



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FABIANA SAYURI TAKAHASHI

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE  
*Ganoderma cf. stipitatum* (Murrill) Murrill E PRODUÇÃO DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS DA CULTURA MICELIAL**

---

Londrina  
2015

FABIANA SAYURI TAKAHASHI

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE  
ANTIPROLIFERATIVA DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE  
*Ganoderma cf. stipitatum* (Murrill) Murrill E PRODUÇÃO DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS DA CULTURA MICELIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

T136c Takahashi, Fabiana Sayuri.

Constituintes químicos e atividade antiproliferativa do corpo de frutificação de *Ganoderma cf. stipitatum* (Murrill) Murrill e produção de exopolissacarídeos da cultura micelial / Fabiana Sayuri Takahashi. – Londrina, 2015.  
91 f. : il.

Orientador: Terezinha de Jesus Faria.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica – Teses. 2. Produtos naturais – Teses. 3. Cogumelos – Teses. 4. *Ganoderma stipitatum* – Teses. 5. Polissacarídeos microbianos – Teses. 6. Produtos de ação antimicrobiana – Teses. I. Faria, Terezinha de Jesus. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 547

FABIANA SAYURI TAKAHASHI

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA  
DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO DE *Ganoderma cf. stipitatum*  
(Murrill) Murrill E PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DA  
CULTURA MICELIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria.  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Londrina, 25 de fevereiro de 2015.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria, por sua dedicada e presente orientação, e principalmente pelo companheirismo e confiança neste trabalho.

À Profa. Dra. Noemia Kazue Ishikawa e Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker pela colaboração e suporte ao trabalho e também às oportunidades oferecidas.

Aos amigos que auxiliaram na pesquisa: Priscila Saito, Marcelo Tempesta, Yasmin Tadayozzi e Luiz César Porto.

A todos os professores e técnicos que tornaram possível a realização desta pesquisa: Profa. Dra. Marsilene Pelisson, Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo, Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, Prof. Dr. César Augusto Tischer, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel, Jurandir “Didi” Pereira Pinto, Nelson Janeiro Rodrigues, Sandra e Edvaldo.

Aos colegas de laboratório, e professores do Programa de Pós-Graduação por todo o conhecimento, ideias e momentos compartilhados, tornando o mestrado um aprendizado para a vida.

Ao amigo Ismael Rodrigues Amador, que sempre esteve presente em momentos que uma opinião fraterna e sincera se fizesse necessária.

Aos meus pais Yutaka Takahashi e Katie Suda Takahashi, e irmãos Myriam e Leandro pelo apoio incondicional.

Ao meu marido Renne Rodrigues pelo companheirismo, dedicação, inspiração e amor oferecido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram desta etapa, meu sincero reconhecimento!

Procurando a primavera o dia todo,  
não a encontrei.  
Apoiando-me em meu bastão,  
atravessei montanhas e montanhas,  
e voltando para casa  
segurei um galho de ameixeira.  
Ali a encontrei: florescia em sua ponta.

Dai Eki (poeta chinês)

TAKAHASHI, Fabiana Sayuri. **Constituintes químicos e atividade antiproliferativa do corpo de frutificação de *Ganoderma cf. stipitatum* (Murrill) Murrill e produção de exopolissacarídeos da cultura micelial.** 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

Estudos das espécies do gênero *Ganoderma* de origem asiática têm sido extensivamente documentados na literatura, mas há poucos relatos sobre as espécies brasileiras. Neste trabalho, foram realizados o estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana e antiproliferativa do extrato etanólico do corpo de frutificação de *Ganoderma cf. stipitatum*, além da obtenção de exopolissacarídeos por meio da cultura micelial do mesmo fungo, coletado em Londrina, Paraná, Brasil. O processo de purificação do extrato etanólico resultou no isolamento do esteroide ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, de uma mistura de ergosterol e ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, do linoleato de etila e do estearato de ergosterila, esse descrito pela primeira vez no gênero *Ganoderma* e presente em mistura com outro éster de esteroide não identificado. No ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), o extrato etanólico inibiu a proliferação da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e do carcinoma hepatocelular (HepG2 C3a) com IC<sub>50</sub> 61,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e IC<sub>50</sub> 36,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Em ambos os casos, a atividade foi seletiva e dose-dependente. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando as cepas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os resultados mostraram que o extrato apresentou atividade bacteriostática para *Enterococcus faecalis*. Neste trabalho também é descrita pela primeira vez, a produção de exopolissacarídeos no meio de cultivo de *G. cf. stipitatum*. A comparação dos deslocamentos de RMN de <sup>13</sup>C do exopolissacarídeo com dados da literatura, indicou que o mesmo trata-se de uma  $\beta$ -D-glucana com ligações 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 6.

**Palavras-chave:** Cogumelo. *Ganoderma stipitatum*. Esteroides. Antiproliferativo. Exopolissacarídeos.

TAKAHASHI, Fabiana Sayuri. **Chemical constituents and antiproliferative activity of fruit body of *Ganoderma* cf. *stipitatum* (Murrill) Murrill and exopolysaccharide production of mycelial culture.** 2015. 91 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Londrina State University, Londrina, PR, Brazil, 2015.

## ABSTRACT

Studies from Asian species of the genus *Ganoderma* have been extensively documented in literature, but there are few reports about Brazilian species. In this work, were performed chemical study, antimicrobial and antiproliferative activities of the ethanolic extract of fruit body of *Ganoderma* cf. *stipitatum*, besides the exopolysaccharide production from mycelial culture of the same fungus, collected in Londrina, South of Brazil. The purification process of ethanolic extract resulted in the isolation of sterol ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, ergosterol and ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol in mixture, ethyl linoleate and ergosterol stearate, that is described for the first time in the genus *Ganoderma* and in mixture with another ester of sterol no identified. In the 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay, the ethanolic extract inhibited the proliferation of cell lines of human breast cancer (MCF-7) and hepatocellular carcinoma (HepG2 C3a) with IC<sub>50</sub> 61,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and IC<sub>50</sub> 36,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. In both cases, the activity was selective and dose-dependent manner. The evaluation of antibacterial activity was performed by microdilution method using *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The results showed that the ethanolic extract have bacteriostatic activity for *Enterococcus faecalis*. In this work, we described for the first time, the exopolysaccharide production for *G.* cf. *stipitatum* in culture medium. The comparison of NMR <sup>13</sup>C shifts with literature data, we suggest the structure is a  $\beta$ -D-glucan with 1 $\rightarrow$ 3 and 1 $\rightarrow$ 6 linkages.

**Keywords:** Mushroom. *Ganoderma stipitatum*. Sterols. Antiproliferative. Exopolysaccharide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Corpo de frutificação de <i>Ganoderma cf. stipitatum</i> . ....	18
<b>Figura 2</b> –	Exemplos de ácidos ganodéricos isolados de <i>Ganoderma lucidum</i> (RIOS et al., 2012). ....	19
<b>Figura 3</b> –	Estruturas de alguns álcoois ganodéricos isolados de <i>Ganoderma</i> sp. (RIOS et al., 2012). ....	19
<b>Figura 4</b> –	Estrutura dos principais esteroides isolados de <i>Ganoderma</i> sp. ....	20
<b>Figura 5</b> –	Esquema adaptado do ensaio de MTT para realização da atividade antiproliferativa. ....	21
<b>Figura 6</b> –	Estruturas de alguns compostos antimicrobianos isolados de <i>Ganoderma</i> sp. ....	22
<b>Figura 7</b> –	Comparação dos anômeros $\alpha$ e $\beta$ -D-glucose. ....	23
<b>Figura 8</b> –	Estrutura química do polissacarídeo $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana com ramificações de resíduos de glucose em C-6. ....	24
<b>Figura 9</b> –	Fluxograma do processo de isolamento dos constituintes do extrato etanólico de <i>Ganoderma cf. stipitatum</i> ; Gp: grupo; f.: frações. ....	34
<b>Figura 10</b> –	Esquema do teste de microdiluição. Colunas 3 a 11: concentrações das amostras do extrato etanólico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Coluna 1: Ext. – controle de esterilidade (extrato etanólico e MHB); coluna 2: Sol. – solução-mãe do extrato e MHB (1:1). Coluna 12: Bac. – controle do inóculo (cepas bacterianas e MHB). ....	37
<b>Figura 11</b> –	Cromatograma obtido por CG-EM de GD-3. ....	41
<b>Figura 12</b> –	Estrutura do Linoleato de etila (GD-3). ....	41
<b>Figura 13</b> –	Espectro de massas do Linoleato de etila (GD-3). ....	41
<b>Figura 14</b> –	Espectro de infravermelho de GD-3. ....	42
<b>Figura 15</b> –	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GD-3 (linoleato de etila) em $\text{CDCl}_3$ (400,13 MHz). ....	44
<b>Figura 16</b> –	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GD-3 (linoleato de etila) em $\text{CDCl}_3$ (400,13 MHz) expandido. ....	45
<b>Figura 17</b> –	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de GD-3 (linoleato de etila) em $\text{CDCl}_3$ (100,61 MHz). ....	47
<b>Figura 18</b> –	Espectro de infravermelho de GD-4. ....	50

<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de GD-4 (ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol) em $\text{CDCl}_3$ (400,13 MHz).....	52
<b>Figura 20</b> – Cromatograma obtido por CG-EM de GD-4 e respectivo espectro de massas.....	53
<b>Figura 21</b> – Estrutura do Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (GD-4). ....	53
<b>Figura 22</b> – Principais fragmentações do espectro de massas para o ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol.....	54
<b>Figura 23</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de GD-4 (ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol) em $\text{CDCl}_3$ (100,61 MHz).....	57
<b>Figura 24</b> – Cromatograma obtido por CG-EM da mistura de GD-4 e GD-5.....	58
<b>Figura 25</b> – Estrutura do ergosterol (GD-5) e do ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (GD-4)...	59
<b>Figura 26</b> – Espectro de massas do pico 1 de GD-5.....	59
<b>Figura 27</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de GD-5 e GD-4 (ergosterol e ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol) em $\text{CDCl}_3$ (400,13 MHz). ....	60
<b>Figura 28</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de GD-5 e GD-4 (ergosterol e ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol) em $\text{CDCl}_3$ (100,61 MHz). ....	62
<b>Figura 29</b> – Resultado do teste de Liebermann-Burchard para a mistura GD-1 e GD-2.....	64
<b>Figura 30</b> – Espectro de infravermelho da mistura de GD-1 e GD-2.....	65
<b>Figura 31</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de GD-1 e GD-2 em $\text{CDCl}_3$ (400,13 MHz). ....	67
<b>Figura 32</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de GD-1 e GD-2 em $\text{CDCl}_3$ (100,61 MHz). ....	68
<b>Figura 33</b> – Experimento de DEPT 135 da região entre 37 a 28 ppm da mistura de GD-1 e GD-2 (100,61 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	69
<b>Figura 34</b> – Estrutura do estearato de ergosterila. ....	71
<b>Figura 35</b> – Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) da mistura de GD-1 e GD-2. ....	71
<b>Figura 36</b> – Efeito antiproliferativo do extrato etanólico de <i>Ganoderma cf. stipitatum</i> em células de HB4a, MCF-7 e HepG2 C3a após 48 horas de exposição. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 8 réplicas técnicas (CN: controle negativo; CS: controle do solvente).....	75

- Figura 37** – Micrografias das células de MCF-7 após o tratamento com diversas concentrações do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum*. CN: controle negativo e CS: controle de solvente. ....77
- Figura 38** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C dos EPS-2 em sonda de sólido (100,61 MHz). .80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico. ....	27
<b>Tabela 2</b> – Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração diclorometânica (GD). ....	28
<b>Tabela 3</b> – Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração diclorometânica (GD). ....	29
<b>Tabela 4</b> – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo A2. ....	29
<b>Tabela 5</b> – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo A2. ....	30
<b>Tabela 6</b> – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo A11. ....	31
<b>Tabela 7</b> – Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v). ....	32
<b>Tabela 8</b> – Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) (GDA). ....	32
<b>Tabela 9</b> – Composição dos meios de cultivo para produção de exopolissacarídeos. ....	39
<b>Tabela 10</b> – Deslocamentos químicos $\delta$ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}$ e RMN $^1\text{H}$ de GD-3 comparados com a literatura. ....	48
<b>Tabela 11</b> – Deslocamentos químicos $\delta_{\text{C}}$ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}$ de GD-4 comparados com valores descritos na literatura. ....	54
<b>Tabela 12</b> – Deslocamentos químicos $\delta_{\text{C}}$ (ppm) de RMN $^{13}\text{C}$ de GD-5 comparados com valores descritos na literatura para o ergosterol. ....	63
<b>Tabela 13</b> – Deslocamentos químicos $\delta_{\text{C}}$ (ppm) de RMN de $^{13}\text{C}$ de GD-1 comparados com valores descritos na literatura para o estearato de ergosterila. ....	70
<b>Tabela 14</b> – Deslocamento químico dos carbonos EPS-2 comparados com os dados da literatura. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
BDA	Batata dextrose ágar
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
EPS	Exopolissacarídeos
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% das células
ITS-1	<i>Internal transcribed spacer</i>
IV	Espectrometria no infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MHB	Caldo Mueller-Hinton
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolium
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
<i>q</i>	Quarteto
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribossômico
<i>t</i>	Triplete
UFC	Unidade formadora de colônias
δ <sub>C</sub>	Deslocamento químico de carbono
δ <sub>H</sub>	Deslocamento químico de hidrogênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1	O GÊNERO <i>GANODERMA</i> P. KARST. ....	16
3.2	<i>GANODERMA STIPITATUM</i> (MURRILL) MURRILL.....	17
3.3	CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO <i>GANODERMA</i> .....	18
3.4	EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>GANODERMA</i> .....	22
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	25
4.1	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1.1	Equipamentos .....	25
4.1.2	Reagentes .....	26
4.1.3	Material Fúngico .....	26
4.1.4	Identificação do Fungo .....	26
4.1.5	Procedimentos Gerais de Extração.....	27
4.1.6	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico .....	27
4.1.7	Purificação das Frações.....	27
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	34
4.2.1	Avaliação da atividade antiproliferativa .....	34
4.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	36
4.2.3	Análise estatística.....	37
4.3	PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) POR <i>GANODERMA</i> CF. <i>STIPITATUM</i> .....	37
4.3.1	Manutenção do <i>Ganoderma cf. stipitatum</i> .....	37

4.3.2	Preparação do pré-inóculo .....	38
4.3.3	Produção e extração de exopolissacarídeos (EPS) .....	38
4.3.4	Análise dos EPS-2 por RMN de <sup>13</sup> C .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1	IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO .....	40
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	40
5.2.1	Constituintes da fração hexânica do extrato etanólico (GH).....	40
5.2.2	Constituintes da fração diclorometânica do extrato etanólico.....	40
5.3	DADOS ESPECTRAIS E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE <i>G.</i> <i>CF. STIPITATUM</i> .....	72
5.3.1	Estearato de ergosterila (GD-1) em mistura com (GD-2) .....	72
5.3.2	Linoleato de etila (GD-3) .....	73
5.3.3	Ergosta-7,22-dien-3β-ol (GD-4).....	73
5.3.4	Ergosterol (GD-5) em mistura com ergosta-7,22-dien-3β-ol (GD-4) 74	
5.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	75
5.4.1	Avaliação da Atividade Antiproliferativa.....	75
5.4.2	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	78
5.5	OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS .....	78
5.5.1	Produção de exopolissacarídeos. ....	78
5.5.2	Análise do EPS-2 por RMN de <sup>13</sup> C .....	79
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Ganoderma* pertence à família Ganodermataceae (Basidiomicetos) e as propriedades medicinais de suas espécies são conhecidas desde os tempos antigos, sendo utilizadas para diversos tipos de doenças (SANODIYA et al., 2009). Acredita-se que o consumo regular destes cogumelos promova a vitalidade e a longevidade humana (WASSON, 1968 apud SANODIYA et al., 2009).

Dentre as várias espécies de *Ganoderma*, *G. lucidum* se destaca por ser um cogumelo comestível muito tradicional na Ásia, comumente chamado de *Ling Chin*, e no Japão, denominado de *Reishi* (PATERSON, 2006). Nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados sobre este fungo relatando o potencial medicinal de um grande número de extratos e compostos isolados de *G. lucidum*, devido às suas atividades anticancerígena (CHENG et al., 2010; SUAREZ-ARROYO et al., 2013), antioxidantes (CILERDZIC et al., 2013), antifúngicas (JOSEPH et al., 2011) e antiviral (NIEDERMEYER et al., 2005). O mesmo fungo possui também potencial uso para o controle da diabetes do tipo II (FATMAWATI; SHIMIZU; KONDO, 2011), doenças imunológicas (XU et al., 2011) e doença de Alzheimer (LEE et al., 2011). Os componentes bioativos responsáveis pelas atividades biológicas são diversos, tais como: triterpenos (RIOS et al., 2012), esteroides (SEO et al., 2009), polissacarídeos (XU et al., 2011), flavonoides (OLUBA et al., 2012) e alcaloides (LIU, C.; ZHAO; CHEN, 2010).

Considerando que os diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos dos extratos de *Ganoderma* ssp., descritos na literatura, são principalmente provenientes da Ásia, e que possíveis variabilidades dos constituintes químicos podem ocorrer em decorrência das diferenças geográficas, é relevante a realização de estudos de espécies conhecidas e até mesmo de novas espécies de *Ganoderma* provenientes de outras regiões.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo de *Ganoderma cf. stipitatum* quanto à investigação de sua composição química e de suas atividades biológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os constituintes químicos do extrato etanólico do corpo de frutificação de *Ganoderma cf. stipitatum*;
- Avaliar as atividades antiproliferativa e antibacteriana do extrato etanólico do corpo de frutificação de *Ganoderma cf. stipitatum*;
- Produzir, extrair e avaliar a possível composição química dos exopolissacarídeos produzidos por *Ganoderma cf. stipitatum*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Utilizados desde a antiguidade como fonte de alimento, os fungos são considerados atualmente como um dos maiores produtores de metabólitos com atuação na prevenção e cura de várias doenças (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2012). As principais classes de antibióticos como: aminoglicosídeos, betalactâmicos, cefalosporinas, cloranfenicol, macrolídeos e tetraciclina; agentes anticancerígenos como a camptotecina, imunossupressores e outros fármacos de uso humano foram descobertos com base em compostos isolados de fungos ou a partir da modificação química dos mesmos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os fungos também apresentam grande importância ecológica pelo seu papel de decompositores da matéria orgânica, além de se associar em simbiose com as plantas para a captação de nutrientes e produção de hormônios (ISHIKAWA et al., 2012). Entretanto, algumas espécies de fungos saprófitas são parasitárias das plantas podendo causar a morte das mesmas (MAIA et al., 2006).

Segundo Maia e colaboradores (2006), os fungos estão agrupados em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo este último considerado o mais evoluído devido à complexidade de suas estruturas de reprodução que são geralmente macroscópicas, variando de tamanho, forma e coloração. Estas estruturas, denominadas de corpo de frutificação, são conhecidas popularmente por cogumelos e orelhas-de-pau (ALEXOPOULOS, 1962; ISHIKAWA et al., 2012).

#### 3.1 O GÊNERO *GANODERMA* P. KARST.

O gênero *Ganoderma* P. Karst, é considerado um dos mais relevantes da família Ganodermataceae Donk, sendo representado por 201 espécies catalogadas e descritas em literatura (Index Fungorum Database 2015). Além do gênero *Ganoderma*, a família Ganodermataceae contempla outros três gêneros:

*Amauroderma* Murrill, *Haddowia* Steyaert e *Humphreya* Steyaert. (KIRK et al., 2008 apud GUGLIOTTA; POSCOLERE; CAMPACCI, 2011).

### 3.2 *GANODERMA STIPITATUM* (MURRILL) MURRILL

A classificação para a espécie *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill, segundo o Index Fungorum (Index Fungorum Database, 2015), é a seguinte:

Reino: Fungi

Divisão (Filo): Basidiomycota

Subdivisão: Agaricomycotina

Classe: Agaricomycetes incertae sedis

Ordem: Polyporales

Família: Ganodermataceae

Gênero: *Ganoderma*

Espécie: *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill

A espécie foi primeiramente descrita por Murrill (1908), e também pode ser encontrada como *Fomes parvulus* (Murrill) Sacc. & D. Sacc., *Fomes stipitatus* Murrill, *Ganoderma bibadiostriatum* Steyaert e *Ganoderma parvulum* Murrill, sendo *Ganoderma stipitatum* a sua nomenclatura atual (Figura 1) (Index Fungorum Database, 2015). Esta espécie encontra-se distribuída em países como Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela e Índia (BHOSLE et al., 2010). No Brasil há relatos de ocorrência deste fungo nos estados do Pará (MARTINS JÚNIOR; BAPTISTA GIBERTONE; SOTÃO, 2011), de Pernambuco, de Rondônia (LIMA JUNIOR; BAPTISTA GIBERTONE; MALOSSO, 2014) e da Bahia (FIGUEIRÊDO, 2008).

**Figura 1** – Corpo de frutificação de *Ganoderma* cf. *stipitatum*.

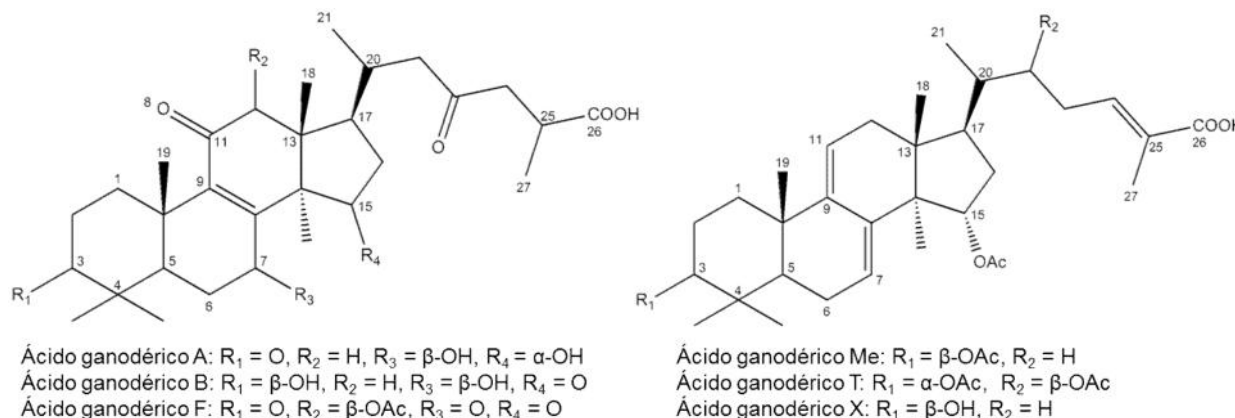


### 3.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GÊNERO *GANODERMA*

Os principais estudos sobre o gênero *Ganoderma* se concentram na espécie *G. lucidum*, que tem sido utilizada por muitos anos para a prevenção e tratamento de diversas doenças. Há inúmeros relatos da produção de metabólitos com atividades biológicas, como triterpenos, esteroides e polissacarídeos por *G. lucidum* (CHENG et al., 2010; RIOS et al., 2012; SANODIYA et al., 2009).

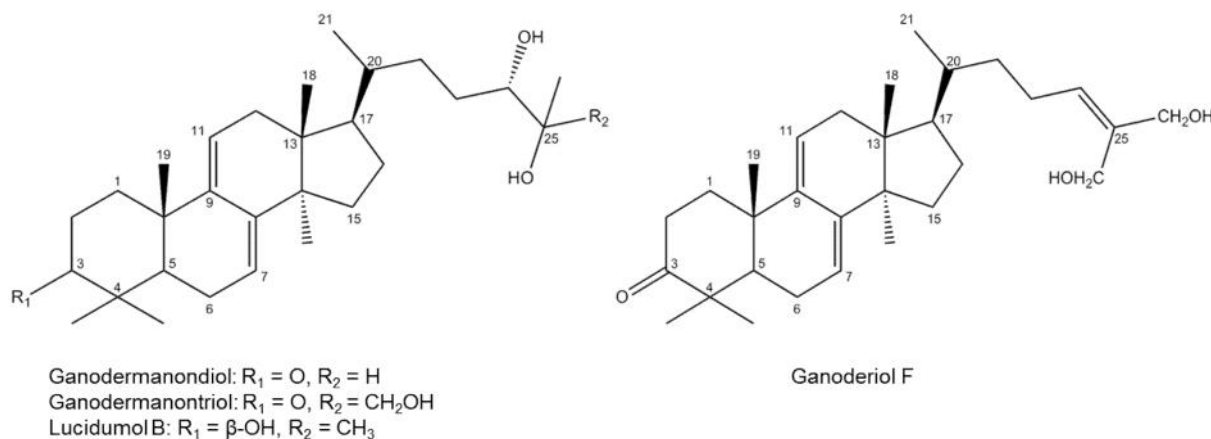
Os triterpenóides isolados de *G. lucidum* e de outras espécies são divididos em dois grupos: ácidos ganodéricos com o grupo carboxila localizado na cadeia lateral e álcool ganodérico, contendo grupo hidroxila na cadeia lateral (GAO et al., 2004). Os primeiros ácidos ganodéricos de *G. lucidum*, os ácidos ganodéricos A e B, foram isolados por Kubota e Asaka (1982) e desde então já foram elucidados mais de 200 triterpenóides provenientes do corpo de frutificação, esporos e micélios de várias espécies do gênero (YANG et al., 2012). Algumas estruturas representativas dos ácidos ganodéricos podem ser observadas na Figura 2.

**Figura 2** – Exemplos de ácidos ganodéricos isolados de *Ganoderma lucidum* (RIOS et al., 2012).



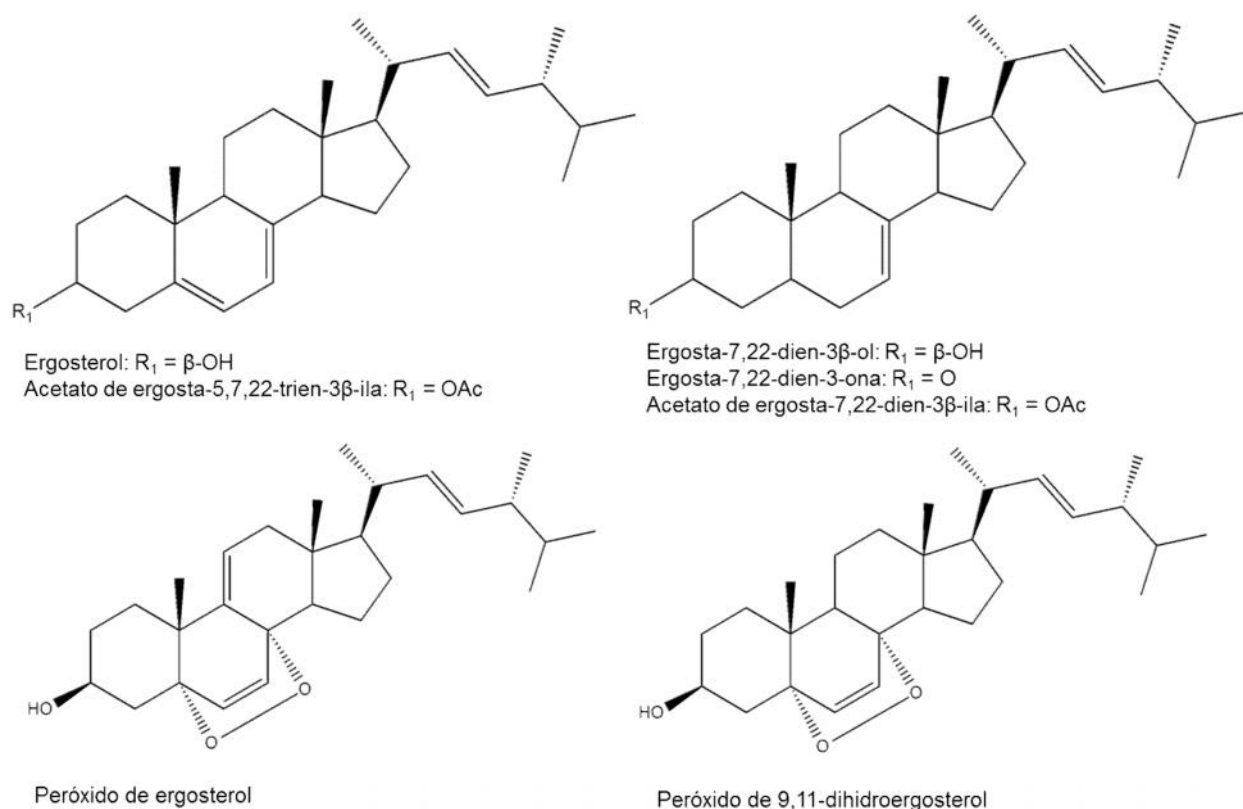
Alguns exemplos de álcoois ganodéricos são: ganodermanondiol, ganodermanontriol, ganoderiol F e lucidumol A e B (RIOS et al., 2012) (Figura 3). Estes apresentaram melhor desempenho em relação a ácidos ganodéricos isolados de *G. lucidum* para citotoxicidade em células de fibrosarcoma (Meth-A) e carcinoma de pulmão (LLC) (MIN et al., 2000). O mesmo resultado foi observado por Cheng e colaboradores (2010) que avaliaram 43 compostos isolados de *G. lucidum* frente a citotoxicidade em células tumorais de colo de útero (HeLa), sendo que a hidroxilação na posição C-26 pode estar relacionada à atividade citotóxica, entretanto o aumento de hidroxilas na cadeia lateral e na estrutura do anel, pode diminuir este efeito (CHENG et al., 2010).

**Figura 3** – Estruturas de alguns álcoois ganodéricos isolados de *Ganoderma* sp. (RIOS et al., 2012).



Com relação aos esteroides isolados do gênero *Ganoderma*, destacam-se o ergosterol, ergosta-7,22-dien-3-ol, ergosta-7,22-dien-3-ona, acetato de ergosta-7,22-dien-3-ila e acetato de ergosta-5,7,22-trien-3-ila (VAZIRIAN et al., 2014), além de peróxido de ergosterol e peróxido de 9,11-dihidroergosterol que apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) (ZHENG; SI; WONG, 2009). Estes importantes esteroides encontram-se ilustrados na Figura 4.

**Figura 4** – Estrutura dos principais esteroides isolados de *Ganoderma* sp..



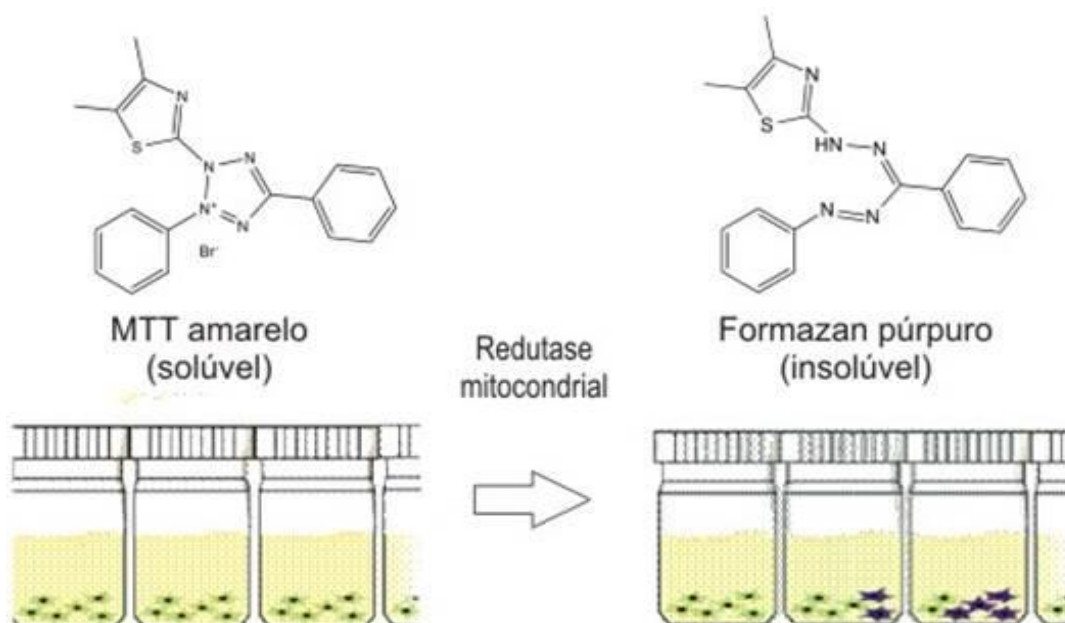
A literatura relata mais de 163 compostos isolados de *Ganoderma* sp. associados à atividade antitumoral, destes, grande parte pertence à espécie *G. lucidum* proveniente de países asiáticos (YANG 2005; YUE et al., 2008; YUE et al., 2010; ZHOU et al., 2011). A classe dos triterpenos derivados do lanosterol se destaca em relação à atividade anticancerígena (CHENG et al., 2010; MIN et al., 2000; ZHOU et al., 2011), juntamente com os polissacarídeos.

Para identificação de compostos com atividade anticancerígena, um ensaio preliminar, *in vitro*, amplamente empregado é o teste do brometo de 3-(4,5-

dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Este método envolve a capacidade das células viáveis em incorporar o MTT (coloração amarela) e, por ação das enzimas desidrogenases mitocondrial, convertê-lo em cristais de formazan (coloração púrpura). A capacidade das células de reduzirem o MTT fornece uma indicação da integridade e atividade metabólica das mesmas, o que pode ser interpretado como medida da viabilidade celular (BERNHARD et al., 2003; MOSMANN, 1983). O esquema adaptado da página do Ltb. Bio Estates (2015) está representado na Figura 5.

A determinação da atividade antiproliferativa causada por um determinado composto é visualizado quando o tratamento é realizado em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal e, na ausência do mesmo, o ensaio é utilizado para a determinação de sua citotoxicidade (BERNHARD et al., 2003).

**Figura 5** – Esquema adaptado do ensaio de MTT para realização da atividade antiproliferativa.



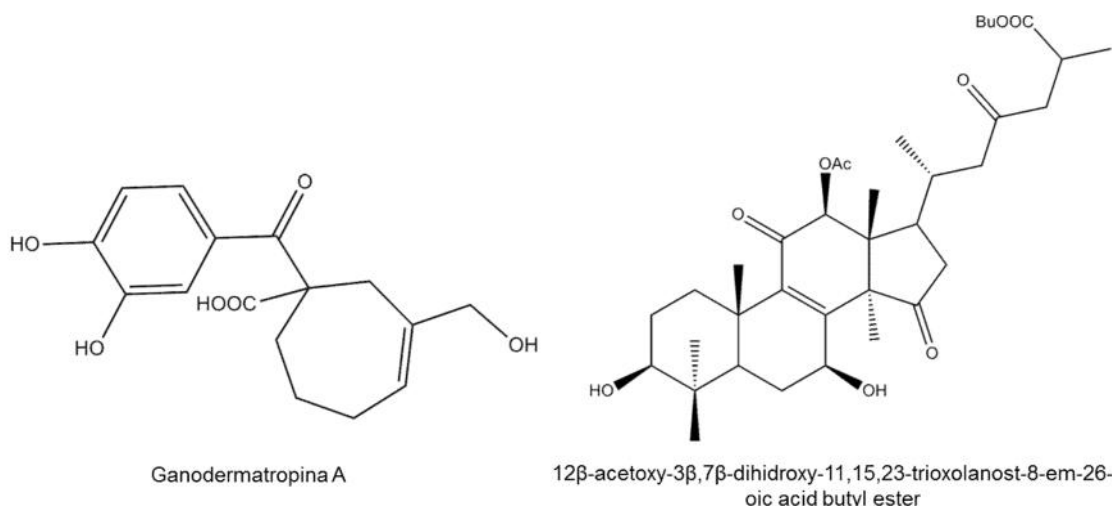
Fonte: Adaptado de Ltb. Bio Estates (2015)

No gênero *Ganoderma*, há inúmeras espécies relatadas na literatura que apresentam atividade antimicrobiana, como extrato aquoso de *G. lucidum* (KARWA; RAI, 2012), extrato etanólico de *G. atrum* (LI et al., 2012), *G. australe* (SMANIA et al., 2007) e óleo essencial de *G. japonicum* (LIU et al., 2009) sendo que as cepas

Gram positivas foram mais sensíveis aos testes, principalmente a *Staphylococcus aureus*.

A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a compostos fenólicos como a ganodermatropina A (Figura 6) isolada de *G. tropicum* (HU et al., 2013), polissacarídeos (SHARIFI et al., 2012) e triterpenos como o ácido ganodérico T, isolado a partir da cultura de *G. orbiforme* que foi ativo contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ISAKA et al., 2013) e o composto identificado por 12 -acetoxi-3,7 -di-hidroxi-11,15,23-trioxolanost-8-en-26-oato de butila isolado da fração acetato de etila de *G. lucidum* (LIU et al., 2014a).

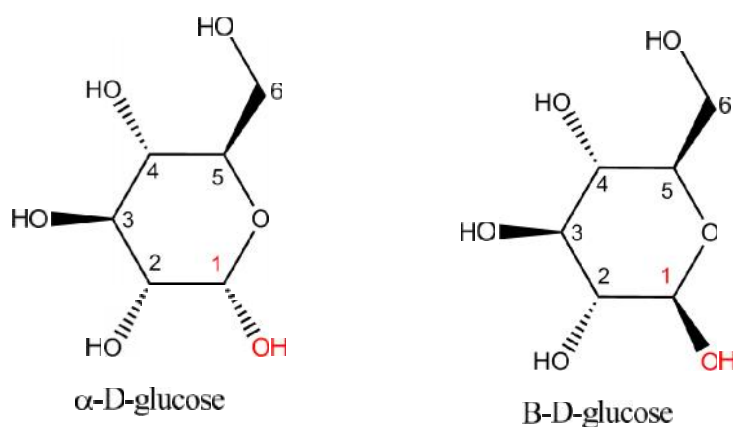
**Figura 6** – Estruturas de alguns compostos antimicrobianos isolados de *Ganoderma* sp.



### 3.4 EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *GANODERMA*

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos sintetizados por determinadas bactérias ou fungos e se encontram aderidos à superfície das células, ou são excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998). Estes biopolímeros de carboidratos são classificados de acordo com a configuração anomérica de seus monômeros (  $\alpha$  ou  $\beta$  ) (Figura 7); a posição da ligação glicosídica, ex. (1 4), (1 3) ou (1 6); o grau e a frequência de ramificação e a composição monossacarídica. Estes fatores podem interferir nas propriedades físicas e fisiológicas dos exopolissacarídeos (GUTIERREZ; PRIETO; MARTINEZ, 1996).

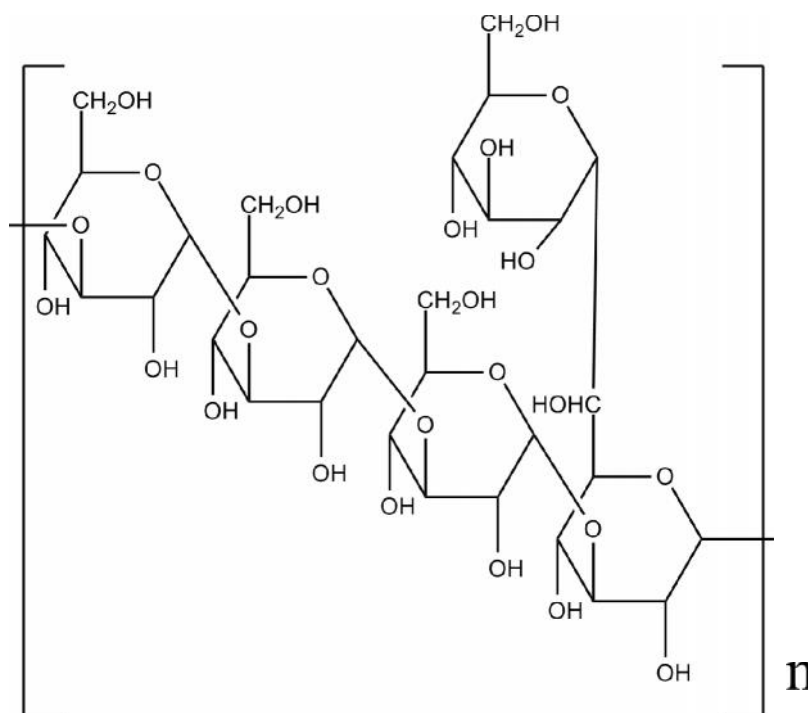
**Figura 7** – Comparação dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -D-glucose.



A maior parte dos EPS de origem fúngica constitui-se de  $\beta$ -glucana (BARBOSA; CUNHA; PIGATTO, 2004). Atualmente, inúmeras pesquisas são realizadas com estes biopolímeros com o intuito de encontrar importantes atividades terapêuticas e os mecanismos envolvidos, dentre as quais podemos citar as propriedades anti-inflamatórias (WENG et al., 2011), anticancerígenas (VETVICKA; VETVICKOVA, 2012), hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicos (MIRANDA-NANTES et al., 2011) e antioxidantes (LIU et al., 2014b).

Vários polissacarídeos obtidos a partir de extratos aquosos de *Ganoderma lucidum* apresentaram atividades antitumorais e imunomoduladoras (XU et al., 2011). Uma das glucanas isoladas apresentou a cadeia principal do tipo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucana com ramificações de resíduos de glucose substituídos em C-6 (Figura 8). Este mesmo estudo sugeriu que o polissacarídeo apresenta atividade indutiva sobre os linfócitos T (BAO et al., 2002).

**Figura 8** – Estrutura química do polissacarídeo  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucana com ramificações de resíduos de glucose em C-6.



Han e colaboradores (2012) isolaram  $\beta$ -D-glucanas altamente ramificadas, denominadas de GSP-6B, a partir do corpo de frutificação de *Ganoderma sinense*. Foi demonstrado, por meio de técnicas de metilação, IV, RMN e análises da composição química, que a glucana consistia de uma cadeia principal de unidades glucopiranosídicas  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  6) substituídas em O-3 por resíduos glucopiranosídicos  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$  4), resíduos de  $\beta$ -D-glucopiranosídicos (1  $\rightarrow$  3) e resíduos  $\beta$ -D-não redutores. Esta glucana solúvel em água apresentou atividade imunomoduladora *in vitro*.

Uma glicoproteína solúvel em água foi extraída do corpo de frutificação de *Ganoderma atrum*, e a mesma apresentou atividade antioxidante (CHEN et al., 2008) e inibiu a proliferação de células da linhagem de câncer colorretal murino (CT26) *in vitro*. Ensaios *in vivo* demonstraram supressão significativa do crescimento tumoral em ratos portadores de câncer colorretal, devido a melhora do sistema imune (ZHANG et al., 2013).

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1.1 Equipamentos

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo CG 17A combinado com o espectrômetro MS-QP5000 Shimadzu, utilizando o *software* CLASS 5000 com as bibliotecas NIST (*National Institute of Standards and Technology*): NIST12, NIST62, NIST147 e NIST27. Os dados foram obtidos por meio de uma coluna capilar DB-1 J&W Scientific (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ). As condições de análise utilizadas foram: Hélio como gás de arraste; vazão de 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura do injetor 300°C; temperatura da coluna programada, sendo iniciada a 60°C por 4 min, rampa de 10°C  $\text{min}^{-1}$  até 250°C, 20°C  $\text{min}^{-1}$  até 330°C, permanecendo em 330°C por 10 min; modo “*split*” 1:10; faixa de massa 45 a 700 D.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Xevo TQS com ionização por eletrospray (ESI-MS), fonte orthogonal Z-spray (Waters). Para aquisição e processamento dos dados foi utilizado o *software* Masslynx 4.1. As condições utilizadas foram: dessolvatação do gás ( $\text{N}_2$ ) a 300°C, temperatura da fonte 120°C, voltagem do capilar 3,2 kV, voltagem do cone 60 V e o gás de colisão sódio.

As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e DEPT 135 foram realizadas no equipamento ADVANCE 400 MHz marca Bruker, operando a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,61 MHz para  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135, temperatura de 25 °C, e utilizando  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO-d}_6$  como solventes para a sonda de líquido. Para a obtenção dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  para amostras sólidas foi utilizada a técnica de polarização cruzada (CP) no ângulo mágico (MAS), tendo a glicina como padrão externo.

Os espectros de infravermelho foram obtidos no equipamento Shimadzu FTIR – 8300 e os dados processados pelo *software* Shimadzu HYPER IR.

Os pontos de fusão foram determinados no aparelho digital de ponto de fusão MQAPF-302 da Microquímica Equipamentos.

#### 4.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol grau p.a., da Labsynth.

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados utilizando-se como adsorvente a sílica-gel 60 (0,063 a 0,200 mm) Merck. As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas com sílica gel G UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel). A revelação das placas cromatográficas foi realizada por meio da detecção na região do ultravioleta (254 nm) e com a solução de vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento.

Para a produção de exopolissacarídeos foram utilizados os seguintes reagentes: sacarose comercial (Alto Alegre), glucose P.A. (Biotec – Reagentes Analíticos), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (CAQ – Casa da Química), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (CAQ – Casa da Química), NaNO<sub>3</sub> (Synth), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck), extrato de levedura (HiMedia), NH<sub>4</sub>Cl (Vetec – Química Fina) e KCl (Synth).

#### 4.1.3 Material Fúngico

O corpo de frutificação de *Ganoderma* sp. foi coletado em 10 de janeiro de 2013, no distrito de Maravilha, no município de Londrina – Paraná. O cogumelo foi depositado sob o nº INPA 250893 no Herbário INPA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

#### 4.1.4 Identificação do Fungo

A identificação do fungo foi realizada com base na análise comparativa de sequências do gene 18S RNAr (ácido ribonucleico ribossômico) e a região ITS-1 (*internal transcribed spacer*), conforme descrição de Saito (2014), sob coordenação do Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL.

#### 4.1.5 Procedimentos Gerais de Extração.

Parte do corpo de frutificação foi seca em estufa de circulação de ar forçado à temperatura de 45°C. Em seguida, o material foi triturado com auxílio de um liquidificador. Parte do material (500 g) foi submetida à extração exaustiva com etanol 95% à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada e a solução obtida foi concentrada em evaporador rotativo (40°C), resultando em 18 g de extrato etanólico. O mesmo foi acondicionado em frasco de vidro âmbar até a realização dos fracionamentos cromatográficos e dos testes biológicos.

#### 4.1.6 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico

Parte do extrato etanólico (15 g) foi cromatografada em coluna filtrante de sílica gel 60 *mesh* (13,5 cm h x 7,0 cm ), eluída exaustivamente com hexano, diclorometano, mistura de diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v), acetato de etila e etanol até que a fração eluída não apresentasse coloração. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotativo, foram obtidas cinco frações conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Série eluotrópica e frações obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico.

<b>Eluentes / volume (L)</b>	<b>Frações / massa (g)</b>
Hexano / 5,0	GH / 0,04
Diclorometano / 6,3	GD / 2,03
Diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) / 2,7	GDA / 3,78
Acetato de etila / 5,0	GA / 2,63
Etanol / 6,5	GE / 4,34

#### 4.1.7 Purificação das Frações.

##### 4.1.7.1 Fração hexânica (GH).

A fração hexânica constituiu de um óleo claro (0,04 g) que foi submetido à análise por CG-EM.

#### 4.1.7.2 Fração diclorometânica (GD).

Parte da fração diclorometânica (1,6 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 *mesh* (21,5 cm h x 2,3 cm ), eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridades crescentes, conforme descrito na Tabela 2. As frações de 100 mL foram concentradas em evaporador rotativo.

**Tabela 2** – Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração diclorometânica (GD).

Eluente	Frações
Hexano	1 - 3
Hexano:diclorometano (17:3 v/v)	4 - 8
Hexano:diclorometano (7:3 v/v)	9 - 14
Hexano:diclorometano (3:2 v/v)	15 - 19
Hexano:diclorometano (1:1 v/v)	20 - 23
Hexano:diclorometano (2:3 v/v)	24 - 30
Hexano:diclorometano (1:4 v/v)	31 - 36
Diclorometano	37 - 42
Diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v)	43 - 46
Diclorometano:acetato de etila (4:1 v/v)	47 - 49
Diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v)	50 - 54
Diclorometano:acetato de etila (3:7 v/v)	55 - 56
Acetato de etila	57 - 59
Etanol	60 - 62

As 62 frações obtidas foram reunidas em 18 grupos, após comparação em cromatoplasmas de sílica gel, reveladas com solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento, conforme Tabela 3.

**Tabela 3** – Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração diclorometânica (GD).

<b>Grupo</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>
A1	1 - 3	7,6
<b>A2</b>	<b>4</b>	<b>100,6</b>
A3	5 - 6	127,9
A4	7	25,6
<b>A5</b>	<b>8</b>	<b>27,1</b>
A6	9	12,2
A7	10 – 11	8,4
A8	12 – 15	174,9
A9	16 – 18	269,2
<b>A10</b>	<b>19 – 21</b>	<b>358,3</b>
<b>A11</b>	<b>22 – 24</b>	<b>112,1</b>
A12	25 - 28	79,3
A13	29 – 32	97,2
A14	33 – 36	23,8
A15	37 – 41	20,6
A16	42 – 51	68,9
A17	52 – 58	12,3
A18	59 – 62	12,9

#### 4.1.7.2.1 Purificação do grupo A2 (fração 4; 100,6 mg).

Para a purificação do grupo A2 utilizou-se uma coluna cromatográfica com sílica gel 60 *mesh* (27,7 cm h x 1,0 cm ) e os seguintes sistemas de solventes: mistura de hexano:diclorometano (3:2 v/v) e diclorometano (Tabela 4).

**Tabela 4** – Série eluotrópica da coluna cromatográfica do grupo A2.

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
Hexano:diclorometano (3:2 v/v)	1 – 35
Diclorometano	36 – 40

Foram coletadas 40 frações de 3 mL cada, que foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica em CCD (revelador vanilina sulfúrica), conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo A2.

<b>Grupo</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>
A2.1	1 - 3	0,0
A2.2	4	0,6
A2.3	5	4,7
A2.4	6 - 7	16,1
<b>A2.5</b>	<b>8 - 10</b>	<b>25,1</b>
A2.6	11 – 17	0,0
A2.7	18 – 40	5,1

O grupo A2.5 (frações 8 – 10; 25,1 mg) foi purificado em placa preparativa de sílica gel, eluída com hexano:diclorometano (3:2 v/v). O processo resultou na obtenção de um sólido de coloração branca (10,1 mg), o qual foi submetido às análises por espectrometrias no IV, ESI-MS, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Este constituinte foi denominado de mistura de GD-1 e GD-2.

#### 4.1.7.2.2 Análise do grupo A5 (fração 8; 27,1 mg)

O grupo A5 constituiu-se de material oleoso e apresentou uma única mancha em CCD. O constituinte foi denominado de GD-3 e o mesmo foi submetido às análises por CG-EM e pelas espectrometrias no IV, de RMN  $^1\text{H}$  e de RMN  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.1.7.2.3 Purificação do grupo A10 (frações 19 – 21; 358,3 mg).

O grupo A10 foi recristalizado com mistura de diclorometano e hexano, resultando na obtenção de um sólido branco (72,0 mg). O composto, denominado GD-4, foi analisado por CG-EM e pelas espectrometrias no IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.1.7.2.4 Purificação do grupo A11 (frações 22 – 24; 112,1 mg).

O fracionamento do grupo A11 em coluna cromatográfica de sílica gel 60 *mesh* (29 cm h x 1,0 cm ), utilizando sistema de solvente diclorometano:acetato de etila (19:1 v/v) resultou na obtenção de 45 frações de 3 mL cada. Estas foram reunidas de acordo com semelhança cromatográfica em oito grupos, conforme apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Reunião das frações da coluna cromatográfica do grupo A11.

<b>Grupo</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>
A11.1	1 - 11	2,7
A11.2	12 - 15	14,6
<b>A11.3</b>	<b>16 - 17</b>	<b>18,1</b>
A11.4	18 - 19	8,0
A11.5	20 - 24	5,3
A11.6	25 - 31	2,9
A11.7	32 – 43	3,9
A11.8	44 - 45	35,7

O grupo A11.3 (frações 16 – 17; 18,1 mg) consistiu de um sólido branco que foi submetido às análises por CG-EM e pelas espectrometrias de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Este constituinte foi denominado mistura de GD-4 e GD-5.

#### 4.1.7.3 Fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) (GDA)

Parte da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) (2,76 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 *mesh* (20 cm h x 2,3 cm ), eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridade crescentes, conforme Tabela 7. As frações, 50 mL cada, foram concentradas em evaporador rotativo.

**Tabela 7** – Série eluotrópica da coluna cromatográfica da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v).

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
Hexano:diclorometano (4:1 v/v)	1
Hexano:diclorometano (1:1 v/v)	2
Diclorometano	3 - 34
Diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v)	35 - 57
Diclorometano:acetato de etila (4:1 v/v)	58 - 75
Diclorometano:acetato de etila (7:3 v/v)	76 - 85
Diclorometano:acetato de etila (3:2 v/v)	86 - 90
Diclorometano:acetato de etila (2:3 v/v)	91 - 98
Acetato de etila	99 - 103
Acetato de etila:etanol (1:1 v/v)	104 - 110
Etanol	111 - 116

Foram obtidas 116 frações que foram reunidas em oito grupos por semelhança cromatográfica, conforme descrito na Tabela 8.

**Tabela 8** – Reunião das frações da coluna cromatográfica da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) (GDA).

<b>Grupo</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>
B1	1 - 3	47,8
B2	4 - 9	149,4
B3	10 - 23	358,2
B4	24 - 36	223,4
<b>B5</b>	<b>37 - 52</b>	<b>567,9</b>
B6	53 - 63	302,0
B7	64 - 80	161,0
B8	81 - 116	115,7

#### 4.1.7.3.1 Purificação do grupo B5 (frações 37 – 52; 567,9 mg)

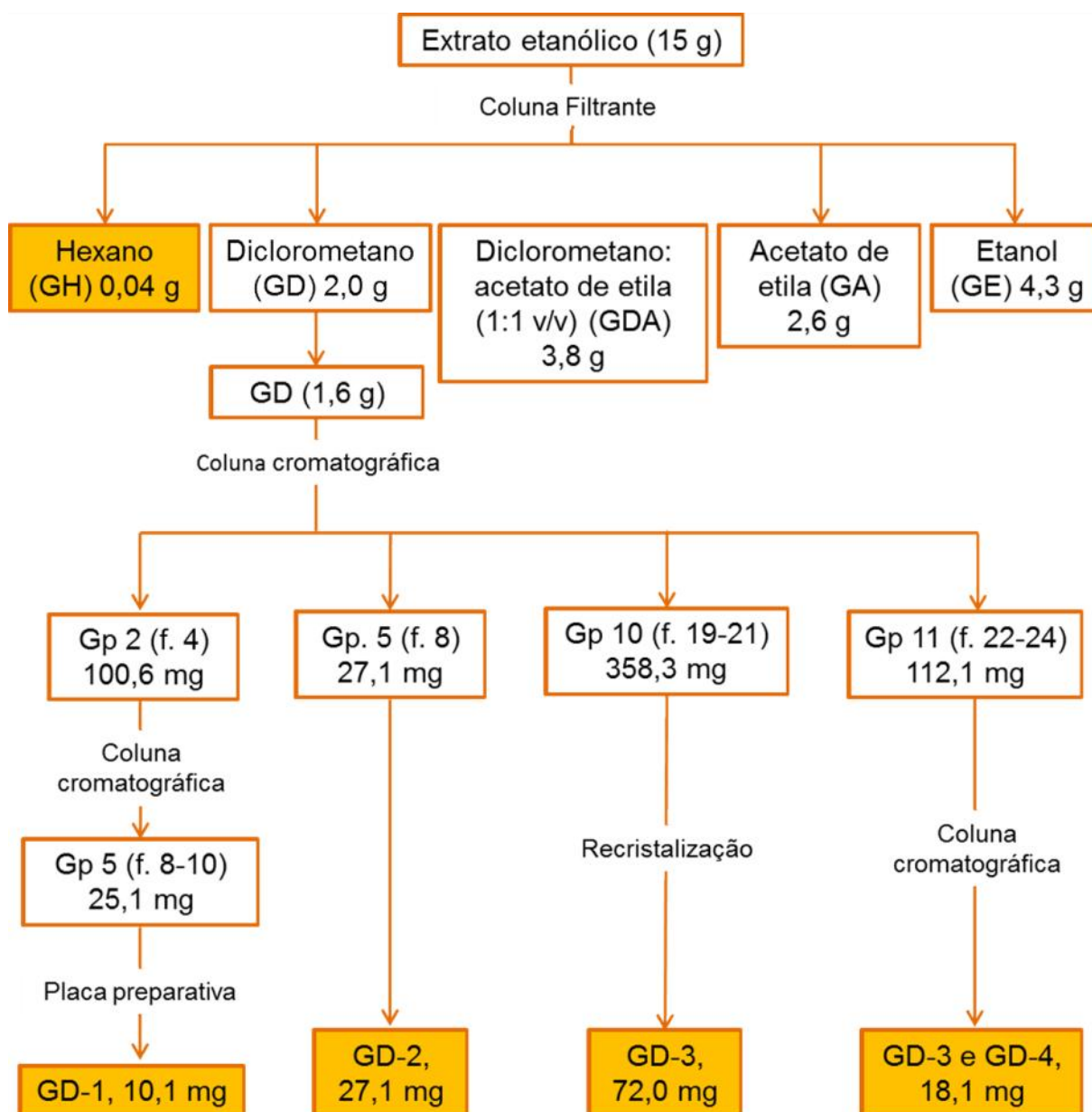
O grupo B5 foi submetido ao processo de lavagem com diclorometano e posterior filtração, resultando em um sólido branco, denominado de GDA-1 (124,4 mg). Entretanto, devido a baixa solubilidade deste constituinte em água e nos demais solventes orgânicos (DMSO, clorofórmio, acetato de etila, metanol e piridina) após a purificação, não foi possível realizar as análises espectrométricas para determinar sua estrutura.

#### 4.1.7.4 Frações acetato de etila (GA) e etanólica (GE).

Parte da fração acetato de etila (GA) (1,8 g) foi submetida à separação em coluna cromatográfica de sílica gel 60 *mesh* (21,8 cm h x 2,3 cm ) eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol em misturas de polaridade crescente. As 61 frações obtidas foram posteriormente reunidas em 10 grupos por semelhança cromatográfica. Por meio da análise dos grupos em CCD foi observada a presença de vários constituintes polares, não sendo possível o isolamento em quantidade suficiente para análises espectroscópicas. Da mesma forma, não foi possível o isolamento de constituintes provenientes da fração etanólica.

Um fluxograma resumindo o processo total de fracionamento do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* é apresentado na Figura 9.

**Figura 9** – Fluxograma do processo de isolamento dos constituintes do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum*; Gp: grupo; f.: frações.



## 4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 4.2.1 Avaliação da atividade antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* foi realizada *in vitro*, utilizando o ensaio do brometo de 3-(4,5-

dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) descrito por Mosmann (1983), com algumas alterações.

As células humanas utilizadas neste estudo foram as linhagens HepG2 C3a (carcinoma hepatocelular) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário), ambas obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro, e a linhagem não-tumoral de mama HB4a (derivada de tecido normal), fornecida pelo Hospital AC Camargo de São Paulo. As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> de área, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – low glucose*) (Gibco – *Life Technologies*) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Gibco – *Life Technologies*), 1% de solução antibiótico-antimicótico (Gibco – *Life Technologies*) e 3,7 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> (Merck), sob condições de incubação de 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para as linhagens MCF-7 e HB4a também foram adicionados ao meio 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de insulina recombinante humana (Gibco – *Life Technologies*) e 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de hidrocortisona.

Para avaliar a atividade antiproliferativa, foram semeadas 5 x 10<sup>3</sup> células por poço, em placas de cultura de 96 poços, em um volume total de 200 µL de meio de cultura completo. Após o tempo de estabilização de 24 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos com extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum*, dissolvido em meio de cultivo, contendo 0,98% de DMSO nas concentrações 12,5; 25; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 e 400 µg mL<sup>-1</sup>, além do controle negativo (meio de cultura completo) e controle de solvente (meio de cultivo contendo 0,98% de DMSO). As placas foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições utilizadas para a estabilização das células. Os tratamentos para os ensaios de MTT foram realizados na presença de 15% de soro bovino fetal. Foram realizadas oito réplicas técnicas de cada condição.

Decorridas 48 horas de tratamento, o meio de cultura de cada poço foi retirado para adição de 100 µL da solução de MTT a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (Amresco) diluído em meio DMEM sem soro bovino fetal. As células foram então incubadas por 4 horas, nas mesmas condições de atmosfera e temperatura descritas anteriormente. Para solubilização dos cristais de formazan foram utilizados 200 µL de DMSO. A mensuração da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Bio Tek) em 570 nm. O percentual de viabilidade celular foi calculado de acordo com a fórmula (%) =  $(\text{Abs}_{\text{tratamento}} / \text{Abs}_{\text{controle negativo (CN)}}) \times 100$ . Os valores do controle de solvente foram

considerados como 100% de viabilidade celular para normalização dos resultados. Não houve diferença significativa entre o controle negativo e o controle de solvente. As micrografias das células foram obtidas pelo FLoid<sup>®</sup> Cell Imaging Station (Life Technologies).

#### 4.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo em placa de 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2012). As cepas bacterianas testadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). As cepas foram suspensas a 0,5 da escala de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) e, posteriormente diluídas 1:100 em solução fisiológica, sendo imediatamente inoculadas na placa, juntamente com o extrato etanólico diluído nas concentrações de 20 a 0,08 µg mL<sup>-1</sup> em caldo Mueller-Hinton (MHB) (Difco). O controle de esterilidade do extrato etanólico (40 µg mL<sup>-1</sup>) (caldo Mueller-Hinton e extrato) e o controle de viabilidade dos inóculos (caldo Mueller-Hinton e as bactérias testadas) foram inseridos na placa. A mesma foi incubada em estufa por 24 e 48 horas, a 37°C.

A Figura 10 representa esquematicamente as concentrações do extrato etanólico e os controles na placa de microdiluição. A solução-mãe do extrato etanólico, na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>, foi utilizada para as diluições seriadas. Considerou-se a Concentração Mínima Inibitória (CIM) como sendo a menor concentração do extrato na qual não se observou crescimento microbiano.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi mensurada por meio da inoculação, em ágar sangue, de uma alíquota de 10 µL dos poços com concentração igual à CIM. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Considerou-se como CBM a menor concentração do extrato na qual não houve o desenvolvimento de colônias. O ensaio foi realizado em duplicata.

**Figura 10** – Esquema do teste de microdiluição. Colunas 3 a 11: concentrações das amostras do extrato etanólico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Coluna 1: Ext. – controle de esterilidade (extrato etanólico e MHB); coluna 2: Sol. – solução-mãe do extrato e MHB (1:1). Coluna 12: Bac. – controle do inóculo (cepas bacterianas e MHB).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>E. coli</i>	<b>A</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>E. coli</i>	<b>B</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>P. aeruginosa</i>	<b>C</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>P. aeruginosa</i>	<b>D</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>S. aureus</i>	<b>E</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>S. aureus</i>	<b>F</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>E. faecalis</i>	<b>G</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.
<i>E. faecalis</i>	<b>H</b>	Ext.	Sol.	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	Bac.

#### 4.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos pelo ensaio de MTT foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet ao nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Todos os dados estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico Origin Pro, versão 8.6.

### 4.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) POR *GANODERMA* CF. *STIPITATUM*

#### 4.3.1 Manutenção do *Ganoderma* cf. *stipitatum*.

O fungo foi mantido em meio sólido BDA (batata, dextrose e ágar) a 4°C, com repiques mensais.

#### 4.3.2 Preparação do pré-inóculo

O fungo foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo BDA, que foram, em seguida, incubadas em estufa por 7 dias a 28°C. Depois de toda a placa estar colonizada, as hifas foram transferidas para três frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de diferentes meios de cultivo (1, 2 e 3), conforme descrito na Tabela 9. Os frascos foram mantidos sob agitação, em *shaker* (MA-420 Marconi) a 180 rpm, a 28°C por 7 dias.

#### 4.3.3 Produção e extração de exopolissacarídeos (EPS)

Os materiais dos três pré-inóculos foram transferidos, assepticamente e respectivamente, para três frascos de Erlenmeyer de 2 L, contendo 400 mL de meio de cultivo 1, 2 e 3 (Tabela 9). Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm a 28°C por sete dias. A recuperação dos exopolissacarídeos foi realizada conforme metodologia descrita por Barbosa e colaboradores (2003), com modificações.

Inicialmente foi feita a interrupção dos cultivos por meio de centrifugação (320 R Hettich Universal) a 9000 rpm por 15 minutos, a 25°C. Os sobrenadantes foram separados, filtrados e tratados com etanol 99% na proporção de 3:1 do volume de etanol e do volume de sobrenadante para precipitação dos exopolissacarídeos. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em água destilada, realizando-se trocas da mesma até a completa eliminação do etanol e de sais residuais. Em seguida, os EPS obtidos foram congelados e liofilizados (Liofilizador Virtis). Os meios de cultivo 1, 2 e 3 originaram os produtos EPS-1, EPS-2 e EPS-3, respectivamente. Os mesmos foram quantificados por meio da pesagem após a liofilização.

**Tabela 9** – Composição dos meios de cultivo para produção de exopolissacarídeos.

<b>Meio de cultivo 1*</b>	<b>Meio de cultivo 2**</b>	<b>Meio de cultivo 3**</b>
50 g L <sup>-1</sup> de sacarose comercial	60 g L <sup>-1</sup> de sacarose comercial	60 g L <sup>-1</sup> de glucose
0,5 g L <sup>-1</sup> de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g L <sup>-1</sup> de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g L <sup>-1</sup> de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,5 g L <sup>-1</sup> de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub>	3,0 g L <sup>-1</sup> de NaNO <sub>3</sub>
0,5 g L <sup>-1</sup> de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup> de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup> de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
1,0 g L <sup>-1</sup> de extrato de levedura	1,0 g L <sup>-1</sup> de extrato de levedura	1,0 g L <sup>-1</sup> de extrato de levedura
4,0 g L <sup>-1</sup> de NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g L <sup>-1</sup> de KCl	0,5 g L <sup>-1</sup> de KCl

\* Adaptado de Yang e Liau (1998).

\*\* Adaptado de Crognale e colaboradores (2007), pH ajustado para 4,7 com solução de HCl 1 molar.

#### 4.3.4 Análise dos EPS-2 por RMN de <sup>13</sup>C

O exopolissacarídeo EPS-2 liofilizado mostrou aspecto de um sólido branco, insolúvel em água, sendo então, analisado por espectrometria de RMN de <sup>13</sup>C em sonda de sólido.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO

A identificação do fungo utilizado neste trabalho foi feita por Saito (2014). Os resultados das análises de sequenciamento do gene 18S RNAr e da região do ITS indicaram que o fungo em estudo trata-se possivelmente da espécie *Ganoderma parvulum*, cuja nomenclatura atual é *G. stipitatum*. Entretanto, há ainda a possibilidade de se tratar de uma espécie nova, o que poderá ser confirmado, futuramente, através da identificação taxonômica.

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

#### 5.2.1 Constituintes da fração hexânica do extrato etanólico (GH)

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a comparação dos espectros com o banco de dados da biblioteca NIST demonstrou que a fração hexânica (GH) constitui-se de uma mistura complexa de hidrocarbonetos de cadeia longa, com total de 56 picos no cromatograma. Dentre estes, pode se destacar o esqualeno ( $C_{30}H_{50}$ ).

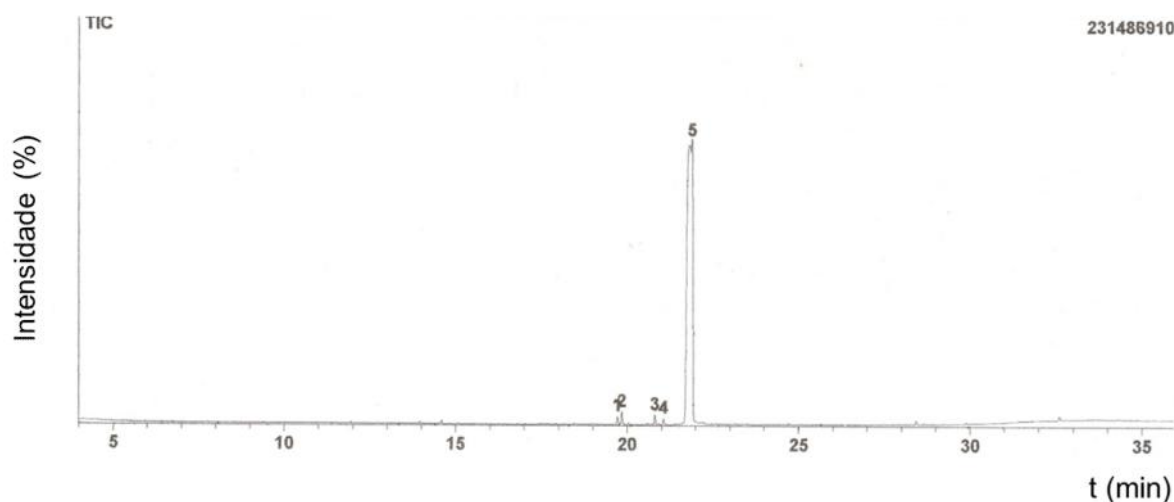
#### 5.2.2 Constituintes da fração diclorometânica do extrato etanólico

##### 5.2.2.1 GD-3

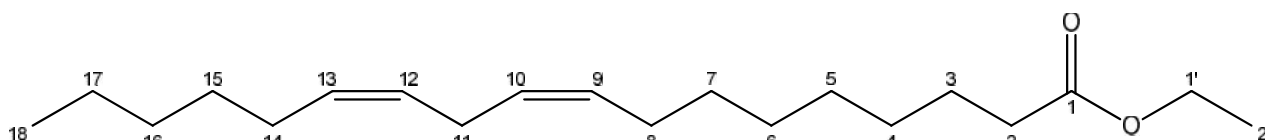
A amostra de GD-3 apresentou aspecto oleoso, sendo submetida primeiramente à análise por CG-EM. O cromatograma (Figura 11) indicou que a amostra constituía-se, praticamente, de um único composto correspondente ao pico 5, com 97,7% de pureza. A comparação do espectro de massas do constituinte (pico

5) com os espectros do banco de dados da biblioteca NIST sugeriu para o composto a estrutura do linoleato de etila ( $C_{20}H_{36}O_2$ ) (Figura 12). De fato, os dados do espectro de massas do constituinte 5 foram compatíveis com os dados registrados na literatura para o linoleato de etila (SHANG et al., 2002), observando-se o pico do íon molecular em  $m/z$  308, pico base em  $m/z$  67 e os fragmentos  $m/z$  81, 55, 95 e 109 (Figura 13).

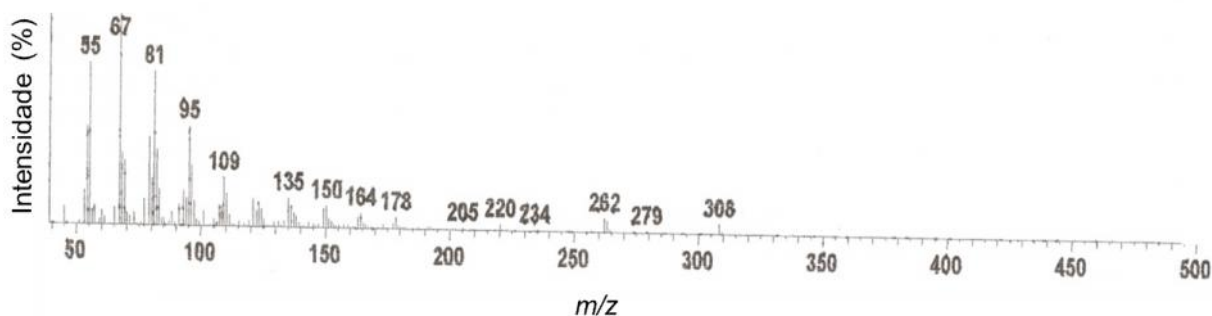
**Figura 11** – Cromatograma obtido por CG-EM de GD-3.



**Figura 12** – Estrutura do Linoleato de etila (GD-3).

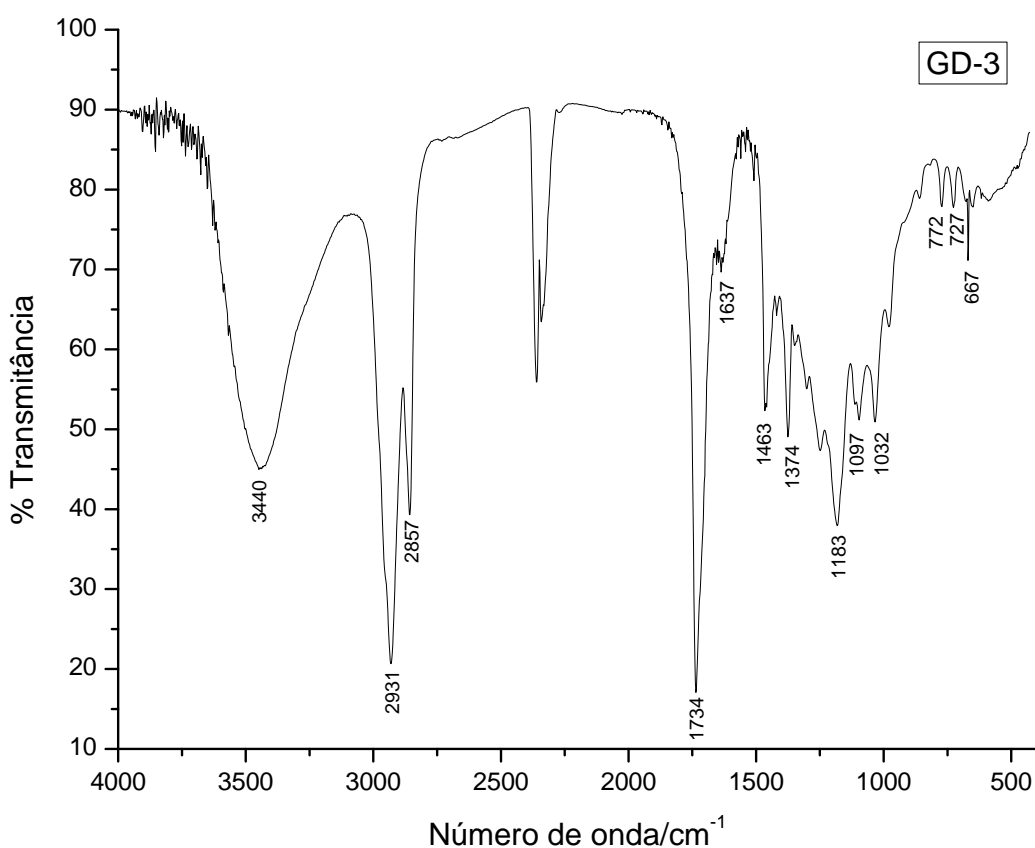


**Figura 13** – Espectro de massas do Linoleato de etila (GD-3).



O espectro de infravermelho de GD-3, Figura 14, confirmou a presença do éster pelas bandas de absorção em  $1734\text{ cm}^{-1}$  ( C=O),  $1183$  e  $1032\text{ cm}^{-1}$  ( C-O). O estiramento de ligação dupla foi caracterizado pela banda em  $1637\text{ cm}^{-1}$  ( C=C). As absorções em  $2931$  e  $2857\text{ cm}^{-1}$  ( C-H) foram atribuídas aos carbonos saturados, enquanto as bandas em  $1463$  e  $1374\text{ cm}^{-1}$  caracterizaram a presença de grupos metilênicos (  $\text{CH}_2$ ) e metílicos (  $\text{CH}_3$ ), respectivamente. A banda em  $727\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao dobramento associado a quatro ou mais grupos metilênicos em uma cadeia aberta (PAVIA et al., 2008). A banda em  $3440\text{ cm}^{-1}$  pode ser decorrente da presença de umidade na amostra ou de grupos hidroxila dos demais compostos presentes na amostra.

**Figura 14** – Espectro de infravermelho de GD-3.



A estrutura de GD-3 foi confirmada por meio da comparação dos dados obtidos da análise da espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  com os dados da literatura para o linoleato de etila (PARK et al., 2014). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Figuras 15 e 16, evidenciou a presença do grupo etoxila por meio do quarteto em  $^1\text{H}$

4,13 (*q*, *J* 7,1 Hz, 2H, H-2') e do tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,26 (*t*, *J* 7,1 Hz, 3H, H-1'). As duas insaturações da molécula foram caracterizadas pelo multiplete na região de 5,29 a 5,44 ppm, com a integração para quatro hidrogênios. O tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,78 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos (H-11) situados entre as ligações duplas, enquanto que o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,29 foi caracterizado como sendo dos hidrogênios metilênicos (H-2) do carbono adjacente à carbonila do éster. As demais atribuições dos deslocamentos químicos estão apresentadas na Tabela 10.

Figura 15 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GD-3 (linoleato de etila) em  $\text{CDCl}_3$  (400,13 MHz).

## RMN $^1\text{H}$

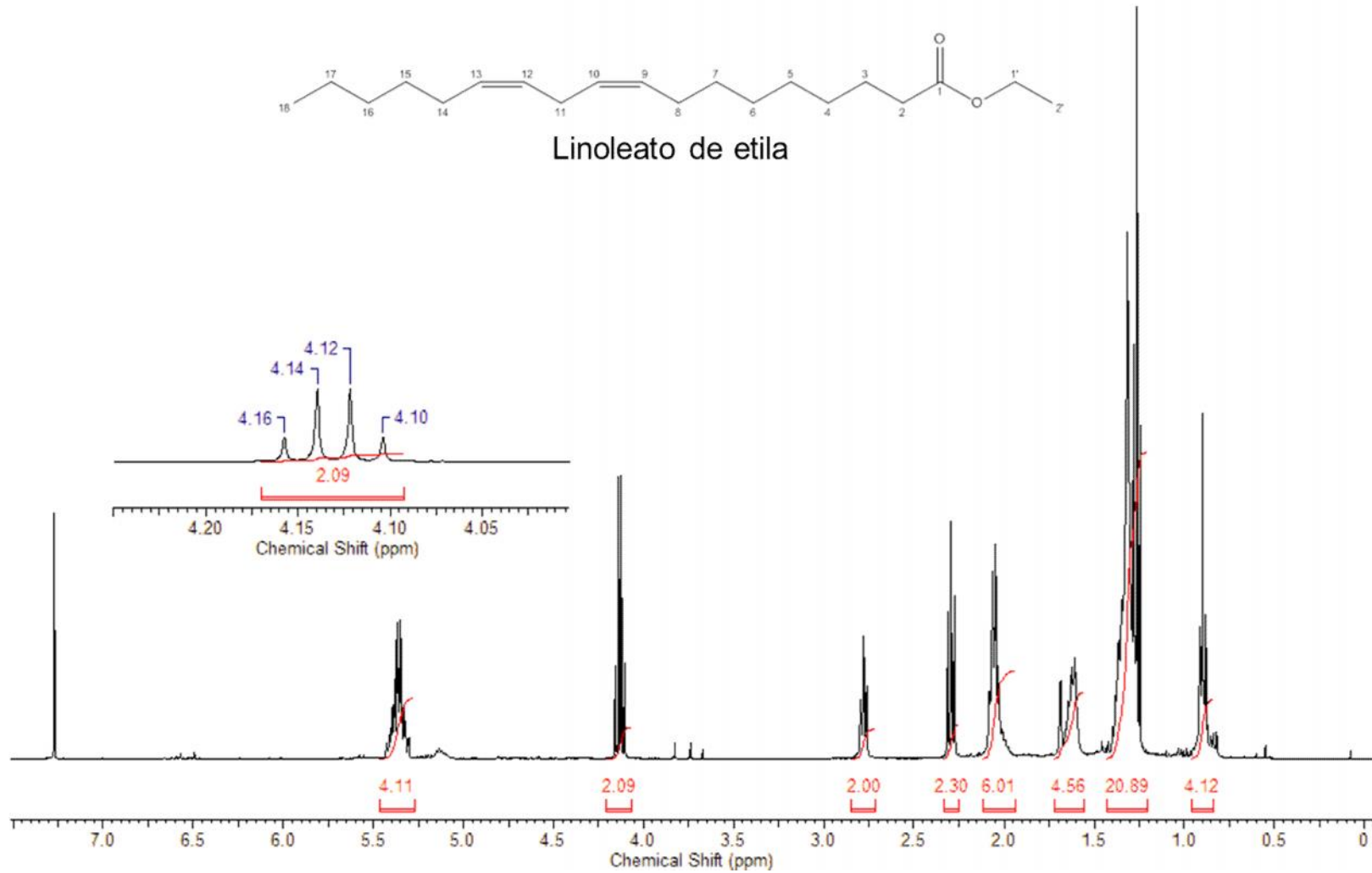
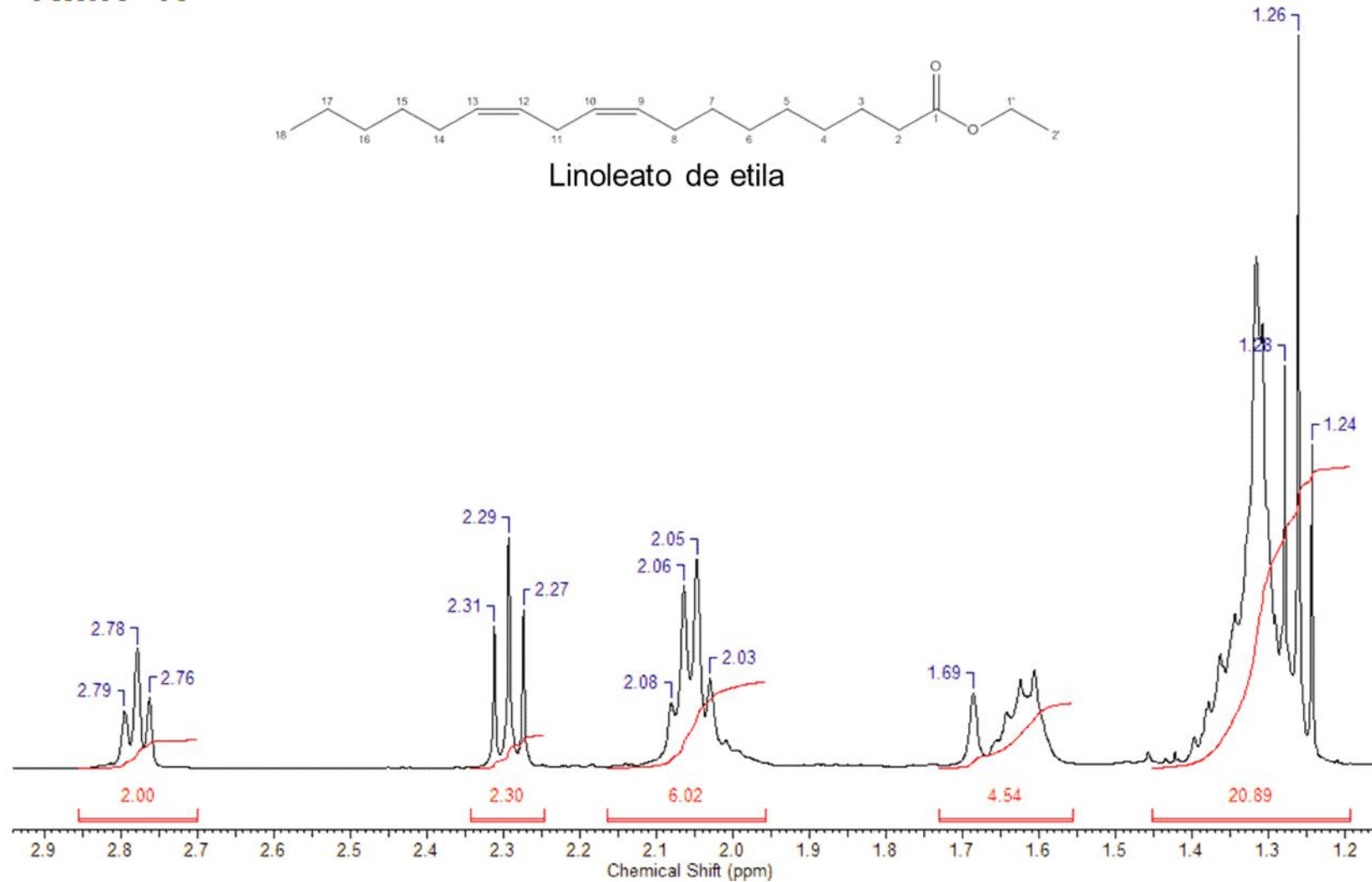


Figura 16 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GD-3 (linoleato de etila) em  $\text{CDCl}_3$  (400,13 MHz) expandido.

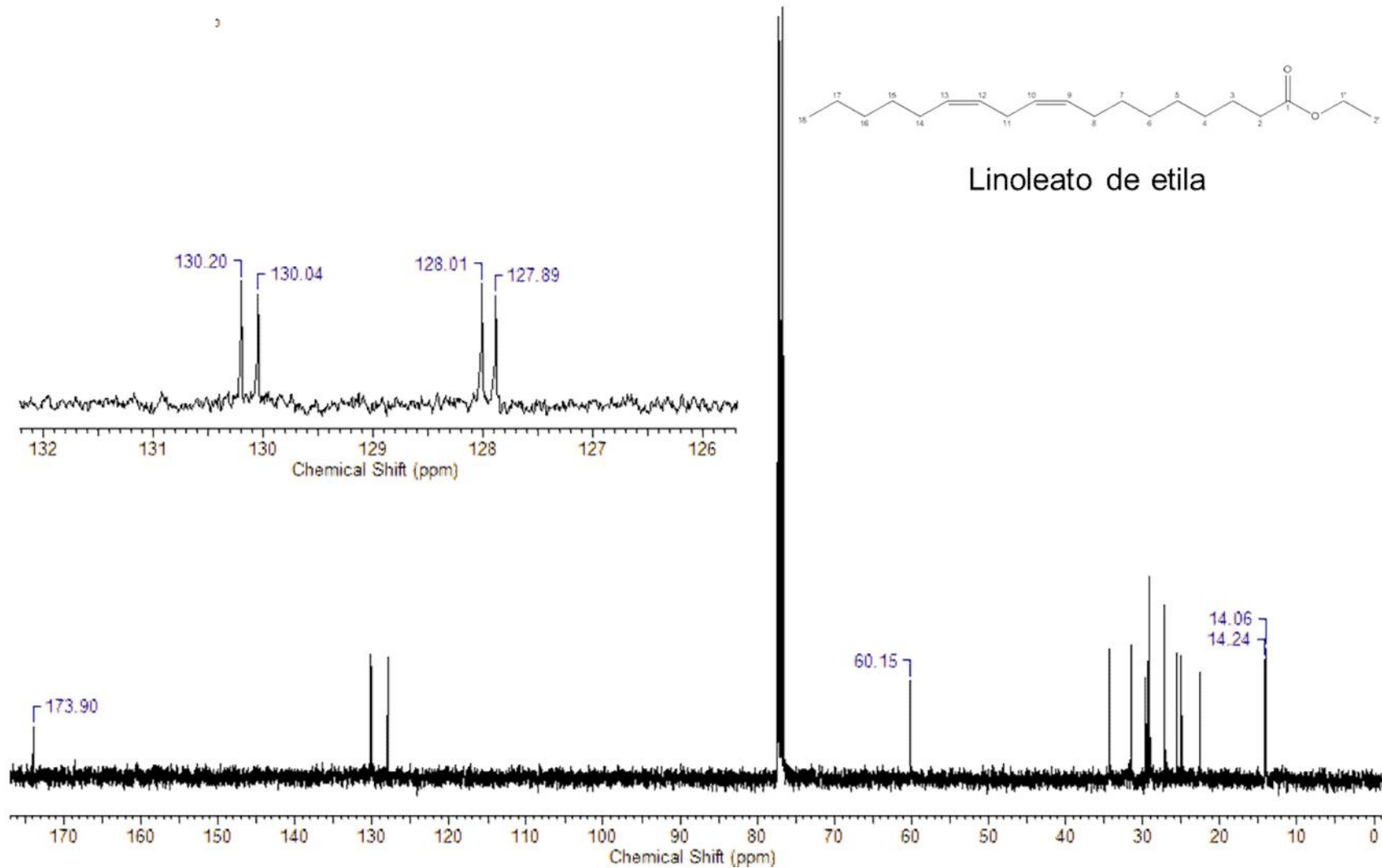
## RMN $^1\text{H}$



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) confirmou a presença da carbonila do éster pelo sinal em  $\delta$  173,9. O grupo etoxila foi evidenciado por meio dos sinais em  $\delta$  60,2 e 14,1 correspondentes a C-2' e C-1', respectivamente.

Figura 17 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GD-3 (linoleato de etila) em  $\text{CDCl}_3$  (100,61 MHz).

RMN  $^{13}\text{C}$



**Tabela 10** – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  de GD-3 comparados com a literatura.

	GD-3		Linoleato de etila (PARK et al., 2014)	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
C-1	173,9		173,9	
C-2	34,4	2,29 ( <i>t</i> , <i>J</i> 7,6 Hz, 2H)	34,4	2,29 (2H)
C-3	25,0		25,0	
C-4	29,1 – 29,6		29,1 – 29,6	1,33 – 1,35 (H-4 – H-7)
C-5	29,1 – 29,6		29,1 – 29,6	1,33 – 1,35 (H-4 – H-7)
C-6	29,1 – 29,6		29,1 – 29,6	1,33 – 1,35 (H-4 – H-7)
C-7	29,1 – 29,6		29,1 – 29,6	1,33 – 1,35 (H-4 – H-7)
C-8	27,2		27,2	
C-9	128,0	5,29 – 5,44 ( <i>m</i> , 4H)	128,1	
C-10	127,9	5,29 – 5,44 ( <i>m</i> , 4H)	127,9	
C-11	25,6	2,78 ( <i>t</i> , <i>J</i> 6,5 Hz, 2H)	25,6	
C-12	130,2	5,29 – 5,44 ( <i>m</i> , 4H)	131,0	
C-13	130,0	5,29 – 5,44 ( <i>m</i> , 4H)	130,2	
C-14	27,2		27,2	
C-15	29,1 – 29,6		29,4	
C-16	31,5		31,5	
C-17	22,6		22,6	
C-18	14,2	0,90 ( <i>t</i> , <i>J</i> 6,8 Hz, 3H)	14,3	0,89 ( <i>t</i> , 3H)
C-1'	60,2	4,13 ( <i>q</i> , <i>J</i> 7,1 Hz, 2H)	60,2	4,12 (2H)
C-2'	14,1	1,26 ( <i>t</i> , <i>J</i> 7,1 Hz, 3H)	14,1	1,25 ( <i>t</i> , 3H)

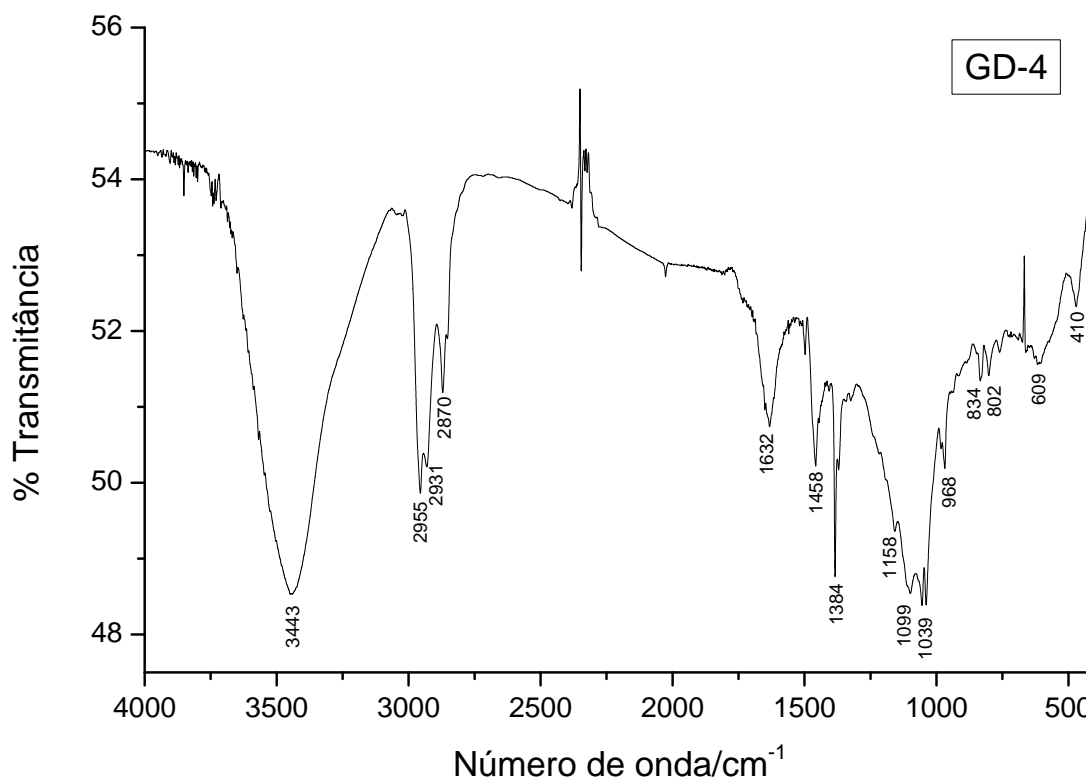
O linoleato de etila é um éster derivado do ácido linoleico, este, por sua vez, é um alimento funcional muito utilizado para a diminuição das doenças cardiovasculares, pois reduz os níveis de colesterol e triglicerídeos do sangue, acarretando no aumento da fluidez nos vasos sanguíneos e diminuição da pressão arterial (ANJO, 2004). O linoleato de etila também possui efeito hipocolesterolêmico, bem como atividades hepatoprotetora, nematocida e anti-histamínica (SUDHA; CHIDAMBARAMPILLAI; MOHAN, 2013). O composto foi identificado como componente principal do óleo volátil do corpo de frutificação do cogumelo comestível

*Pleurotus sajor-caju* (USAMI et al., 2014) e está presente também em várias plantas como *Allium sativum* (alho) e *Euphrasia stricta* (MILADINOVIC et al., 2014). *Allium sativum* possui diversas atividades biológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória, que estão associadas à presença de compostos voláteis de enxofre e também de compostos mais estáveis como o linoleato de etila. Recentemente, Park e colaboradores (2014) isolaram o linoleato de etila do óleo de alho e investigaram sua atividade anti-inflamatória, esclarecendo o mecanismo de ação do composto. Os autores concluíram, então, que os resultados obtidos forneceram a base molecular para o entendimento dos efeitos de inibição do linoleato de etila sobre a inflamação e que o composto pode ser usado como agente farmacológico no tratamento de doenças associadas à inflamação (PARK et al., 2014).

#### 5.2.2.2 GD-4

GD-4 consistiu de um sólido branco de ponto de fusão 164°C, cujo teste de Liebermann-Burchard indicou tratar-se de um esteroide (MATOS, 1988). No espectro de IV do composto (Figura 18), a banda larga em 3443 cm<sup>-1</sup> ( O-H) e as bandas em 1099 e 1039 cm<sup>-1</sup> ( C-O) evidenciaram a presença de hidroxila. As bandas em 2955, 2931 e 2870 cm<sup>-1</sup> caracterizaram estiramentos de ligações C<sub>sp</sub><sup>3</sup>-H, enquanto que as bandas em 1458 e 1384 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas a grupos metilênicos ( CH<sub>2</sub>) e metílicos ( CH<sub>3</sub>), respectivamente. O espectro evidenciou ainda a presença de ligação dupla ( C=C) por meio da banda em 1632 cm<sup>-1</sup>.

Figura 18 – Espectro de infravermelho de GD-4.



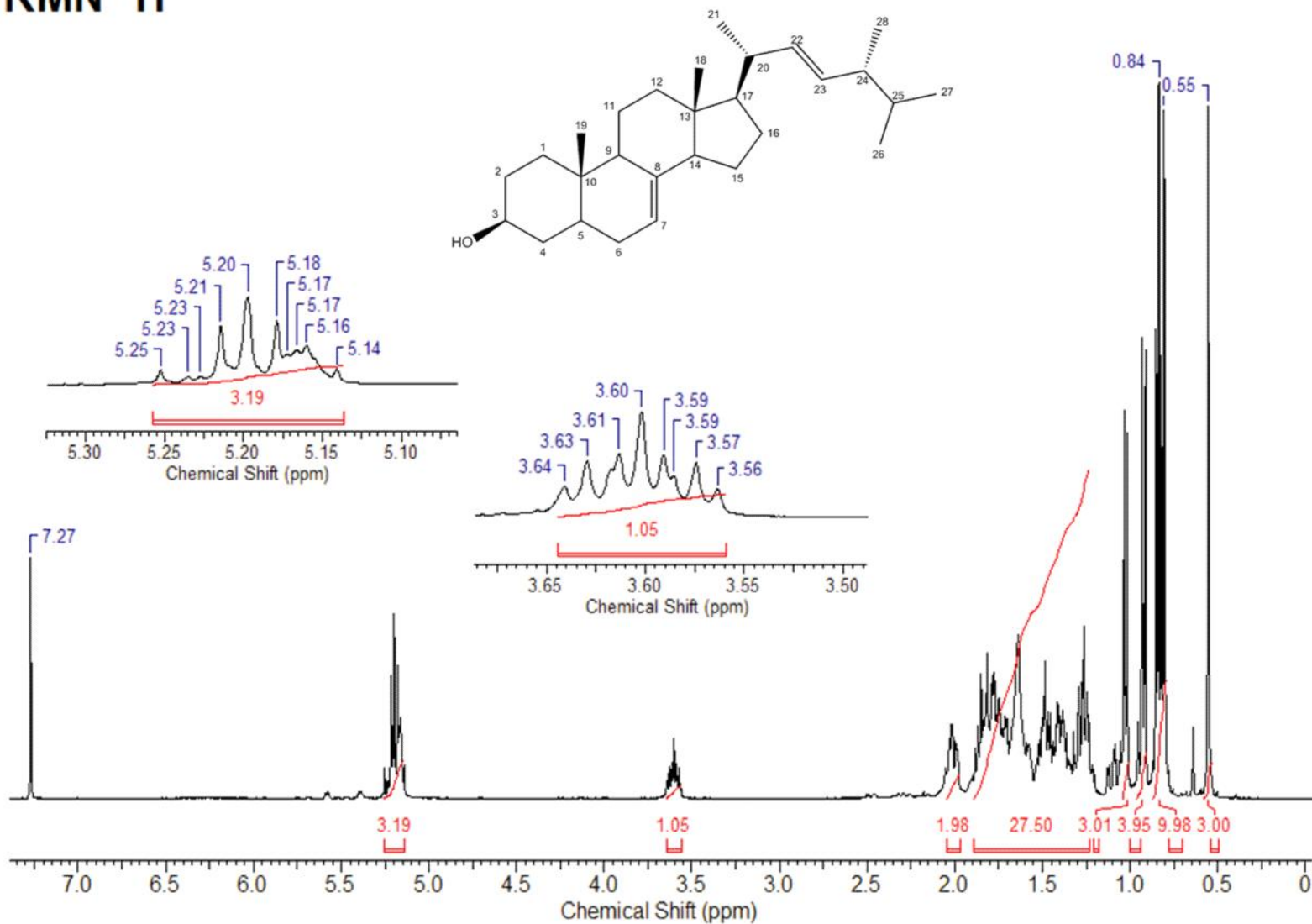
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GD-4, Figura 19, também sugeriu um composto esteroidal, apresentando diversos sinais na região de  $\delta$  0,5 a 2,0, referentes a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Foram observados ainda um sinal em  $\delta$  3,6 (1H, H-3), correspondente a um hidrogênio ligado ao carbono carbinólico e um multiplete na região de  $\delta$  5,14 a 5,24, com integração para três hidrogênios, que indicou a presença de insaturações.

A análise por CG-EM revelou a presença de um único constituinte e o espectro de massas deste (Figura 20) foi idêntico ao espectro do Ergosta-7,22-dien-3-ol ( $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ ) (Figura 21), obtido da biblioteca NIST, apresentando pico do íon molecular em  $m/z$  398 e pico base em  $m/z$  55. A perda de um grupo metílico resultou no fragmento  $m/z$  383  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ . O fragmento em  $m/z$  271 corresponderia à eliminação da cadeia lateral e transferência de dois hidrogênios  $[\text{M}-\text{R}-2\text{H}]^+$ . Tal decomposição é característica de esteroides com duas ligações duplas, uma em um dos anéis do núcleo esteroidal e a outra na cadeia lateral (MOSEICHUK et al., 1984). Os fragmentos  $m/z$  300, 255,  $[\text{M}-\text{R}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 246  $[\text{M}-\text{Anel D}]^+$ , 107, 91, 81, 69 e

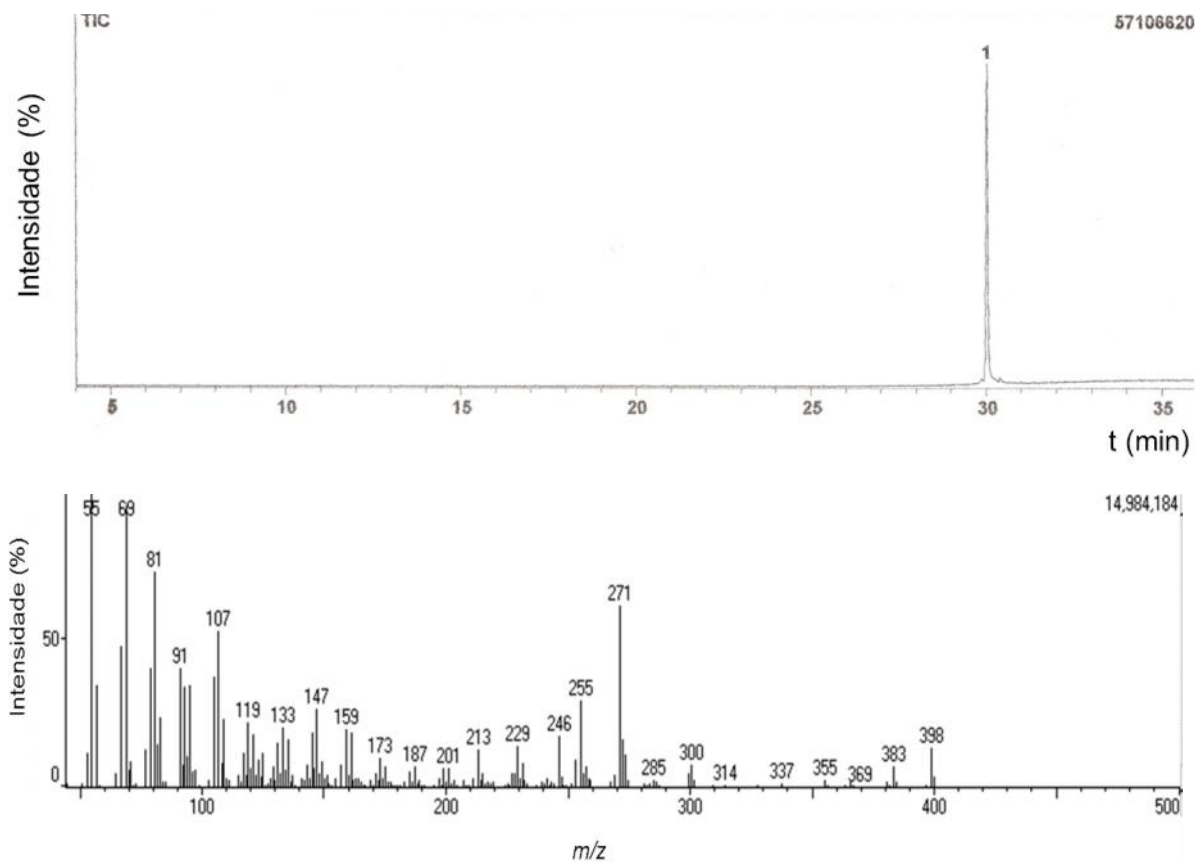
55 também foram compatíveis com dados registrados na literatura para o ergosta-7,22-dien-3-ol (MOSEICHUK et al., 1984). As propostas dos mecanismos das principais fragmentações citadas estão representadas na Figura 22.

Figura 19 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de GD-4 (ergosta-7,22-dien-3-ol) em  $\text{CDCl}_3$  (400,13 MHz)

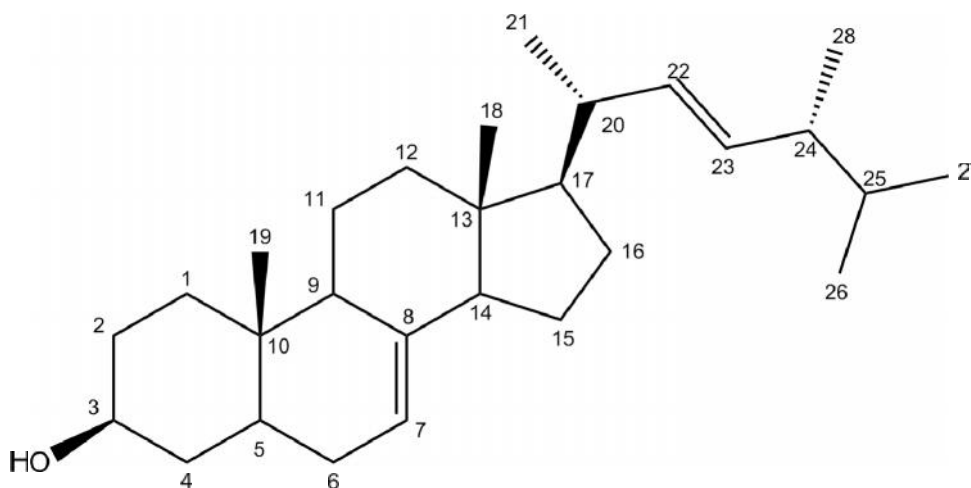
## RMN $^1\text{H}$



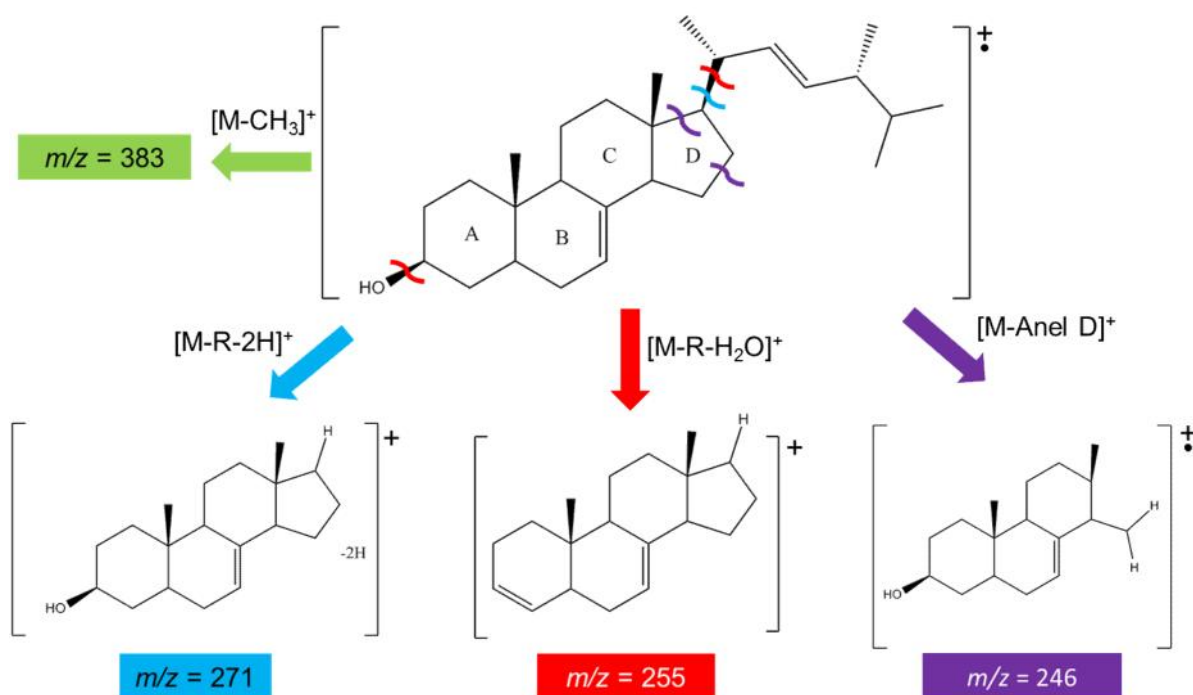
**Figura 20** – Cromatograma obtido por CG-EM de GD-4 e respectivo espectro de massas.



**Figura 21** – Estrutura do Ergosta-7,22-dien-3-ol (GD-4).



**Figura 22** – Principais fragmentações do espectro de massas para o ergosta-7,22-dien-3-ol.



A estrutura de GD-4 foi inequivocamente determinada como sendo o ergosta-7,22-dien-3-ol pelos dados do espectro de RMN de <sup>13</sup>C, Figura 23. Os sinais em  $\delta_c$  117,4 (C-7), 139,6 (C-8), 135,7 (C-22) e 131,9 (C-23) confirmaram a presença de duas ligações duplas, enquanto que o sinal em  $\delta_c$  71,1, atribuído ao carbono carbinólico (C-3), evidenciou a presença de uma hidroxila. Os demais sinais foram atribuídos aos carbonos  $sp^3$  e também foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos do ergosta-7,22-dien-3-ol registrados na literatura (SEO et al., 2009) (Tabela 11).

**Tabela 11** – Deslocamentos químicos  $\delta_c$  (ppm) de RMN <sup>13</sup>C de GD-4 comparados com valores descritos na literatura.

Posição	$\delta_c$ GD-4 (100,61 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta_c$ Ergosta-7,22-dien-3-ol (SEO et al., 2009) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
1	37,1	37,4
2	28,1	28,3
3	71,1	71,3
4	38,0	38,2

---

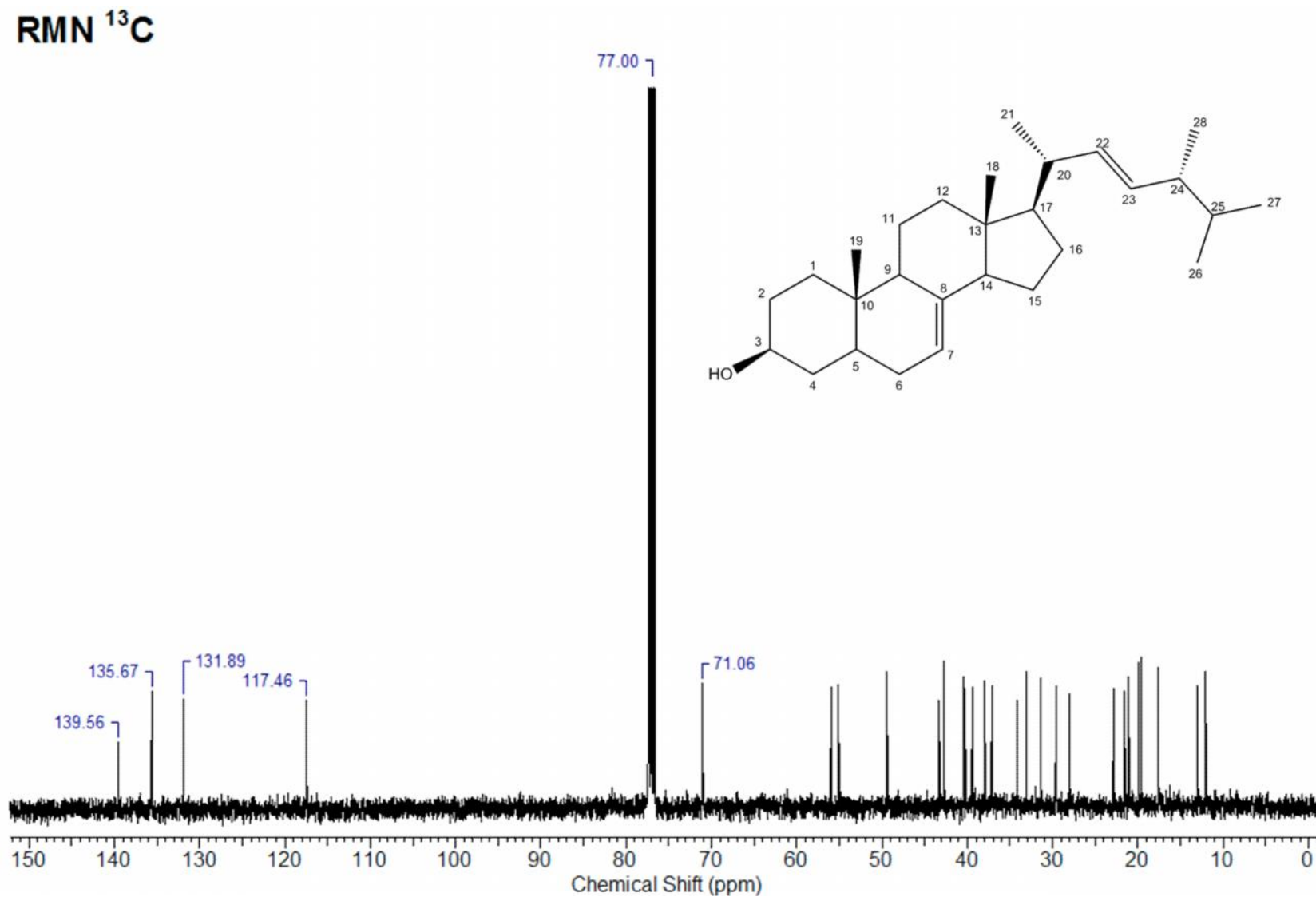
5	40,3	40,5
6	31,5	31,7
7	117,4	117,7
8	139,6	139,8
9	49,4	49,7
10	34,2	34,4
11	21,5	21,8
12	39,4	39,7
13	43,3	43,5
14	55,1	55,3
15	22,9	23,1
16	29,6	29,9
17	55,9	56,2
18	12,1	12,3
19	13,0	13,2
20	40,5	40,7
21	21,1	21,3
22	135,7	135,9
23	131,9	132,1
24	42,8	43,0
25	33,1	33,3
26	19,9	20,2
27	19,6	19,9
28	17,6	17,8

---

O ergosta-7,22-dien-3 -ol se destaca como sendo um dos esteroides mais isolados do gênero *Ganoderma*, tendo sido encontrado nas espécies de *G. mastoporum* (THANG et al., 2013), *G. pfeifferi* (NIEDERMEYER et al., 2005), *G. applanatum* e *G. neo-japonicum* (GAN; KUO; LIN, 1998), bem como em *G. annulare* coletado na região de Capanema, litoral do Paraná (SMANIA et al., 2003). Recentemente, Pereira e colaboradores (2014b) demonstraram que o ergosta-7,22-dien-3 -ol possui atividade contra células de neuroblastoma (SH-SY5Y), inibindo o ciclo celular entre G0/G1. Além disso, o mesmo grupo verificou um aumento do efeito anti-inflamatório desse composto quando administrado conjuntamente com

ácidos graxos insaturados (ácidos *cis*-eicos-11-enóico e *cis*-eicosa-11,14-dienóico)  
(PEREIRA et al., 2014a).

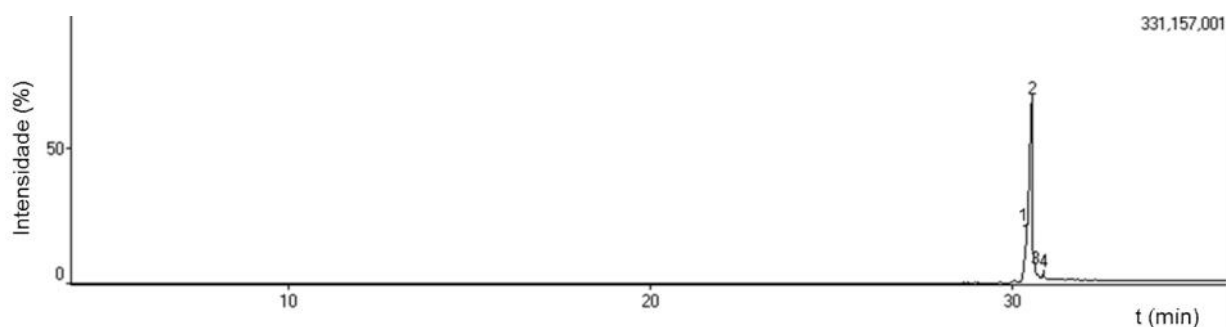
Figura 23 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GD-4 (ergosta-7,22-dien-3-ol) em  $\text{CDCl}_3$  (100,61 MHz).



### 5.2.2.3 Mistura de GD-4 e GD-5

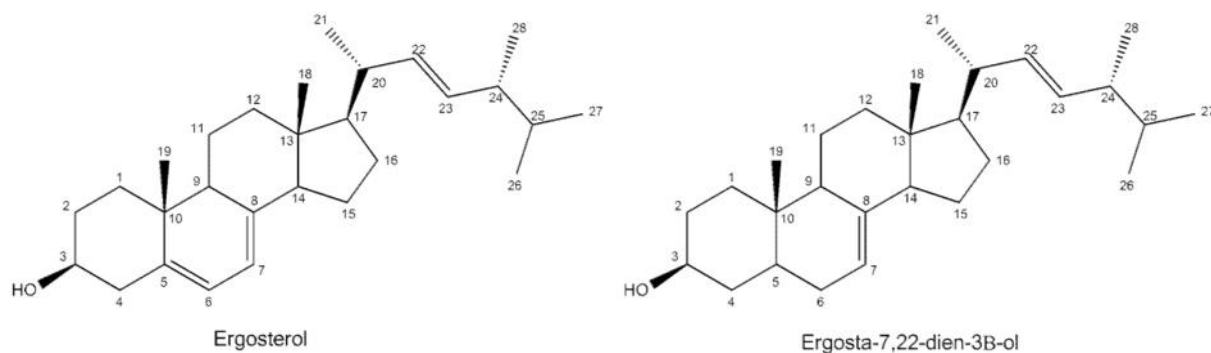
A mistura consistiu de um sólido branco que apresentou uma única mancha quando analisado por CCD revelada com vanilina sulfúrica e aquecimento. A análise por CG-EM indicou tratar-se de uma mistura de dois constituintes de difícil separação, conforme mostrado no cromatograma da Figura 24.

**Figura 24** – Cromatograma obtido por CG-EM da mistura de GD-4 e GD-5.

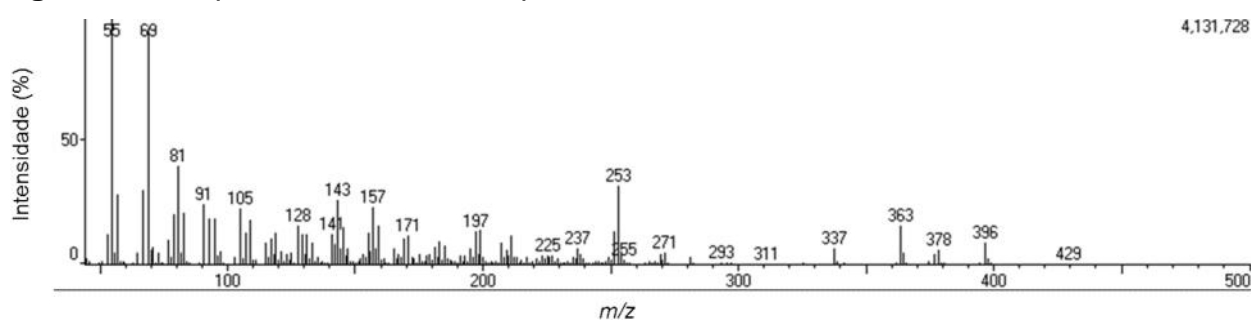


Os espectros de massas das substâncias apresentaram picos dos íons moleculares em  $m/z$  396, para o composto relativo ao pico 1, e  $m/z$  398, para o composto referente ao pico 2, indicando que o composto 1 continha uma ligação dupla a mais que o constituinte 2. De fato, a pesquisa no banco de dados da biblioteca NIST mostrou que o espectro de massas do constituinte correspondente ao pico 1 era idêntico ao do ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ ) e que o espectro do composto 2 correspondia à estrutura do ergosta-7,22-dien-3-ol (Figura 25) composto já isolado anteriormente e denominado de GD-4. O espectro de massas do composto correspondente ao pico 1, agora denominado de GD-5, também apresentou pico base em  $m/z$  55 e demais picos equivalentes aos do composto GD-4, com exceção do pico do íon molecular ( $m/z$  396) e dos fragmentos em  $m/z$  363  $[M-CH_3-H_2O]^+$ , 337  $[M-59]^+$  e 253, conforme mostrado na Figura 26. Todos os dados do espectro de massas foram condizentes com os registrados na literatura para o ergosterol (MOSEICHUK et al., 1984).

**Figura 25** – Estrutura do ergosterol (GD-5) e do ergosta-7,22-dien-3-ol (GD-4).

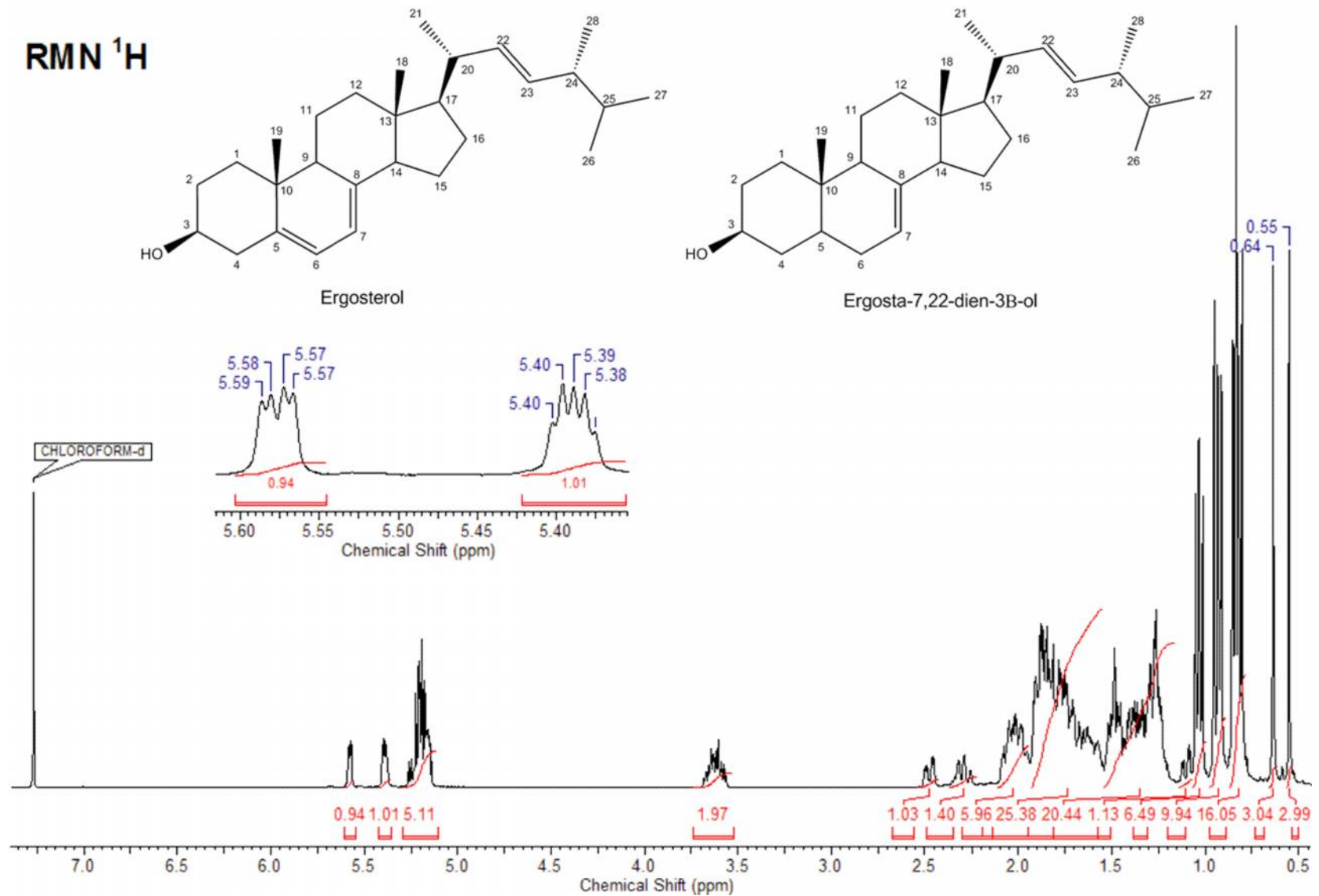


**Figura 26** – Espectro de massas do pico 1 de GD-5.



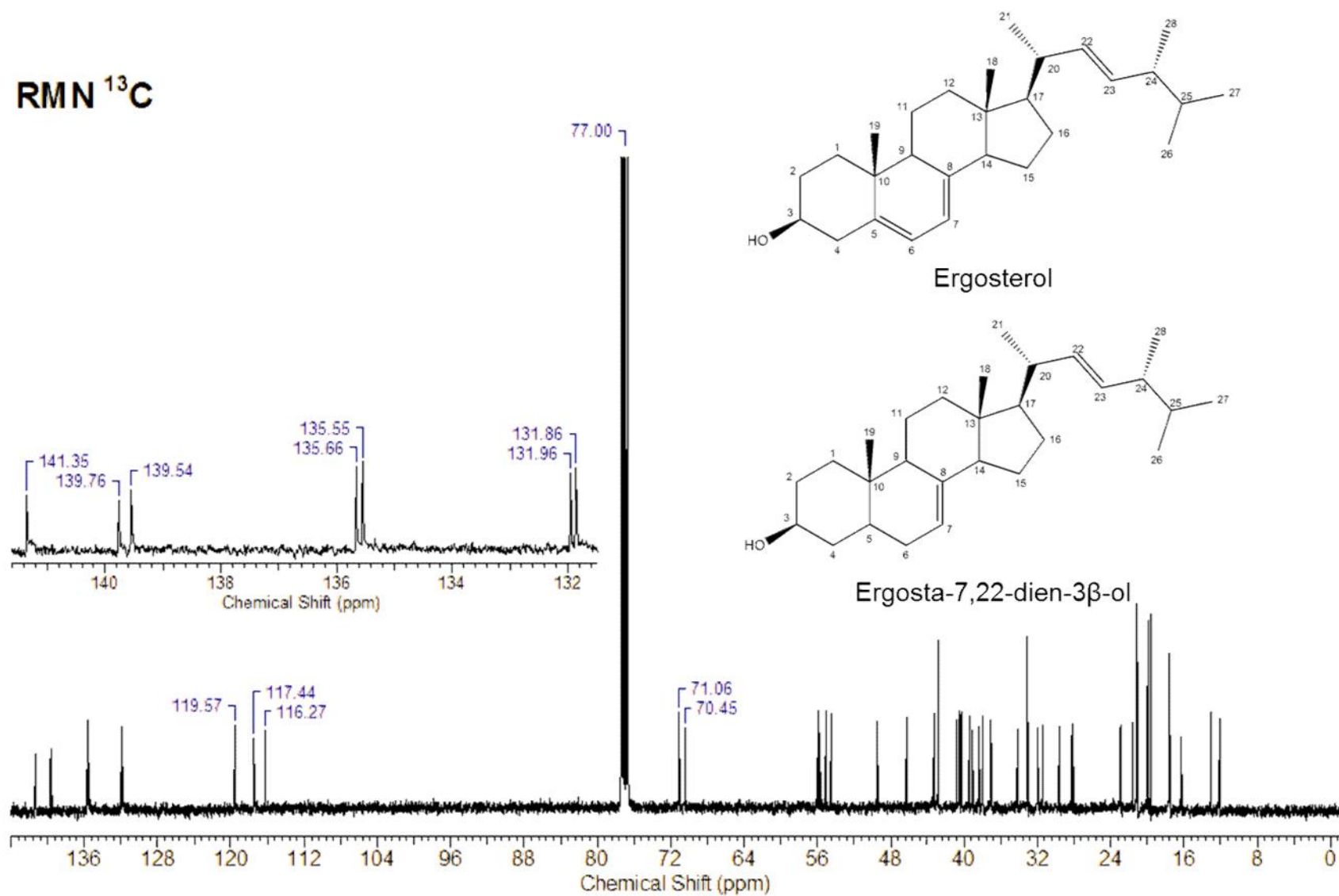
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura (Figura 27) foi semelhante ao observado para o ergosta-7,22-dien-3-ol, com exceção da presença de mais quatro hidrogênios olefínicos e de mais um hidrogênio ligado ao carbono carbinólico em 3,7 ppm. Na região de absorção dos prótons olefínicos, destaca-se a presença de um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,58 ( $dd$ ,  $J^3$  5,5 Hz,  $J^4$  2,2 Hz, 1H) atribuído ao H-6 e do multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,39 ( $m$ , 1H) do H-7, referentes à ligação dupla adicional da estrutura do ergosterol (SEO et al., 2009).

Figura 27 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de GD-5 e GD-4 (ergosterol e ergosta-7,22-dien-3-ol) em  $\text{CDCl}_3$  (400,13 MHz).



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 10 picos na região de carbono insaturado, correspondentes às três ligações duplas do ergosterol [  $\delta_{\text{C}}$  139,8 (C-5); 119,6 (C-6); 116,3 (C-7); 141,4 (C-8); 135,6 (C-22) e 132,0 (C-23)] e duas do ergosta-7,22-dien-3-ol [  $\delta_{\text{C}}$  117,4 (C-7); 139,6 (C-8); 135,7 (C-22) e 131,9 (C-23)]. Também foram observados dois sinais atribuídos a carbonos carbinólicos, um em 70,5 ppm, correspondente a C-3 do ergosterol (GD-5) e outro em 71,2 ppm, referente a C-3 do ergosta-7,22-dien-3-ol. Todos os sinais foram concordantes com os deslocamentos químicos dos carbonos do ergosta-7,22-dien-3-ol (GD-4) e do ergosterol (GD-5) (Figura 28) (Tabela 12) registrados na literatura (SEO et al., 2009). O aumento da intensidade dos sinais de carbonos coincidentes para as duas estruturas confirmou também a mistura dos dois esteroides.

Figura 28 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de GD-5 e GD-4 (ergosterol e ergosta-7,22-dien-3-ol) em  $\text{CDCl}_3$  (100,61 MHz).



**Tabela 12** – Deslocamentos químicos  $\delta_c$  (ppm) de RMN  $^{13}\text{C}$  de GD-5 comparados com valores descritos na literatura para o ergosterol.

<b>Posição</b>	<b><math>\delta_c</math> GD-5 (100,61 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>	<b><math>\delta_c</math> Ergosterol (SEO et al., 2009) (100 MHz, <math>\text{CDCl}_3</math>)</b>
1	38,4	38,6
2	32,0	32,2
3	70,5	70,7
4	40,8	41,0
5	139,8	140,0
6	119,6	119,8
7	116,3	116,5
8	141,4	141,6
9	46,2	46,5
10	37,0	37,2
11	21,5	21,7
12	39,1	39,3
13	42,8	43,0
14	54,5	54,8
15	23,0	23,2
16	28,3	28,5
17	55,7	55,9
18	12,0	12,3
19	16,3	16,5
20	40,4	40,6
21	21,1	21,3
22	135,6	135,8
23	132,0	132,2
24	43,3	43,0
25	33,1	33,3
26	19,6	19,9
27	19,9	20,2
28	17,6	17,8

O ergosterol é muito encontrado em fungos, estando completamente ou quase ausente em animais, vegetais e bactérias. Esta substância é um dos constituintes essenciais para a manutenção do micro-organismo, visto que confere rigidez, fluidez e permeabilidade à membrana celular. Além de desempenhar papel importante como precursor da vitamina D<sub>2</sub>, o ergosterol e seus derivados foram identificados como alguns dos responsáveis pela diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol e triglicerídeos em humanos. Outros efeitos benéficos encontrados para este composto foram as atividades antioxidante, antiangiogênica e anticancerígena (HE et al., 2014). Seo e colaboradores (2009) relataram que o ergosterol, juntamente com o ácido ganodérico Sz, apresentou potente atividade anticomplementar podendo ser utilizado na terapia de doenças inflamatórias.

#### 5.2.2.4 Mistura de ésteres de esteroides GD-1 e GD-2

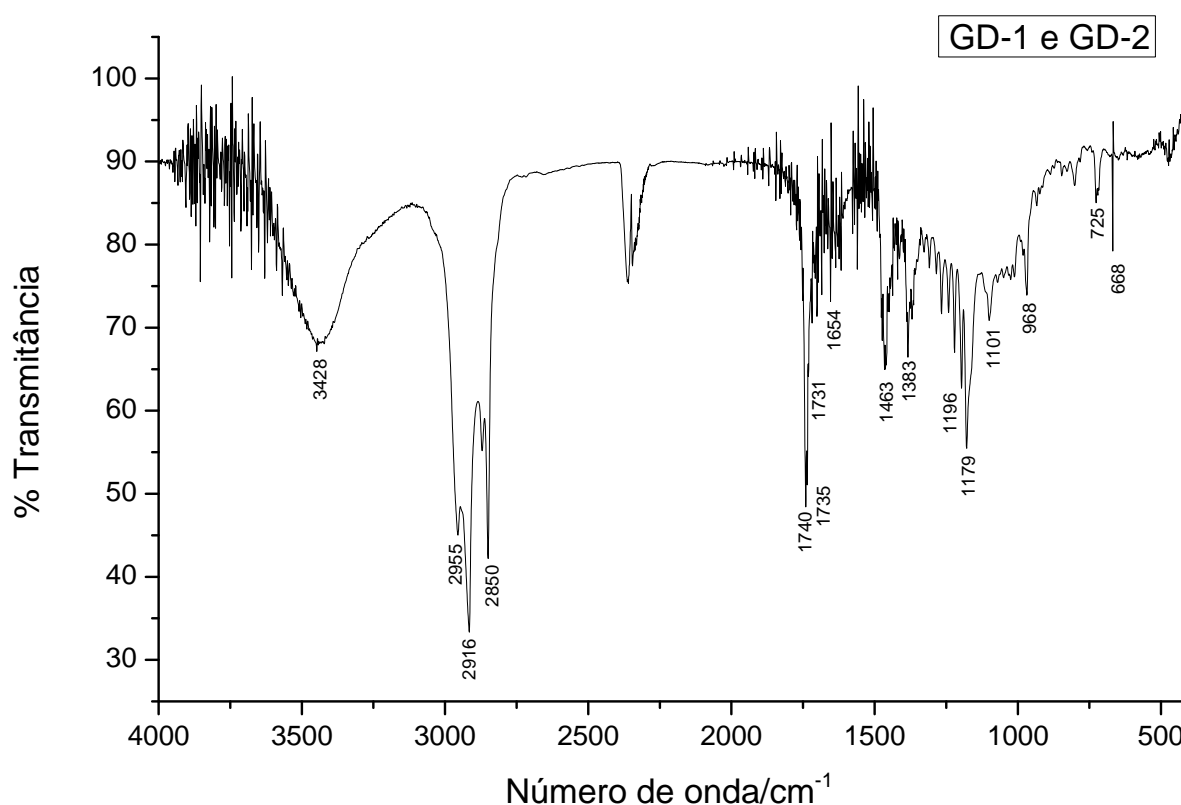
A mistura consistiu de um sólido branco que apresentou uma única mancha quando analisado em CCD, revelada com vanilina sulfúrica. O teste de Liebermann-Burchard indicou a presença de esteroide pelo desenvolvimento da coloração azul seguida de cor verde persistente (MATOS, 1988), Figura 29.

**Figura 29** – Resultado do teste de Liebermann-Burchard para a mistura GD-1 e GD-2.



O espectro de infravermelho (Figura 30) apresentou bandas de absorção em 2955, 2916 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  que foram atribuídas ao estiramento da ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ . As bandas intensas em 1740 e 1735  $\text{cm}^{-1}$  indicaram a presença de carbonilas de ésteres ( $\text{C}=\text{O}$ ), enquanto que a banda em 1179  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à ligação  $\text{C-O}$ . O estiramento de ligação dupla foi observado pela banda de intensidade média em 1654  $\text{cm}^{-1}$ . A banda em 1463  $\text{cm}^{-1}$  indicou a presença de grupo metilênico ( $\text{CH}_2$ ), enquanto que a banda em 725  $\text{cm}^{-1}$  foi característica de quatro ou mais grupos  $\text{CH}_2$  em cadeia aberta.

**Figura 30** – Espectro de infravermelho da mistura de GD-1 e GD-2.



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , Figura 31, mostrou-se muito complexo devido à sobreposição dos sinais de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos entre 0,5 e 2,5 ppm. O multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,72 foi característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Na região de hidrogênios vinílicos, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,27 (*m*, 7H), 5,39 (*m*, 1H) e 5,57 (*dd*,  $J^{\beta}$  5,7 Hz,  $J^{\alpha}$  2,7 Hz, 1H) foram muito semelhantes aos valores de deslocamentos encontrados no espectro da mistura de ergosterol (GD-5) e ergosta-7,22-dien-3-ol (GD-4), descritos anteriormente (Figura 27).

A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) confirmou a presença de duas carbonilas pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  173,5 e 173,3. O espectro indicou ainda a existência de cinco insaturações por meio dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  141,5, 139,5, 138,6, 135,7, 135,6, 132,0, 131,9, 120,1, 117,3 e 116,3, cujos deslocamentos químicos foram também, muito próximos daqueles encontrados para os carbonos  $\text{sp}^2$  da mistura de ergosterol (GD-5) e ergosta-7,22-dien-3-ol (GD-4). Comparando os deslocamentos de carbono  $\text{sp}^3$  da presente mistura com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de GD-4 e GD-5, foram observados valores muito próximos, com exceção dos carbonos oxigenados, que aparecem um pouco mais desprotegidos no espectro da mistura de GD-1 e GD-2 (72,5 e 73,1 ppm, respectivamente) em relação aos da mistura de ergosterol e ergosta-7,22-dien-3-ol (71,1 e 70,5 ppm), indicando que as hidroxilas estariam esterificadas. Outra diferença observada nos espectros foi a presença de vários sinais na região de  $\delta_{\text{C}}$  28,1 a 29,7 no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que foram confirmados por meio do experimento de DEPT 135, tratarem-se de pelo menos nove grupos metilênicos (Figura 33).

Figura 31 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de GD-1 e GD-2 em  $\text{CDCl}_3$  (400,13 MHz).

## RMN $^1\text{H}$

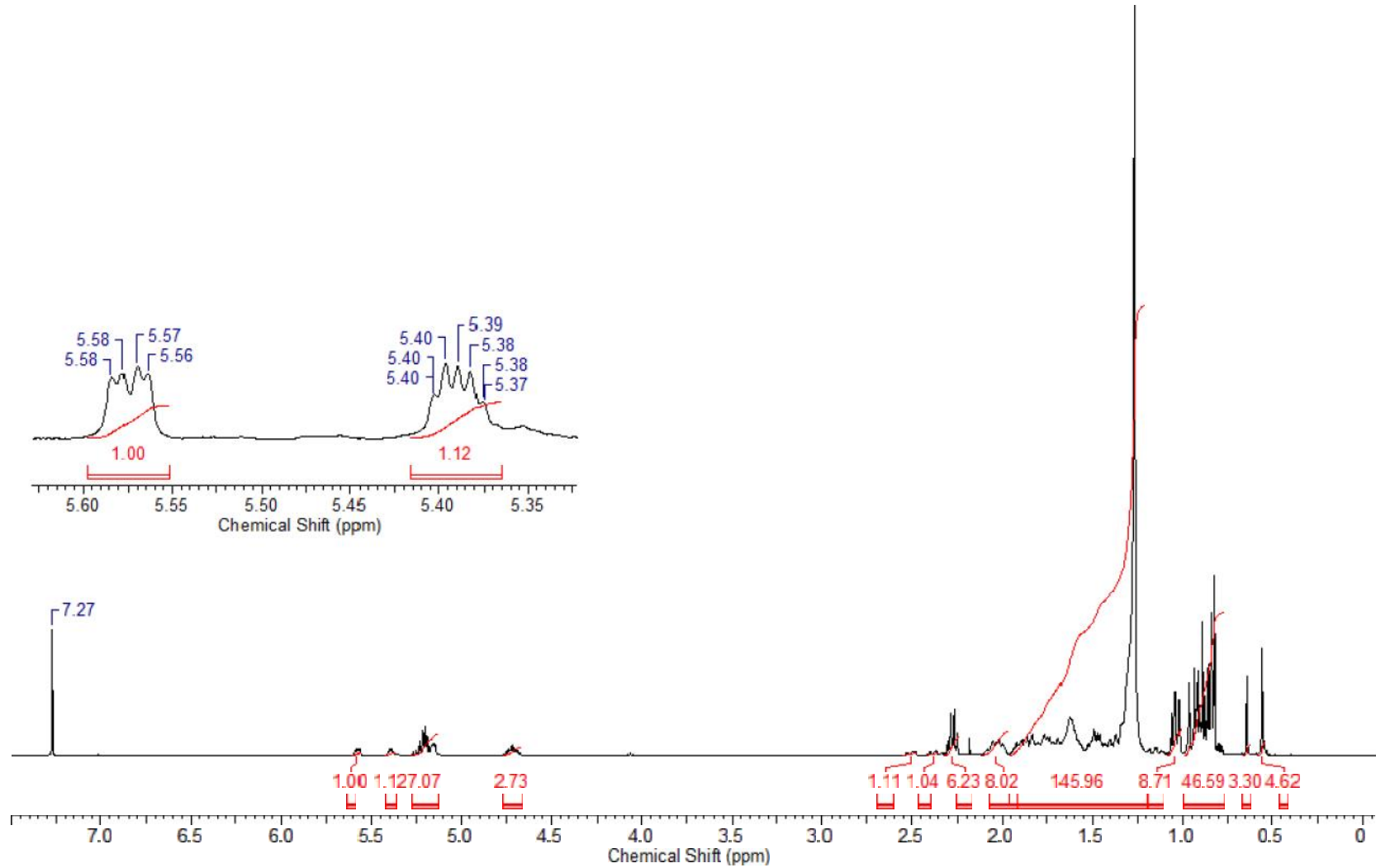
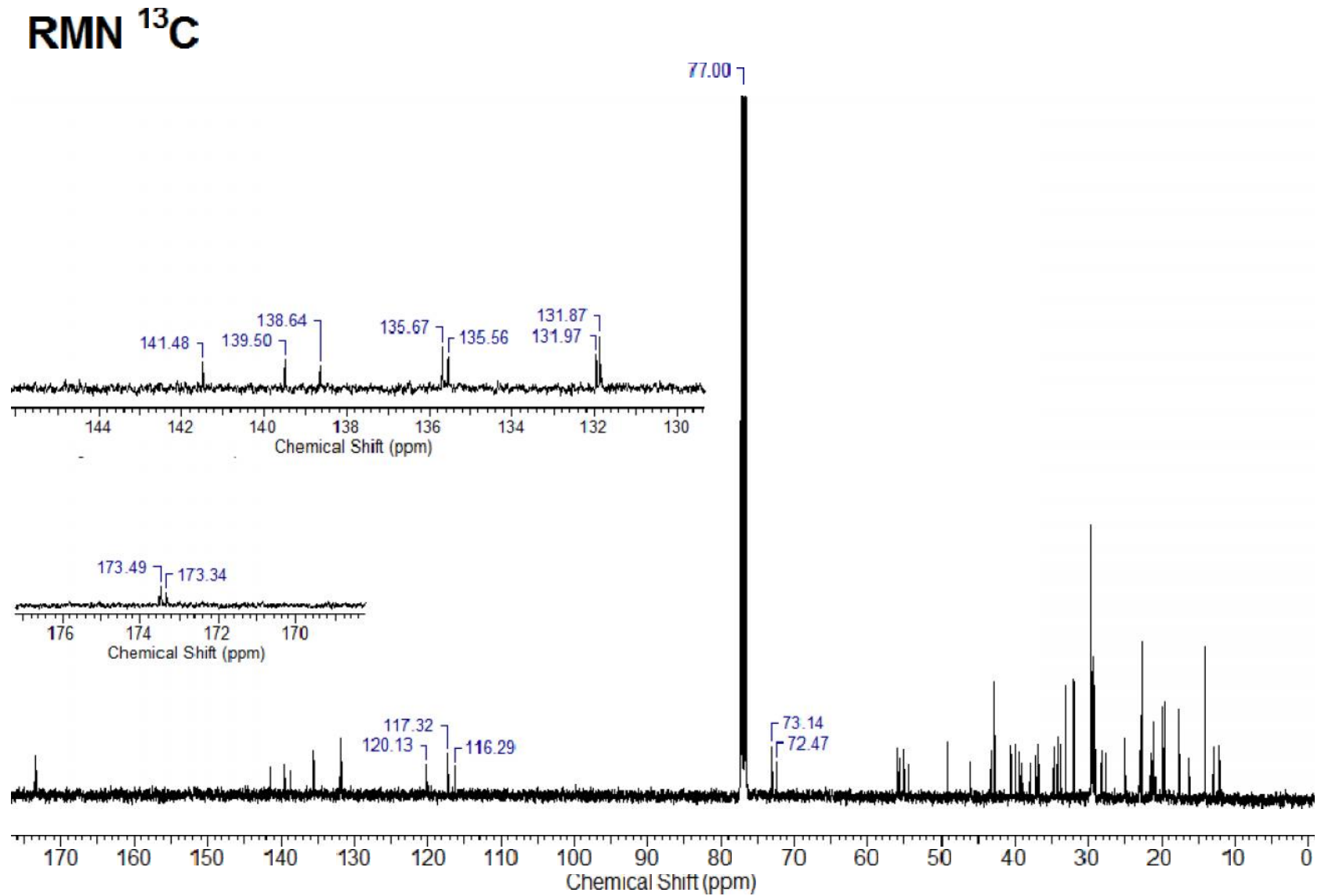
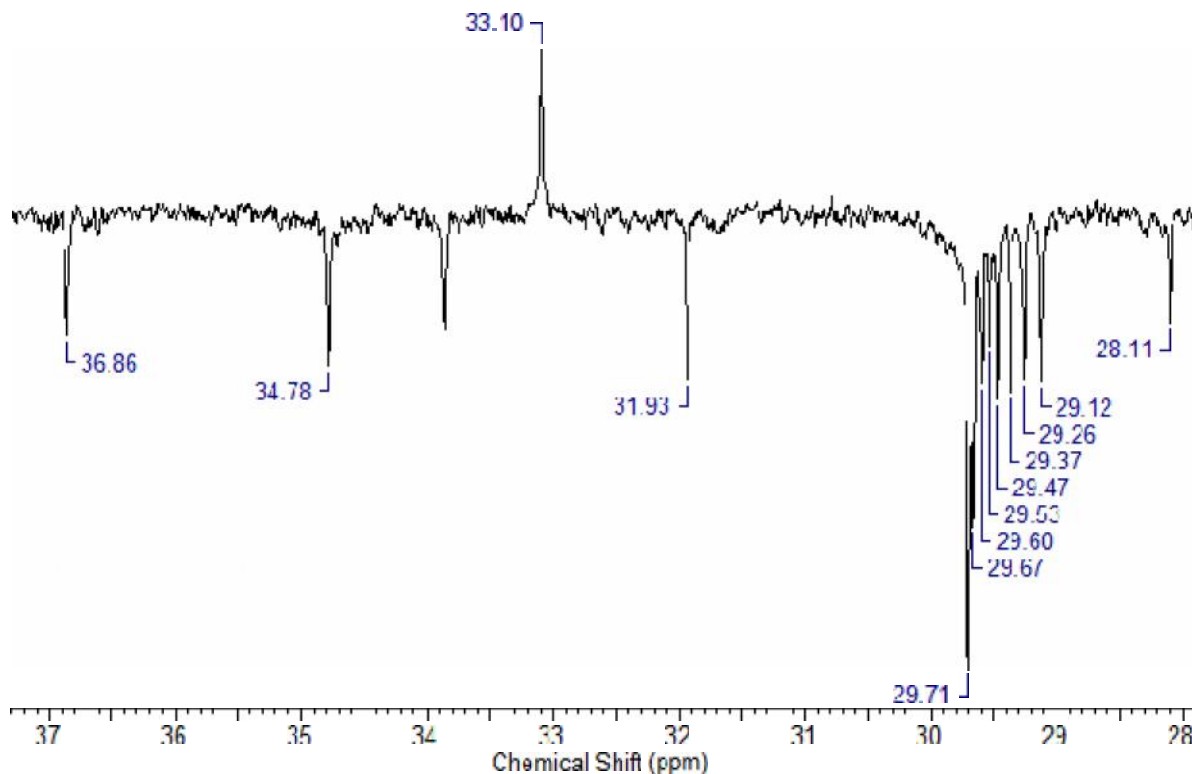


Figura 32 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de GD-1 e GD-2 em  $\text{CDCl}_3$  (100,61 MHz).



**Figura 33** – Experimento de DEPT 135 da região entre 37 a 28 ppm da mistura de GD-1 e GD-2 (100,61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## DEPT 135



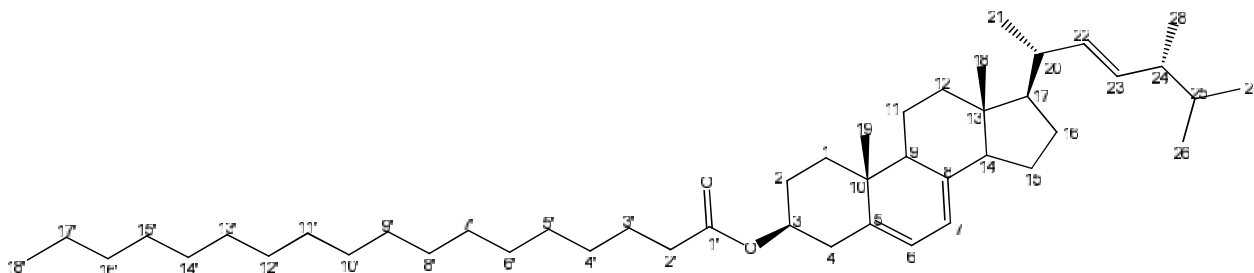
Os dados analisados sugeriram que o constituinte em análise tratava-se de uma mistura de ergosterol e ergosta-7,22-dien-3 -ol esterificados com ácido graxo. De fato, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de GD-1 e GD-2 foi possível identificar deslocamentos químicos similares a todos os sinais atribuídos à estrutura do estearato de ergosterila ( $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_2$ ) (Tabela 13), sintetizado por Komura e colaboradores (2008).

A análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) da mistura de GD-1 e GD-2 confirmou a estrutura de GD-1 como estearato de ergosterila (Figura 34) por meio do aduto em  $m/z$  685  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , que indicou uma massa molecular de 662 u (Figura 35). Conforme descrito na literatura, este constituinte foi identificado na fração lipídica de *Saccharomyces cerevisiae* (EZANKA, 1992) e no corpo de frutificação do fungo *Hericium erinaceum* (LI et al., 2014), no entanto, é a primeira vez que se isola o estearato de ergosterila no gênero *Ganoderma*.

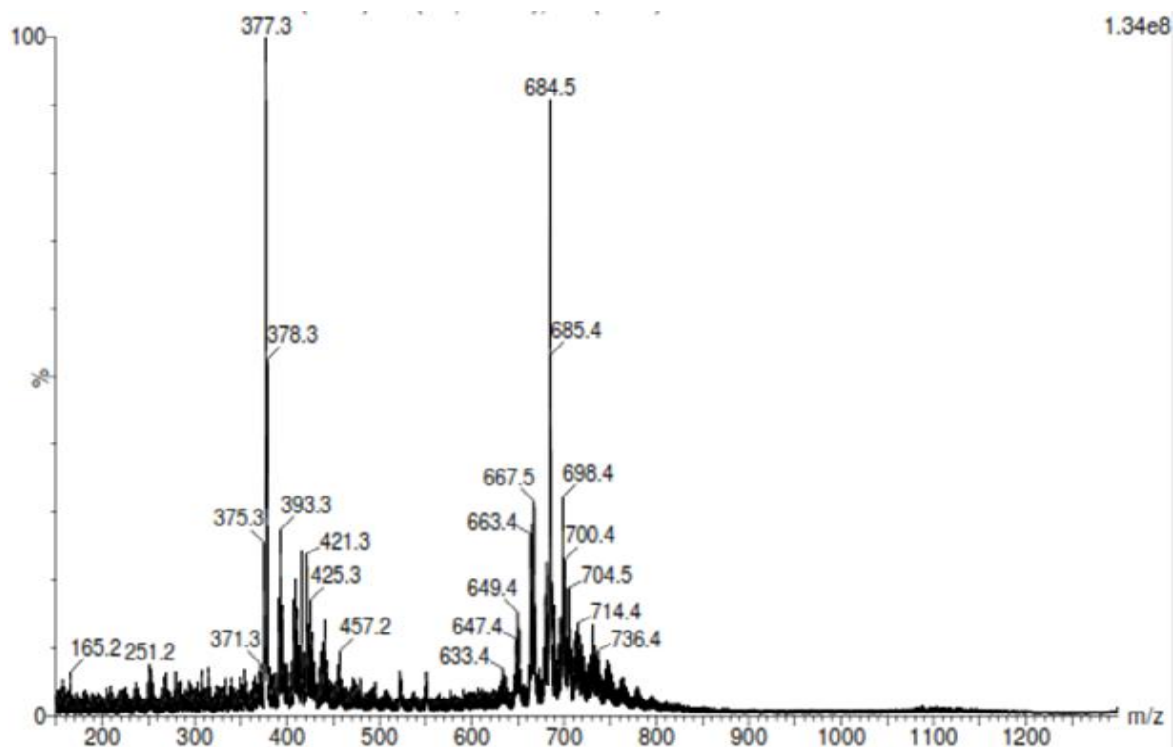
**Tabela 13** – Deslocamentos químicos  $\delta_c$  (ppm) de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GD-1 comparados com valores descritos na literatura para o estearato de ergosterila.

Posição	$\delta_c$ Mistura de GD-1 e GD-2 (100,61 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_c$ Estearato de ergosterila (KOMURA, K. et al., 2008) (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
C-1	37,9	38,0
C-2	31,9	32,0
C-3	72,5	72,5
C-4	40,4	40,5
C-5	138,7	138,7
C-6	120,1	120,2
C-7	116,3	116,4
C-8	141,5	141,5
C-9	46,0	46,1
C-10	37,1	37,2
C-11	21,0	21,1
C-12	39,0	39,1
C-13	42,8	42,9
C-14	54,5	54,6
C-15	23,0	23,1
C-16	28,3	28,4
C-17	55,7	55,7
C-18	12,1	12,1
C-19	16,2	16,3
C-20	40,5	40,5
C-21	21,1	21,2
C-22	135,6	135,6
C-23	132,0	132,1
C-24	43,3	42,9
C-25	33,1	33,2
C-26	19,6	19,7
C-27	20,0	20,0
C-28	17,6	17,7
C-1'	173,4	173,4
C-2'	34,8	35,0
C-3'	31,9	32,0
C-4' – C-15'	28,1 – 29,7	28,2 – 29,8
C-16'	25,1	25,1
C-17'	22,7	22,8
C-18'	14,1	14,2

**Figura 34** – Estrutura do estearato de ergosterila.



**Figura 35** – Espectro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) da mistura de GD-1 e GD-2.



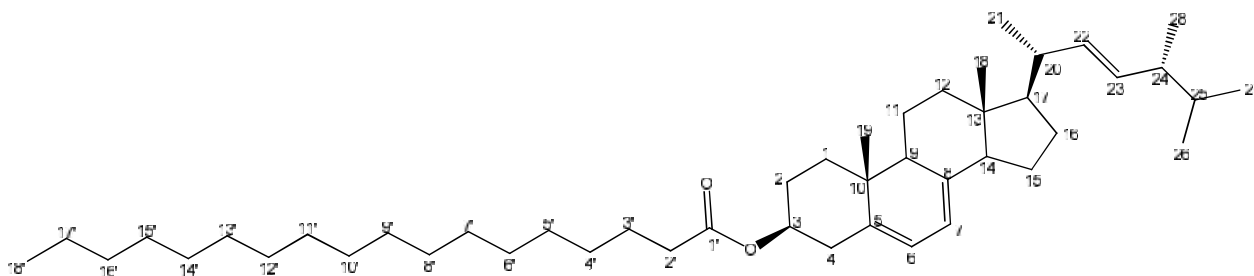
Apesar dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indicarem que o outro composto, GD-2, da mistura seria o estearato de ergosta-7,22-dien-3-ila, não foi possível caracterizar todos os carbonos da estrutura proposta, devido à complexidade dos espectros da mistura. Além disso, o aduto correspondente à massa molecular desta estrutura não foi detectada no espectro de ESI-MS. Entretanto, relatos na literatura indicam que ésteres deste esteroide já foram isolados de corpo de frutificação de *Ganoderma* sp, como o palmitato (LIN; TOME; WON, 1990) e pentadecanoato de ergosta-7,22-dien-3-ila (ZIEGENBEIN; HANSSSEN; KONIG, 2006). Desta forma, pode-se inferir que GD-2 trata-se do ergosta-7,22-dien-3-ol esterificado com ácido graxo, porém não foi

possível estabelecer o número de carbonos deste ácido graxo e, portanto, a estrutura de GD-2 não pode ser completamente elucidada.

A importância da presença do estearato de ergosterol no cogumelo em estudo reside no fato de que, por ser esta molécula mais lipossolúvel do que o ergosterol, os efeitos benéficos desta substância seriam potencializados. Nos últimos anos, um grande número de estudos foram desenvolvidos para sintetizar ésteres de ácidos graxos de fitoesteróides utilizando tanto a esterificação química como a catálise por lipases (HE et al., 2014).

### 5.3 DADOS ESPECTRAIS E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *G. CF. STIPITATUM*

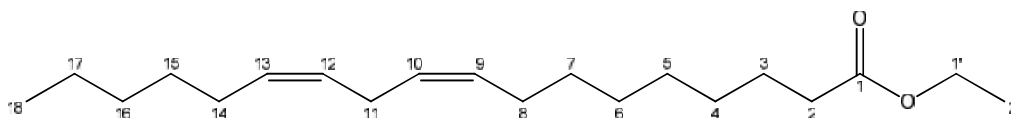
#### 5.3.1 Estearato de ergosterila (GD-1) em mistura com (GD-2)



Sólido (10,1 mg).

Estearato de ergosterila (Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, 3-octadecanoato) ( $C_{46}H_{78}O_2$ ): ESI-MS ( $m/z$ ) 662;  $^1H$  NMR (400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $H$  5,57 (*dd*, 1H,  $J = 5,8$  e 2,7 Hz), 5,39 (*m*, 1H), 5,27 (*m*), 4,72 (*m*, H-3);  $^{13}C$  NMR (100,61 MHz,  $CDCl_3$ )  $C$  37,9 (C-1), 31,9 (C-2), 72,5 (C-3), 40,4 (C-4), 138,7 (C-5), 120,1 (C-6), 116,3 (C-7), 141,5 (C-8), 46,0 (C-9), 37,1 (C-10), 21,0 (C-11), 39,0 (C-12), 42,8 (C-13), 54,5 (C-14), 23,0 (C-15), 28,3 (C-16), 55,7 (C-17), 12,1 (C-18), 16,2 (C-19), 40,5 (C-20), 21,1 (C-21), 135,6 (C-22), 132,0 (C-23), 43,3 (C-24), 33,1 (C-25), 19,6 (C-26), 20,0 (C-27), 17,6 (C-28), 173,4 (C-1'), 34,8 (C-2'), 31,9 (C-3'), 28,1 – 29,7 (C-4' – C-15'), 25,1 (C-16'), 22,7 (C-17'), 14,1 (C-18').

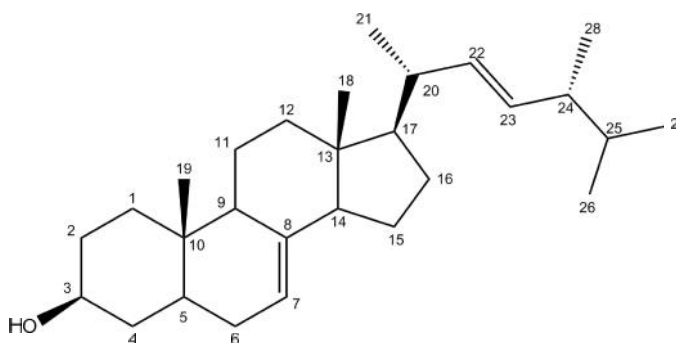
## 5.3.2 Linoleato de etila (GD-3)



Óleo (27,1 mg).

Linoleato de etila, (9-*cis*,12-*cis*)-octadeca-9,12-dienoato de etila (C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>): CG-MS (*m/z*): 308 [M]<sup>+</sup>, 279, 262, 220, 109, 95, 81, 67, 55; IR (KBr) max 2931, 2857, 1734, 1637, 1463, 1374, 1183, 1097, 1032, 772, 727, 667 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <sub>H</sub> 5,36 (*m*, 4H, H-9, H-10, H-12, H-13), 4,13 (*q*, 2H, *J* = 7,1 Hz, H-1'), 2,78 (*t*, 2H, *J* = 6,5 Hz, H-11), 2,29 (*t*, 2H, *J* = 7,6 Hz, H-2), 1,26 (*t*, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-2'), 0,90 (*t*, 3H, *J* = 6,8 Hz, H-18); <sup>13</sup>C NMR (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <sub>C</sub> 173,9 (C-1), 34,4 (C-2), 25,0 (C-3), 29,1 – 29,6 (C-4, C-5, C-6, C-7), 27,2 (C-8), 128,0 (C-9), 127,9 (C-10), 25,6 (C-11), 130,2 (C-12), 130,0 (C-13), 27,2 (C-14), 29,1 – 29,6 (C-15), 31,5 (C-16), 22,6 (C-17), 14,2 (C-18), 60,2 (C-1'), 14,1 (C-2').

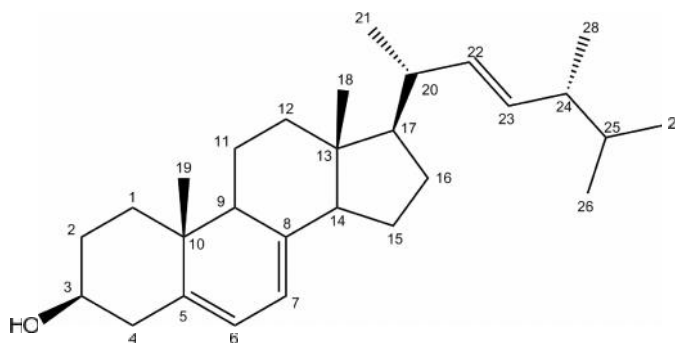
## 5.3.3 Ergosta-7,22-dien-3 -ol (GD-4)



Ergosta-7,22-dien-3 -ol (*stella sterol*) (C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O): sólido branco (72,0 mg); Recristalizado em: mistura de hexano e diclorometano; P.F.: 164°C; CG-MS (*m/z*): 398 [M]<sup>+</sup>, 383, 271, 255, 246, 107, 91, 81, 69, 55; IR (KBr) max 3443, 2955, 2931, 2870, 1632, 1458, 1384, 1158, 1099, 1039, 968 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <sub>H</sub> 5,2 (*m*), 3,6 (*m*); <sup>13</sup>C NMR (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <sub>C</sub> 37,1 (C-1), 28,1 (C-2), 71,1 (C-3), 38,0 (C-4), 40,3 (C-5), 31,5 (C-6), 117,4 (C-7), 139,6 (C-8), 49,4 (C-9), 34,2 (C-10), 21,5 (C-11), 39,4 (C-12), 43,3 (C-13), 55,1 (C-14), 22,9 (C-15), 29,6 (C-16), 55,9 (C-

17), 12,1 (C-18), 13,0 (C-19), 40,5 (C-20), 21,1 (C-21), 135,7 (C-22), 131,9 (C-23), 42,8 (C-24), 33,1 (C-25), 19,9 (C-26), 19,6 (C-27), 17,6 (C-28).

#### 5.3.4 Ergosterol (GD-5) em mistura com ergosta-7,22-dien-3 -ol (GD-4)



Sólido branco (18,1 mg)

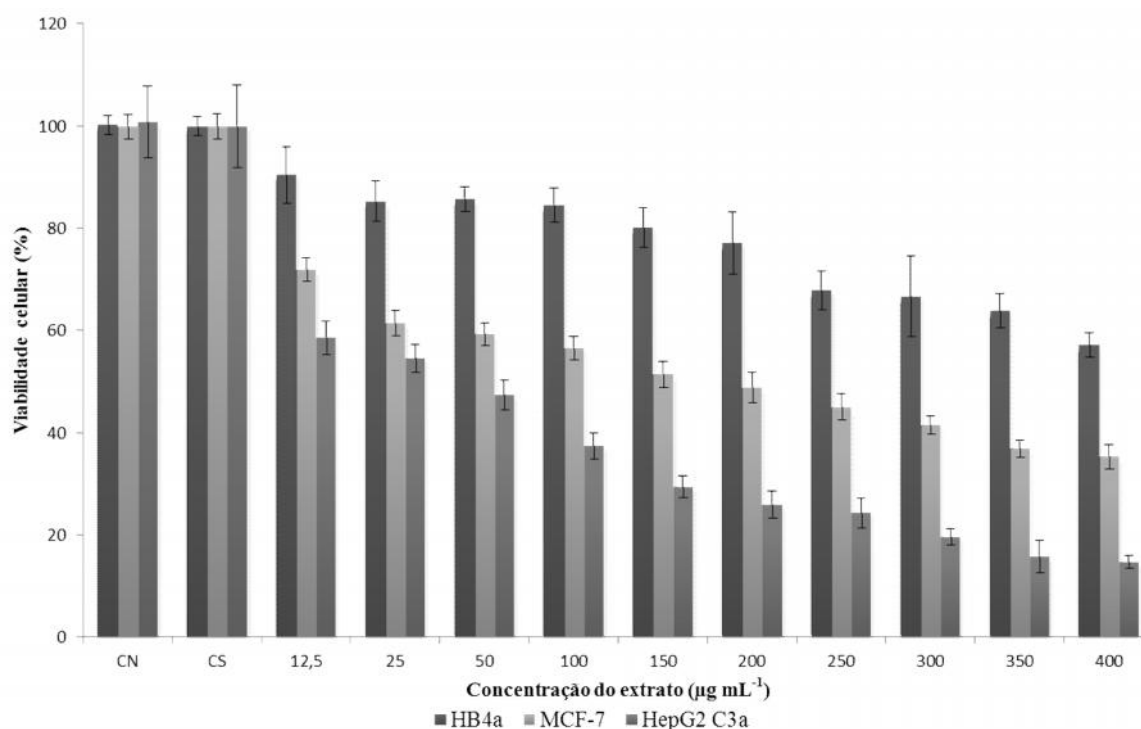
Ergosterol (Ergosta-5,7,22-trien-3 -ol) ( $C_{28}H_{44}O$ ): CG-MS ( $m/z$ ): 396  $[M]^+$ , 363, 337, 271, 253, 105, 91, 81, 69, 55;  $^1H$  NMR (400,13 MHz,  $CDCl_3$ )  $_H$  5,58 (*dd*,  $J = 5,5$  e 2,2 Hz, H-6), 5,39 (*m*, H-7);  $^{13}C$  NMR (100,61 MHz,  $CDCl_3$ )  $_C$  38,4 (C-1), 32,0 (C-2), 70,5 (C-3), 40,8 (C-4), 139,8 (C-5), 119,6 (C-6), 116,3 (C-7), 141,4 (C-8), 46,2 (C-9), 37,0 (C-10), 21,5 (C-11), 39,1 (C-12), 42,8 (C-13), 54,5 (C-14), 23,0 (C-15), 28,3 (C-16), 55,7 (C-17), 12,0 (C-18), 16,3 (C-19), 40,4 (C-20), 21,1 (C-21), 135,6 (C-22), 132,0 (C-23), 43,3 (C-24), 33,1 (C-25), 19,6 (C-26), 19,9 (C-27), 17,6 (C-28).

## 5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 5.4.1 Avaliação da Atividade Antiproliferativa

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* contra linhagens celulares mostrou maior atuação para as células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7,  $IC_{50}$   $61,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e de carcinoma hepatocelular (HepG2 C3a,  $IC_{50}$   $36,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em relação à linhagem não tumorigênica de mama (HB4a,  $IC_{50} > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 36). Em razão da semelhança existente entre as células tumorais e células vizinhas saudáveis, há grande dificuldade de se encontrar fármacos anticancerígenos de ação seletiva, por isso os resultados demonstram o potencial do extrato para uso clínico (BRANDÃO et al., 2010). Nota-se também que a atividade do extrato em todas as linhagens foi dose-dependente.

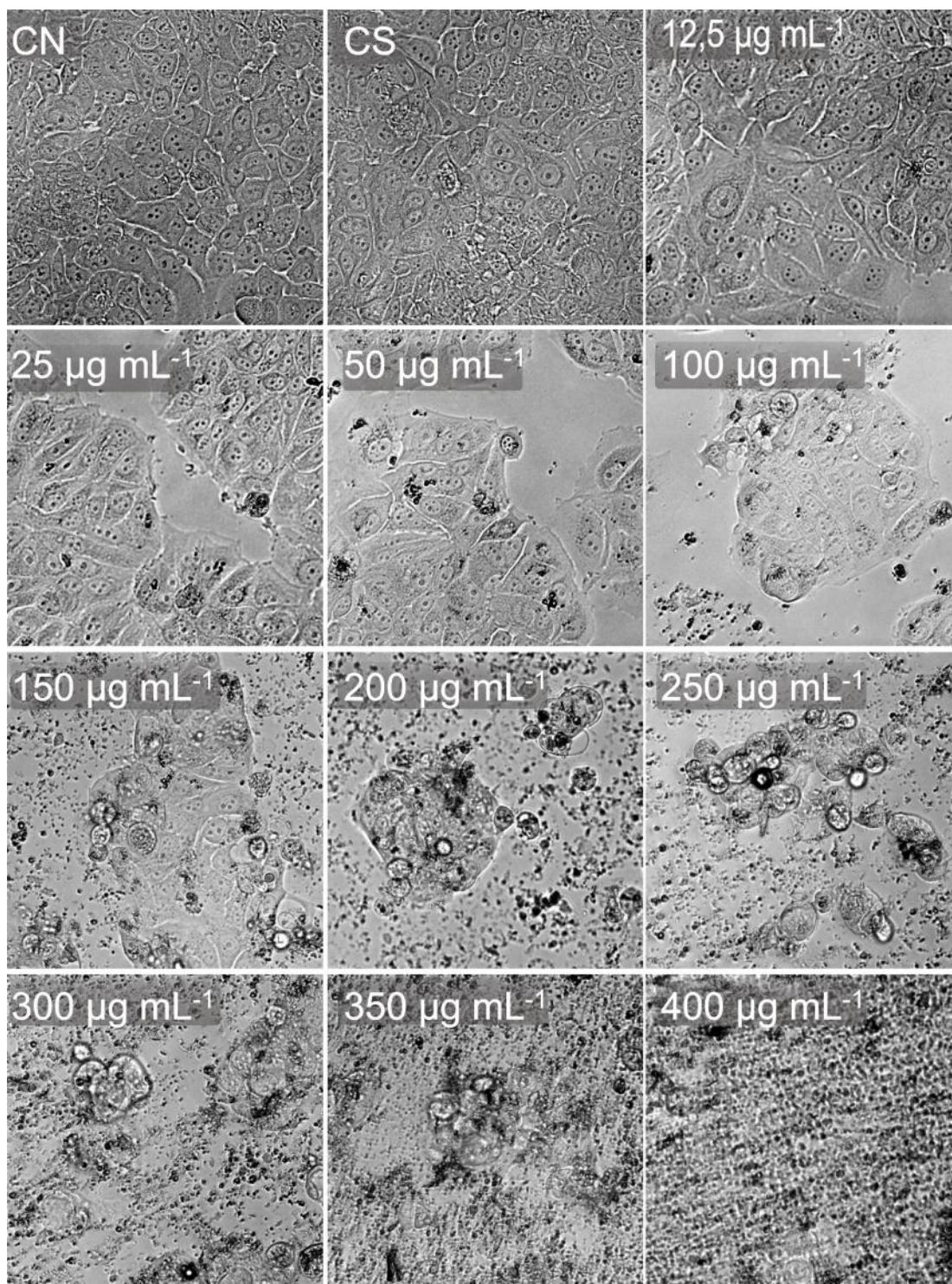
**Figura 36** – Efeito antiproliferativo do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* em células de HB4a, MCF-7 e HepG2 C3a após 48 horas de exposição. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 8 réplicas técnicas (CN: controle negativo; CS: controle do solvente).



Os resultados deste trabalho foram bastante significativos quando comparados aos obtidos por Yue e colaboradores (2006) que avaliaram a atividade antiproliferativa em linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama altamente invasivo) de extrato aquoso de espécies de *Ganoderma lucidum*, *G. sinense* e *G. tsugae*. Neste estudo, todos os extratos inibiram a proliferação celular, todavia o extrato de *G. tsugae*, que foi mais ativo ( $IC_{50}$  214,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), apresentou atividade menos pronunciada do que a demonstrada pelo extrato de *Ganoderma cf. stipitatum* ( $IC_{50}$  61,66  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Apesar dos extratos analisados nos dois estudos serem aquosos, as diferenças entre os resultados obtidos foram bastante significativas. No estudo citado, também foi verificado o efeito seletivo para células tumorais, em comparação com as células de mama normais (HMEC). Outro trabalho (HU et al., 2002) reportou que o extrato etanólico de *G. lucidum* diminuiu a proliferação celular de MCF-7 por meio de mecanismos que inibem o ciclo celular na fase G1. Além disso, o mesmo extrato induziu a apoptose das células tumorais, resultados concordantes com este trabalho, pois as micrografias das células de MCF-7 após o tratamento com o extrato também demonstram a apoptose celular (Figura 37).

A importância da atuação do extrato de *Ganoderma cf. stipitatum* sobre a diminuição da proliferação celular de HepG2 C3a se deve ao alto poder de metástase do carcinoma hepatocelular. Weng e colaboradores (2009) sugeriram que este efeito poderia estar relacionado à ação dos triterpenos ácidos lucidênicos A, B, C e N presente no extrato etanólico de *G. lucidum*. Foi observado também que a inibição da invasão celular se deve à supressão da atividade da enzima metaloproteinase da matriz MMP-9, uma das responsáveis pela degradação do colágeno do tipo IV durante o processo de infiltração do carcinoma.

**Figura 37** – Micrografias das células de MCF-7 após o tratamento com diversas concentrações do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum*. CN: controle negativo e CS: controle de solvente.



#### 5.4.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* foi aplicada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2012), utilizando as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

O extrato apresentou efeito bacteriostático sobre *Enterococcus faecalis* (Gram positiva) mas foi inativo para as demais cepas, nas condições empregadas neste experimento. Sharifi e colaboradores (2012) verificaram que frações de polissacarídeos de *Ganoderma stipitatum* e outras espécies do gênero, coletadas na região norte do Iran, demonstraram atividade contra cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumonia* (MIC 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 5.5 OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

#### 5.5.1 Produção de exopolissacarídeos.

Neste experimento, foi observada pela primeira vez a produção de exopolissacarídeos (EPS) pelo fungo isolado *Ganoderma cf. stipitatum*. Foi verificada também que a maior produção de EPS (0,16 g L<sup>-1</sup>) foi obtida no Meio 2, no qual a sacarose foi a fonte de carbono utilizada para o fungo se desenvolver, enquanto que a menor (0,09 g L<sup>-1</sup>) foi no Meio 3, no qual a glucose foi a fonte de carbono. No Meio 1 a produção de EPS foi de 0,11 g L<sup>-1</sup>. O polissacarídeo produzido no meio de cultivo 2 (EPS-2) foi o escolhido para a análise estrutural por RMN <sup>13</sup>C.

Embora a glucose seja considerada, biologicamente, uma fonte de energia mais efetiva, a comparação dos meios 2 e 3, demonstra que a sacarose comercial foi melhor como fonte de carbono para a produção do EPS por *Ganoderma cf. stipitatum*. O motivo da preferência pela sacarose ainda é desconhecido, mas observações similares foram reportadas na síntese da botriosferana pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (STELUTI et al., 2004) e na produção da  $\alpha$ -glucana pululana pelo *Aureobasidium pullulans* (SHINGEL, 2004).

### 5.5.2 Análise do EPS-2 por RMN de $^{13}\text{C}$

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do EPS-2, Figura 38, foi semelhante ao espectro encontrado na literatura para  $\beta$ -D-glucanas (BARBOSA et al., 2003). O sinal em 104,2 ppm foi atribuído ao carbono anomérico (C-1) de  $\beta$ -glucose. Este, de acordo com a literatura, apresenta deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  104, enquanto que carbonos anoméricos de  $\alpha$ -glucose estão mais protegidos e apresentam sinal em 100 ppm (BARBOSA et al., 2003). O deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  61,9 foi comparado com a literatura e atribuído a carbonos C-6 livres. O sinal diminuto de C-6 livre em comparação com o carbono anomérico C-1, sugere a existência do carbono 6 ligado na forma (1 $\rightarrow$ 6). Os demais sinais foram atribuídos de acordo com a literatura, e estão representados na Tabela 14. Estes resultados indicam que os exopolissacarídeos (EPS-2) produzidos pelo *G. cf. stipitatum* são  $\beta$ -D-glucanas, e por meio da comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos com os dados da literatura, pode-se inferir que está presente na estrutura ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 3 e 1 $\rightarrow$ 6. No entanto, é necessária a confirmação, por meio de reação de metilação seguida de análise quantitativa de seus derivados e de reação de hidrólise, a fim de verificar a composição monossacarídica dos EPS (BARBOSA; CUNHA; PIGATTO, 2004).

Os resultados relatados são concordantes com a literatura, visto que as  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) são comumente produzidas no meio de cultivo ou isoladas do corpo de frutificação de espécies de *Ganoderma* (LIU, Y. et al., 2014c; NIE et al., 2013). Estes polissacarídeos fúngicos possuem interessantes atividades biológicas como: anticancerígena, anti-inflamatória e imunomoduladoras (BARBOSA et al., 2003; NIE et al., 2013).

Figura 38 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  dos EPS-2 em sonda de sólido (100,61 MHz).

## RMN $^{13}\text{C}$

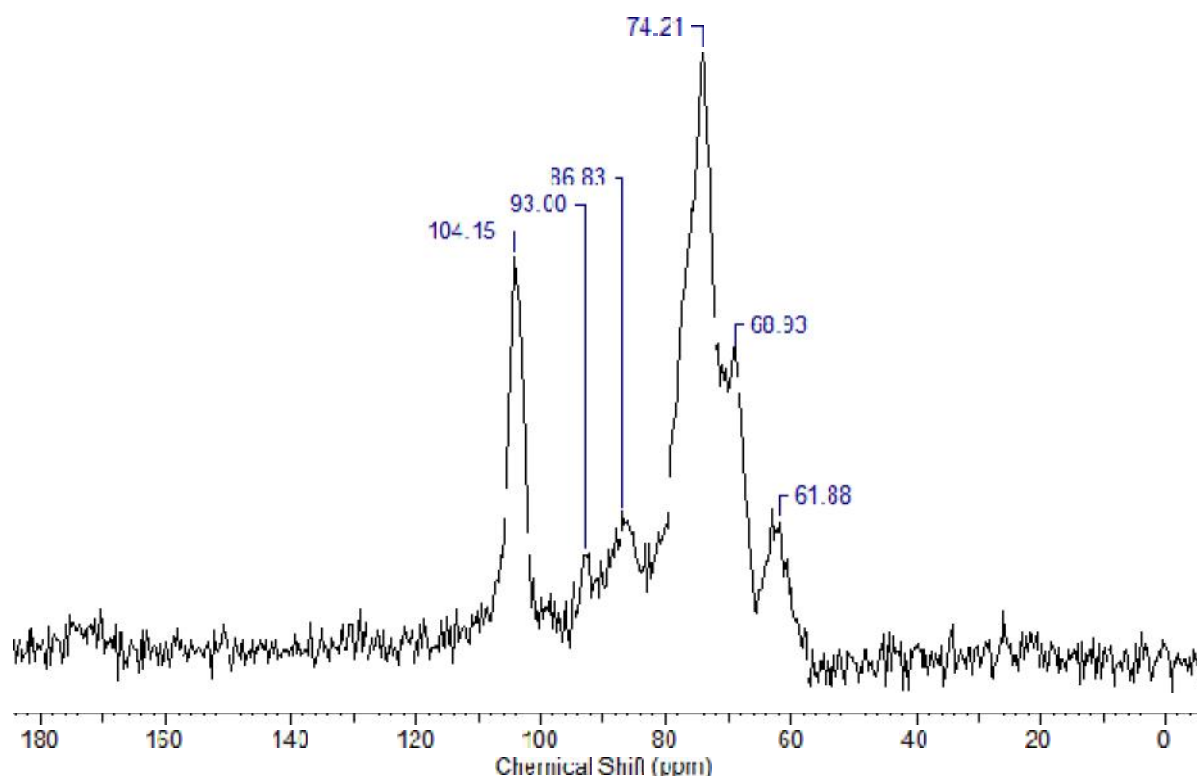


Tabela 14 – Deslocamento químico dos carbonos EPS-2 comparados com os dados da literatura.

	Tipo de ligação	Deslocamentos químicos $^c$ (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
EPS-2		104,2	74,2	86,8	68,9		61,9
Komura et al., (2014)	3)- -D-Glcp-(1	103,0	73,3	84,4	68,1	75,9	60,7
Smiderle et al., (2014)	3)- -D-Glcp-(1	102,7	72,6	85,9	68,2	76,0	60,7
Liu Y. et al., (2014c)	3)- -D-Glcp-(1	102,9	72,8	86,5	68,4	76,1	60,7

O presente estudo, portanto, avaliou pela primeira vez os constituintes químicos da espécie *Ganoderma cf. stipitatum*, identificando a ocorrência do estearato de ergosterol que ainda não tinha sido descrito no gênero *Ganoderma*. Os efeitos seletivos sobre a proliferação celular em linhagens cancerosas, adenocarcinoma de mama e carcinoma hepatocelular, evidenciam que esta espécie apresenta potencial

como fármaco anticancerígeno, no entanto, será necessário realizar os mesmos ensaios para as frações obtidas do extrato, bem como das substâncias isoladas, a fim de identificar quais compostos contribuem para esta atividade.

## CONCLUSÃO

A partir do processo de isolamento dos constituintes químicos do extrato etanólico de *Ganoderma cf. stipitatum* foram identificados o linoleato de etila e os compostos esteroidais: ergosta-7,22-dien-3-ol, ergosterol e estearato de ergosterol, sendo este identificado pela primeira vez no gênero *Ganoderma*.

O trabalho também demonstrou que o extrato exerce efeitos significativos sobre a proliferação celular em linhagens de adenocarcinoma de mama e carcinoma hepatocelular de maneira seletiva e dose-dependente. Em relação à atividade antibacteriana, foi observado efeito bacteriostático do extrato etanólico para *Enterococcus faecalis*.

A produção de exopolissacarídeos foi descrita pela primeira vez para a espécie *Ganoderma cf. stipitatum*, constatando-se maior rendimento dos EPS no meio de cultivo contendo sacarose comercial como fonte de carbono. Por meio das comparações dos dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  com os registrados na literatura, foi possível concluir que EPS-2 trata-se de uma  $\alpha$ -D-glucana que apresenta ligações do tipo 1-3 e 1-6.

## COLABORADORES

- Departamento de Química/UEL – Laboratório de Pesquisa em Moléculas Bioativas (LPMB): Realização do estudo químico de *Ganoderma cf. stipitatum* (Murrill) Murrill.
- Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-UEL/FINEP): Realização dos experimentos de ressonância magnética nuclear.
- Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/UEL: Realização de identificação filogenética de *Ganoderma cf. stipitatum*.
- Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) – Realização da análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).
- Departamento de Biologia Geral/UEL – Laboratório de Genética Toxicológica: Realização dos ensaios de atividade antiproliferativa em linhagens de células humanas.
- Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas/UEL – Laboratório de Microbiologia: Realização dos ensaios de atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J. **Introductory mycology**. 2 ed. Londres: Jonh Wiley and Sons, 1962. 613 p.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 145-54, jun. 2004.

BAO, X. F. et al. Purification, characterization, and modification of T lymphocyte-stimulating polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 50, n. 5, p. 623-9, maio 2002.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Tech. Ex.**, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004.

BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1<sup>3</sup>;1<sup>6</sup>)-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydr. Res.**, v. 338, n. 16, p. 1691-1698, jul. 2003.

BERNHARD, D. et al. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 195, n. 2, p. 193-199, jan. 2003.

BHOSLE, S. et al. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the western parts of Maharashtra (India). **Mycosphere**, v. 1, n. 3, p. 249-262, october 2010.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-69, jun. 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012. 2112 p.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev. Virtual Quím.**, v. 5, n. 3, p. 421-437, nov. 2012.

CHEN, Y. et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. **Food Chem.**, v. 107, n. 1, p. 231-241, jan. 2008.

CHENG, C. R. et al. Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry.**, v. 71, n. 13, p. 1579-85, set. 2010.

CILERDZIC, J. et al. Oxidative stress and species of genus *Ganoderma* (higher Basidiomycetes). **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 15, n. 1, p. 21-8, mar. 2013.

CLSI. **M07-A9 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

CROGNALÉ, S. et al. Production of beta-glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 3, p. 860-71, mar. 2007.

ESTATES, L. B. **Ensaio de MTT**. 2015. Disponível em: < [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=57&no=119](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=57&no=119) >. Acesso em 28 jan. 2015.

FATMAWATI, S.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Ganoderol B: a potent alpha-glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1053-5, set. 2011.

FIGUEIRÊDO, V. R. D. **Estudo de fungos Aphylophorales no sul da Bahia**. 2008. 122 f. (Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)). Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia.

GAN, K.-H.; KUO, S.-H.; LIN, C.-N. Steroidal constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 11, p. 1421-1422, nov. 1998.

GAO, J. J. et al. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of ganoderma products. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 52, n. 6, p. 688-95, jun. 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, ago. 2010.

GUTIERREZ, A.; PRIETO, A.; MARTINEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydr. Res.**, v. 281, n. 1, p. 143-54, fev. 1996.

HAN, X. Q. et al. Isolation, structure characterization, and immunomodulating activity of a hyperbranched polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 17, p. 4276-81, abr. 2012.

HE, W. S. et al. Efficient synthesis and characterization of ergosterol laurate in a solvent-free system. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, n. 48, p. 11748-55, dez. 2014.

HU, H. et al. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. **Int. J. Cancer**, v. 102, n. 3, p. 250-3, nov. 2002.

HU, L.-L. et al. Two new phenolic compounds from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 34, n. 3, p. 884-886, 2013.

**Index Fungorum Database**. 2015. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> >. Acesso em 21 jan. 2015.

ISAKA, M. et al. Lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma orbiforme* BCC 22324. **Phytochemistry**, v. 87, p. 133-9, mar. 2013.

ISHIKAWA, N. K. et al. Macrofungos da Amazônia: importância e potencialidades. **Ciência & Ambiente**, v. 44, p. 129-139, jan./jun. 2012.

JOSEPH, S. et al. A new epoxidic ganoderic acid and other phytoconstituents from *Ganoderma lucidum*. **Phytochem. Lett.**, v. 4, n. 3, p. 386-388, set. 2011.

KARWA, A. S.; RAI, M. K. Naturally occurring medicinal mushroom-derived antimicrobials: a case-study using Lingzhi or Reishi *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes). **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 14, n. 5, p. 481-90, jan. 2012.

KIRK, P. M. et al. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. CABI, 2008. 771 p. apud GUGLIOTTA, A. D. M.; POSCOLERE, G. D.; CAMPACCI, T. V. S. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil: fungos, 10: Ganodermataceae. **Hoehnea**, v. 38, n. 4, p. 687-696, dez. 2011.

KOMURA, D. L. et al. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. florida mycelial biomass. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 70, p. 354-9, set. 2014.

KOMURA, K. et al. FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O as a versatile catalyst for the esterification of steroid alcohols with fatty acids. **Synthesis**, v. 2008, n. 21, p. 3407-3410, out. 2008.

KUBOTA, T. et al. Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. **Helv. Chim. Acta.**, v. 65, n. 2, p. 611-619, 1982.

LEE, I. et al. Selective cholinesterase inhibition by lanostane triterpenes from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, n. 21, p. 6603-7, nov. 2011.

LI, W. et al. Sterol fatty acid esters from the mushroom *Hericium erinaceum* and their PPAR transactivational effects. **J. Nat. Prod.**, v. 77, n. 12, p. 2611-2618, dez. 2014.

LI, W. J. et al. Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, n. 3-4, p. 689-94, mar. 2012.

LIMA JUNIOR, N. C.; BAPTISTA GIBERTONE, T.; MALOSSO, E. Delimitation of some neotropical laccate *Ganoderma* (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. **Rev. Biol. Trop.**, v. 62, n. 3, p. 1197-208, set. 2014.

LIN, C.-N.; TOME, W.-P.; WON, S.-J. A lanostanoid of formosan *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 673-675, maio 1990.

LIU, C.; ZHAO, F.; CHEN, R. A novel alkaloid from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang. **Chinese Chem. Lett.**, v. 21, n. 2, p. 197-199, fev. 2010.

- LIU, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*. **J. Nanjing Med. Univer.**, v. 23, n. 3, p. 168-172, maio 2009.
- LIU, D. Z. et al. New triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their bioactivities. **Chem. Biodivers.**, v. 11, n. 6, p. 982-6, jun. 2014a.
- LIU, Y. et al. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 64, p. 63-68, mar. 2014b.
- LIU, Y. et al. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive beta-D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 101, p. 968-74, jan. 2014c.
- MAIA, L. C. et al. **Diversidade biológica e conservação da Floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 75-106 p.
- MARTINS JÚNIOR, A. S.; BAPTISTA GIBERTONE, T.; SOTÃO, H. M. P. Espécies de *Ganoderma* P. Karst (Ganodermataceae) e *Phellinus* Quél. (Hymenochaetaceae) na Estação Científica Ferreira Penna, Pará, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 25, n. 3, p. 531-533, jul./set. 2011.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1988. 128 p.
- MILADINOVIC, D. et al. Volatile constituents of *Euphrasia stricta*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 49, n. 6, p. 1146-1147, jan. 2014.
- MIN, B.-S. et al. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 48, n. 7, p. 1026-1033, mar. 2000.
- MIRANDA-NANTES, C. C. B. O. et al. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in diabetes-induced and hyperlipidemia conditions in rats. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 187-193, set. 2011.
- MOSEICHUK, A. V. et al. Mass spectrometry of some unsaturated sterols. **Chem. Nat. Comp.**, v. 20, n. 5, p. 585-587, set. 1984.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.
- MURRILL, W. A. **North American Flora**. New York: The New York Botanical Garden 1908. 73-131 p.

NIE, S. et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. **Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre**, v. 1, n. 1, p. 10-20, jan. 2013.

NIEDERMEYER, T. H. et al. Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 12, p. 1728-31, dez. 2005.

OLUBA, O. M. et al. Antimalarial and hepatoprotective effects of crude ethanolic extract of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.)P.Karst. (higher Basidiomycetes), in Plasmodium berghei-infected mice. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 14, n. 5, p. 459-66, jan. 2012.

PARK, S. Y. et al. Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 19, n. 2, p. 253-261, abr. 2014.

PATERSON, R. R. M. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1985-2001, set. 2006.

PAVIA, D. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4 ed. USA: Cengage Learning, 2008. 752 p.

PEREIRA, D. M. et al. Anti-inflammatory effect of unsaturated fatty acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from *Marthasterias glacialis*: prevention of CHOP-mediated ER-stress and NF-kappaB activation. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88341, fev. 2014a.

\_\_\_\_\_. Palmitic acid and ergosta-7,22-dien-3-ol contribute to the apoptotic effect and cell cycle arrest of an extract from *Marthasterias glacialis* L. in neuroblastoma cells. **Mar. Drugs**, v. 12, n. 1, p. 54-68, jan. 2014b.

EZANKA, T. Analysis of sterol esters from alga and yeast by high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry with chemical ionization. **J. Chromatogr. A**, v. 598, n. 2, p. 219-226, maio 1992.

RIOS, J. L. et al. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 11, p. 2016-44, nov. 2012.

SAITO, P. **Caracterização molecular e identificação de metabólitos de *Ganoderma parvulum***. 2014. 22 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SANODIYA, B. S. et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 10, n. 8, p. 717-42, dez. 2009.

SEO, H. W. et al. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity. **Arch. Pharm. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1573-9, nov. 2009.

- SHANG, C. et al. Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase microextraction. **J. Chromatogr. A**, v. 942, n. 1–2, p. 283-288, abr. 2002.
- SHARIFI, A. et al. Antimicrobial potentials of crude fractions of polysaccharides of *Ganoderma* spp. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 6, n. 39, p. 6817-21, out. 2012.
- SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydr. Res.**, v. 339, n. 3, p. 447-60, fev. 2004.
- SMANIA, E. D. F. A. et al. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia.**, v. 74, n. 4, p. 375-377, jun. 2003.
- SMANIA, E. D. F. A. et al. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 14-16, jan./mar. 2007.
- SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1–3)- $\beta$ -D-glucan. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110266, nov. 2014.
- STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **J. Basic Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 480-6, nov. 2004.
- SUAREZ-ARROYO, I. J. et al. Anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in inflammatory breast cancer in in vivo and in vitro models. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57431, fev. 2013.
- SUDHA, T.; CHIDAMBARAMPILLAI, S.; MOHAN, V. R. GC-MS analysis of bioactive components of aerial parts of *Kirganelia reticulata* poir (Euphorbiaceae). **J. Curr. Chem. Pharm. Sc.**, v. 3, n. 2, p. 113-122, 2013.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol.**, v. 16, n. 1, p. 41-46, jan. 1998.
- THANG, T. et al. Triterpenoids and Steroids from *Ganoderma mastoporum* and Their Inhibitory Effects on Superoxide Anion Generation and Elastase Release. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 14285-14292, 2013.
- USAMI, A. et al. Chemical composition and aroma evaluation of volatile oils from edible mushrooms (*Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus sajor-caju*). **J. Oleo Sci.**, v. 63, n. 12, p. 1323-1332, nov. 2014.
- VAZIRIAN, M. et al. Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 16, n. 1, p. 77-84, jun. 2014.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. 1, 3-Glucan in cancer treatment. **Am. J. Immunology**, v. 8, n. 2, p. 38-43, 2012.

WASSON, R. G. **Soma: divine mushroom of immortality**. Los Angeles, EUA: Harcourt Brace Janovich, 1968. 80-92 p. apud SANODIYA, B. S. et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 10, n. 8, p. 717-42, dez. 2009.

WENG, B. B.-C. et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β-glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 4, p. 910-916, abr. 2011.

WENG, C. J. et al. Inhibitory effects of *Ganoderma lucidum* on tumorigenesis and metastasis of human hepatoma cells in cells and animal models. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 11, p. 5049-57, jun. 2009.

XU, Z. et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. **Am. J. Chin. Med.**, v. 39, n. 1, p. 15-27, jan. 2011.

YANG, F.-C.; LIAU, C.-B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochem.**, v. 33, n. 5, p. 547-553, jun. 1998.

YANG, H.-L. Ganoderic acid produced from submerged culture of *Ganoderma lucidum* induces cell cycle arrest and cytotoxicity in human hepatoma cell line BEL7402. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, n. 12, p. 835-838, jun. 2005.

YANG, S.-X. et al. Toxic lanostane triterpenes from the basidiomycete *Ganoderma amboinense*. **Phytochem. Lett.**, v. 5, n. 3, p. 576-580, set. 2012.

YUE, G. G. et al. Comparative studies of various *Ganoderma* species and their different parts with regard to their antitumor and immunomodulating activities in vitro. **J. Altern. Complement Med.**, v. 12, n. 8, p. 777-89, out. 2006.

YUE, Q. X. et al. Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug targeted network. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 949-961, maio 2008.

YUE, Q. X. et al. Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 606-613, jul. 2010.

ZHANG, S. et al. Immunomodulatory effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide on CT26 tumor-bearing mice. **Food Chem.**, v. 136, n. 3-4, p. 1213-9, fev. 2013.

ZHENG, L.; SI, J.; WONG, Y.-S. Ergosterol peroxide and 9,11-dehydroergosterol peroxide from Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae) mycelia inhibit the growth of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. **Int. J. Med. Mushrooms**, v. 11, n. 3, p. 249-257, 2009.

ZHOU, L. et al. Ganoderic acid Me induces apoptosis through mitochondria dysfunctions in human colon carcinoma cells. **Process Biochem.**, v. 46, n. 1, p. 219-225, jan. 2011.

ZIEGENBEIN, F. C.; HANSSEN, H. P.; KONIG, W. A. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. **Phytochemistry.**, v. 67, n. 2, p. 202-11, jan. 2006.