 mL de caldo Mueller-Hinton (MHb). Foi utilizada solução salina para calibrar a transmitância à 100% em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm. A suspensão do padrão 0,5 da escala de McFarland foi medida, esperando-se uma transmitância de 96%, que corresponde a 10^6 UFC.mL^{-1} (CLSI, 2012). Todas as suspensões bacterianas foram ajustadas na mesma transmitância.

Os compostos foram diluídos em DMSO. Um miligrama das amostras foi pesado e solubilizado em 125 μL de DMSO. Para cada 125 μL desta solução, foram adicionados 500 μL de caldo Mueller-Hinton (Difco). Para a validação da técnica foi utilizado Tetraciclina (Sigma) em concentrações que variaram entre 0,0115 e 5,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas a uma concentração de 10 mg.mL^{-1} sendo diluídas em água destilada esterilizada. Em seguida, foram transferidos 4 μL do composto para um tubo contendo 1.996 μL de caldo Mueller-Hinton.

Para determinação da CIM utilizou-se a técnica de micro diluição em microplaca realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2012) com adaptações empregando-se resazurina como revelador do crescimento bacteriano.

A determinação da CIM para cada bactéria foi realizada em duplicata. Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, culturas das bactérias foram transferidas para tubos contendo solução salina a 0,9% e padronizadas em espectrofotômetro. Em uma microplaca

esterilizada de 96 orifícios foram depositadas um total de 100 µL da mistura do caldo Mueller-Hinton, amostra teste e suspensão bacteriana, de forma a obter-se uma concentração das amostras de 0,048 a 100 µg.mL⁻¹. Em um dos orifícios foi realizado o controle de cultura, em outros orifícios o controle de esterilidade do caldo e da amostra, e em outro o controle do solvente (DMSO). A placa foi incubada à 37°C em estufa bacteriológica, durante 24 h.

Após o período de incubação, 30 µL de resazurina (Sigma) preparado em solução aquosa (0,02%) foram adicionados em cada orifício. Este sistema revelador do metabolismo permitiu a observação visual, sendo que a cor azul representou ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha a sua presença (Sarker *et al.* 2007). As microplacas foram reincubadas por 30 min e após este período foram observadas e analisadas de forma descritiva. As amostras foram consideradas ativas, quando a CIM foi igual ou inferior a 100 µg.mL⁻¹.

3.1.10.5 Protocolo do bioensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pela equipe da Prof^a. Dra. Andrea Dessen no LNBio-CNPq (Campinas, SP). O ensaio semi-automatizado padronizado foi realizado como se segue. Um pré-inóculo da cepa *E. coli* foi crescido com agitação, à 250 rpm, 37°C, por 5 horas. Para montagem das placas, foram dispensados 98 µL de Mueller Hinton *Broth* cátion ajustado (CA-MHB) em placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 2 µL dos compostos em toda a placa exceto na coluna 12 (controles positivos). A fim de se ter um controle mais rígido do ensaio, foram utilizadas duas concentrações de antibióticos, 1 µg.mL⁻¹ e 32 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol. Após o período de incubação do pré-inóculo, este, foi diluído em CA-MHB para a concentração final de aproximadamente 10⁵ unidades formadoras de colônias (UFC). 100 µL do inóculo bacteriano foram adicionados por toda a placa e uma leitura inicial da densidade óptica da biomassa bacteriana foi realizada utilizando o equipamento CLARIOstar® (BMG LABTECH Ortenberg, Germany). Após 20 h de incubação à 37°C, a placa foi selada e homogeneizada em vórtex para sedimentar o *pellet* acumulado no fundo da placa e outra leitura para mensurar a densidade óptica é realizada. A análise dos dados foi realizada por meio da subtração dos valores de DO da leitura inicial dos valores de DO da leitura final. O cálculo da porcentagem de inibição utilizou a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(DO \text{ controle negativo} - DO \text{ composto testado})}{(DO \text{ controle negativo} - DO \text{ controle positivo})}$$

Os extratos que reduziram 50% ou mais do crescimento bacteriano foram selecionados para confirmação e posterior caracterização.

3.1.10.6 Protocolo do ensaio de atividade da enzima PBP2x

Os ensaios de atividade da foram realizados pela equipe da Prof^a. Dra. Andrea Dessen no LNBio-CNPEM (Campinas, SP). Fragmentos correspondentes as PBPs 2b cepas 5205 e R6, PBP2x e PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* clonados em vetor pGEX-4T-1. As proteínas recombinantes foram expressas na presença de 1 mM de IPTG durante um período overnight à 16°C. Uma vez induzidas, as células foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4°C e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 7,5. A ruptura das células, bem como do DNA das amostras foi realizado mecanicamente no gelo utilizando-se sonicação (2 segundos com intervalos de 10 segundos por 2 min), e os extratos foram centrifugados a 13000 rpm durante 40 min a 4°C para a obtenção do sobrenadante. Para a purificação da proteína, o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi fracionado em coluna GSTrap (GE Healthcare) de 5 mL previamente equilibrada com tampão A: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0 e a proteína foi eluída após tratamento com trombina por 2 h a temperatura ambiente em tampão: 50 mM Tris e 200 mM NaCl em pH 8,0. As frações contendo a proteína foram então submetidas à exclusão por tamanho em coluna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) utilizando-se para tanto tampão: 20 mM Tris, 200 mM NaCl e 1 mM EDTA em pH 8,0.

Os compostos puros foram incubados por 1 h com a proteína recombinante purificada e posteriormente foi adicionado a Bocilina FL® (Invitrogen), análogo fluorescente à penicilina, que foi utilizado como competidor ao domínio de ligação à penicilina das proteínas PBPs. Foram utilizadas placas escuras de 384 poços ProxiPlate® (PerkinElmer®), e o leitor ClarioStar® do LNBIO com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm, utilizando-se um filtro a 515 nm para bloquear excitações residuais. O pré-ensaio de otimização e o ensaio de screening utilizando-se as diferentes bibliotecas foram realizados de acordo com protocolo descrito em (FEDAROVICH et al., 2012) sob supervisão do Dr. Artur Cordeiro especialista em HTS e pesquisador integrante do Laboratório Nacional de Biociências LNBio.

3.1.10.7 Protocolo de avaliação do potencial antiproliferativo de células tumorais (citotoxicidade)

Os ensaios do potencial antiproliferativo de células tumorais foram realizados pela equipe da Prof^a. Dra. Raquel A. dos Santos no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (Universidade de Franca, SP).

A citotoxicidade foi determinada por meio da utilização do *Cell Proliferation Kit* (Roche Applied Science), baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT pelas células metabolicamente ativas, formando o corante formazana alaranjado. Foram semeadas 10^4 células por poço em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ à 37°C por 24 h. Após esse período o protocolo de tratamento consistiu na exposição das células às diferentes concentrações da substância teste (0,1; 1; 10 e 100 µM) por 24 h. O controle negativo não recebeu tratamento e o controle positivo foi tratado com DMSO 10% (v/v). Após esse tempo de exposição, foi realizada lavagem das células com tampão salino fosfato (PBS) 1X e incubação das mesmas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após esse período, foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. O IC₅₀ foi calculado por meio de regressão não-linear usando o software GraphPad Prism 3.0.

3.2 Investigação química do basidiomiceto *Auricularia* sp.

3.2.1 Coleta do material

O basidiomiceto *Auricularia* sp. foi coletado no dia 30 de abril de 2016 no parque Três Cachoeiras, (S 22°42.709' W 48°02.288'), no município de Brotas-SP (Tabela 1).

Tabela 1 - Ficha de informações da coleta do basidiomiceto *Auricularia* sp.

Identificação:	<i>Auricularia</i> sp.
Inf. GPS:	S 22°42.709' W48°02.288' Elevação 784 metros	
Dados do local de coleta:	Próximo a cachoeira Luminosidade: média Ambiente: úmido Frequência: média Apresenta crescimento em troncos	
Voucher:	CB	

Fonte: Autoria própria.

3.2.2 Identificação do basidiomiceto

O basidiomiceto foi identificado por meio de técnicas morfológicas, realizadas em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues, responsável pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Campus de Rio Claro).

3.2.3 Isolamento dos metabólitos do basidiomiceto *Auricularia* sp.

O corpo de frutificação do basidiomiceto (100 g) foi triturado em liquidificador e extraído exaustivamente com MeOH em banho de ultrassom (40 KHz por 60 min).

Após filtração o extrato foi evaporado, ressuspendido em (100 mL) MeOH/H₂O 95:5 e particionado com (100 mL) hexano três vezes. Os solventes das frações metanólicas e hexânicas foram evaporados. Os extratos foram denominados CBM e CBH, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de fracionamento do basidiomiceto CB.

3.2.4 Fracionamento do extrato CBM

O extrato CBM (209 mg) foi fracionado em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN, 2 g, Waters®) utilizando os eluentes indicados na figura 5, originando 5 frações. Todas as frações foram analisadas por CLAE-UV-ELSD-MS.

Após análise por desreplicação utilizando metodologia descrita por PARRA (2016), a fração CBM1 apresentou compostos possivelmente inéditos e foi selecionada para separação por CLAE-UV, originando 6 frações (Figura 5-6).

Figura 5 - Fluxograma de separação da amostra CBM.

Legenda: **A** – Coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila (CN, 2 g, Waters®), eluída com 50 mL das misturas de solventes: CH₂Cl₂/MeOH (8:2 v/v), CH₂Cl₂/MeOH (1:1 v/v), 100% MeOH. **B** – Separação por CLAE-UV detector UV ($\lambda_{\text{máx}} = 254$), coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Inertsil, 250 x 4,6 mm, 5 μm), eluída com 1 mL.min⁻¹ em modo isocrático com a mistura de solventes H₂O/MeOH/MeCN (5:4:1).

Figura 6 - Perfil cromatográfico da fração CBM1 (Condição: Figura 5 - Legenda B).

As frações obtidas foram analisadas por CLAE-UV-ELSD-MS e os compostos puros foram analisados por UPLC-QToF-MS e por RMN uni e bidimensionais, além disso, os compostos puros foram enviados para ensaio de atividade biológica.

3.3 Investigação química do basidiomiceto *Aurantiopileus mayanensis*

3.3.1 Coleta do material

A coleta do basidiomiceto *A. mayanensis* foi realizada no dia 20 de dezembro de 2016 na fazenda Pico Paraná, (S 25°23.018' W 48°84.758'), no município de Campina Grande do Sul-PR (Tabela 2).

Tabela 2 - Ficha de informações da coleta do basidiomiceto *A. mayanensis*.

Identificação:	<i>Aurantiopileus mayanensis</i>
Inf. GPS:	S 25°23.018' W 48°84.758' Elevação 1311 metros	
Dados do local de coleta:	Próximo a cachoeira	
	Luminosidade: média	
	Ambiente: úmido	
	Frequência: média	
Voucher:	Apresenta crescimento em troncos	
	CC	

Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Identificação do basidiomiceto

O basidiomiceto foi identificado por meio de técnicas morfológicas, realizadas pelo Prof. Dr. Elisandro R. D. Santos, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.3.3 Isolamento dos metabólitos do basidiomiceto *A. mayanensis*

O corpo de frutificação do basidiomiceto (80 g) foi triturado em liquidificador e extraído exaustivamente com MeOH em banho de ultrassom (40 KHz por 60 min).

Após filtração do material sólido o extrato metanólico foi evaporado, ressuspendido em (100 mL) MeOH/H₂O 95:5 e particionado com (100 mL) hexano por três vezes. O solvente das frações metanólicas e hexânicas foi evaporado. Os extratos foram denominados CCM e CCH, respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de fracionamento do basidiomiceto CC.

3.3.4 Fracionamento do extrato CCM

O extrato CCM (1,6 g) foi fracionado em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN, 5 g, Waters®) utilizando os eluentes indicados na Legenda A da Figura 8, originando 6 frações.

Figura 8 - Fluxograma de separação da amostra CCM.

Legenda: **A** – Coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila (10 g, Waters®), eluída com 100 mL de cada mistura de solventes Hex:CH₂Cl₂ (1:1 v/v), CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:AcOEt (1:1 v/v), AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (1:1, v/v) e MeOH (100%).

Após análise das frações por CLAE-UV-ELSD-MS, CCM1 e CCM2 apresentaram perfil cromatográfico semelhante e foram reunidas e repurificadas por CLAE-UV (Figura 9).

Figura 9 - Fluxograma de separação da amostra CCM12.

Legenda: **A** – Coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica (10 g, Phenomenex) eluída com 40 mL de cada mistura de solventes Hex, Hex:AcOEt (9:1 v/v), Hex:AcOEt (8:2 v/v), Hex:AcOEt (7:3 v/v), Hex:AcOEt (6:4 v/v), Hex:AcOEt (1:1 v/v), CH₂Cl₂:MeOH (9:1 v/v), CH₂Cl₂:MeOH (7:3 v/v), CH₂Cl₂:MeOH (1:1 v/v), MeOH.

Após análise do perfil cromatográfico das frações CCM12 e desreplicação utilizando o DNP, metodologia descrita por PARRA (2016), verificou-se a presença de compostos de interesse nas frações CCM12B e CCM12C. Sendo assim, as frações CCM12B e CCM12C foram separadas por CLAE-UV (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Fluxograma de separação da amostra CCM12B.

Legenda: A – Separação por CLAE-UV detector UV ($\lambda_{\text{máx}} = 254$ e 275 nm), coluna de fase reversa C₈-4 (GL Sciences, 250 x 4,6 mm, 5 μm) analítica, eluída em modo isocrático com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O/ACN (2:3, v/v).

Figura 11 - Perfil cromatográfico da fração CCM12B (Condição: Figura 10 - Legenda A).

Após análise das frações por CLAE-UV-ELSD-MS, verificou-se que os compostos CCM12B3, CCM12B5 e CCM12B7 apresentavam alta pureza. Estes foram analisados por UPLC-QToF-MS e por RMN uni e bidimensionais, e após elucidação estrutural foram enviados para ensaio biológico. A fração CCM12B4 foi novamente fracionada por CLAE-UV (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Fluxograma de separação da amostra CCM12B4.

Legenda: A – Separação por CLAE-UV detector UV ($\lambda_{\text{máx}} = 254$ e 273 nm), coluna de fase reversa C18 X-Terra (Waters, 250 x 4,6 mm, 5 μm) analítica, eluída em modo isocrático com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O/ACN (3:7, v/v).

Figura 13 - Perfil cromatográfico da fração CCM12B4 (Condição: Figura 12- Legenda A).

Após análise das frações por CLAE-UV-ELSD-MS, verificou-se que o composto CCM12B4E apresentava alta pureza. Este foi analisado por UPLC-QToF-MS e por RMN uni e bidimensionais.

A fração CCM12C também apresentou compostos de interesse após analisada por desreplicação utilizando o DNP e foi separada por CLAE-UV (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Fluxograma de separação da amostra CCM12C.

Legenda: A – Separação por CLAE-UV detector UV ($\lambda_{\text{máx}} = 254$ e 302 nm), coluna de fase reversa C₈-4 (GL Sciences, 250 x 4,6 mm, 5 μ m) analítica, eluída em modo isocrático com 1 mL.min⁻¹ da mistura de solventes H₂O/ACN (3:7, v/v).

Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração CCM12C (Condição: Figura 14- Legenda A).

Após análise das frações CCM12C por CLAE-UV-ELSD-MS, verificou-se que o composto CCM12C5 apresentou alta pureza. Este foi analisado por UPLC-QToF-MS, GC-MS e por RMN uni e bidimensionais para a elucidação estrutural do composto.

3.4 Derivatização dos ácidos anacárdicos com dimetil dissulfeto (DMDS)

Para a elucidação estrutural completa dos compostos presentes nas frações CCM12B5 e CCM12B7 foi efetuada a derivatização com DMDS (Figura 16) e análise por GC-MS.

Para a reação de tiometilação foi utilizada metodologia adaptada descrita por SILVA *et al.* (2008). Em um eppendorf contendo 1 mg do composto puro, foram adicionados 6 μ L de DMDS 112,5 mmol, 0,2 mg de I_2 e 200 μ L de éter etílico. À temperatura ambiente, a reação foi agitada por 24 horas. Posteriormente, adicionou-se 0,2 mL uma solução aquosa saturada de $NaHSO_3$ para a redução do excesso de I_2 . Em seguida, realizou-se a extração da fase aquosa com hexano (3x). A fração hexânica foi analisada por GC-MS (ATTYGALLE *et al.*, 1993; FRANCIS, 1981; SHIBAMOTO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2008).

Figura 16 - Reação geral de tiometilação de alcenos.

Fonte: (GONZÁLEZ, 1995)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação dos metabólitos do basidiomiceto *Auricularia* sp.

Os extratos metanólico e hexânico do basidiomiceto *Auricularia* sp. apresentaram atividades leishmanicida e tripanossomicida. O fracionamento foi realizado com a intenção de se identificar os compostos responsáveis pelas atividades biológicas.

4.1.1 Isolamento e identificação do éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C)

O espectro de massas e de absorção no UV obtidos para a fração CBM1C foram utilizados para a pesquisa na base de dados DNP e SciFinder. Após a pesquisa verificou-se a ausência na literatura de um composto com os dados idênticos, sugerindo tratar-se de um composto desconhecido. As análises espectrométricas e espectroscópicas foram realizadas para a elucidação estrutural. O composto inédito presente na fração CBM1C foi identificado e nomeado como éster metílico do ácido brotásico (**17**) (Tabela 3).

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (Figura 17) apresentou o íon protonado $[M+H]^+ = 280,1541$, o íon aduto de sódio $[M+Na]^+ = 302,1357$ e o íon dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+ = 581,2827$, logo, a fórmula molecular sugerida é $C_{15}H_{21}O_4N$, com IDH = 6 (Equação 1).

$$\text{Equação 1: } IDH = C(15) - \frac{H(21)}{2} + \frac{N(1)}{2} + 1 = 6$$

No espectro no UV (Figura 18) foram observadas as bandas de absorção de maior intensidade nos comprimentos de ondas $\lambda_{\text{máx}} = 247$ e 309 nm. O espectro de absorções no IV (Figura 19) apresentou absorções nos números de onda (cm^{-1}):

3500 cm^{-1} = banda larga atribuída a estiramento de OH,

2500 cm^{-1} = banda atribuída a estiramento de C=O de amidas *N,N*-substituídas.

1400 cm^{-1} = deformação angular do CH_2 adjacente à C=O,

1280 cm^{-1} = C-N de alifáticos

1250 cm^{-1} = C-O de éters.

780 cm^{-1} = deformação angular de 2 hidrogênios adjacentes, anéis *p*-substituídos.

Figura 17 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) do éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

Figura 18 - Espectro no UV do éster metílico do ácido brotásico (**17**, Fração CBM1C, 1 mg.mL⁻¹, MeOH).

Figura 19 - Espectro no IV do éster metílico do ácido brotásico (**17**, Fração CBM1C, pastilha de sílica).

O espectro de RMN de ^1H do composto CBM1C (Apêndices 1-3) apresentou dois duplos dubletos que correspondem à dois hidrogênios quimicamente equivalentes em δ 6,6 (dd, $J = 6,7$ Hz, CH-5', CH-3') e em δ 7,3 (dd, $J = 6,7$ Hz, CH-6', CH-2'). A constante de acoplamento $J = 6,7$ Hz corresponde ao acoplamento *o* (*orto*) entre os hidrogênios δ 6,6 e 7,3, sugerindo assim a presença de um anel aromático *p*-dissubstituído.

Foram observados dois singletos, um integrando para um hidrogênio em δ 9,57 indicando a presença de hidrogênio de amida e outro integrando para três hidrogênios em δ 3,6 indicando a presença de um grupo metoxila.

Foram observados sinais de hidrogênios característicos de cadeia alquila: um multiplete em δ 1,29, atribuído a dois metilenos vizinhos CH-4, CH-5; dois grupos metilenos em δ 1,52 CH-6, CH-3; e dois tripletos em δ 2,21 (t, $J = 7,3$ Hz, H-10) e δ 2,28 (t, $J = 7,3$ Hz, H-11). A constante de acoplamento $J = 7,3$ Hz é típica do acoplamento entre hidrogênios vicinais.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 4) apresentou um conjunto de 13 sinais. Os sinais em δ 115,4 e δ 121,3 são significativamente mais intensos, correspondendo a quatro carbonos metínicos aromáticos (C-2'; C-3' e C-5'; C-6'), indicando a presença de 15 átomos de carbono. O deslocamento químico na região de δ 110-125 e a presença de dois

carbonos quimicamente semelhantes confirmou a presença de um anel aromático *p*-dissubstituído.

Na região entre δ 24-36 foram observados seis sinais de carbonos sp^3 correspondendo à carbonos metilênicos. Os deslocamentos químicos nas regiões de δ 170,9 e δ 173,8 são característicos de carboxilas de amida ou éster.

A análise do espectro COSY (Apêndices 5-6) indicou correlações entre hidrogênios com deslocamentos em δ 6,60 (CH-5'; CH-3') e δ 7,30 (CH-2'; CH-6'), confirmando a presença de um anel aromático *p*-dissubstituído.

A análise do espectro HMBC (Apêndices 7-9) permitiu observar correlações entre os carbonos C-1', C-2'; C-3'; C-4', C-5' e C-6' com os hidrogênios em CH-2'; CH-3'; CH-5' e CH-6' δ com deslocamentos em δ 6,60 e δ 7,30 (Figura 20).

Figura 20 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

A análise do espectro COSY (Apêndices 5-6) indicou as correlações entre hidrogênios com deslocamentos em δ 1,29 e δ 1,52. Ainda se observou a correlação entre os hidrogênios em δ 1,52 com os hidrogênios em δ 2,21 e δ 2,28, indicando a presença de uma cadeia alquila.

A partir da análise do espectro HMBC (Apêndices 7-9) observou-se a correlação entre o carbono em δ 28,7 com os hidrogênios em δ 1,29; δ 1,52; δ 2,21 e δ 2,28. Além disso, o carbono em δ 28,7 apresentou correlação com os hidrogênios em δ 1,29; δ 1,52 e δ 2,28, o que indica que estes carbonos estão na parte central da cadeia alquila. Foram também observadas correlações entre os carbonos em δ 33,7 e δ 36,6 com os hidrogênios em δ 1,29 e δ 1,52, indicando que estes carbonos estão na parte final da cadeia. Além disso, o carbono em δ 24,8

apresentou correlação com os hidrogênios em δ 1,29 e δ 2,28 e o carbono em δ 25,5 apresentou correlação com os hidrogênios em δ 1,29 e δ 2,21 indicando que estes estão localizados na parte intermediária da cadeia alquila (Figura 21).

Figura 21 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

A análise do mapa de contorno dos experimentos HMBC (Apêndices 7-9) e COSY (Apêndices 5-6) permitiu observar as correlações entre o carbono em δ 131,4 com os hidrogênios em δ 6,6; 7,3 e δ 9,5. Esta correlação permitiu conectar o agrupamento do anel benzênico com a cadeia alifática.

O carbono de carbonila em δ 170,9, apresentou correlações com os hidrogênios em δ 1,5 e δ 2,2 indicando a ligação com a cadeia alquila e com o hidrogênio em δ 9,57 indicando ligação com o nitrogênio de amida. O hidrogênio em δ 9,5 apresenta correlações com os carbonos em δ 131,4 e 170,9 indicando a ligação entre o anel aromático e a cadeia alquila. Os valores de deslocamento químico apresentados, bem como, as correlações observadas indicam a presença de um nitrogênio na ligação entre o anel aromático e a cadeia alquila, sendo este nitrogênio ligado a um nitrogênio em δ 9,5 (Figura 22).

Figura 22 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

A partir de análises do espectro de HMBC (Apêndices 7-9) foram observadas correlações entre o carbono em δ 173,8 com os hidrogênios em δ 1,5 e δ 2,2, indicando ligação com uma cadeia alquila. Além disso, foi observado correlação entre o carbono em δ 173,8 e os hidrogênios de um grupo metila em δ 3,6. O sinal de hidrogênios em δ 3,6 foi observado como um singlete, com integração para três hidrogênios, confirmando a presença de uma metila. Os valores de deslocamento do hidrogênio δ 3,6 e de carbono δ 51,6 da metila indicaram substituição por oxigênio, indicando a presença de um éster metílico no composto (Figura 23).

Figura 23 - Correlações COSY e HMBC observadas para o éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

Após análises das correlações observadas por COSY, HMBC e HSQC (Apêndices 5-11) pôde-se sugerir a estrutura do composto **17** apresentada na Figura 24.

Figura 24 - Estrutura do éster metílico do ácido brotásico (**17**, fração CBM1C).

methyl 8-((4-hydroxyphenyl)amino)-8-oxooctanoate

Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (**17**, fração CBM1C).

Posição	δ^a	$\delta(J \text{ em Hz})^b$
1	173,8	-
2	33,7	2,28, t, (7,3)
3	24,8	1,52, m
4	28,7	1,29, m
5	28,8	1,29, m
6	25,5	1,52, m
7	36,6	2,21, t, (7,3)
8	170,9	-
9	51,6	3,60, s
1'	131,4	-
2'	121,3	7,30, dd (2,1; 6,7)
3'	115,4	6,60, dd (2,1; 6,7)
4'	153,5	-
5'	115,4	6,60, dd, (2,1; 6,7)
6'	121,3	7,30, dd, (2,1; 6,7)
-	-	9,57, s

^a $\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz, ^b $\text{DMSO}-d_6$ 600 MHz.

O composto éster metílico do ácido brotásico (**17**) foi enviado para os ensaios de atividade biológica e não apresentou toxicidade para células normais humanas de fibroblasto de

pulmão (GM07492A), linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7), linhagens de adenocarcinoma alveolares (A549) ou contra células tumorais gástricas (ACP01). Além disso, também não apresentou atividade de inibição do proteassomo, bem como, não apresentou atividade contra *T. cruzi* ou *Leishmania*.

4.2 Isolamento e identificação dos metabólitos do basidiomiceto *A. mayanensis*.

A análise dos metabólitos secundários produzidos pelo basidiomiceto *A. mayanensis* permitiu a identificação de metabólitos já relatados na literatura como derivados dos ácidos anacárdicos, isolados de plantas da família *Anacardiaceae*. No entanto, este é o primeiro isolamento a partir do basidiomiceto *A. mayanensis*, sendo estes com características diferenciadas da maior parte dos ácidos anacárdicos encontrados na natureza devido a presença de uma cadeia lateral com 17 carbonos.

4.2.1 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3)

Os dados dos espectros de massas e de absorções no UV obtidos para a fração CCM12B3 foram utilizados para a pesquisa na base de dados DNP e SciFinder. Análises de RMN uni e bidimensionais (Apêndices 12-20) foram realizadas para a elucidação estrutural e após comparação com a literatura verificou-se que o composto trata-se do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**) ou ácido-hidroxibenzóico-2-((8Z,11Z,14Z)-heptadeca-8,11,14-trien-1-il)-6 (Tabela 4), previamente isolado da plantas *Spondias mombin* (*Anacardiaceae*) (COATES *et al.*, 1994) (CORTHOUT *et al.*, 1994) e *Ginkgo biloba* (*Anacardiaceae*) (WANG *et al.*, 1998).

O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 25) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 369,2422$, que corresponde à fórmula molecular $C_{24}H_{34}O_3$, com IDH = 8. No espectro no UV foram observadas bandas de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 213,0$; 243,7 e 311,2 nm (Figura 26). O espectro de absorções no IV (Figura 27) apresentou absorções nos numeros de onda (cm^{-1}):

3800 cm^{-1} = banda larga atribuída ao estiramento OH,

2900 e 2850 cm^{-1} = atribuída ao estiramento C-H alifático,

1700 cm^{-1} = deformação axial de duplas ligações de C=O de ácidos carboxílicos,

1600 cm^{-1} = atribuída a deformação axial de C=C de alcenos,

1400 cm^{-1} = atribuído a dobramentos de grupos CH_2 e CH_3 .

Figura 25 - Espectro de massas de alta resolução (ESI-) do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3).

Figura 26 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3, 1 mg.mL⁻¹, MeOH).

Figura 27 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3, pastilha de sílica).

O espectro de RMN de ^1H da fração CCM12B3 (Apêndices 12-14), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndices 18-20), apresentou três sinais com deslocamento químico em δ 6,63, δ 6,58 e δ 7,08 atribuídos a hidrogênios ligados à anel aromático, um sinal em δ 5,32 atribuído a seis hidrogênios vinílicos; um sinal em δ 2,77 correspondente à dois hidrogênios metilênicos bis-alílicos, um sinal em δ 2,03 atribuído à dois hidrogênios metilênicos alílicos, um sinal em δ 2,69 atribuído à um hidrogênio metilênico alílico, um sinal em δ 1,48 correspondente à um hidrogênio metilênico, um sinal intenso em δ 1,26 correspondente à oito hidrogênios metilênicos e um sinal tripleto em δ 0,91 atribuído a hidrogênios de uma metila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 15) apresentou um sinal em δ 171,2 possivelmente de um carbono carboxílico; doze sinais na faixa de δ 114 – 160 eventualmente pertencentes à carbonos sp^2 . Ainda, foram observados dez sinais da faixa de δ 20 – 34 possivelmente de carbonos metilênicos e um sinal em δ 14,5 atribuído carbono de metila.

Análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em conjunto com espectros COSY (Apêndices 12-16) permitiram observar correlação entre os hidrogênios vicinais em δ 6,63 e δ 7,08, em δ 6,58 e δ 7,08 o que indicam a semiestrutura do anel aromático do tipo 1,2,3 – trissubstituído. No espectro HMBC foram observadas correlações carbono-hidrogênio entre os

sinais δ 171,2 e δ 6,63; δ 6,58, em δ 120,7 e δ 6,58; δ 6,63, em δ 158,8 e δ 7,08; δ 6,63, em δ 114,1 e δ 7,08; δ 6,58, em δ 130,4 e δ 6,58, em δ 120,2 e δ 7,08; δ 6,63, em δ 142,9 e δ 7,08; δ 6,58 (Figura 28).

Figura 28 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3).

No espectro COSY foram observadas correlações entre os hidrogênios δ 5,32 e δ 2,77; δ 2,03, δ 2,03 e δ 1,26; δ 0,91. Além de correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 14,5 e δ 2,03, δ 20,5 e δ 0,91; δ 5,32, δ 131,9 e δ 0,91; δ 2,77; δ 2,03, δ 128,4 e δ 5,32; δ 2,77; δ 2,03, δ 25,5 e δ 5,32, δ 128,4 e δ 5,32; δ 2,77, δ 26,6 e δ 5,32, δ 128,0 e δ 5,32; δ 2,77, δ 27,1 e δ 5,32; δ 1,26, δ 29,5 e δ 5,32; δ 2,03, que sugerem estrutura parcial apresentada na Figura 29.

Figura 29 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3).

A geometria *cis* para as três ligações olefinicas foi indicada em virtude da constante de acoplamento de $J = 6,09$ Hz entre os hidrogênios dos carbonos metilênicos bis-álílicos H-C10' e H-C13' (COATES *et al.*, 1994).

No espectro COSY foram observadas correlações entre os hidrogênios δ 2,03 e δ 1,26, δ 1,26 e δ 1,26; δ 1,48, δ 1,48 e δ 2, 69. Além de correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC entre os sinais em δ 29,5 e δ 5,32; δ 2,03, δ 29,5 e δ 1,26; δ 2,03, δ 29,2 e δ 1,26, δ 29,07 e δ 1,26; δ 1,48, δ 31,6 e δ 1,26; δ 2,69, δ 34,3 e δ 1,48; δ 1,26, δ 142,9 e δ 2,68; δ 1,48, δ 120,2 e δ 2,68, que sugeriram a estrutura parcial apresentada na Figura 30.

Figura 30 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3).

Figura 31 - Estrutura do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, Fração CCM12B3).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ (**18**, fração CCM12B3).

Posição	δ^a	δ^b	δ (J em Hz) ^c	δ (J em Hz) ^d
1	120,7	118,6	-	-
2	158,8	162,3	-	-
3	114,1	115,2	6,63, d (7,9)	6,65, dd, (1,0;7,9)
4	130,4	132,4	7,08, dd, (7,9; 8,1)	7,11, dd, (7,7; 7,9)
5	120,2	122,5	6,58, d, (8,1)	6,61, dd, (1,0; 7,7)
6	142,9	147,5	-	-
7	171,2	176,5	-	-
1'	34,3	36,4	2,69, t, (7,5)	3,02, t, (7,7)
2'	31,6	33,3	1,48, quinteto, (7,4)	1,58, m
3'	29,1	30,1	1,26, m	1,31, m
4'	29,2	30,8	1,26, m	1,31, m
5'	29,5	30,6	1,26, m	1,28, m
6'	29,5	30,4	1,26, m	1,26, m
7'	27,1	21,5	2,03, m	2,06, m
8'	130,7	132,7	5,32, m	5,36, m
9'	127,5	131,2	5,32, m	5,35, m
10'	25,6	26,4	2,77, t, (6,1)	2,79, m
11'	128,0	129,2	5,32, m	5,31, m
12'	128,4	129,2	5,32, m	5,31, m
13'	25,5	26,0	2,77, t, (6,1)	2,79, m
14'	129,4	128,7	5,32, m	5,30, m
15'	131,9	128,7	5,32, m	5,27, m
16'	20,5	28,2	2,03, m	2,07, m
17'	14,5	14,7	0,91, t, (7,6)	0,95, t, (7,5)

^aDMSO- d_6 , 150 MHz, ^bMeOH- d_4 , 100 MHz, ^cDMSO- d_6 600 MHz, ^dMeOH- d_4 400 MHz.

^{b-d}(COATES *et al.*, 1994).

4.2.2 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E)

A análise dos dados de massas, no UV e dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Apêndices 21-32) em comparação com os dicionários DNP e Scifinder possibilitaram identificação do composto **19** como sendo o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**) ou ácido-hidroxibenzóico-2-(pentadeca-10'(Z)-enil)-6 (Tabela 5), isolado previamente das plantas *Ozoroa mucronata* (Anacardiaceae) (KUBO *et al.*, 1987), *Knema laurina* (AKHTAR *et al.*, 2011) e *Ginkgo biloba* (VAN BEEK *et al.*, 2001).

O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 32) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 345,2419$, indicando fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_3$, com IDH igual a 6. No espectro no UV foram observadas bandas de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 218,9; 243,7$ e $311,2$ nm (Figura 33).

Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, CCM12B4E).

Figura 33 – Espectro no UV do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, CCM12B4E, 1 mg.mL⁻¹, MeOH).

O espectro de RMN de ^1H da fração CCM12B4E (Apêndices 21-23), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndices 30-32), apresentou três sinais com deslocamento químico em δ 6,62, δ 6,58 e δ 7,08 atribuídos a hidrogênios ligados a anel aromático; um sinal em δ 5,31 atribuído a hidrogênios vinílicos; dois sinais em δ 2,67 e δ 1,48 atribuídos a hidrogênios metilênicos, um sinal em δ 1,98 atribuídos a hidrogênios metilênicos vizinhos a hidrogênios vinílicos; um sinal intenso em δ 1,28 atribuído a hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 0,85 atribuído hidrogênio de metila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração CCM12B4E (Apêndice 24) apresentou um sinal em δ 170,4 atribuído a carbono de carbonila de ácido carboxílico; seis sinais entre δ 119,6 – 163,9 atribuídos a carbonos vinílicos de anel aromático; dois sinais em δ 129,5 e δ 129,6 atribuído a carbonos vinílicos; doze sinais entre δ 21,7 – 33,8 atribuído a carbonos metilênicos; um sinal em δ 13,8 atribuído a carbono de metila.

As correlações observadas nos espectros COSY e HMBC (Apêndices 25-32) são apresentadas na Figura 34 e 35.

Figura 34 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

Figura 35 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

A geometria *cis* para a ligações olefinicas foi indicada em virtude da constante de acoplamento entre os hidrogênios dos carbonos metilênicos H-C9' e H-C12' com $J = 5,6; 5,9$ Hz, característica para ligações *cis* (COATES *et al.*, 1994; LEVY, 1974).

A posição da ligação dupla foi proposta com base nas correlações observadas entre o hidrogênio em δ 0,85 e δ 1,28; δ 1,98 e das correlações dos carbonos em δ 21,7 e δ 1,98; δ 1,28; δ 0,85, δ 26,3 e δ 0,85; δ 1,28; δ 5,31, δ 31,3 e δ 1,98; δ 1,28; δ 0,85, δ 13,8 e δ 1,28, sugerindo a semiestrutura apresentada na Figura 36.

Figura 36 - Correlações HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

A partir das correlações observados no espectro HMBC entre os sinais em δ 33,8 e δ 6,58, δ 120,3 e δ 2,67, δ 143,4 e δ 2,27 foi possível conectar a cadeia alifática com o anel aromático 1,2,3-trissubstituído (Figuras 37-38).

Figura 37 - Correlações HMBC observadas para o ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

Figura 38 - Estrutura do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (15:1) Δ^{10} (**19**, fração CCM12B4E).

Posição	δ^a	δ^b	δ (J em Hz) ^c	δ (J em Hz) ^d
1	119,6	110,4	-	-
2	163,9	163,6	-	-
3	113,6	122,8	6,62, d, (8,0)	6,76
4	130,2	135,5	7,08, dd, (8,0; 7,3)	7,35
5	120,3	115,9	6,58, d, (7,3)	6,86
6	143,4	147,9	-	-
7	170,4	176,4	-	-
1'	33,8	36,5	2,67, t, (7,1)	2,97, t, (8,0)
2'	31,2	26,9-31,8	1,48, quinteto, (7,3)	1,59, m
3'	28,9	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
4'	28,5	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
5'	29,1	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
6'	29,1	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
7'	29,1	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
8'	28,8	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
9'	26,5	26,9-31,8	1,98, dt, (5,6; 5,9)	2,0, m
10'	129,5	130,0	5,31, m	5,33, m
11'	129,6	129,9	5,31, m	5,33, m
12'	26,3	26,9-31,8	1,98, dt, (5,6; 5,9)	2,0, m
13'	31,3	26,9-31,8	1,28, m	1,27, m
14'	21,7	22,4	1,28, m	1,27, m
15'	13,8	14,0	0,85, t, (6,5)	0,88, t, (6,4)

^a - DMSO- d_6 , 150 MHz, ^b - CDCl₃- d , 50 MHz, ^c - DMSO- d_6 600 MHz, ^d - CDCl₃- d 200 MHz.

^{b-d} (VAN BEEK *et al.*, 2001)

4.2.3 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5)

Os dados dos espectros de massas e no UV obtidos para a fração CCM12B5 foram utilizados para a pesquisa na base de dados DNP e SciFinder. Análises de RMN uni e bidimensionais (Apêndices 33-41), derivatização com dimetil dissulfeto (DMS) e análises por GC-MS foram realizadas para a elucidação estrutural do composto **20**. Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o composto **20** é o ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$, ácido pelandjuaico ou ácido 6-(8'Z,11'Z-heptadecadienil)-salicílico (Tabela 6), previamente isolado da planta *Spondias mombin* (CORTHOUT *et al.*, 1994).

No espectro no UV foram observadas bandas de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 243,7$ e $311,2$ nm (Figura 39). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 40) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 371,2585$, que corresponde a fórmula molecular $C_{24}H_{36}O_3$, com IDH igual a 7. O espectro de absorções no IV (Figura 41) apresentou absorções nos números de onda (cm^{-1}):

3500 cm^{-1} = banda larga atribuída ao estiramento OH,

2900 e 2850 cm^{-1} = atribuída ao estiramento C-H alifático,

1700 cm^{-1} = deformação axial de duplas ligações C=O de ácidos carboxílicos,

1600 cm^{-1} = atribuída à deformação axial de C=C de alcenos,

1450 cm^{-1} = atribuído a dobramentos de grupos CH_2 e CH_3

Figura 39 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5, 1 mg.mL^{-1} , MeOH).

Figura 40 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, CCM12B5).

Figura 41 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5, pastilha de sílica).

O espectro de RMN de ^1H da fração CCM12B5 (Apêndice 33), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndices 39-41), apresentou três sinais com deslocamento químico em δ 6,69, δ 6,65 e δ 7,13 atribuídos a hidrogênios ligados a anel aromático; um sinal em δ 5,31 atribuído a hidrogênios vinílicos; dois sinais em δ 2,54 e δ 1,49 atribuídos a hidrogênios metilênicos, um sinal em δ 2,0 atribuídos a hidrogênios metilênicos vizinhos a hidrogênios vinílicos; um sinal intenso em δ 1,28 foi atribuído à hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 0,84 atribuído hidrogênio de metila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração CCM12B5 (Apêndice 34) apresentou um sinal em δ 170,7 atribuído a carbono de carbonila de ácido carboxílico; seis sinais entre δ 113,9 – 156,4 atribuídos a carbonos vinílicos de anel aromático; dois sinais intensos em δ 128,1 e 130,0 atribuídos a quatro carbonos vinílicos; doze sinais entre δ 22,3 – 33,9 atribuídos a carbonos metilênicos; um sinal em δ 14,3 atribuído a carbono de metila de fim de cadeia.

Correlações observadas nos espectros COSY e HMBC (Apêndices 35-41) são apresentadas na Figura 42.

Figura 42 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

A posição da ligação dupla não pôde ser identificada por espectroscopia de RMN. Vários trabalhos propõem a identificação de duplas ligações em cadeia alifática através da derivatização com dimetil dissulfeto (DMDS) e análises por GC-MS (FRANCIS, 1981; SCRIBE *et al.*, 1988). De acordo com SHIBAMOTO *et al.* (2016) o método de adição de dimetil dissulfeto é um dos métodos mais convenientes e eficazes para determinar a posição de duplas ligações em ácidos graxos insaturados, aliado à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (SHIBAMOTO *et al.*, 2016).

A análise do composto CCM12B5 por GC-MS após derivatização com DMDS possibilitou a identificação de íons característicos de alta intensidade indicando a posição em que ocorreu a quebra da dupla ligação.

No espectro de fragmentação do composto CCM12B5 m/z 372,25 (Figura 43) verificou-se a presença do íon molecular m/z 559, que corresponde ao composto CCM12B5 com o acréscimo de 188 Da, após a adição de 2x $\text{CH}_3\text{S}_2\text{CH}_3$. Análises por GC-MS indicaram que as quebras ocorrem preferencialmente na ligação C-C que contém os substituintes SCH_3 , originando o fragmento majoritário m/z 251. Além disso, são observados os íons de média intensidade m/z 325 e m/z 191 onde possivelmente ocorreram as quebras, indicando a posição da dupla ligação.

Figura 43 - Espectro de massas GC-MS do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

Segundo SHIBAMOTO *et al.*, em compostos onde a posição das duplas ligações estão próximas, interrompidas apenas por um metileno, o DMDS é adicionado em apenas uma ligação dupla aleatoriamente, fenômeno possivelmente explicado pelo impedimento estérico do grupo SCH_3 (SHIBAMOTO *et al.*, 2016). Estudos realizados com compostos com duplas ligações suficientemente distantes (quatro carbonos ou mais) pode ocorrer adição de DMDS nas duas posições (SCRIBE *et al.*, 1988).

No presente trabalho, verificou-se que após derivatização com DMDS e análises por GC-MS ocorreu à adição nas duas duplas ligações (Figura 44).

Figura 44 - Proposta de fragmentação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5) por análises por GC-MS.

Uma das possíveis explicações para a adição do DMDS nas duplas ligações interrompidas apenas por um metileno seria o fato do tempo utilizado para a reação de derivatização (24 h), de acordo com metodologia descrita na literatura (ATTYGALLE *et al.*, 1993; FRANCIS *et al.*, 1987), diferentemente do tempo utilizado por SHIBAMOTO *et al.*, (2016) que foi de apenas 20 min. Outro fato é a configuração das duplas em posição *cis*, podendo ocorrer um deslocamento de aproximadamente 30° na cadeia alifática, reduzindo o impedimento estérico e possibilitando a adição nas duas duplas (Figura 45) (SHIBAMOTO *et al.*, 2016).

Figura 45 – Possível conformação do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

Figura 46 - Estrutura do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

Posição	δ^a	δ^b	δ (J em Hz) ^c	δ (J em Hz) ^d
1	120,3	110,3	-	-
2	156,4	163,6	-	-
3	113,9	115,8	6,69, dd, (1,0; 8,1)	6,86, d, (8,3)
4	130,8	135,4	7,13, dd, (7,5; 8,1)	7,35, dd, (8,3; 6,6)
5	120,9	122,7	6,65, dd, (0,8; 7,5)	6,76, d (6,6)
6	141,9	147,7	-	-
7	170,7	176,1	-	-
1'	33,9	36,4	2,59, t, (6,6; 8,8)	-
2'	31,4	31,9	1,49, quinteto, (7,4)	-
3'	29,4	29,3-29,6	1,25, m	-
4'	29,4	29,3-29,6	1,25, m	-
5'	29,1	29,3-29,6	1,25, m	-
6'	29,1	29,3-29,6	1,25, m	-
7'	26,9	27,2	2,0, dt, (6,7; 6,7)	2,03, m
8'	130,1	130,1	5,31, m	5,34, m
9'	128,1	127,9	5,31, m	5,34, m
10'	25,6	25,6	2,72, t, (6,1)	2,78, m
11'	128,1	127,9	5,31, m	5,34, m
12'	130,1	130,1	5,31, m	5,34, m
13'	26,9	27,2	2,0, dt, (6,7; 6,7)	2,03, m
14'	28,9	29,3	1,25, m	-
15'	31,3	31,5	1,25, m	-
16'	22,3	22,5	1,25, m	-
17'	14,3	14,0	0,84, t, (6,9)	0,88, t, (7,6)

^aDMSO- d_6 , 50,10 MHz, ^bCDCl₃- d , 100 MHz, ^cDMSO- d_6 600 MHz, ^dCDCl₃- d 199,50 MHz.

^{b-d}(CORTHOUT *et al.*, 1994).

4.2.4 Isolamento e identificação do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7)

Os dados dos espectros de massas e de absorções no UV obtidos para a fração CCM12B7 foram utilizados para a pesquisa na base de dados DNP e SciFinder. Análises de RMN uni e bidimensionais (Apêndices 42-50), derivatização com DMDS (dimetil dissulfeto) e análises por GC-MS foram realizadas para a elucidação estrutural. Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o composto **21** é o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 ou ácido hidroxibenzóico-(Z)-2-(heptadec-10-en-1-il)-6 (Tabela 7) previamente isolado da planta *Gingko biloba* (IRIE *et al.*, 1996) do basidiomiceto *Lenzites betulina* (LIU *et al.*, 2014).

O espectro no UV apresentou bandas de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 220,1; 243,7$ e $311,2$ nm (Figura 47). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 48) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 373,2731$, indicando a fórmula molecular $C_{24}H_{38}O_3$, com IDH igual a 6. O espectro de absorções no IV (Figura 49) apresentou absorções nos números de onda (cm^{-1}):

2900 e 2850 cm^{-1} = atribuída ao estiramento C-H alifático,

1700 cm^{-1} = deformação axial de duplas ligações C=O de ácidos carboxílicos,

1600 cm^{-1} = atribuída a deformação axial de C=C de alcenos,

1480 cm^{-1} = atribuído a dobramentos de grupos CH_2 e CH_3 .

Figura 47 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7, 1 mg.mL^{-1} , MeOH).

Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Figura 49 - Espectro no IV do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7, pastilha de sílica).

O espectro de RMN de ^1H da fração CCM12B7 (Apêndice 42), analisado em conjunto com o espectro HSQC (Apêndice 48-50), apresentou três sinais com deslocamento químico em δ 6,64, δ 6,68 e δ 7,12 atribuídos à hidrogênios ligados à anel aromático; um sinal em δ 5,31 atribuído à hidrogênios vinílicos; dois sinais em δ 2,62 e δ 1,49 atribuídos à hidrogênios metilênicos, um sinal em δ 1,98 atribuídos à hidrogênios metilênicos vizinhos à hidrogênios vinílicos; um sinal intenso em δ 1,28 atribuído à hidrogênios metilênicos; um sinal em δ 0,84 atribuído à hidrogênio de metila.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração CCM12B7 (Apêndice 43) apresentou um sinal em δ 170,8 atribuído à carbono de carbonila de ácido carboxílico; seis sinais entre δ 113,9 – 156,9 atribuídos à carbonos vinílicos de anel aromático; um sinal intenso em δ 130,0 atribuído à dois carbonos vinílicos; quatorze sinais entre δ 22,5 – 34,0 atribuídos à carbonos metilênicos; um sinal em δ 14,3 atribuído à carbono de metila.

As correlações observadas nos espectros COSY e HMBC (Apêndices 44-50) são apresentadas na Figura 50.

Figura 50 - Correlações COSY e HMBC observadas para o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

A posição da ligação dupla não pôde ser identificada por espectroscopia de RMN. Sendo assim, foi realizada a derivatização com DMDS e análises por GC-MS que possibilitaram a identificação de íons característicos de alta intensidade indicando a posição em que ocorreu a quebra da dupla ligação.

O espectro de fragmentação do composto CCM12B7 m/z 374,27 (Figura 51) apresentou o íon molecular m/z 424 sendo o composto **21** com adição de 94 Da, referente a tiometilação com $\text{CH}_3\text{S}_2\text{CH}_3$ e a perda de 44 Da devido à descarboxiação do anel aromático. Em análises por GC-MS as quebras ocorrem preferencialmente nas ligações C-C contendo os substituintes SCH_3 , ocasionando a formação de dois fragmentos intensos. Neste caso são observados os íons

de alta intensidade m/z 251 e m/z 173 referentes a posição onde ocorreu quebra da ligação, além do íon m/z 107 representando uma quebra próxima ao fenol. A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 52.

Figura 51 - Espectro de massas GC-MS do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Figura 52 – Proposta de fragmentação (GC-MS) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) do ácido anacárdico (17:2) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Posição	δ^a	δ^b	δ (J em Hz) ^c	δ (J em Hz) ^d
---------	------------	------------	---------------------------------	---------------------------------

1	120,8	122,70		
2	156,9	163,461	-	-
3	113,9	110,55	6,68, dd, (8,2; 1,0)	6,88, dd, (7,3; 1,0)
4	130,8	135,24	7,12, dd, (7,6; 8,2)	7,36, t, (7,3)
5	120,2	115,70	6,64, dd, (7,6; 1,0)	6,78, dd, (7,3; 1,0)
6	142,2	147,75	-	-
7	170,8	176,19	-	-
1'	34,0	36,41	2,62, t, (7,7)	3,0, t, (7,6)
2'	31,6	31,92	1,49, quinteto, (7,3)	1,61, quinteto, (7,6)
3'	29,5	29,79	1,24, m	1,30, m
4'	29,5	29,64	1,24, m	1,30, m
5'	29,1	29,54	1,24, m	1,30, m
6'	28,9	27,08	1,24, m	1,30, m
7'	26,9	29,74	1,98, dt, (6,1; 6,2)	2,03, m
8'	130,0	129,74	5,31, m	5,36, m
9'	130,0	129,84	5,31, m	5,36, m
10'	26,9	29,74	1,98, dt, (6,1; 6,2)	2,03, m
11'	28,9	26,92	1,24, m	1,30, m
12'	29,1	29,61	1,24, m	1,30, m
13'	29,4	29,47	1,24, m	1,30, m
14'	29,2	29,28-	1,24, m	1,30, m
15'	31,4	31,92	1,24, m	1,30, m
16'	22,5	22,45	1,24, m	1,30, m
17'	14,3	14,01	0,84, t, (7,0)	0,92, t (7,0)

^aDMSO-*d*₆, 150 MHz, ^bCDCl₃-*d*, 60 MHz, ^cDMSO-*d*₆ 600 MHz, ^dCDCl₃-*d* 270 MHz.

^{b-d}(IRIE *et al.*, 1996)

Figura 53 - Estrutura do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

4.2.5 Identificação do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8)

Os dados dos espectros de massas e de absorções no UV obtidos para a fração CCM12B8 foram utilizados para a pesquisa na base de dados DNP e SciFinder. A quantidade de composto isolada não foi suficiente para a obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . No, entanto, o espectro de massas de alta resolução no modo negativo apresentou o íon desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^- = 375,2883$, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_3$, com IDH igual a 5. Análises da fragmentação do íon $[\text{M}-\text{H}]^- = 375,2883$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **22** como sendo o ácido anacárdico (17:0) (Figura 54).

Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o ácido anacárdico (17:0) ou ácido-6-hidroxibenzóico-2-heptadecil foi previamente isolado da planta *Ginkgo biloba* (IRIE *et al.*, 1996) do basidiomiceto *Lenzites betulina* (LIU *et al.*, 2014).

No espectro no UV foram observadas bandas de absorção nos comprimentos de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 210,7$; 243,7 e 311,2 (Figura 55). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 56) apresentou o íon desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^- = 375,2883$.

Figura 54 - Estrutura do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8).

Figura 55 - Espectro no UV do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8, 1 mg.mL⁻¹, MeOH).

Figura 56 - Espectro de massas de alta resolução (ESI) do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 375,28, pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (17:0) (Figuras 57-58). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida ocorre uma perda de CH_3CH_2 além da perda de um hidrogênio ocorrendo a formação da ligação dupla (30 Da). Em seguida, ocorrem perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,04). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 59.

Figura 57 - Espectro de fragmentação MS/MS para o íon m/z 375,29 (20 eV) do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8).

Figura 58 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 375,29 (40 eV) do ácido anacárdico (17:0) (**22**, fração CCM12B8).

Figura 59 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:0) (ESI⁻) (**22**, fração CCM12B8).

4.2.6 Identificação do ácido anacárdico (15:0) (**23**, fração CCM12B8)

Após análise da fração CCM12B8 por UPLC-QToF-MS (ESI⁻), verificou-se o íon desprotonado $[M-H]^- = 347,2579$, indicando a fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_3$ com IDH igual a 5. Análises da fragmentação do íon $[M-H]^- = 347,2579$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **23** como sendo o ácido anacárdico (15:0) (Figura 60).

Figura 60 - Estrutura do ácido anacárdico (15:0) (**23**, fração CCM12B8).

Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o ácido anacárdico (15:0) ou ácido-2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico foi previamente isolado da planta *Ozoroa mucronata* (KUBO et al., 1987) e da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) (HIMEJIMA et al., 1991). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 61) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 347.2579$

Figura 61 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁻) do ácido anacárdico (15:0) (**23**, fração CCM12B8).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 347,25 pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (15:0) (Figuras 62-63). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida ocorre uma perda de CH_3CH_2 além da perda de um hidrogênio ocorrendo a formação da ligação dupla (30 Da). Em seguida, ocorrem perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,04). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 64.

Figura 62 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 371,26 (40 eV) do ácido anacárdico (15:0) (**23**, fração CCM12B8).

Figura 63 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 371,26 (40 eV) do ácido anacárdico (15:0) (**23**, fração CCM12B8).

Figura 64 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:0) (ESI⁻) (**23**, fração CCM12B8).

4.2.7 Identificação do ácido anacárdico (14:0) (**24**, fração CCM12B5)

Após análise da fração CCM12B5 por UPLC-QToF-MS (ESI⁻), verificou-se o íon desprotonado $[M-H]^- = 333,2419$, indicando a fórmula molecular $C_{21}H_{34}O_3$ com IDH igual a 5. Análises da fragmentação do íon $[M-H]^- = 333,2419$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **24** como sendo o ácido anacárdico (14:0) (Figura 65).

Figura 65 - Estrutura do ácido anacárdico (14:0) (**24**, fração CCM12B5).

Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o ácido anacárdico (14:0), ácido-2-hidroxi-6-pentadecil benzoico ou ácido hidroginkgolínico, foi previamente isolado da planta *Ginkgo biloba* (FENG-YOUNG *et al.*, 1962). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 66) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 333,2419$.

Figura 66 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁻) do ácido anacárdico (14:0) (**24**, fração CCM12B5).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 333,2419, pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (14:0) (Figuras 67 e 68). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida ocorre uma perda de CH_3 além da perda de um hidrogênio ocorrendo a formação da ligação dupla (16 Da). Em seguida, ocorrem perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,0412). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 69.

Figura 67 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 333.21 (40 eV) do ácido anacárdico (14:0) (**24**, fração CCM12B5).

Figura 68 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 333,21 (40 eV) do ácido anacárdico (14:0) (**24**, fração CCM12B5).

Figura 69 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (14:0) (ESI⁻) (**24**, fração CCM12B5).

4.2.8 Identificação do ácido anacárdico (13:0) (**25**, fração CCM12B3)

Após análise da fração CCM12B3 por UPLC-QToF-MS (ESI⁻), verificou-se o íon desprotonado $[M-H]^- = 319,2291$, indicando a fórmula molecular C₂₀H₃₂O₃ com IDH igual a 5. Análises da fragmentação do íon $[M-H]^- = 319,2291$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **25** como sendo o ácido anacárdico (13:0) (Figura 70).

Figura 70 - Estrutura do ácido anacárdico (13:0) (**25**, fração CCM12B3).

Após consulta e comparação da literatura verificou-se que o ácido anacárdico (13:0) ou ácido-2-hidroxi-6-tridecil-benzóico foi previamente isolado da planta *Kneama elegans* (SPENCER et al., 1980) e da planta *Ginkgo biloba* (ITOKAWA et al., 1987). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 71) apresentou o íon $[M-H]^- = 319,2291$.

Figura 71 - Espectro de massas de alta resolução (ESI-) do ácido anacárdico (13:0) (**25**, fração CCM12B3).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 319,2291, pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (13:0) (Figura 72). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida ocorre uma perda de CH_3 além da perda de um hidrogênio ocorrendo a formação da ligação dupla (16 Da). Em seguida, ocorrem perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,04). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 73.

Figura 72 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 319,18 (40 eV) do ácido anacárdico (13:0) (**25**, fração CCM12B3).

Figura 73 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (13:0) (ESI) (**25**, fração CCM12B3).

4.2.9 Identificação de derivados dos ácidos anacárdicos insaturados por UPLC-QToF-MS/MS

Após a identificação das posições das duplas ligações por derivatização com DMDS e análise por GC-MS dos compostos CCM12B5 $\Delta^{8,11}$ (4.2.3) e CCM12B7 Δ^8 (4.2.4), os mesmos compostos foram analisados por UPLC-QToF-MS/MS com a intenção de se verificar alguma relação entre a fragmentação e a posição das duplas ligações.

A partir do espectro de fragmentação MS/MS do composto CCM12B5 (17:2) $\Delta^{8,11}$ com seleção do íon m/z 371,2585 (Figura 74), verificou-se inicialmente uma perda neutra de CO_2 (44 Da), seguida de uma perda de CH_3CH (29 Da), outra perda de CH_3H (16 Da), além das perdas consecutivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática. No entanto, os fragmentos m/z 257,1900 e m/z 217,1572 foram os únicos que sofreram uma perda de C (12 Da), indicando a posição exata da ligação dupla apenas por análises de MS/MS. Sendo assim, pode-se confirmar a presença de fragmentos característicos que indicam a posição exata da dupla ligação. A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 75.

Figura 74 - Espectro de fragmentação ampliado MS/MS íon m/z 371,2585 (40 eV) do ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**, fração CCM12B5).

Figura 75 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (ESI⁻) (20, fração CCM12B5).

A análise por UPLC-QToF-MS/MS do composto CCM12B7 (17:1) Δ^8 selecionando o íon m/z 373,2731, mostrou o mesmo comportamento em sua fragmentação, como é ilustrado nas Figuras 76-78.

A partir do espectro de fragmentação MS/MS do composto CCM12B7 (17:1) Δ^8 com seleção do íon m/z 373,2731 (Figura 77), verificou-se inicialmente uma perda neutra de CO₂ (44 Da), seguida de perdas consecutivas de CH₂ (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 161.0960). No entanto, o fragmento m/z 217,1595 foi o único que sofreu uma perda de C (12 Da), indicando a posição exata da dupla ligação. A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 78.

Figura 76 - Espectro de fragmentação MS/MS íon m/z 373,2731 (40 eV) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Figura 77 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 373,24 (40 eV) do ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Figura 78 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**, fração CCM12B7).

Dessa maneira, o presente trabalho propõe um método rápido para a identificação de duplas ligações em cadeias insaturadas de ácidos anacárdicos, válida para cadeias alifáticas insaturadas em geral, sem a necessidade de derivatização química e análises por GC-MS, sendo até mesmo possível a análise de amostras em misturas por UPLC-QToF-MS/MS. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos que relatam a identificação da posição de duplas ligações em longas cadeias insaturadas apenas por análises de MS/MS.

Outras frações foram analisadas por UPLC-QToF-MS para a detecção e identificação de derivados minoritários dos ácidos anacárdicos.

4.2.9.1 Identificação do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (**26**, fração CCM12B3)

Após análise da fração CCM12B3 por UPLC-QToF-MS (ESI⁻), verificou-se o íon desprotonado $[M-H]^- = 343,2273$, indicando a fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_3$ com IDH igual a 7.

Análises da fragmentação do íon $[M-H]^- = 343,2273$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **26** como sendo o ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (Figura 79).

Figura 79 - Estrutura do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (**26**, fração CCM12B3).

Após consulta e comparação com a literatura verificou-se que o ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$, ou ácido-benzoico 2-hidroxi-6-((8Z,11Z)-pentadeca-8,11-dien-1-il) já havia sido isolado a partir da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) (KUBO et al., 1986) (HIMEJIMA et al., 1991). O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 80) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 343,2273$.

Figura 80 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁻) do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (**26**, fração CCM12B3).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 343,2273, pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (Figura 81). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida outra perda de CH_3CH_2 além da perda de um hidrogênio ocorrendo à formação da ligação dupla (30 Da). Posteriormente, ocorrem duas perdas de C (12 Da), indicando as posições das duplas ligações e então perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,0420). A proposta de fragmentação é apresentada na Figura 82.

Figura 81 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 343,19 (40 eV) do ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (**26**, fração CCM12B3).

Figura 82 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:2) $\Delta^{8,11}$ (**26**, fração CCM12B3).

4.2.9.2 Identificação do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (**27**, fração CCM12B8)

Após análise da fração CCM12B8 por UPLC-QToF-MS (ESI), verificou-se o íon desprotonado $[M-H]^- = 319,2291$, indicando a fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_3$ com IDH igual a 6. Análises da fragmentação do íon $[M-H]^- = 319,2291$ por UPLC-QToF-MS/MS confirmaram a identificação do composto **27** como sendo o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (Figura 83).

Figura 83 - Estrutura do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (**27**, fração CCM12B8).

Após consulta e comparação com dados da literatura verificou-se que o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 , ou ácido-benzoico-(Z)-2-hidroxi-6-(pentadec-9-en-1-il) ainda não foi relatado na literatura. O espectro de massas de alta resolução no modo negativo (Figura 84) apresentou o íon desprotonado $[M-H]^- = 345,2428$.

Figura 84 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁻) do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (27, fração CCM12B8).

A partir de análises por UPLC-QToF-MS/MS com seleção do íon m/z 345,2428, pôde ser observado o padrão de fragmentação do ácido anacárdico (15:2) Δ^9 (Figura 85). Inicialmente ocorre uma perda neutra de CO_2 (44 Da), em seguida ocorre uma perda de CH_3CH_2 além da perda de um hidrogênio ocorrendo a formação da ligação dupla (30 Da). Posteriormente, ocorre uma perda de C (12 Da) indicando a posição da ligação dupla e então perdas sucessivas de CH_2 (14 Da) até o final da cadeia alifática (m/z 106,0420). Sendo a proposta de fragmentação é apresentada na Figura 86.

Figura 85 - Espectro ampliado de fragmentação MS/MS íon m/z 345,2428 (40 eV) do ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (**27**, fração CCM12B3).

Figura 86 - Proposta de fragmentação para o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (**27**, fração CCM12B3).

A Tabela 8 apresenta os derivados de ácidos anacárdicos isolados e identificados no presente trabalho. Foi realizado o isolamento de quatro derivados dos ácidos anacárdicos e por meio da análise de MS/MS foram identificados seis compostos, sendo o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 ainda não relatado na literatura. Além disso, este é o primeiro relato sobre a identificação da posição de duplas ligações em cadeias carbônicas saturadas utilizando apenas análises de fragmentação por MS/MS.

Tabela 8 - Derivados dos ácidos anacárdicos detectados nas frações CCM12 obtidas do fracionamento do extrato metanólico do basidomiceto *A. mayanensis*.

Fração (Composto)	(Cad. Lat.:Insat.) Posição dupla ligação	Quantidade isolada (mg)	m/z experimental [M-H] ⁻	m/z teórico [M-H] ⁻	Diferença de massa (mDa)
Compostos identificados por RMN, derivatização química e GC-MS, e UPLC-QToF-MS/MS					
CCM12B3 (18)	(17:3) $\Delta^{8,11,14}$	1,5	369,2421	369,2435	1,4
CCM12B5 (20)	(17:2) $\Delta^{8,11}$	24,7	371,2585	371,2592	0,7
CCM12B7 (21)	(17:1) Δ^8	9,3	373,2731	373,2748	1,7
CCM12B4E(19)	(15:1) Δ^{10}	2,8	345,2419	345,2435	1,6
Compostos minoritários detectados e identificados por UPLC-QToF-MS/MS					
CCM12B8 (22)	(17:0)	*	375,2892	375,2905	1,3
CCM12B3 (26)	(15:2) $\Delta^{8,11}$	*	343,2273	343,2279	0,6
CCM12B8 (27)	(15:1) Δ^9	*	345,2428	345,2435	0,7
CCM12B8 (23)	(15:0)	*	347,2570	347,2592	2,2
CCM12B5 (24)	(14:0)	*	333,2419	333,2435	1,6
CCM12B3 (25)	(13:0)	*	319,2291	319,2279	1,2

* Compostos apenas identificados.

4.2.10 Ácidos anacárdicos

Os ácidos anacárdicos são constituídos pelo ácido salicílico substituído na posição seis por uma cadeia alquílica saturada ou insaturada. Essa classe de compostos foi isolada a partir de várias plantas da família *Anacardiaceae*. São comumente encontrados na casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*) (GELLERMAN *et al.*, 1968), bem como nas plantas *Ginkgo Biloba* (ITOKAWA *et al.*, 1987), *Spondias mombim* (CORTHOUT *et al.*, 1994), *Pelargonium* (SCHULTZ *et al.*, 2000), *Ozoroa mucronata* (KUBO *et al.*, 1987), *Knema laurina* (AKHTAR *et al.*, 2011) e *Amphipterygium adstringens* (RIVERO-CRUZ *et al.*, 2011). Também foram encontrados em própolis produzida por *Apis melífera* (SILVA *et al.*, 2008) e nos basidiomicetos *Merulius tremellosus*, *Phlebia radiata* e *Lenzites betulina* (GIANNETTI *et al.*, 1978; LIU *et al.*, 2014).

A biossíntese dos ácidos anacárdicos pode ocorrer a partir de ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados ω -5, C₁₆ e C₁₈, por alongamento da cadeia através da adição de de três grupos acetato, que então sofrem redução parcial e desidratação, seguido por condensação aldólica intramolecular formando o anel aromático de uma forma semelhante à proposta de biossíntese do ácido salicílico (WALTERS *et al.*, 1990) (Figura 87).

Figura 87 - Proposta de biossíntese para os ácidos anacárdicos.

Fonte: Adaptado de Walters *et al.*, 1990

Os ácidos anacárdicos são utilizados em várias partes do mundo na medicina popular a partir das partes de plantas da família *Anacardiaceae*. Por exemplo, a partir da fruta, do suco, do óleo, da semente e das folhas de cajueiro. São relatados como remédios populares para gengivite, malária, úlcera, calos, verrugas, queimaduras, asma, resfriados e repelente (DUKE, 1983).

Os primeiros trabalhos publicados sobre os ácidos anacárdicos foram realizados por EICHBAUM em 1946 relatando a sua atividade vermícida (EICHBAUM, 1946) e por LAMBERTON e GELLERMAN e seus colaboradores em 1959 e 1969, respectivamente, sobre o isolamento e elucidação estrutural dos compostos a partir de plantas da família *Anacardiaceae* (GELLERMAN *et al.*, 1968; LAMBERTON, 1959).

Em 1969, GELLERMAN *et al.* relataram sua atividade antibiótica mostrando uma melhor atividade contra bactérias Gram-positivas. Para bactérias Gram-negativas, a sensibilidade pode ser ampliada com o aumento das insaturações na cadeia alifática (GELLERMAN *et al.*, 1969). Desde então, vários trabalhos foram publicados sobre a atividade antibiótica, sendo verificado que o tamanho da cadeia e o número de insaturações são fundamentais para o aumento ou decréscimo da atividade (HAMAD *et al.*, 2015).

Para melhor explicar os dados seguintes será utilizada a forma (X:Y), onde X representa o tamanho da cadeia alquílica e o Y representa o número de insaturações. No estudo realizado por KUBO *et al.*, (1999) contra a bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori* considerada responsável pela gastrite, observou-se que a atividade é aumentada gradualmente com a diminuição do tamanho da cadeia, sendo o ácido anacárdico (12:0) foi o que apresentou maior atividade, enquanto que o ácido anacárdico (15:0) não apresentou atividade. Observou-se que a atividade aumenta gradativamente com grau de insaturações da cadeia alquílica, do menos ativo (15:0) < (15:1) < (15:2) < (15:3) ao mais ativo, fato possivelmente explicado pela inclinação de aproximadamente 30° na cadeia lateral de hidrocarbonetos impostas pela configuração *cis* na dupla ligação, já que para os compostos (15:3) e (15:2) ocorre maior inclinação diminuindo o comprimento relativo da cadeia (KUBO *et al.*, 1999).

Em outro estudo realizado por HIMEJIMA *et al.* contra bactérias Gram-positivas, verificou-se que o aumento de atividade é diferente das encontradas para bactérias Gram-negativas. No estudo com a bactéria *Propionibacterium acnes* verificou-se que o aumento da atividade diminui com o grau de insaturações, sendo assim, o ácido anacárdico (15:0) apresentou a maior atividade, enquanto que, o ácido anacárdico (15:3) foi o menos ativo. A partir disso, pôde-se concluir que a relação estrutura-atividade depende da bactéria em estudo (HIMEJIMA *et al.*, 1991).

Em 2003 no estudo realizado por KUBO *et al.* os ácidos anacárdicos foram testados contra a bactéria *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) sendo observado que a atividade antibacteriana foi significativamente ampliada com a combinação da meticilina com o ácido anacárdico (12:0), possivelmente podendo-se utilizar os ácidos anacárdicos como um coadjuvante. Verificou-se que o aumento de atividade está diretamente relacionado com o aumento de insaturações (KUBO *et al.*, 2003).

Os ácidos anacárdicos mostram-se promissores não só na atividade antibacteriana, mas em vários outros estudos, nos quais observou-se atividade antitumoral moderada contra células de carcinoma de mama BT-20 (KUBO *et al.*, 1993), e atividade de inibição da prostaglandina sintase (KUBO *et al.*, 1987). Também observou-se a ação antioxidante na inibição da lipoxigenase e da prostaglandina peróxido-sintase (GRAZZINI *et al.*, 1991), potente atividade moluscicida contra o caracol *Biomphalaria glabrata* (CORTHOUT *et al.*, 1994), e atividade contra o besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) podendo ser utilizado como *spray* químico para a proteção de plantas (SCHULTZ *et al.*, 2006).

Outras aplicações dos ácidos anacárdicos estão relacionadas com a inibição da proteína SUMOilação, um modificador relacionado a ubiquitina responsável pelo controle de várias funções celulares, podendo estar relacionadas ao câncer e doenças degenerativas (FUKUDA *et al.*, 2009; KHADEM *et al.*, 2010), além da atividade de inibição da tirosinase de basidiomicetos, responsável pela oxidação de fenóis e da produção da melanina (KUBO *et al.*, 1994), bem como, potente antifúngico, inibindo a germinação de esporos de *Colletotrichum capsici* (PRITHIVIRAJ *et al.*, 1997), atividade zoosporicida contra *Aphanomyces cochliodites*, sendo observado que um grupo carboxílico no anel aromático e uma cadeia lateral insaturada são importantes para melhores atividades inibitórias de mobilidade e atividades líticas contra o zoósporo (BEGUM *et al.*, 2002).

Em 2011, ALKHALAR *et al.* testaram os ácidos anacárdicos isolados da planta *Knema laurina* contra a acetilcolinesterase, no qual o ácido anacárdico (17:1) apresentou potente atividade. Estudos de docagem molecular indicaram que o composto fenólico com uma cadeia alongada poderia adentrar profundamente no sítio ativo da enzima e organizar-se através de ligações de hidrogênio, interação hidrofóbica e interações π - π ao longo da complexa geometria da enzima (Figura 88).

Figura 88 - Representação da ligação entre enzima acetilcolinesterase e o composto (17:1).

A: Interação molecular do composto (17:1) com os resíduos do sítio catalítico da acetilcolinesterase. **B:** Contatos interatômico (amarelo) entre o ligante e os resíduos no sítio ativo baseado nas ligações Van der Walls gerado pelo software Chimera.

Fonte: Figura adaptada de AKHTAR *et al.*, (2011)

Após vários trabalhos publicados utilizando os ácidos anacárdicos, CARVALHO *et al.* verificaram que nenhum era responsável pela toxicidade destes. Sendo assim, publicaram um estudo sobre a toxicidade aguda, subaguda e sobre os efeitos mutagênicos dos ácidos anacárdicos e verificaram que doses inferiores à 300 mg.Kg^{-1} não produziram alterações bioquímicas e hematológicas, além de que nenhum efeito mutagênico foi produzido (CARVALHO *et al.*, 2011).

4.2.11 Bioatividade dos ácidos anacárdicos isolados do basidiomiceto *Aurantiopileus mayanensis*

Grande parte dos trabalhos apresentados na literatura sobre ácidos anacárdicos relatam apenas ácidos anacárdicos com cadeia lateral com até quinze carbonos, com cadeia totalmente saturada ou não. O presente trabalho relata o isolamento de compostos com cadeia alifática contendo dezessete carbonos, com cadeia saturada ou insaturada. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos avaliando estes compostos para atividades inibidoras do proteassomo, leishmanicida e tripanossomicida.

Os ácidos anacárdicos isolados no presente estudo não apresentaram atividade contra a *Leishmania amazonensis*, *T. cruzi* ou contra a bactéria *E. coli*. O composto **20** (CCM12B5), não apresentou citotóxicidade para as linhagens testadas. No entanto, o composto **21** (CCM12B7) apresentou atividade para linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7), células epiteliais de mama não tumorais (MCF-10A), células tumorais gástricas (ACP01), em células HELA e em células de adenocarcinoma alveolar (A549), sendo os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Ensaio de Citotoxicidade

Amostra	LINHAGEM IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)				
	MCF-7	MCF-10A	ACP01	HELA	A549
CCM12B5	>100	>100	>100	>100	>100
CCM12B7	15,43±2,1	27,48±3,6	40,4±7,2	32,9±5,2	12,4±3,5

Os compostos **20** (CCM12B5) e **21** (CCM12B7) foram testados contra diversas bactérias. O composto **20** (CCM12B5) apresentou atividade acima de 64 µg.mL⁻¹ para todas as bactérias testadas. No entanto, o composto **21** (CCM12B7) apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MSSA), bem como contra a bactéria *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE). Os valores de CIM são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Ensaio Antibacteriano

Amostra	CIM (µg.mL ⁻¹)	
	<i>S. aureus</i> (MSSA)	<i>E. faecalis</i> (VRE)
CCM12B5	>64	>64
CCM12B7	16	16

Em teste de inibição da bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, o composto **20** (CCM12B5) apresentou atividade (CIM de 32 µg.mL⁻¹). Podendo ser observado na Figura 89 a curva de inibição da bactéria *B. Subtilis* na presença do composto 20 (CCM12B5).

Figura 89 - Curva de inibição de *B. subtilis* CCM12B5.

A partir da análise da curva de inibição do *B. subtilis* (Figura 89) foi possível observar que após 4 h iniciou-se o crescimento da bactéria testada com o controle negativo. No entanto, verificou-se que tanto para a bactéria tratada com controle positivo quanto para a bactéria testada com o composto **20** (CCM12B5) (CIM de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o crescimento não foi iniciado, mesmo após 20 h. Sendo assim, concluiu-se que o composto **20** apresentou atividade antibacteriana.

HIMEJIMA *et al.*, (1991) testaram os ácidos anacárdicos (15:3), (15:2), (15:1) e (15:0) contra a bactéria *B. subtilis*, e observaram que o composto com maior número de insaturações na cadeia alifática (15:3) foi o mais ativo, seguido pelo composto com uma insaturação (15:1), e em terceiro lugar, os ácidos anacárdicos totalmente saturado (15:0), e com duas insaturações (17:2) apresentando mesma atividade (HIMEJIMA *et al.*, 1991).

Com o intuito de entender o mecanismo de ação dos ácidos anacárdicos contra a bactéria *B. subtilis*, estudos foram realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Andréa Dessen (LNBio, Campinas, SP). O composto **20** (CCM12B5) foi testado no ensaio de inibição da enzima *Penicillin binding protein 2x* (PBP2x) por anisotropia em fluorescência (Figura 90).

Figura 90 - Ensaio de inibição da PBP2x baseado em anisotropia de fluorescência para CCM12B5.

A partir da análise por anisotropia de fluorescência (Figura 90), observou-se que quando a enzima PBP2x foi tratada com o composto **20** (CCM12B5) a porcentagem de inibição desta foi muito semelhante ao do controle positivo. Sendo assim, conclui-se que o composto **20** inibiu a enzima PBP2x. Desse modo, é plausível supor que o mecanismo de ação dos ácidos anacárdicos seja por meio da inibição desta enzima, e consequentemente enfraquecimento da parede celular bacteriana, levando a morte da bactéria.

As enzimas *Penicillin binding protein* (PBPs) são caracterizadas pela afinidade de se ligar com a penicilina e estão presentes em grande parte das bactérias apresentando a função de síntese de peptidoglicanos (componentes majoritários da parede celular de bactérias). Sendo que, a inibição das PBPs leva à irregularidades na estrutura celular bacteriana, como: alongamento, perda de permeabilidade seletiva, lesões e eventual morte celular (MATTEI *et al.*, 2010).

Grande parte das PBPs se ligam com as β -lactamas (compostos com anel heteroatômico, consistindo de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio – maior parte dos antibióticos). Com o surgimento da resistência de algumas bactérias Gram-positivas às β -lactamas, surgiu-se a necessidade de se isolar e testar outras formas de PBPs. Nesse sentido, DESSEN *et al.*, (2001) elucidaram a estrutura da PBP2x (isolada da *P. pneumoniae*), por meio de cristalografia de Raios-X. A PBP2x é uma enzima que também participa da síntese peptidoglicanos como as PBPs, mas não apresenta ligação com as β -lactamas, sendo assim uma interessante alternativa para encontrar compostos bioativos contra bactérias Gram-positivas resistentes (STONE *et al.*, 2018) (DESSSEN *et al.*, 2001).

Além do estudo de inibição da PBP2x, foram realizados testes com dois marcadores de bactérias, o FM1-43 (que realça a cor da membrana celular bacteriana) e o DAPI (DNA-

targeting). Utilizando as bactérias marcadas por análises de microscopia de fluorescência (Figura 91) é possível verificar que na presença de CCM12B5 a membrana da bactéria *B. subtilis* fica destruída “picotada”, levando a morte celular. Estes resultados reforçaram a hipótese que o mecanismo de ação dos ácidos anacárdicos seja por meio da inibição da PBP2x, e consequentemente, inibição da síntese de peptideoglicanos, fazendo com que a parede celular seja destruída.

Figura 91 - Análise de microscopia de fluorescência para o composto CCM12B5.

Este trabalho apresenta o primeiro estudo de ácidos anacárdicos isolados a partir de basidiomicetos como possíveis inibidores do proteassomo. A inibição do proteassomo é uma estratégia de combate ao câncer, pois este é um complexo proteico que degrada proteínas relacionadas a atividades essenciais para a célula, como: divisão celular, crescimento e estresse. Nas células tumorais, a inibição do proteassomo diminui a vascularização dos tumores, reduz a incidência de metástases e aumenta as chances da morte celular por apoptose (LEE *et al.*, 1998). Estudos realizados por TRIVELA *et al.*, (2014) demonstraram a atividade de compostos a partir de microrganismos como possíveis inibidores do proteassomo (TRIVELLA *et al.*, 2014).

Os compostos (**20**, CCM12B5) e **21** (CCM12B7) apresentaram atividade inibitória do proteassomo, que é ilustrada na Figura 92.

Figura 92 -Atividade de inibição do proteassomo testado para CCM12B5 e CCM12B7

A partir da análise da porcentagem de inibição do proteassomo por *chymotrypsin-like* (ChTL) (Figura 92), pôde-se verificar que os compostos **20** (CCM12B5) e **21** (CCM12B7) apresentaram um resultado muito semelhante ao controle negativo, sendo que, o composto **20**, apresentou uma atividade um pouco superior ao composto **21**.

4.3 Isolamento e identificação do ergosterol (**28**, fração CCM12C5)

O composto presente na fração CCM12C5 foi identificado pelos seus dados espectroscópicos e espectrométricos. O espectro de massas obtido por GC-MS (Figura 93), o espectro no UV (Figura 94) e de RMN uni e bidimensionais (Apêndices 51-62), bem como, a comparação com os dados já publicados na literatura possibilitaram a identificação do composto como sendo o ergosterol (Figura 95) (TAKAISHI *et al.*, 1991). A Tabela 9 apresenta a comparação entre os valores de deslocamento químico dos sinais de hidrogênio de carbono nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos no presente trabalho e na literatura.

Não foi possível a identificação da massa do composto **28** por análises em UPLC-QToF-MS, sendo assim, foi realizada a análise por GC-MS, sendo observado o pico base m/z 396 e a fragmentação característica do ergosterol em comparação com o dicionário NIST.

Figura 93 - Espectros de GC-EM obtidos para o ergosterol (**28**, fração CCM12C5).

Figura 94 - Espectro no UV obtido para o ergosterol (**28**, fração CCM12C5, 1 mg.mL⁻¹, MeOH).

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, piridina- d_5) do ergosterol (**28**, fração CCM12C5).

Carbono	δ^a	δ^b	δ (J em Hz) ^c	δ (J em Hz) ^d
1	38,7	39,0	1,85, m 1,33, m	
2	32,7	33,0	2,11, m 1,77, m	
3	69,6	69,9	3,92, tt, (4,4; 11,2)	3,67, m
4	41,7	42,0	2,65, m 2,70, m	
5	140,6	140,8	-	-
6	119,4	119,6	5,68, m	5,56, m
7	116,8	117,1	5,47, m	5,39, m
8	141,0	141,3	-	-
9	46,3	46,6	-	-
10	37,2	37,5	-	-
11	21,1	21,4	1,55, m	
12	39,1	39,4	1,6, m 2,0, m	
13	42,8	43,0	-	-
14	54,5	54,8	-	-
15	23,1	23,4	1,39, m 1,63, m	
16	28,4	28,7	1,74, m	
17	55,6	55,9	1,21, m	
18	11,9	12,2	0,65, s	0,63, s
19	16,3	16,6	1,02, s	0,94, s
20	40,5	40,8	2,03, m	
21	21,1	21,4	1,06, d, (6,6)	1,04, d, (6,6)
22	135,9	136,1	5,25, m	5,20, m
23	131,9	132,2	5,24, m	5,20, m
24	42,8	43,1	1,87, m	
25	33,1	33,4	1,46, m	
26	19,6	19,9	0,85, d, (6,9)	0,82, d, (6,8)
27	19,9	20,2	0,86, d, (6,8)	0,84, d, (6,8)
28	17,6	17,9	0,95, d, (6,8)	0,92, d, (6,8)

^apiridina- d_5 , 150 MHz, ^bpiridina- d_5 , 100.5 MHz, ^cpiridina- d_5 600 MHz, ^dpiridina- d_5 400 MHz.

^{b-d}TAKAISHI, UDA (1991).

Figura 95 - Estrutura do ergosterol (28, fração CCM12C5).

O ergosterol é utilizado como precursor da vitamina D, além de ser um componente da membrana celular de fungos e protozoários, exercendo funções semelhantes ao colesterol em células de animais. Vários trabalhos reportam o isolamento de ergosterol a partir de basidiomicetos. Um estudo recente realizado por ALEXANDRE *et al.* mostrou que o ergosterol isolado a partir do basidiomiceto *Pleurotus salmonestramineus* apresentou atividade antiparasitária contra o *Trypanosoma cruzi*, possivelmente pela da permeabilização da membrana plasmática, bem como pela despolarização da membrana mitocondrial levando o parasita a morte (ALEXANDRE *et al.*, 2017). Outros estudos realizados por TAKAISHI *et al.* (1991), YUE *et al.* (2001) levou ao isolamento de derivados do ergosterol a partir dos basidiomicetos *Hericum erinacens* e *Lactarium volemus* (TAKAISHI *et al.*, 1991; YUE *et al.*, 2001).

5 CONCLUSÕES

Este trabalho relatou o isolamento e a identificação de metabólitos secundários a partir de extratos dos basidiomicetos *Auricularia* sp. e *Aurantiopileus mayanensis*, sendo este o primeiro estudo químico apresentado na literatura.

A partir do extrato metanólico do basidiomiceto *Auricularia* sp. foi isolado um composto com esqueleto de carbono inédito, denominado com o nome comum de éster metílico do ácido brotásico (**17**), composto que não apresentou toxicidade para células normais humanas de fibroblasto de pulmão (GM07492A).

Estudos com o extrato metanólico do basidiomiceto *A. mayanensis* permitiram o isolamento do ergosterol, além da identificação de dez derivados dos ácidos anacárdicos, sendo o ácido anacárdico (15:1) Δ^9 (**27**) inédito na literatura. Além disso, este foi o primeiro relato da identificação da posição de duplas ligações apenas por análises da fragmentação por UPLC-QToF-MS/MS.

Ainda, observou-se que o ácido anacárdico (17:1) Δ^8 (**21**) apresentou inibição para linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7) (IC_{50} de $15,43 \pm 2,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), células epiteliais de mama não tumorais (MCF-10A) (IC_{50} de $27,48 \pm 3,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), células tumorais gástricas (ACP01) (IC_{50} de $40,4 \pm 7,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em células HELA (IC_{50} de $32,9 \pm 5,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e em células de adenocarcinoma alveolar (A549) (IC_{50} de $12,4 \pm 3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Além disso, apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MSSA) (IC_{50} de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$), bem como, contra a bactéria *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE) (IC_{50} de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O ácido anacárdico (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**) apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* (IC_{50} de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e de inibição da enzima PBP2x, sugerindo assim, que o mecanismo de ação seja através da inibição da PBP2x, hipótese que é reforçada por imagens de microscopia de fluorescência, onde mostram a parede celular bacteriana destruída após tratamento com o ácido anacárdico.

Além disso, os ácidos anacárdicos (17:2) $\Delta^{8,11}$ (**20**) e (17:1) Δ^8 (**21**) também apresentaram atividade de inibição do proteassomo, indicando a utilização destes como um possível agente anticâncer, sendo necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação e a relação entre estrutura e atividade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, M. N.; LAM, K. W.; ABAS, F.; AHMAD, S.; SHAH, S. A. A.; CHOUDHARY, M. I.; LAJIS, N. H. New class of acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Knema laurina* and their structural insights. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 13, p. 4097-4103, 2011.

ALEXANDRE, T. R.; LIMA, M. L.; GALUPPO, M. K.; MESQUITA, J. T.; DO NASCIMENTO, M. A.; DOS SANTOS, A. L.; SARTORELLI, P.; PIMENTA, D. C.; TEMPONE, A. G. Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 30-40, 2017.

ATTYGALLE, A.; JHAM, G.; MEINWALD, J. Determination of double-bond position in some unsaturated terpenes and other branched compounds by alkylthiolation. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 2528-2533, 1993.

BEGUM, P.; HASHIDOKO, Y.; ISLAM, M. T.; OGAWA, Y.; TAHARA, S. Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 9-10, p. 874-882, 2002.

BENNETT, L.; SHEEAN, P.; ZABARAS, D.; HEAD, R. Heat-stable components of wood ear mushroom, *Auricularia polytricha* (higher Basidiomycetes), inhibit in vitro activity of beta secretase (BACE1). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 3, p. 233-249, 2013.

BINDER, M.; JUSTO, A.; RILEY, R.; SALAMOV, A.; LOPEZ-GIRALDEZ, F.; SJÖKVIST, E.; COPELAND, A.; FOSTER, B.; SUN, H.; LARSSON, E. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. **Mycologia**, v. 105, n. 6, p. 1350-1373, 2013.

BÜCHEL, E.; MARTINI, U.; MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Omphalotins B, C and D, nematocidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. Absolute configuration of omphalotin A. **Tetrahedron**, v. 54, n. 20, p. 5345-5352, 1998.

CARVALHO, A. L. N.; ANNONI, R.; SILVA, P. R. P.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; TREVISAN, M. T. S.; MAUAD, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730-736, 2011.

CHEN, H. P.; ZHAO, Z. Z.; LI, Z. H.; DONG, Z. J.; WEI, K.; BAI, X.; ZHANG, L.; WEN, C. N.; FENG, T.; LIU, J. K. Novel natural oximes and oxime esters with a vibrallactone backbone from the basidiomycete *Boreostereum vibrans*. **ChemistryOpen**, v. 5, n. 2, p. 142-149, 2016.

CHIU, W.-C.; YANG, H.-H.; CHIANG, S.-C.; CHOU, Y.-X.; YANG, H.-T. *Auricularia polytricha* aqueous extract supplementation decreases hepatic lipid accumulation and improves antioxidative status in animal model of nonalcoholic fatty liver. **BioMedicine**, v. 4, n. 2, p. 29-38, 2014.

COATES, N. J.; GILPIN, M. L.; GWYNN, M. N.; LEWIS, D. E.; MILNER, P. H.; SPEAR, S. R.; TYLER, J. W. SB-202742, a novel β -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 654-657, 1994.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, n. 5, p. 460-463, 1994.

DESSEN, A.; MOUZ, N.; GORDON, E.; HOPKINS, J.; DIDEBERG, O. Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate a mosaic framework containing 83 mutations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45106-45112, 2001.

DUKE, J. A. **Handbook of energy crops**. West Lafayette: Purdue University. Center of News Crops and Plant Products, 1983. p. 225-228.

DURU, M. E.; ÇAYAN, G. T. Biologically active terpenoids from mushroom origin: a review. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 4, p. 456-483, 2015.

EICHBAUM, F. Biological properties of anacardic acid (o-pentadecadienyl-salicylic acid) and related compounds. Part IV. The vermicial, antiprotozoic, antiektoparasitic and larvicidal action of anacardates. **Memorias do Instituto Butantan**, v. 19, p. 119-126, 1946.

FRANCIS, G. W. Alkylthiolation for the determination of double-bond position in unsaturated fatty acid esters. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 29, n. 4, p. 369-374, 1981.

FRANCIS, G. W.; VELAND, K. Alkylthiolation for the determination of double-bond positions in linear alkenes. **Journal of Chromatography A**, v. 219, n. 3, p. 379-384, 1987.

FEDAROVICH, A.; DJORDJEVIC, K. A.; SWANSON, S. M.; PETERSON, Y. K.; NICHOLAR, R. A.; DAVIES, C. High-throughput screening for novel inhibitors of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. 1-9, 2012

FENG-YUNG, F. U. DE-QUAN, Y.U., WEI-LIGAN, S>U. N.G., YUN-FENG, J. A. I., NAN-CHUN, S. U. N. The chemical study of hydroginkgolic acid a new constituent of *Ginkgo biloba*. **Acta Chimica Sinica**, v.1, n, 28, p. 52-56, 1962.

FUKUDA, I.; ITO, A.; HIRAI, G.; NISHIMURA, S.; KAWASAKI, H.; SAITOH, H.; KIMURA, K.-I.; SODEOKA, M.; YOSHIDA, M. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 2, p. 133-140, 2009.

GARGANO, M. L.; VAN GRIENSVEN, L. J.; ISIKHUEMHEN, O. S.; LINDEQUIST, U.; VENTURELLA, G.; WASSER, S. P.; ZERVAKIS, G. I. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 151, n. 3, p. 548-565, 2017.

GELLERMAN, J. L.; SCHLENK, H. Methods for isolation and determination of anacardic acids. **Analytical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 739-743, 1968.

GELLERMAN, J. L.; WALSH, N. J.; WERNER, N. K.; SCHLENK, H. Antimicrobial effects of anacardic acids. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 1219-1223, 1969.

GIANNETTI, B. M.; STEGLIEH, W. Antibiotika aus basidiomyceten, VI [1] merulinsäuren A, B und C, neue antibiotika aus *Merulius tremellosus* Fr. und *Phlebia radiata* Fr./antibiotics from basidiomycetes, VI merulinic acids A, B, and C, new antibiotics from *Merulius tremellosus* and *Phlebia radiata*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 33, n. 11-12, p. 807-816, 1978.

GINNS, J.; LINDNER, D. L.; BARONIA, T. J.; RYVARDEN, L. *Aurantiopileus mayanensis* a new genus and species of polypore (Polyporales, Basidiomycota) from Belize with connections to existing Asian species. **North American Fungi**, v. 5, p. 1- 10, 2010. .

GONZÁLEZ, M. J. T. G. **Estudo de compostos de origem vegetal com potencial actividade biológica e obtenção de derivados**. 1995. 226 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmaceuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 1995.

GRAZZINI, R.; HESK, D.; HEININGER, E.; HILDENBRANDT, G.; REDDY, C. C.; COX-FOSTER, D.; MEDFORD, J.; CRAIG, R.; MUMMA, R. O. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, n. 2, p. 775-780, 1991.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569-8590, 2015.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 418-421, 1991.

IRIE, J.; MURATA, M.; HOMMA, S. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase inhibitors, anacardic acids, from *Ginkgo biloba*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 240-243, 1996.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; NAKAHARA, K.; TAKEYA, K.; LEPOITTEVIN, J.-P.; ASAKAWA, Y. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 7, p. 3016-3020, 1987.

JAEGER, R. J.; LAMSHÖFT, M.; GOTTFRIED, S.; SPITELLER, M.; SPITELLER, P. HR-MALDI-MS imaging assisted screening of β -carboline alkaloids discovered from *Mycena metata*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 2, p. 127-134, 2013.

JUSTO, A.; MIETTINEN, O.; FLOUDAS, D.; ORTIZ-SANTANA, B.; SJÖKVIST, E.; LINDNER, D.; NAKASONE, K.; NIEMELÄ, T.; LARSSON, K.-H.; RYVARDEN, L. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal Biology**, v. 121, n. 9, p. 798-824, 2017.

KHADEM, S.; MARLES, R. J. Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7985-8005, 2010.

KUBO, I.; KIM, M.; NAYA, K.; KOMATSU, S.; YAMAGIWA, Y.; OHASHI, K.; SAKAMOTO, Y.; HIRAKAWA, S.; KAMIKAWA, T. Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. **Chemistry Letters**, v. 16, n. 6, p. 1101-1104, 1987.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 970-973, 1986.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; YOKOKAWA, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p. 545-551, 1994.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M.; YAMAGIWA, Y.; MERA, H.; TOKUSHIMA, K.; OHTA, S.; KAMIKAWA, T. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 1016-1019, 1993.

KUBO, I.; NIHEI, K.-I.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7624-7628, 2003.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 533-537, 1999.

LAMBERTON, J. Studies of the optically active compounds of anacardiaceae exudates. Vi. The exudate from *Pentaspadon officinalis* Holmes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 234-239, 1959.

LEE, D. H.; GOLDBERG, A. L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 397-403, 1998.

LEE, I.; AHN, B.; CHOI, J.; HATTORI, M.; MIN, B.; BAE, K. Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 21, p. 6603-6607, 2011.

LEVY, G. C. **Topics in carbon-13 NMR spectroscopy**. New York: Wiley, 1974. p. 130-131.

LIERMANN, J. C.; OPATZ, T.; KOLSHORN, H.; ANTELO, L.; HOF, C.; ANKE, H. Omphalotins E-I, five oxidatively modified nematocidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 8, p. 1256-1262, 2009.

LIU, K.; WANG, J.-L.; ZHAO, L.; WANG, Q. Anticancer and antimicrobial activities and chemical composition of the birch mazegill mushroom *Lenzites betulina* (higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 4, p. 327-337, 2014.

- MA, B.-J.; LIU, J.-K. An unusual nitrogenous terphenyl derivative from fruiting bodies of the basidiomycete *Sarcodon scabrosus*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 60, n. 5, p. 565-568, 2005.
- MA, Z.; WANG, J.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; DING, K. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 977-983, 2010.
- MATTEÏ, P.-J.; NEVES, D.; DESSEN, A. Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 6, p. 749-755, 2010.
- MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. **Natural Product Letters**, v. 10, n. 1, p. 25-32, 1997.
- MILES, P. G.; CHANG, S.-T. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC, 2004. p. 39.
- MISAKI, A.; KAKUTA, M.; SASAKI, T.; TANAKA, M.; MIYAJI, H. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 $\rightarrow$ 3)-glycosidic linkages. **Carbohydrate Research**, v. 92, n. 1, p. 115-129, 1981.
- NGUYEN, T. L.; CHEN, J.; HU, Y.; WANG, D.; FAN, Y.; WANG, J.; ABULA, S.; ZHANG, J.; QIN, T.; CHEN, X. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1254-1258, 2012.
- ORTIZ, R.; PÁRRAGA, M.; NAVARRETE, J.; CARRASCO, I.; DE LA VEGA, E.; ORTIZ, M.; HERRERA, P.; JURGENS, J. A.; HELD, B. W.; BLANCHETTE, R. A. Investigations of biodeterioration by fungi in historic wooden churches of Chiloé, Chile. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 3, p. 568-575, 2014.
- OTTO, A.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J. R.; BRANDT, W.; WESSJOHANN, L.; ARNOLD, N. Structure and absolute configuration of pseudohygrophorones A12 and B12, alkyl cyclohexenone derivatives from *Hygrophorus abieticola* (Basidiomycetes). **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 74-80, 2015.
- PARRA, L. L. L. **Uso de desreplicação por HPLC-UV-MS para a descoberta de metabólitos bioativos de invertebrados marinhos**. 2016. 107 f. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- PETERS, S.; SPITELLER, P. Mycenarubins A and B, red pyrroloquinoline alkaloids from the mushroom *Mycena rosea*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2007, n. 10, p. 1571-1576, 2007.
- PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U.; MANICKAM, M.; RAY, A. Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, n. 1, p. 207-211, 1997.

PULTE, A.; WAGNER, S.; KOGLER, H.; SPITELLER, P. Pelianthinarubins A and B, red pyrroloquinoline alkaloids from the fruiting bodies of the mushroom *Mycena pelianthina*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 873-878, 2016.

RATHEE, S.; RATHEE, D.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; RATHEE, P. Mushrooms as therapeutic agents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 459-474, 2012.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **Pharma Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 35-46, 2017.

REZA, A.; CHOI, M.-J.; DAMTE, D.; JO, W.-S.; LEE, S.-J.; LEE, J.-S.; PARK, S.-C. Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells. **Toxicological Research**, v. 27, n. 2, p. 77, 2011.

RIVERO-CRUZ, B. E.; ESTURAU, N.; SÁNCHEZ-NIETO, S.; ROMERO, I.; CASTILLO-JUÁREZ, I.; RIVERO-CRUZ, J. F. Isolation of the new anacardic acid 6-[16' Z-nonadecenyl]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 13, p. 1282-1287, 2011.

SCHÜFFLER, A.; ANKE, T. Secondary metabolites of basidiomycetes. In: ANKE, T.; WEBER, D. (Ed.) **Physiology and Genetics**. Berlin: Springer, 2009. p.209-231.

SCHÜFFLER, A.; WOLLINSKY, B.; ANKE, T.; LIERMANN, J. C.; OPATZ, T. Isolactarane and sterpurane sesquiterpenoids from the basidiomycete *Phlebia uda*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 7, p. 1405-1408, 2012.

SCHULTZ, D.; MEDFORD, J.; COX-FOSTER, D.; GRAZZINI, R.; CRAIG, R.; MUMMA, R. Anacardic acids in trichomes of *Pelargonium*: Biosynthesis, molecular biology and ecological effects. **Advances in Botanical Research**, v. 31 n. 2 p. 175-192, 2000.

SCHULTZ, D. J.; OLSEN, C.; COBBS, G. A.; STOLOWICH, N. J.; PARROTT, M. M. Bioactivity of anacardic acid against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7522-7529, 2006.

SCRIBE, P.; GUEZENNEC, J.; DAGAUT, J.; PEPE, C.; SALIOT, A. Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 9, p. 928-931, 1988.

SHIBAMOTO, S.; MURATA, T.; YAMAMOTO, K. Determination of double bond positions and geometry of methyl linoleate isomers with dimethyl disulfide adducts by GC/MS. **Lipids**, v. 51, n. 9, p. 1077-1081, 2016.

SILVA, M.; DE LIMA, S.; OLIVEIRA, E.; LOPES, J.; CHAVES, M.; REIS, F.; CITÓ, A. Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity. **Eclética Química**, v. 33, n. 3, p. 53-58, 2008.

- SONG, G.; DU, Q. Structure characterization and antitumor activity of an α β -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 381-387, 2012.
- SPENCER, G.F.; TJARKS, L. Q.; KLEIMAN, R. Alkyl and phenylalkyl anacardic acids from *Knema elegans* seed oil. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 6, p. 724-730, 1980.
- STONE, M. R. L.; BUTLER, M. S.; PHETSANG, W.; COOPER, M. A.; BLASKOVICH, M. A. Fluorescent antibiotics: new research tools to fight antibiotic resistance. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 523-546, 2018.
- TAKAISHI, Y.; UDA, M.; OHASHI, T.; NAKANO, K.; MURAKAMI, K.; TOMIMATSU, T. Glycosides of ergosterol derivatives from *Hericum erinacens*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4117-4120, 1991.
- TRIVELLA, D. B.; PEREIRA, A. R.; STEIN, M. L.; KASAI, Y.; BYRUM, T.; VALERIOTE, F. A.; TANTILLO, D. J.; GROLL, M.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Enzyme inhibition by hydroamination: design and mechanism of a hybrid carmaphyacin-syringolin enone proteasome inhibitor. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 6, p. 782-791, 2014.
- UTKINA, N. K.; MAKARCHENKO, A. E.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S. Zyzzyanone A, a novel pyrrolo [3, 2-f] indole alkaloid from the Australian marine sponge *Zyzzya fuliginosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 40, p. 7491-7494, 2004.
- VAN BEEK, T. A.; WINTERMANS, M. S. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. **Journal of Chromatography A**, v. 930, n. 1-2, p. 109-117, 2001.
- WALTERS, D. S.; CRAIG, R.; MUMMA, R. O. Fatty acid incorporation in the biosynthesis of anacardic acids of geraniums. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1815-1822, 1990.
- WANG, D.; GIRARD, T. J.; KASTEN, T. P.; LACHANCE, R. M.; MILLER-WIDEMAN, M. A.; DURLEY, R. C. Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor– Factor VIIa complex. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 11, p. 1352-1355, 1998.
- YOON, S.-J.; YU, M.-A.; PYUN, Y.-R.; HWANG, J.-K.; CHU, D.-C.; JUNEJA, L. R.; MOURÃO, P. A. S. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. **Thrombosis Research**, v. 112, n. 3, p. 151-158, 2003.
- YU, J.; SUN, R.; ZHAO, Z.; WANG, Y. *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 67-71, 2014.
- YUE, J.-M.; CHEN, S.-N.; LIN, Z.-W.; SUN, H.-D. Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 801-806, 2001.

ZENG, F.; ZHAO, C.; PANG, J.; LIN, Z.; HUANG, Y.; LIU, B. Chemical properties of a polysaccharide purified from solid-state fermentation of *auricularia auricular* and its biological activity as a hypolipidemic agent. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 9, p. 1470-1475, 2013.

ZHAO, S.; RONG, C.; LIU, Y.; XU, F.; WANG, S.; DUAN, C.; CHEN, J.; WU, X. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, n. 1, p. 39-45, 2015.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**17**, CBM1C)

Apêndice 2 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**17**, CBM1C)

Apêndice 3 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**17**, CBM1C)

Apêndice 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**17**, CBM1C)

Apêndice 5 - Espectro de COSY (**17**, CBM1C) Apêndice 6 - Expansão um do espectro de COSY (**17**, CBM1C)

Apêndice 7 - Espectro de HMBC (**17**, CBM1C) Apêndice 8 - Expansão um do espectro de HMBC (**17**, CBM1C)

Apêndice 9 - Expansão dois do espectro de HMBC (**17**, CBM1C) Apêndice 10 - Espectro de HSQC (**17**, CBM1C)

Apêndice 11 - Expansão um do espectro de HSQC (17, CBM1C)

Apêndice 12 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (18, CCM12B3)

Apêndice 13 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**18**, CCM12B3)

Apêndice 14 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**18**, CCM12B3)

Apêndice 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**18**, CCM12B3)

Apêndice 16 - Espectro de COSY (**18**, CCM12B3)

Apêndice 17 - Espectro de HMBC (**18**, CCM12B3) Apêndice 18 - Espectro de HSQC (**18**, CCM12B3)

Apêndice 19 - Expansão um do espectro de HSQC (**18**, CCM12B3) Apêndice 20 - Expansão dois do espectro de HSQC (**18**, CCM12B3)

Apêndice 21 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 22 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 23 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 25 - Espectro de COSY (**19**, CCM12B4E) Apêndice 26 - Espectro de HMBC (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 27 - Expansão um do espectro de HMBC (**19**, CCM12B4E) Apêndice 28 - Expansão dois do espectro de HMBC (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 29 - Expansão três do espectro de HMBC (**19**, CCM12B4E) Apêndice 30 - Espectro de HSQC (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 31 - Expansão um do espectro de HSQC (**19**, CCM12B4E) Apêndice 32 - Expansão dois do espectro de HSQC (**19**, CCM12B4E)

Apêndice 33 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**20**, CCM12B5)

Apêndice 34 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**20**, CCM12B5)

Apêndice 35 - Espectro de COSY (**20**, CCM12B5) Apêndice 36 - Espectro de HMBC (**20**, CCM12B5)

Apêndice 37 - Expansão um do espectro de HMBC (**20**, CCM12B5) Apêndice 38 - Expansão dois do espectro de HMBC (**20**, CCM12B5)

Apêndice 39 - Espectro de HSQC (**20**, CCM12B5) Apêndice 40 - Expansão um do espectro de HSQC (**20**, CCM12B5)

Apêndice 41 - Expansão dois do espectro de HSQC (**20**, CCM12B5)

Apêndice 42 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**21**, CCM12B7)

Apêndice 43 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**21**, CCM12B7)

Apêndice 44 - Espectro de COSY (**21**, CCM12B7)

Apêndice 45 - Espectro de HMBC (**21**, CCM12B7) Apêndice 46 - Expansão um do espectro de HMBC (**21**, CCM12B7)

Apêndice 47 - Expansão dois do espectro de HMBC (**21**, CCM12B7) Apêndice 48 - Espectro de HSQC (**21**, CCM12B7)

Apêndice 49 - Expansão um do espectro de HSQC (**21**, CCM12B7) Apêndice 50 - Expansão dois do espectro de HSQC (**21**, CCM12B7)

Apêndice 51 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (28, CCM12C5)

Apêndice 52 - Expansão um do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (28, CCM12C5)

Apêndice 53 - Expansão dois do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) (**28**, CCM12C5)

Apêndice 54 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) (**28**, CCM12C5)

Apêndice 55 - Espectro de COSY (**28**, CCM12C5) Apêndice 56 - Expansão um do espectro de COSY (**28**, CCM12C5)

Apêndice 57 - Espectro de HMBC (**28**, CCM12C5) Apêndice 58 - Expansão um do espectro de HMBC (**28**, CCM12C5)

Apêndice 59 - Expansão dois do espectro de HMBC (**28**, CCM12C5) Apêndice 60 - Expansão três do espectro de HMBC (**28**, CCM12C5)

Apêndice 61 - Espectro de HSQC (28, CCM12C5)

Apêndice 62 - Expansão um do espectro de HSQC (28, CCM12C5)