

Tania Maria Costa

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS PELO FUNGO
Ganoderma lipsiense CULTIVADO EM ARROZ VERMELHO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Lorena Benathar Ballood Tavares

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Tania Maria

Produção de metabólitos bioativos pelo fungo
Ganoderma lipsiense cultivado em arroz vermelho /
Tania Maria Costa ; orientadora, Débora de
Oliveira, coorientadora, Lorena Benathar Ballod
Tavares, 2019.
199 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Compostos bioativos. 3.
Ganoderma lipsiense. 4. Atividades biológicas. I.
Oliveira, Débora de . II. Tavares, Lorena Benathar
Ballod. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

**Produção de Metabólitos Bioativos pelo Fungo *Ganoderma lipsiense*
Cultivado em Arroz Vermelho**

por

Tania Maria Costa

Tese julgada para obtenção do Título de **Doutor em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
orientadora

Prof.^a Dr.^a Lorena Benathar Ballod Tavares
coorientadora

Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares
coordenadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski

Prof. Dr. Marco Di Luccio
videoconferência

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Bertarello Zeni

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.....

Ao meu marido Rômulo, pelo companheirismo, paciência, amor, incentivo, dedicação e apoio em todas as minhas decisões;

A minha família, meus pais Edi e Teresinha, minha irmã Susimara, meus sogros Pedro e Solange, pelo apoio emocional e financeiro, que sempre acreditaram no meu potencial e me deram força para nunca desistir;

Às minhas Professoras orientadora Dr. Débora de Oliveira e coorientadora Dr. Lorena Benathar Ballod Tavares, por todo o aprendizado pessoal e profissional repassado, pela paciência, pelos conselhos e incentivos, tanto na vida pessoal como profissional, pela confiança, por me proporcionarem a vivência na área da biotecnologia e pela oportunidade de poder ter compartilhado esses anos com vocês. Serei eternamente grata;

A Professora Dr. Michele Debiasi Alberton, pela parceria, apoio e pelo amplo conhecimento repassado em todas as etapas de extração, purificação e identificação dos compostos naturais;

Aos colegas, Professor Gustavo Micke e Diogo Siebert do Departamento de Química da UFSC, Professor Vander Kaufman da Pós-graduação em Engenharia Ambiental da FURB, ao técnico Leandro Nandi da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, as alunas de mestrado em Química Camila Paganelli e em Engenharia Ambiental Juliana Lenzi, pelas análises antibacterianas e antiparasitárias e ao colega Diego Mayer do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, pelo auxílio nas análises cinéticas da inibição enzimática.

A todos os companheiros de laboratório e aos colegas da Pós-Graduação, pelas amizades, conversas, trocas de informações e parcerias;

Aos professores do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos pelos ensinamentos adquiridos;

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC, pela oportunidade;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro (Código 001) concedido durante a realização deste trabalho de doutorado;

A todos que de alguma forma me ajudaram na concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Vigie seus pensamentos, eles se tornam palavras; vigie suas palavras, elas se tornam ações; vigie suas ações, elas se tornam hábitos; vigie seus hábitos, eles se tornam seu caráter; vigie seu caráter, ele se torna o seu destino”

(Lao Tzu)

RESUMO

Os fungos basidiomicetos são reconhecidos por produzirem distintos compostos de importância biológica e terapêutica. Este trabalho teve como objetivo identificar compostos bioativos com propriedades biológicas produzidos pelo fungo *Ganoderma lipsiense* cultivado em arroz vermelho. O trabalho foi realizado em quatro etapas: na primeira etapa *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* e *Ganoderma lipsiense* foram cultivados em arroz vermelho por fermentação em estado sólido (FES) a fim de selecionar um fungo com potencial de produção de cumarinas. Todos os fungos apresentaram uma produção indicativa destas moléculas por análises qualitativas e valores similares quanto ao teor nos ensaios quantitativos espectrofotométricos. O fungo *G. lipsiense* mostrou melhor crescimento morfológico dentre os fungos testados, além de menor volume de publicações descritas na literatura, sendo este selecionado para estudos cinéticos subsequentes. *Ganoderma lipsiense* foi cultivado em arroz vermelho por 63 dias com extrações a cada 7 dias para identificação dos compostos fenólicos e avaliação da atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Foram identificados no extrato os ácidos cafeico, siríngico, salicílico, ferúlico, *p*-cumárico e vanilina por cromatografia líquida de alta eficiência / espectrometria de massa por ionização por eletrovaporização (HPLC-ESI-MS/MS). Os ácidos cafeico e siríngico, assim como a vanilina foram produzidos por *G. lipsiense*, sendo quantificados por cromatografia líquida de alta performance com detecção de rede de diodo (HPLC) maiores concentrações de vanilina e ácido cafeico no extrato do 49º dia. O extrato se mostrou ativo somente para *P. aeruginosa* com melhores atividades em 63 dias. A partir de um novo cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho por FES, na segunda etapa, foi possível identificar biocompostos produzidos pelo fungo presentes nas frações apolares do extrato. O esteroide ergosta-6,22-dieno-3β,5α,8α-triol foi identificado a partir de análises de infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio (RMN ¹H e ¹³C), no qual mostrou significativa atividade antiparasitária contra *Giardia duodenalis* na concentração de 500 µg·mL⁻¹. Além do esteroide, foram identificados 18 ácidos graxos nas frações purificadas com hexano e diclorometano, dentre eles os ácidos oleico, linoleico, palmítico, tetradecanóico e pentadecanóico. O extrato bruto e as frações purificadas tiveram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* nas concentrações de 500 µg·mL⁻¹ e atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* na concentração de 100 µg·mL⁻¹. A partir da terceira etapa, o

fungo foi cultivado por fermentação submersa (FS). Na etapa três, foi avaliada a atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* além da identificação dos compostos produzidos no micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio sintético. Foram identificados esteroides, ácidos graxos e compostos como sesquiterpenos, aldeídos e álcoois, com destaque para os esteroides ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol, ergosta-5,8(14)-dien-3-ol, 7,22-ergostadienol, ergosta-7,22-dien-3-ol (3 β ,22E), ergosta-7,22-dien-3-ol (3 β , 5 α , 22E), ergosterol, 7,22-ergostadienona e ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona e do sesquiterpeno ar-turmerona. Elevadas atividades antiparasitárias foram observadas, especialmente na fração hexano. A quarta etapa deste trabalho avaliou o potencial inibitório da enzima α -glicosidase pelo extrato bruto da primeira etapa, do extrato micelial da terceira etapa e do extrato micelial do fungo cultivado em meio a base de arroz vermelho. Os extratos miceliais apresentaram melhores atividades inibidoras da enzima α -glicosidase, com inibições > 96%. Os ajustes dos dados experimentais por modelos matemáticos não-lineares indicaram uma inibição competitiva ocasionada pelo extrato micelial cultivado em arroz vermelho, enquanto o extrato micelial cultivado em meio sintético tem características de inibição incompetitiva. Assim, constatou-se que o fungo *G. lipsiense* testado nesse trabalho possui habilidades para produzir biocompostos com atividades antibacterianas, antiparasitárias, além de inibidores da enzima α -glicosidase, dependendo do tipo de substrato utilizado e da forma de cultivo empregada.

Palavras-chave: Atividades biológicas. Biocompostos. *Ganoderma lipsiense*.

ABSTRACT

Basidiomycete fungi are recognized for producing several compounds with important biological and therapeutic properties. This work aimed to identify bioactive compounds with biological properties produced by the *Ganoderma lipsiense* fungus cultivated in red rice. Four stages were carried out in this work: in the first stage *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma lipsiense* were cultivated in red rice by solid-state fermentation (SSF) in order to select a fungus with potential for coumarins production. All fungi presented an indicative production of these molecules by qualitative analyzes and similar values for the content in the quantitative spectrophotometric assays. The *G. lipsiense* fungus showed better morphological growth among the fungi tested, as well as lower volume of publications described in the literature, being selected for subsequent kinetic studies. *Ganoderma lipsiense* was grown in red rice for 63 days with extractions every 7 days to identify the phenolic compounds and evaluate of the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Caffeic acid, syringic acid, salicylic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid and vanillin were identified in the extract by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS / MS). Caffeic and syringic acids as well as vanillin were produced by *G. lipsiense*, and higher concentrations of vanillin and caffeic acid were measured by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC) in 49 days. The extract was only effective against *P. aeruginosa* with higher activities in 63 days. *G. lipsiense* was grown again on red rice by SSF, in the second stage, and then was possible to identify biocomposites produced by the fungus present in the non-polar fractions of the extract. The steroid ergosta-6,22-dien-3 β ,5 α ,8 α -triol was identified from infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance of carbon and hydrogen (^1H and ^{13}C NMR) from the purified extract, and it which it showed significant antiparasitic activity against *Giardia duodenalis* at the 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration. In addition to the steroid, 18 fatty acids were identified in the fractions purified with hexane and dichloromethane, among them oleic, linoleic, palmitic, tetradecanoic and pentadecanoic acids. The crude extract and the purified fractions had antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus* at concentrations of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and antiparasitic activity against *G. duodenalis* at the concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Third and fourth stages, the fungus was cultivated by submerged fermentation (SF). The third step consisted in the antiparasitic activity evaluation against *G. duodenalis* and

identification of biocompounds produced in the mycelium of the *G. lipsiense* grown in synthetic medium. At this stage, steroids, fatty acids and compounds such as sesquiterpenes, aldehydes and alcohols were identified, with highlights for ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol, ergosta-5,8(14)-dien-3-ol, 7,22-ergostadienol, ergosta-7,22-dien-3-ol (3 β ,22E), ergosta-7,22-dien-3-ol (3 β , 5 α , 22E), ergosterol, 7,22-ergostadienone and ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, in addition to the sesquiterpene Arturmerone. High antiparasitic activities were observed for mycelial extracts of *G. lipsiense*, especially in the hexane fraction. The fourth step of this work evaluated the inhibitory potential of the α -glycosidase enzyme for the *G. lipsiense* crude extract of the first stage, the third stage mycelial extract and the mycelial extract of the fungus cultivated in red rice-based medium. The mycelial extracts presented higher inhibitory activities of the α -glycosidase enzyme, with > 96 percent of inhibitions. The adjustments of the experimental data by nonlinear mathematical models indicated a competitive inhibition caused by the mycelial extract growth in red rice, while the mycelial extract growth in synthetic medium has uncompetitive inhibition characteristics. Thus, the results showed that *G. lipsiense* fungus evaluated in this work has the ability to produce distinct biocompounds with antibacterial, antiparasitic activity, as well as α -glycosidase inhibitor, depending on the type of substrate used and the culture form evaluated.

Keywords: Biological activities. Biocompounds. *Ganoderma lipsiense*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama geral das etapas relativas aos objetivos específicos e procedimentos deste trabalho de tese.	35
Figura 2 – Esquema descritivo dos constituintes dos fungos basidiomicetos.....	40
Figura 3 – Representação esquemática da equação de Michaelis e Menten	45
Figura 4 – Representação esquemática da inibição competitiva	47
Figura 5 - Representação esquemática da inibição não-competitiva.....	48
Figura 6 - Representação esquemática da inibição incompetitiva.....	49
Figura 7 – Via biossintética proposta para a produção de cumarinas em plantas (1-5) e a partir do ácido <i>p</i> -cumárico na produção de escopoletina (7-12), ácido cafeico (7-8; 6-8) e vanilina (7-10; 13-14)	54
Figura 8 – Esteroides isolados e identificados em fungos do gênero <i>Ganoderma</i> com propriedades terapêuticas	58
Figura 9 – <i>Ganoderma lipsiense</i> em sua forma macroscópica.....	61
Figura 10 - Estrutura dos ácidos ganoderênicos isolados de <i>G. lipsiense</i>	62
Figura 11– Estrutura do ergosterol e derivados isolados de <i>G. lipsiense</i>	63
Figura 12 – Diagrama geral dos procedimentos referentes à Etapa 1. ..	71
Figura 13 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 2 desta pesquisa.	79
Figura 14 – Diagrama geral do processo de extração, purificação e identificação dos compostos do extrato de <i>G. lipsiense</i> em FES cultivado em arroz vermelho.....	81
Figura 15 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 3 desta pesquisa.....	85
Figura 16 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 4 desta pesquisa.	89
Figura 17 – <i>Ganoderma lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho após 21 dias de cultivo	98
Figura 18 - Placa de cromatografia de camada delgada para fungos do gênero <i>Ganoderma</i> após 40 dias de cultivo	99
Figura 19 – Cromatografia de camada delgada para extratos do fungo <i>G. lipsiense</i>	102
Figura 20 – Espectros de cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrofotometria de massas (HPLC-ESI MS/MS) do extrato bruto de <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho por FES.....	106

Figura 21 – Compostos fenólicos identificados no extrato de <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho e no meio controle.....	107
Figura 22 - Quantificação da vanilina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do extrato bruto de <i>G. lipsiense</i> em FES durante 63 dias	109
Figura 23 – Composto cristalizado da fração 19 (A) e CCD (B) do composto da fração 19	115
Figura 24 – Espectro de infravermelho (IV) correspondente a fração 19	115
Figura 25 – Espectro de ^1H RMN da fração 19	118
Figura 26 – Espectros de ^{13}C RMN da fração 19: segunda análise (A); primeira análise (B).....	119
Figura 27 - Esteróide ergosta-6,22-dieno- $3\beta,5\alpha,8\alpha$ -triol sugerido na fração 19	121
Figura 28 – CCD das frações purificadas em coluna de sílica e reveladas com anisaldeído sulfúrico	129
Figura 29 – Esteróides identificados no extrato micelial de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mSin</i>	130
Figura 30 – Curvas de formação de produto <i>pNP</i> na ausência e presença de metanol após 30 minutos de reação e variando a concentração de substrato	139
Figura 31 – Curva de calibração do produto <i>pNP</i>	139
Figura 32 – Inibição da enzima α -glicosidase em extrato bruto de <i>G. lipsiense</i> cultivado em FES e FS na concentração de $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	140
Figura 33 – <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho por FES (A) e FS (B). Micélio fúngico cultivado em <i>mBA</i> (C).....	141
Figura 34 – Cinética de formação de produto <i>pNP</i> em diferentes concentrações de inibidores, no tempo de 60 minutos.....	143
Figura 35 – Cinética de formação de produto <i>pNP</i> em diferentes concentrações de inibidores, no tempo de 10 minutos.....	144
Figura 36 – Representação gráfica dos dados experimentais da enzima α -glicosidase na ausência de inibidor e pelo extrato bruto micelial de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i> e <i>mSin</i> para inibição incompetitiva.....	146
Figura 37 - Representação gráfica dos dados experimentais da enzima α -glicosidase na ausência de inibidor e pelo extrato bruto micelial de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i> e <i>mSin</i> para inibição competitiva.....	147
Figura 38 – Cromatografia de camada delgada (CCD) nos micélios fúngicos cultivados em FS	149
Figura 39 – Percentual de inibição enzimática nas frações purificadas dos extratos bruto da FS em <i>mBA</i> (A) e em <i>mSin</i> (B)	149

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes classificações e aplicações de cumarinas..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização do arroz vermelho (m/m, %).	97
Tabela 2 – Resultados para pH, rendimento extrativo (%) e quantificação de cumarinas totais obtidos para os extratos fúngicos após 40 dias de cultivo e para o meio controle (arroz)	100
Tabela 3– Resultados para pH, rendimento extrativo (%), compostos fenólicos totais e cumarinas totais obtidos para o meio controle (arroz vermelho) e extratos de <i>G. lipsiense</i> durante 63 dias.	103
Tabela 4– Compostos fenólicos identificados no extrato bruto de <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho e no meio controle (arroz) nos diferentes dias de cultivo/extração	105
Tabela 5– Atividade antibacteriana do extrato bruto de <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho	110
Tabela 6 – Ácidos graxos identificados no extrato de <i>G. lipsiense</i> em cultivo sólido (FES)	113
Tabela 7 – Dados do espectro de IV da fração 19	116
Tabela 8 – Deslocamento Químico de ^1H RMN da fração 19 com o esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol proposto	117
Tabela 9 – Deslocamentos para ^{13}C RMN fundamentais para elucidação da estrutura descritos na literatura e comparados aos identificados no composto da fração 19.	119
Tabela 10 – Deslocamentos para ^{13}C RMN descritos na literatura e comparados aos identificados no composto da fração 19.	120
Tabela 11– Atividade antibacteriana do extrato bruto, dos extratos hexano, diclorometano e acetato de etila e do esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol de <i>G. lipsiense</i> cultivado em arroz vermelho	122
Tabela 12 – Avaliação da viabilidade celular de <i>G. duodenalis</i> em relação ao extrato bruto, a fração hexano purificada e ao composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol do cultivo de <i>G.lipsiense</i> por FES.	123
Tabela 13 – Compostos identificados nas frações hexano e diclorometano do extrato micelial de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mSin</i>	127
Tabela 14 – Compostos identificados por CG-EM nas frações purificadas da coluna de fracionamento do extrato micelial de <i>G. lipsiense</i> em <i>mSin</i> e suas aplicações descritas na literatura	131
Tabela 15 – Avaliação da viabilidade celular de <i>G. duodenalis</i> em relação ao extrato bruto, fração hexano, diclorometano e acetato de etila do cultivo de <i>G.lipsiense</i>	136
Tabela 16 – Inibição da enzima α -glicosidase pelos micélios de <i>G. lipsiense</i> em FS	142

Tabela 17 - Equações de regressão e coeficientes de determinação da inibição enzimática em distintas concentrações de inibidor no tempo de 60 minutos.....	144
Tabela 18 - Equações de regressão e coeficientes de determinação da inibição enzimática em distintas concentrações de inibidor no tempo de 10 minutos.....	145
Tabela 19 – Parâmetros cinéticos de inibição da α -glicosidase pelo extrato bruto de <i>G.lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i> e <i>mSin</i>	146
Tabela 20 - Compostos identificados nas frações hexano e diclorometano do extrato micelial de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i>	151
Tabela 21 – Comparativo das variáveis analisadas <i>versus</i> tipo de cultivo e meio utilizado com o fungo <i>G. lipsiense</i>	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ – deslocamento químico
CCD – cromatografia de camada delgada
CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CIM – concentração inibitória mínima
DAD – detector de arranjo de diodos
ESI – detector de ionização por Electrospray
FES – cultivo em estado sólido
FID – detector de ionização de chama
FS – cultivo submerso
HPLC - cromatografia líquida de alta performance (CLAE)
IC₅₀ – concentração inibitória de 50%
IR – infravermelho
K_i – constante de inibição enzimática
K_m – constante de Michaelis e Menten
*m*BA – meio de cultivo a base de arroz vermelho
MS – espectrômetro de massas
*m*Sin – meio de cultivo sintético
RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear do carbono treze
RT – tempo de retenção
UFC – unidade formadora de colônia
UV/Vis – ultravioleta / visível
V_{max} – velocidade enzimática máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	OBJETIVOS	32
1.1.1	Objetivo geral	32
1.1.2	Objetivos específicos	33
1.2	DESCRIÇÃO DAS ETAPAS RELATIVAS AOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
1.3	JUSTIFICATIVA.....	36
2	REVISÃO DA LITERATURA	39
2.1	FUNGOS: UMA FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E TERAPÊUTICOS NATURAIS	39
2.1.1	Fungos e os inibidores enzimáticos da α-glicosidase	43
2.1.1.1	Cinética enzimática	44
2.1.1.2	Inibição enzimática	46
2.2.	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>GANODERMA</i>	49
2.2.1.	Compostos fenólicos	50
2.2.2.	Polissacarídeos	56
2.2.3.	Terpenos e esteroides	57
2.2.4.	Outros compostos identificados em fungos do gênero <i>Ganoderma</i>	59
2.3.	COMPOSTOS IDENTIFICADOS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i>	61
2.4.	PROCESSOS FERMENTATIVOS E O USO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS	64
2.5.	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	66
3.	MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1.	ETAPA 1: SELEÇÃO DO FUNGO <i>GANODERMA</i> PRODUTOR DE BIOCOMPOSTOS POR MÉTODOS QUALI E QUANTITATIVOS; CINÉTICA DE IDENTIFICAÇÃO E	

QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRODUZIDOS POR <i>G. LIPSIENSE</i>	71
3.1.1. Fungos e meio de cultivo	72
3.1.2. Caracterização do substrato sólido	72
3.1.3. Preparo do meio de cultivo sólido.....	72
3.1.4. Cinética da produção de biocompostos.....	72
3.1.5. Extração dos biocompostos do meio de cultivo sólido	73
3.1.6. Rendimento extrativo (%).....	73
3.1.7. Análise de pH	73
3.1.8. Métodos de análises de detecção dos biocompostos	73
3.1.8.1. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada.....	73
3.1.8.2. Detecção da presença e quantificação de cumarinas nos extratos por espectrofotometria UV.....	74
3.1.9. Teor de compostos fenólicos totais	74
3.1.10. Identificação de compostos fenólicos por métodos qualitativos	75
3.1.11. Teor de ácido cafeico e vanilina	76
3.1.12. Avaliação da atividade antibacteriana.....	77
3.1.12.1. Microrganismos e meios de cultivo	77
3.1.12.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	77
3.1.13. Análises estatísticas.....	78
3.2. ETAPA 2: CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> NO SISTEMA FES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS E DO ESTEROIDE IDENTIFICADO....	79
3.2.1. Fungo e meio de cultivo sólido	80
3.2.2. Obtenção e purificação do extrato bruto	80
3.2.3. Caracterização e identificação dos biocompostos	82

3.2.3.1. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada	82
3.2.3.2. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM).....	82
3.2.3.3. Identificação do composto purificado da fração 19	83
3.2.4. Atividades biológicas.....	83
3.2.4.1. Atividade antibacteriana.....	83
3.2.4.2. Teste de viabilidade celular sobre a <i>Giardia duodenalis</i>	84
3.3. ETAPA 3: IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS PELO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> EM MEIO SINTÉTICO	85
3.3.1. Fungo e meio de cultivo líquido	86
3.3.2. Extração dos biocompostos do micélio fúngico	86
3.3.3. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada	87
3.3.4. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM).....	87
3.3.5. Teste de viabilidade celular sobre a <i>Giardia duodenalis</i> ..	88
3.4. ETAPA 4: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA A-GLICOSIDASE PELO EXTRATO DO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> EM CULTIVOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS E CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS	89
3.4.1. Fungo e meio de cultivo líquido	90
3.4.2. Extração dos biocompostos do micélio fúngico	90
3.4.3. Ensaio inibição da enzima α-glicosidase - curva padrão e preparo das soluções	90
3.4.3.1. Preparo das soluções	90
3.4.3.2. Curva padrão de pNP	91
3.4.4. Ensaio inibição da enzima α-glicosidase <i>in vitro</i>.....	91
3.4.5. Cinética de inibição e determinação do tipo de inibição enzimática	92

3.4.6. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM)	93
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1. ETAPA 1: SELEÇÃO DO FUNGO <i>GANODERMA</i> PRODUTOR DE BIOCOMPOSTOS POR MÉTODOS QUALI E QUANTITATIVOS; CINÉTICA DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRODUZIDOS POR <i>G. LIPSIENSE</i>	97
4.1.1. Estudo cinético da produção de compostos fenólicos.....	102
4.1.2. Identificação dos compostos fenólicos do extrato de <i>G. lipsiense</i> em arroz vermelho	105
4.1.3. Análises antibacterianas.....	110
4.2. ETAPA 2: CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> NO SISTEMA FES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS E DO ESTEROIDE IDENTIFICADO..	112
4.2.1. Elucidação estrutural do composto presente na fração 19.....	114
4.2.2. Atividades biológicas	121
4.3. ETAPA 3: IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS PELO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> EM MEIO SINTÉTICO	126
4.3.1. Identificação dos compostos do micélio de <i>G. lipsiense</i> .	126
4.3.2. Análises antiparasitárias	135
4.4. ETAPA 4: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA A-GLICOSIDASE PELO FUNGO <i>G. LIPSIENSE</i> EM CULTIVOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS	138
4.4.1. Medidas de velocidade enzimática com variação na concentração de inibidor	143
4.4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima α-glicosidase e tipo de inibição pelo micélio de <i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i> e <i>mSin</i>	145

4.4.3.	Caracterização do extrato bruto e inibição enzimática nas frações purificadas do extrato bruto	148
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	153
6.	CONCLUSÕES	159
	REFERÊNCIAS	161
	APÊNDICE A	196

ORGANIZAÇÃO GERAL DO TRABALHO

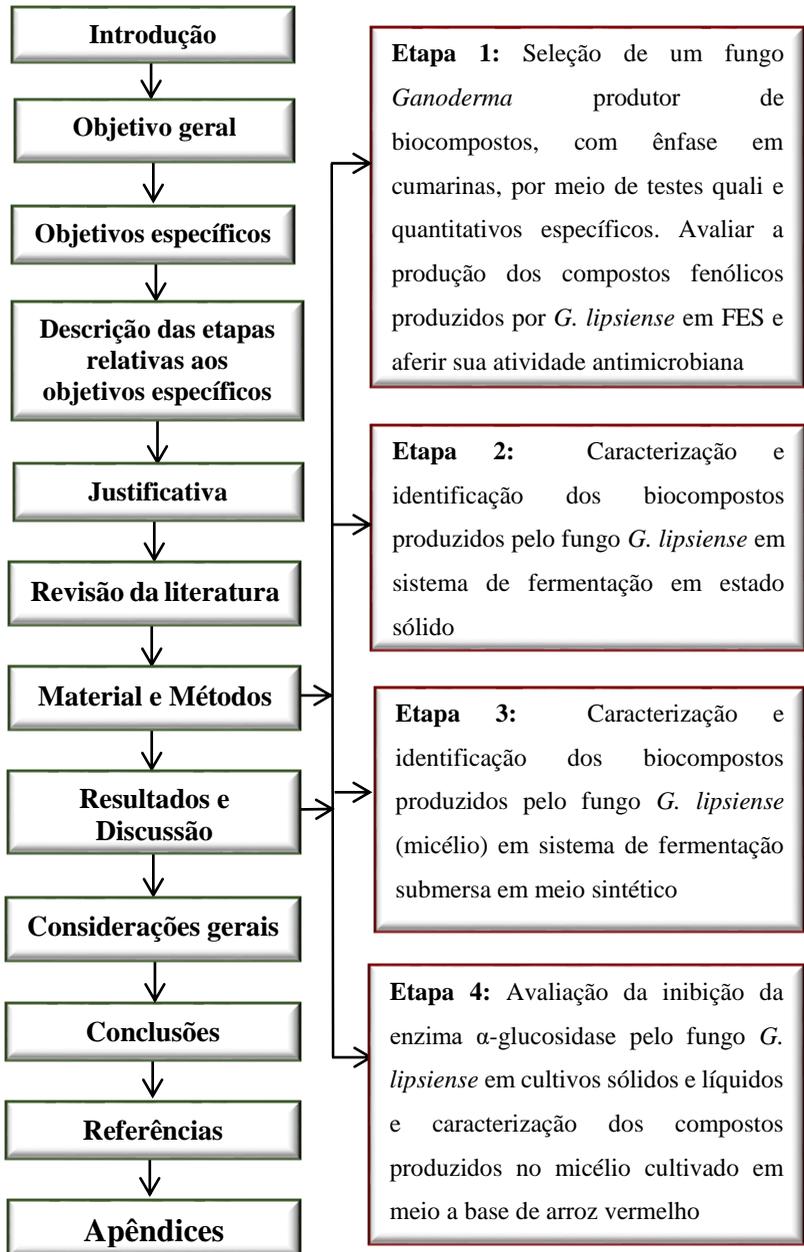


DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Produção de metabólitos bioativos pelo fungo *Ganoderma lipsiense*
cultivado em arroz vermelho

Justificativa:

Os fungos basidiomicetos produzem uma diversidade de compostos com atividades biológicas, sendo reconhecidos por tal habilidade;

Produtos derivados de fungos do gênero *Ganoderma* são utilizados na medicina oriental tradicional para a prevenção e tratamento de algumas doenças;

Diversas moléculas descritas na literatura para *G. lipsiense* apontam importantes atividades biológicas e terapêuticas;

O tema já foi estudado?

Referente às cumarinas, poucos são os estudos sobre sua identificação em fungos basidiomicetos;

Não foram encontrados trabalhos de produção de cumarinas por *G. lipsiense* nos periódicos das plataformas CAPES, Science Direct e GOOGLE;

O fungo *G. lipsiense* é pouco estudado frente à outras espécies do gênero *Ganoderma*;

Não foram encontrados na literatura relatos de ação antiparasitária e inibidores enzimáticos relacionados à enzima α -glucosidase para esta espécie de fungo.

Hipóteses

H1. Fungos *G. lucidum*, *G. applanatum* e *G. lipsiense* tem capacidade metabólica de síntese de cumarinas quando cultivados em arroz vermelho;

H2. O fungo *G. lipsiense* quando cultivado em arroz vermelho tem capacidade metabólica de síntese de biocompostos com atividades biológicas e terapêuticas;

H3. O meio de cultivo utilizado nos sistemas de cultivo líquido de *G. lipsiense* influencia na capacidade metabólica de síntese de biocompostos fúngicos com atividades biológicas e terapêuticas.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido utilizados por seres humanos desde a antiguidade, com o objetivo de aliviar e curar doenças. Inicialmente buscou-se em plantas o isolamento e o mecanismo de ação dos princípios ativos, o que levou ao atual estágio de desenvolvimento científico com a descoberta de novas e importantes drogas. Além das plantas, o potencial fúngico na produção de importantes metabólitos bioativos é muito amplo, sendo reconhecido como uma estratégia em estudos e processos relacionados à química verde. Muitas pesquisas têm sido realizadas buscando entender a relação dos compostos bioativos produzidos pelos fungos e sua ação no metabolismo humano. Dentre os compostos já conhecidos e comumente estudados em fungos basidiomicetos, podem ser citados os compostos fenólicos, vitaminas, polissacarídeos, terpenos, esteroides, ácidos graxos, alcalóides e carboidratos (RÖSECKE E KÖNIG, 2000; SMIDERLE et al., 2012; COSTA et al., 2016; ISLAM et al., 2016; LOJEWSKA et al., 2017; RATHORE et al., 2017; RONCERO-RAMOS e DELGADO-ANDRADE, 2017; WANG et al., 2017b; SINGDEVSACHAN et al., 2017). Compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados devido as suas propriedades antioxidantes (PENG et al., 2015). Eles incluem uma diversidade de substâncias ativas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas, cada um com suas propriedades específicas.

As cumarinas são substâncias derivadas do ácido cinâmico (DEWICK, 2002) e apresentam diversas aplicações, entre elas medicamentos, cosméticos e perfumaria (STEFFENSKY et al., 2000; VILA NOVA et al., 2012). Obtido inicialmente por extração vegetal e após por síntese química, algumas cumarinas foram identificadas nos mais diferentes fungos, dentre eles os fungos basidiomicetos (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; ELKHATEEB et al., 2018).

Os fungos basidiomicetos são reconhecidos por seu potencial de degradação (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004) e portanto, se encaixam muito bem em sistemas de cultivo em estado sólido (FES). Alguns compostos agroindustriais são utilizados como meio de cultura de fungos. O arroz é um cereal rico em carboidratos e nutrientes necessários para o desenvolvimento de fungos e a produção de vários compostos bioativos. Cumarinas, inibidores enzimáticos e compostos com atividade antiinflamatória foram identificados em culturas de arroz utilizando fungos do gênero *Ganoderma* (KIM et al., 2010; HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; ABD EL-HADY et al., 2016). O gênero *Ganoderma* tem sido utilizado em países orientais há muitos anos

(ISLAM et al., 2016) e são reconhecidos pelo seu potencial na produção de compostos bioativos com propriedades terapêuticas. Até o momento, o número de estudos de identificação e mecanismos de ação dos compostos produzidos por fungos *Ganoderma* aumentou. Em uma revisão na literatura científica, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Ganoderma lingzhi*, *Ganoderma sinense* e *Ganoderma capense* são os mais estudados (MAU et al., 2001; HUIE e DI, 2004; TSENG et al., 2005; RUSSELL e PATERSON, 2006; MA et al., 2015; SAKAMOTO et al., 2016). No entanto, outras espécies produzem compostos bioativos com amplo potencial de aplicação. Atividades antitumorais, antivirais e antibacterianas, atividades anticolesterolêmicas, bem como hipoglicemiantes, hepatoprotetoras, neuroprotetoras, antioxidantes, antienvhecimento e imunomoduladoras são alguns dos efeitos produzidos e estudados em extratos de *Ganoderma*.

Ganoderma lipsiense é um fungo pouco estudado na literatura científica. Até o momento, alguns terpenos, esteroides e ácidos graxos têm sido identificados em seu basidiocarpo (RÖSECKE e KÖNIG, 2000), bem como alcalóides, vitaminas e compostos fenólicos observados em sua constituição (SINGDEVSACHAN et al., 2017). Apesar do número de compostos identificados nesta espécie ser reduzido, os compostos identificados e observados mostram potencial para aplicações biotecnológicas. No entanto, entre os estudos publicados para esta espécie, poucos envolvem a identificação dos compostos produzidos no micélio fúngico, sendo sua maioria relacionados à identificação dos compostos extraídos de seu corpo frutífero. A identificação dos compostos produzidos pelo fungo na forma de micélio se faz necessária, uma vez que, desta forma, se reduz o tempo de cultivo. Neste contexto, esta tese de doutorado consiste na investigação da produção de compostos bioativos produzidos por *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho e em meio sintético.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Identificar compostos bioativos com propriedades biológicas produzidos pelo fungo *Ganoderma lipsiense* cultivado em arroz vermelho.

1.1.2 Objetivos específicos

Etapa 1:

- Avaliar a produção de cumarinas pelos fungos *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma lipsiense* e *Ganoderma applanatum* cultivados em arroz vermelho;
- Realizar um estudo cinético para avaliar a produção de cumarinas e compostos fenólicos totais no extrato de *G. lipsiense* cultivado em meio de arroz vermelho em sistema de cultivo sólido (FES);
- Identificar os compostos fenólicos obtidos no extrato bruto;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto sobre as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Etapa 2:

- Identificar os compostos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho por FES presentes nos extratos bruto e purificado;
- Identificar os compostos produzidos pelo fungo no extrato purificado da fração apolar;
- Avaliar o potencial antibacteriano e antiparasitário dos extratos bruto e purificado.

Etapa 3:

- Identificar os compostos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* cultivado em meio sintético por cultivo submerso (FS) presentes nos extratos micelial bruto e purificado;
- Identificar os compostos produzidos pelo fungo no extrato purificado da fração apolar e comparar aos compostos obtidos na Etapa II por FES;
- Avaliar o potencial antiparasitário dos extratos bruto e purificado.

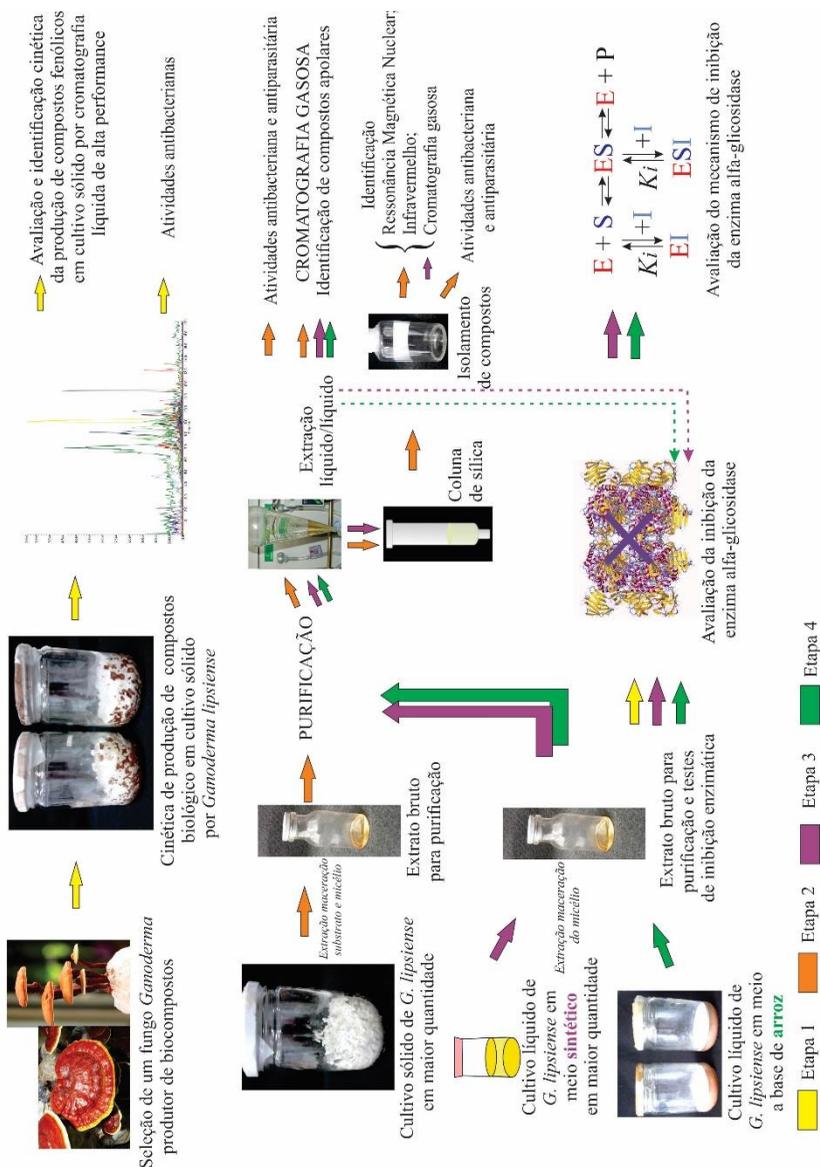
Etapa 4:

- Avaliar a inibição da enzima α -glicosidase pelo extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado por FES e FS em arroz vermelho e por FS em meio sintético;
- Identificar o tipo de inibição enzimática ocasionada pelo extrato bruto;
- Caracterizar e identificar compostos presentes na fração apolar do extrato micelial do cultivo em FS em arroz vermelho.

1.2 DESCRIÇÃO DAS ETAPAS RELATIVAS AOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os procedimentos e etapas realizadas para esta tese são mostrados na Figura 1. O artigo de revisão desenvolvido na Etapa 1, intitulado **Fungi as a source of natural coumarins production**, se refere à pesquisa para o referencial teórico sobre cumarinas produzidas por fungos. Este foi publicado no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*, em 2016. O segundo artigo desenvolvido na Etapa 1, intitulado **Kinetic identification of phenolic compounds and potential production of caffeic acid by *Ganoderma lipsiense* in solid-state fermentation** corresponde aos dados de identificação dos compostos fenólicos e quantificação do ácido cafeico, aceito no periódico *Bioprocess and Biosystems Engineering* em 2019. O terceiro artigo desenvolvido corresponde aos dados da Etapa 2, sendo submetido em periódico internacional. O quarto artigo desenvolvido na Etapa 3, corresponde aos dados de identificação e de atividade antiparasitária do micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio sintético, sendo submetido em periódico internacional. O quinto artigo desenvolvido na Etapa 4 corresponde aos ensaios utilizados na inibição da enzima α glicosidase.

Figura 1 - Diagrama geral das etapas relativas aos objetivos específicos e procedimentos deste trabalho de tese.



Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens autorais e disponíveis *on-line* no banco de imagens *free* das plataformas Pixabay e Pexels.

1.3 JUSTIFICATIVA

Os compostos bioativos desempenham um importante papel na prevenção e tratamento de distintas doenças. Obtidos a partir de fontes vegetais (SIEBERT et al., 2017; TENFEN et al., 2017) como também por síntese química, muitos compostos bioativos podem ser produzidos por microorganismos, como fungos e bactérias, em determinadas condições de cultivo. Os fungos, especialmente os basidiomicetos, são conhecidos pelo potencial de produção de compostos com atividades biológicas, como terpenos, esteróides, compostos fenólicos e alcalóides (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; BABY et al., 2015; PAGANO e ROSA, 2015). Em se tratando de compostos fenólicos, estes têm uma estrutura variável e, portanto, são multifuncionais (GONÇALVES e ROMANO, 2017; MENA e LLORACH, 2017) capazes de atuar como antibacterianos, antioxidantes e antivirais. Obtidos naturalmente a partir de fontes vegetais, os processos biotecnológicos tem se mostrado uma forma alternativa de produção de compostos fenólicos denominados naturais. Cumarinas, ácido cafeico, vanilina, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido clorogênico e ácido *p*-hidroxibenzóico são alguns dos compostos fenólicos identificados em cultivos fúngicos utilizando como substrato, arroz e farelo de arroz (HWANG et al., 2013; HE et al., 2014b; SCHMIDT et al., 2014).

As cumarinas constituem um grupo de moléculas bioativas com propriedades e aplicações terapêuticas, como anticoagulantes, vasodilatadores, anti-inflamatórias e anticancerígenas (WANG et al., 2007; LV et al., 2013). Tais atribuições estão relacionadas ao tipo de estrutura cumarínica obtida. Cumarinas com estruturas muito complexas são de difícil produção envolvendo processos de síntese química, o que acaba deixando o processo oneroso. Processos biotecnológicos são uma alternativa à produção de moléculas naturais que contêm alto valor agregado, utilizando substratos indutores para a síntese microbiana dos compostos de interesse. A produção de cumarinas, ácido cafeico, ácido ferulico e vanilina podem ser obtidas a partir do ácido *p*-cumárico, como já descrito em rotas de produção destes compostos em plantas (DEWICK, 2002). O ácido *p*-cumárico é um constituinte do arroz (ITO et al., 2014), um cereal utilizado como substrato em processos biotecnológicos para obtenção de compostos fenólicos (HWANG et al., 2013; HE et al., 2014b; SCHMIDT et al., 2014), inibidores enzimáticos da α -glicosidase (ABD EL-HADY et al., 2016) e acetilcolinesterase (HASNAT et al., 2013; NONG et al., 2014), compostos com atividade antiviral contra HSV-1

(herpes-vírus humano tipo 1) e anti-crustante testada em larva de *Balanus amphitrite* (NONG et al., 2014).

A obtenção de compostos bioativos em fungos basidiomicetos pode ser realizada em seu corpo de frutificação, micélio ou no caldo do processo fermentativo. Antimicrobianos, antitumorais, inibidores enzimáticos, antioxidantes, imunomoduladores e hipoglicemiantes têm sido amplamente estudados e identificados em fungos do gênero *Ganoderma* (RUSSELL e PATERSON, 2006; CILERDZIC et al., 2014; BABY et al., 2015; KLUPP et al., 2016; KAUR et al., 2017). Os tipos de processo empregados na literatura para *Ganoderma* são sólidos ou líquidos, dependendo do composto a ser produzido. Fungos basidiomicetos, por serem considerados degradadores, mostram boa adaptação em cultivos sólidos (COSTA e TAVARES, 2017). Em relação ao processo de escala industrial, a FS é mais desenvolvida que a FES (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017) e tem mostrado resultados promissores na produção de biocompostos com fungos basidiomicetos. Polissacarídeos, compostos fenólicos, esteroides, cumarinas, terpenos, inibidores enzimáticos e enzimas foram identificados em FES, em micélios fúngicos e no caldo (FS) com fungos basidiomicetos.

Ganoderma lucidum, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. lingzhi*, *G. sinense* e *G. capense* são fungos comumente utilizados em estudos de identificação e aplicação de compostos. A exploração de novas espécies do gênero *Ganoderma* é importante, dada a diversidade de compostos bioativos conhecidos por sua produção. Poucos artigos foram publicados com *G. lipsiense* quando comparados aos demais fungos do gênero. No entanto, os compostos identificados nesta espécie mostram importantes propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana e inibição da linhagem de células de câncer de mama (TNBC) cultivadas em modelo de camundongo. Até o momento, triterpenos, esteróides e ácidos graxos foram identificados na composição de seus corpos frutíferos (RÖSECKE e KÖNIG, 2000) e alcalóides, glicosídeos, vitaminas saponinas, carotenóides, proteínas e carboidratos, ácidos graxos e compostos fenólicos também foram observados (SINGDEVSACHAN et al., 2017).

A importância dos compostos bioativos quanto as suas propriedades biológicas e terapêuticas e o baixo volume de pesquisas relacionados à produção de cumarinas fúngicas foram o estímulo inicial para a pesquisa dessas moléculas. O potencial de fungos do gênero *Ganoderma* quanto a produção de compostos bioativos, a baixa quantidade de estudos publicados referente a produção e identificação de biocompostos por *G. lipsiense*, além da ausência de publicações

envolvendo identificação de cumarinas, ácido cafeico e vanilina pelo fungo *G. lipsiense*, também estimularam a presente pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os compostos produzidos por fungos, suas propriedades biológicas e terapêuticas foram contextualizados neste capítulo, com ênfase para os gêneros *Ganoderma* e *G.lipsiense*. O cultivo micelial pode ser realizado em processos de cultivos sólidos ou líquidos em diferentes substratos, nos quais possuem grande influência na síntese dos compostos produzidos. Abordam-se as características gerais do cultivo sólido e líquido assim como o potencial destes processos para uso na indústria.

2.1 FUNGOS: UMA FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS E TERAPÊUTICOS NATURAIS

Os fungos são um grupo ubíquo e diverso de organismos pertencentes ao reino Fungi, que foi considerado inicialmente como o quinto reino por Whittaker (1959) (MEDEIROS de SILVEIRA, 2015). De acordo com sua classificação, este reino compreende 1 subclasse, 7 filos, 10 sub-filos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens (MEDEIROS de SILVEIRA, 2015), e estima-se que 1,5 milhão de espécies existem em todo o mundo e cerca de 120 mil espécies foram descritas até a data (MEDEIROS de SILVEIRA, 2015; VALENCIA e CHAMBERGO, 2013).

Fungos são organismos eucarióticos que incluem microrganismos como as leveduras, bolores e cogumelos. Eles representam um papel importante na decomposição, contribuindo para a manutenção da biosfera por reciclagem de material vegetal orgânico e diversos outros compostos. Outra característica importante dos fungos é o seu potencial para processos biotecnológicos com foco na produção de compostos bioativos (PAGANO e ROSA, 2015).

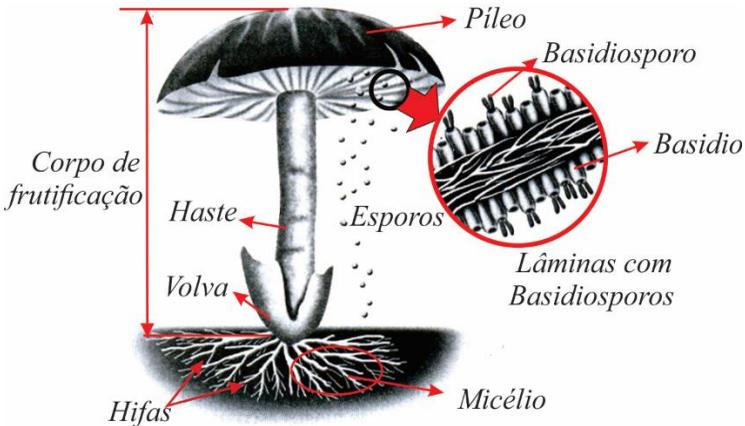
De acordo com a classificação de Alexopoulos e Mims, (1985), são os filos Ascomycota e Basidiomycota, constituintes de uma imensa fonte de componentes biologicamente ativos (SMITH et al., 2015). Os fungos ascomicetos têm uma incrível diversidade em todos os aspectos da sua vida, proporcionando recursos interessantes para estudos científicos (WHITEWAY et al., 2015). Muitas espécies de leveduras são ascomicetos unicelulares, que são distribuídos em 60 gêneros com aproximadamente 500 espécies conhecidas (RIBEIRO da SILVA e COELHO, 2006).

Os fungos são reconhecidos por seu grande potencial de produção de enzimas em escala comercial (CORTÉS e MOSQUEDA, 2013) assim como na síntese de medicamentos, incluindo compostos com atividades

anticâncer (HAZALIN et al., 2012), processos de biotransformação (AGUIRRE-PRANZONI et al., 2011), síntese de ácidos orgânicos (CORTÉS e MOSQUEDA, 2013) e compostos com atividades antimicrobianas e antiparasitárias (LENZI et al., 2018).

Os fungos basidiomicetos, comumente conhecidos como cogumelos, são muito importantes no ecossistema florestal. Eles são definidos como macro fungos e constituídos por um corpo frutífero, conforme mostra a Figura 2. A produção de esporos (basidiosporos) nos basidiomicetos ocorre em uma estrutura externa chamada basidium (ALEXOPOULOS e MIMS, 1985). O micélio de basidiomicetos é formado por hifas septadas, que penetram no substrato absorvendo nutrientes do meio. Essas hifas são microscópicas, mas seu conjunto forma uma estrutura visível chamada micélio (ALEXOPOULOS e MIMS, 1985). Os corpos de frutificação (basidiocarpos) de muitos basidiomicetos são comestíveis e algumas espécies são comercialmente cultivadas para alimentação.

Figura 2 – Esquema descritivo dos constituintes dos fungos basidiomicetos



Fonte: Adaptado de Santos, 2012

Os cogumelos são usados por muitos anos na cultura oriental para alimentos humanos (ISLAM et al., 2016). No Brasil, a coleta e o uso destes fungos foi uma prática comum entre os povos indígenas, mas essa prática foi perdida ao longo do tempo. Na década de 1950, as técnicas de cultivo começaram a ser realizadas por imigrantes orientais, que trouxeram fungos comestíveis de seus países de origem (MELO de

CARVALHO, 2014). As pesquisas indicam que os cogumelos comestíveis já existiram no período Cretáceo, há 130 milhões de anos, antes do surgimento da humanidade. Inicialmente, eles eram coletados nas florestas por coletores de alimentos e caçadores, sendo posteriormente cultivados por humanos (MELO de CARVALHO, 2014; RATHORE et al., 2017).

Recentemente, o consumo de cogumelos como alimento aumentou consideravelmente, devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana. *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp. e *Lentinula edodes* são os basidiomicetos mais consumidos para alimentos humanos em todo o mundo. O consumo de cogumelos expandiu-se não só como alimento, mas também na área de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosmeceuticos (RATHORE et al., 2017). Numerosos estudos relataram a capacidade dos cogumelos medicinais para curar doenças (RATHORE et al., 2017; RONCERO-RAMOS et al., 2017). *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Fomes fometarius*, *Tremella fuciformis* e *Lentinus edodes* são tradicionalmente utilizados na medicina popular Chinesa (SAINI e ATRI, 1999).

Em geral, os basidiomicetos têm altos teores de carboidratos totais (50 - 60%), fibras, proteínas (19 - 35%), vitaminas e alguns minerais, incluindo fósforo, potássio e cálcio, além de baixo teor de gordura (2 - 6%) em sua matéria seca (SMIDERLE et al., 2012; RATHORE et al., 2017; SINGDEVSACHAN et al., 2017). Os ácidos graxos não saturados são predominantes em relação aos ácidos graxos saturados, especialmente ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico (RATHORE et al., 2017).

Os compostos produzidos por fungos basidiomicetos são constituintes de diversos grupos químicos e podem ser classificados de acordo com sua estrutura. Uma diversidade de metabólitos pode ser sintetizada pelo mesmo fungo, dependendo das condições em que está sujeito. Os compostos bioativos de alto valor medicinal, como terpenos, ergosterol, fenólicos, polifenóis, lectinas, polissacarídeos e compostos orgânicos voláteis são constituintes em cogumelos (RÖSECKE E KÖNIG, 2000; COSTA et al., 2016; ISLAM et al., 2016; LOJEWSKA et al., 2017; RONCERO-RAMOS et al., 2017; WANG et al., 2017). Estes compostos tem mostrado inúmeros benefícios para a prevenção e tratamento de doenças, como diabetes mellitus (JEONG et al., 2010; MA et al., 2015; KAEWNARIN et al., 2016; RONCERO-RAMOS e DELGADO-ANDRADE, 2017; WANG et al., 2017), câncer (KAEWNARIN et al., 2016; SINGDEVSACHAN et al., 2016; RONCERO-RAMOS e DELGADO-ANDRADE, 2017) e doenças cardiovasculares (JEONG et al., 2010; RONCERO-RAMOS e

DELGADO-ANDRADE, 2017), além das propriedades biológicas avaliadas no tratamento de doenças negligenciáveis (MOGLAD e SAADABI, 2012; MA et al., 2014; LELIEBRE-LARA et al., 2016). Doenças negligenciáveis são um grupo de doenças infecciosas causadas por bactérias, parasitas ou vírus que prevalecem especialmente em regiões de clima tropical (LENZI et al., 2018).

Os fungos basidiomicetos são considerados uma fonte rica de antibióticos naturais. No entanto, ao contrário das pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e potentes contra bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais (YAYAN et al., 2015), o número de pesquisas publicadas relacionando fungos basidiomicetos como agentes antiparasitários ainda é limitada (LENZI et al., 2018).

Dentre os parasitas mais usuais de desenvolvimento em países de clima tropical, destacam-se *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., *Giardia* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Helminthus*, cujo o tratamento convencional foi desenvolvido a muito tempo atrás. A literatura reporta a ação de compostos como terpenos, esteroides, cumarinas e quinonas como compostos com propriedades antiparasitárias, em especial os terpenos e esteroides, dos quais podemos citar os fungos basidiomicetos do gênero *Lentinus* spp., *Ganoderma* spp., *Pycnoporys sanguineus*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* (RUKACHAISIRIKUL et al, 2005; CORREA et al., 2006; ADAMS et al., 2010; RAMOS-LIGONIO et al., 2012; MA et al., 2014; LELIEBRE-LARA et al., 2016; LENZI et al., 2018) como produtores.

Apesar do parasita *Giardia duodenalis*, um protozoário flagelado e causador da giardíase ser considerado o mais comum protozoário parasita humano, poucos estudos voltados a busca de novas drogas antiparasitárias são publicados. O gênero *Giardia* consiste em seis espécies: *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. microti*, *G. duodenalis*, *G. psittaci* e *G. muris* e se distinguem com base na morfologia e ultraestrutura de seus trofozoítos (DURIGAN, 2015). As manifestações clínicas da giardíase são divididas em giardíase assintomática (portadores) ou giardíase sintomática: diarreia aguda à crônica, dor abdominal, vômitos, desidratação e perda de peso além da má absorção dos nutrientes podendo ocasionar redução do crescimento e do desenvolvimento cognitivo de crianças (DURIGAN, 2015; YARAHMADI et al., 2016).

A *G. duodenalis* apresenta dois estágios em seu ciclo de vida: estágio trofozoito e estágio de cisto (YARAHMADI et a., 2016). Quando em condições ideais no interior do hospedeiro (temperatura ± 37 °C e pH ácido) estão presentes na forma trofozoítos, que costumam parasitar o

duodeno e o íleo, anexando-se ao epitélio intestinal. Os cistos costumam ser encontrados no ambiente e são uma forma essencial para a sobrevivência do parasita fora do hospedeiro, sendo resistentes à cloração e ozonização e permanecem viáveis durante bastante tempo. Quando um novo hospedeiro consome um cisto, o ambiente ácido do estômago do hospedeiro estimula sua excitação. Cada cisto produz dois trofozoítos. Esses trofozoítos migram para o duodeno e o jejuno, onde se ligam à parede da mucosa por meio de um disco adesivo ventral e se replicam por fissão binária (KUCIK et al., 2004; DURIGAN, 2015).

Os tratamentos utilizando drogas químicas atuais, como metronidazol, tinidazol e furazolidona, são frequentemente prescritos pelos médicos para o tratamento da giardíase. No entanto, a resistência ao uso dos medicamentos devido aos efeitos colaterais ocasionados pelo longo tempo de tratamento, tem sido associado aos tratamentos convencionais. Com isso, a busca por novas drogas naturais, que sejam seguras e que tenham efeitos terapêuticos, baixo custo de produção e efeitos colaterais mínimos se faz necessário (YARAHMADI et al., 2016), buscando reduzir assim, o tempo de tratamento da doença.

2.1.1 Fungos e os inibidores enzimáticos da α -glicosidase

Terpenos, cumarinas, compostos fenólicos, alcaloides, peptídeos e polissacarídeos obtidos via processos biotecnológicos envolvendo fungos, também tem sido alvo de pesquisas relacionadas à inibição de algumas enzimas associadas ao desenvolvimento de sérias doenças endócrinas, como a diabetes mellitus (KANG et al., 2013; DEL VALLE et al., 2016; PENG et al., 2016; WANG et al., 2017), em virtude do efeito hipoglicêmico destes compostos.

Diabetes é um distúrbio metabólico sistêmico caracterizado pelo aumento dos níveis de glicose no sangue (DEL VALLE ET AL., 2016; WANG et al., 2017^a; WANG et al., 2017b) e geralmente compreende 2 tipos: tipo 1, também conhecido como diabetes mellitus dependente de insulina (DM1), e diabetes mellitus tipo 2 ou não insulina-dependente (DM2) (FATMAWATI et al., 2011). O DM2 é causado por disfunção da insulina, especialmente pós-prandial. O principal objetivo do tratamento da diabetes é a regulação e a manutenção dos valores glicêmicos, de modo a prevenir complicações agudas e crônicas, prolongando e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (WANG et al., 2017a).

Nos anos 80, os inibidores da α -glicosidase (E.C. 3.2.1.20) tornaram-se uma nova classe de fármacos antidiabéticos. A enzima α -glicosidase é secretada pela mucosa epitelial do intestino delgado e

responsável pela degradação dos carboidratos (YIN et al., 2014), ou seja, hidrolisam moléculas de carboidratos maiores em glicose e outros monossacarídeos, facilitando sua absorção. Os inibidores enzimáticos da α -glicosidase retardam o processo de digestão e absorção de carboidratos, característica pela qual os fazem ser propostos como tratamento para o diabetes mellitus tipo 2 (FATMAWATI et al., 2011). Consequentemente, o pico de concentração de glicose no sangue pós-prandial é reduzido e o nível de açúcar no sangue fica sob controle (YIN et al., 2014). Os inibidores da α -glicosidase usados clinicamente existentes são acarbose, miglitol e voglibose, todos originários de produtos naturais; no entanto, estão associados a efeitos colaterais gastrointestinais, como distensão abdominal, flatulência e possibilidade de diarreia (DEL VALLE et al., 2016; ROUZBEHAN et al., 2017). Além disso, a resistência a estes medicamentos também foi relatada após tratamento prolongado (ISLAM et al., 2013).

A literatura denota a ação do extrato bruto (ABD EL-HADY et al., 2016) e de compostos fúngicos isolados (FATMAWATI et al., 2011; KANG et al., 2013; DEL VALLE et al., 2016; JING et al., 2016; CHEN et al., 2018) como inibidores da enzima α -glicosidase. Dentre os fungos com potencial inibição da enzima: *Aspergillus oryzae* (KANG et al., 2013), *Aspergillus unguis* (ABD EL-HADY et al., 2016), *Ganoderma leucocontextum* (WANG et al., 2017b), *G. lucidum* (FATMAWATI et al., 2011), *Ganoderma resinaceum* (CHEN et al., 2018), *Lachnum* YM406 (JING et al., 2016), *Penicillium spathulatum* (DEL VALLE et al., 2016), *Xylariaceae* sp. QGS 01 (INDRIANINGSIH e TACHIBANA, 2017) podem ser citados.

A diversidade de compostos bioativos produzidos pelos fungos, de acordo com as características genéticas, as condições de cultivo e de processo, amplia o seu espectro de aplicação, o que os tornam capazes de atuar como agentes transformadores no desenvolvimento de novas drogas para fins terapêuticos e processos biotecnológicos industriais.

2.1.1.1 Cinética enzimática

O modelo cinético de Michaelis e Menten é hoje o modelo mais utilizado quando se deseja avaliar a cinética enzimática de α -glicosidase. O substrato (S), moléculas de carboidratos maiores, juntamente com a enzima (E), reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário, denominado complexo enzima-substrato (ES) com constante de velocidade k_1 . Este complexo pode se dissociar em E e S com uma constante de velocidade k_2 , ou reagir com outra substância,

regenerando a enzima e formando os produtos (P) da reação com uma constante de velocidade k_3 (BORZANI, 2001), que no caso da α -glicosidase é glicose e outros monossacarídeos.

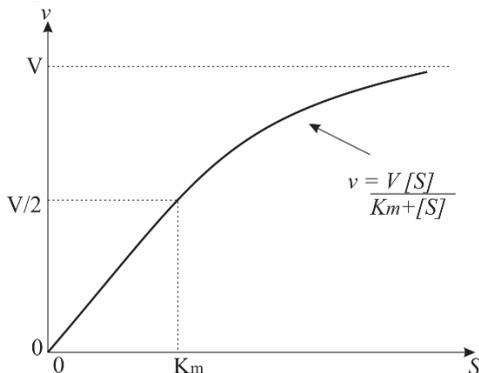
Esquemáticamente, teremos em um dado instante t:



Uma vez que este modelo já está amplamente descrito na literatura, o mesmo não será aqui desenvolvido. A Equação de Michaelis e Mentem (Equação 1) correlaciona a velocidade máxima (V_{max}) vezes a concentração de substrato (S) pela constante de Michaelis e Mentem (K_m) mais a concentração de substrato (S), que é representada na Figura 3.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Figura 3 – Representação esquemática da equação de Michaelis e Mentem



Fonte: Elaborado pelo autor.

A velocidade da reação é máxima (V_{max}) quando toda a enzima participante da reação estiver na forma de complexo. A constante de Michaelis e Mentem (K_m) corresponde a afinidade da enzima com o substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_m , maior será a sua afinidade com o substrato, e seu valor corresponde a uma velocidade igual a metade da máxima (BORZANI, 2001).

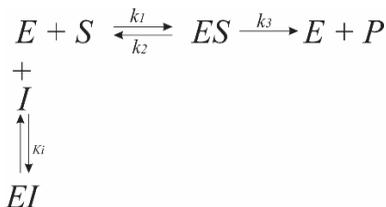
2.1.1.2 Inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos [I] são substâncias que acarretam uma diminuição na velocidade da reação (BORZANI, 2001). Muitas doenças são ocasionadas pela deficiência ou pelo excesso de um metabólito específico no organismo, dentre essas doenças pode-se citar a diabetes mellitus. Usualmente quando há inibição, ocorre um acúmulo do substrato no meio e os produtos deixam de ser gerados, ou são gerados em menor quantidade (SOARES, 2011).

Existem dois tipos de inibição enzimática: irreversíveis e reversíveis. A inibição irreversível reage irreversivelmente com a enzima, bloqueando-a parcial ou totalmente, como é o caso de alguns metais pesados. Isso ocorre devido a formação de uma ligação covalente entre a enzima e o inibidor, de forma que o substrato e o sítio ativo enzimático se tornem ligados permanentemente (SOARES, 2011). Já os inibidores reversíveis, se ligam à enzima de forma reversível e podem ser classificados em competitivos, não competitivos e incompetitivos.

Além dos parâmetros cinéticos V_{\max} e K_m , quando na presença de inibidor, determina-se a constante de inibição K_i . Quanto menor o valor de K_i , maior será a inibição ocasionada pelo inibidor (MAJOULI et al., 2016).

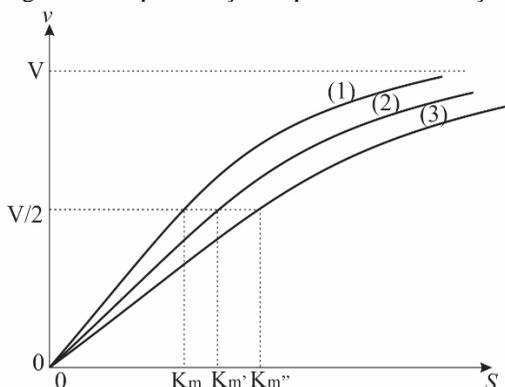
Os inibidores competitivos são substâncias que competem diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Geralmente eles se assemelham estruturalmente ao substrato ou ao estado de transição da reação. Este tipo de inibidor se liga apenas na enzima em sua forma livre, e não na forma de complexo enzima-substrato, formando o complexo enzima-inibidor (EI) conforme esquema abaixo:



Na inibição competitiva, a V_{\max} da reação não se altera, enquanto os valores de K_m aumentam (Figura 4). Uma forma de contornar o problema deste tipo de inibição é aumentando a concentração de substrato no meio. A equação 2 mostra a equação de Michaelis e Menten para inibição competitiva.

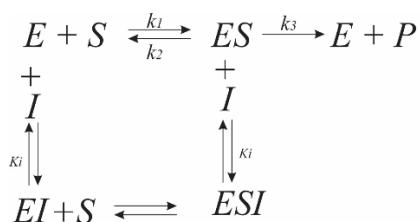
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] + [S]} \quad (2)$$

Figura 4 – Representação esquemática da inibição competitiva



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na inibição não-competitiva, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo, mas ocupa outro sítio da enzima (BORZANI, 2001), formando além dos complexos ES e EI, o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), como indicado esquematicamente a seguir:

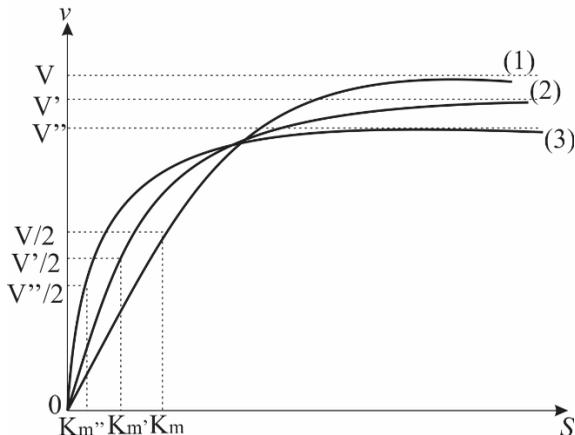


Na inibição não-competitiva o valor de V_{max} diminui e o valor de K_m não é alterado (Figura 5). A equação 3 mostra a equação de Michaelis e Menten para inibidor não-competitivo:

$$v = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)} \quad (3)$$

Sendo:
$$V_{max}^{ap} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{I}{K_i}} \quad \text{e} \quad K_m^{ap} = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)$$

Figura 6 - Representação esquemática da inibição incompetitiva



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *GANODERMA*

Em um contexto geral, o interesse no uso de fungos para a produção de substâncias químicas por conversão microbiana aumentou nos últimos anos. Entre muitas espécies de fungos, o gênero *Ganoderma* parece ser o mais interessante principalmente devido ao seu amplo efeito terapêutico (JAROSZUK et al., 2014). Mais de 250 espécies de *Ganoderma* são reportadas em todo o mundo e cada espécie apresenta suas propriedades biológicas características (SINGDEVSACHAN et al., 2017). Pertencentes ao grupo de cogumelos degradadores de madeira, estes fungos apresentam corpos de frutificação grossos e resistentes, o que os tornam pouco usuais dentre os cogumelos comestíveis (BABY et al., 2015).

Estudos científicos mostram que diferentes espécies de *Ganoderma* contêm esteroides, fenóis, ligninas, lecitinas, alcaloides e triterpenos em sua constituição. Estes compostos apresentam distintas propriedades terapêuticas, como atividades antitumoral, antiviral e antibacteriana, hipocolesterolêmicas, bem como atividades hipoglicêmicas, hepatoprotetoras, neuroprotetoras, antioxidantes,

antienvelhecimento e imunomoduladoras (RUSSELL e PATERSON, 2006; CILERDZIC et al., 2014; BABY et al., 2015; KLUPP et al., 2016; KAUR et al., 2017), o que os tornam uma alternativa para antibióticos comerciais, antimicóticos, antioxidantes e citotásticos (CILERDZIC et al., 2014). Uma ampla gama de doenças tem sido alvo de extratos de *Ganoderma* incluindo câncer, hepatite B, neurastenia (SAKAMOTO et al., 2016), artrite, bronquite (CILERDZIC et al., 2014), diabetes (FATMAWATI et al., 2011) e Alzheimer (WEI et al., 2017).

2.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão entre as classes mais estudadas de compostos bioativos em virtude de sua ampla gama de propriedades biológicas. Identificados em plantas e em fungos, os compostos fenólicos tem demonstrado propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (GONÇALVES et al., 2017), nos quais são metabolizados e transformados em moléculas biodisponíveis, capazes de atuar em processos biológicos relacionados à saúde humana e auxiliando na prevenção de algumas doenças, como síndrome metabólica, distúrbios neurodegenerativos (Parkinson e Alzheimer), aterosclerose, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e certos tipos de cânceres (GONÇALVES et al., 2017; MENA e LLORACH, 2017). Uma das estratégias mais importantes para o tratamento das doenças neurodegenerativas é manter os níveis de acetilcolina através da inibição da acetilcolinesterase (HASNAT et al., 2013; CÖR et al., 2017). Estudos envolvendo *G. lucidum* cultivados em arroz integral mostraram resultados interessantes em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase (HASNAT et al., 2013). Esta inibição tem sido associada à presença de compostos fenólicos em sua constituição (CÖR et al., 2017).

Compostos fenólicos produzidos por espécies de *Ganoderma* têm demonstrado significativa atividade antioxidante (PENG et al., 2015). Os antioxidantes permitem eliminar os radicais livres, doar hidrogênio, íons quelatos de metais, quebrar as reações de cadeias radicais e suprimir o oxigênio singlete *in vitro* e *in vivo* (HASNAT et al., 2013). Estudos sobre a transformação metabólica de compostos fenólicos em modelos *in vitro* visam fornecer informações sobre sua biodisponibilidade e como estes compostos podem alterar a estrutura de moléculas presentes no meio celular (ARAGONÈS et al., 2017; HASNAT et al., 2013; CÖR et al., 2017).

Diferentes fenólicos, como as cumarinas, ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico e ácido elágico tem sido identificados em extratos de *G. lucidum* cultivados em arroz (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015). Outros constituintes fenólicos, como ganoderin A, ganocochlearin A, B, C e D, fornicidun D and ganomycin C (PENG et al., 2015) foram relatados em estudos de *Ganoderma coclear*.

As cumarinas, uma das substâncias alvo deste estudo, é um composto natural extraído das plantas e utilizada como aromatizante em alimentos, medicamentos, fixadores de perfumes, tintas e aditivos em spray. No entanto, embora algumas cumarinas sejam obtidas por bactérias e fungos, há pouca informação no que diz respeito à produção microbiana. Pesquisadores têm observado a produção de compostos cumarínicos com distintas propriedades biológicas, como anticancerígenos (LV et al., 2013), antiinflamatórios (WANG et al. 2007) e antibacterianos (HWANG et al., 2013) por meio de extração e cultivos fúngicos. Apesar da identificação de cumarinas a partir de cultivos envolvendo fungos *Ganoderma* ser restrita (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; ISLAM et al., 2015; ELKHATEEB et al., 2018), um levantamento bibliográfico elaborado pela autora desta tese e publicado na forma de artigo de revisão intitulado “**Fungi as a source of natural coumarins production**” no periódico *Applied Microbiology and Biotechnology* (IF=3,420) em 2016, mostra que a obtenção de cumarinas com propriedades terapêuticas e biológicas envolvendo a biossíntese fúngica é possível. Recentemente, foram identificadas as isocumarinas 7-metoxi-2,3,6-trimetilcromona, 5-hidroxi-6-etil-7-metoxi-metilcromanona e a cumarina Citosporona C no corpo de frutificação de *G. applanatum* (ELKHATEEB et al., 2018).

Estima-se que mais de 1300 cumarinas tenham sido identificadas como metabólitos secundários de plantas, bactérias e fungos (HWANG et al. 2013; VENUGOPALA et al. 2013; WANG et al. 2015). Isolada por Vogel em 1820 a partir da planta coumarou (*Dipteryx odorata*) (VENUGOPALA et al. 2013; ROHINI e SRIKUMAR 2014; ISLAM et al., 2015; MATOS et al. 2015), as cumarinas apresentam odor adocicado, similar a vanila, sendo utilizada em perfumes desde 1882 (ASLAM et al. 2010; SANTOS et al. 2013; MATOS et al. 2015; COSTA et al., 2016). Derivadas do ácido cinâmico (DEWICK, 2002), as cumarinas podem ser classificadas em quatro categorias: cumarina simples, furanocumarina, piranocumarina e cumarina com substituintes no anel de pirona (JAIN e JOSHI 2012; LIN et al. 2013; VENUGOPALA et al. 2013; ROHINI e SRIKUMAR 2014), conforme mostrado no Quadro 1. Sua versatilidade as tornam interessante para uma ampla gama de aplicações (MATOS et

al. 2015), como potencial tecnológico em indústrias farmacêuticas, agroquímicas, de fragrâncias, alimentos, indústria cosmética e em tecnologia de cores como agentes clareadores ópticos ou corantes a laser (DARU e STIRLING 2011; SANTOS et al. 2013; VENUGOPALA et al. 2013; VEKARIYA e PATEL 2014; COSTA et al., 2016). Apesar das propriedades e da importância farmacêutica das cumarinas, há pouca informação disponível sobre a biossíntese microbiana de moléculas de cumarina simples, que servem como porta de entrada para outros derivados de cumarina (LIN et al. 2013). A síntese da cumarina utilizando a engenharia metabólica permite identificar melhor as reações e enzimas envolvidas no processo e aumentar a probabilidade de desenvolver estratégias efetivas com o objetivo de fabricação em grande escala (COSTA et al., 2016).

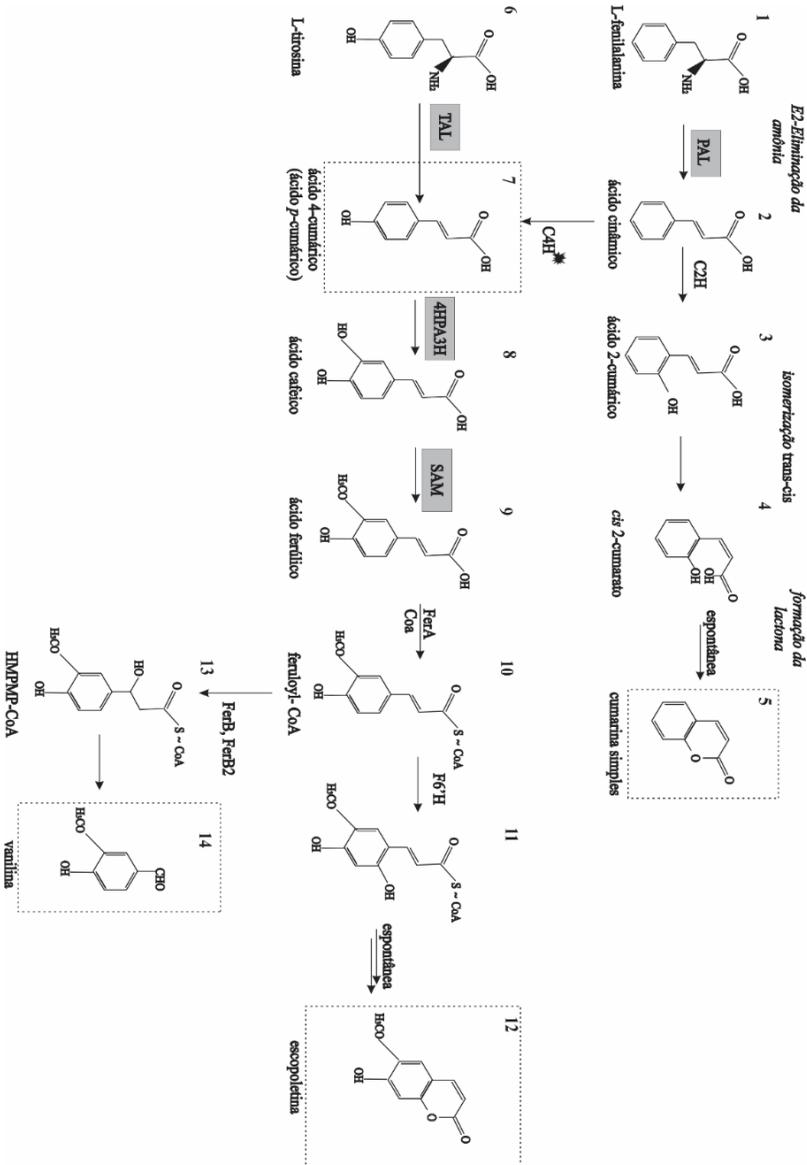
Em uma rota metabólica conhecida em plantas (Figura 7), a cumarina é formada a partir da conversão da glicose, a partir da *L*-fenilalanina (**1**), na qual a fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.24) remove o (pro-3S) -hidrogênio e $-NH_3^+$ da *L*-fenilalanina para produzir ácido *trans*-cinâmico (CA) (**2**) (KOUKOL e CONN 1961; VANNELLI et al. 2007). Na sequência, a enzima do citocromo P450, cinamato 2-hidroxilase (C2H) catalisa a hidroxilação na posição 2 do cinamato *trans* dando o *trans*-2-coumarato ou ácido 2-cumárico (**3**) (GESTETNER e CONN 1974; LIN et al. 2013). O último passo é a lactonização espontânea do *cis* 2-coumarato (**4**) formando assim a cumarina simples (**5**) (HASKINS et al. 1964; KLEINHOFS et al. 1967; OBA et al. 1981; LIN et al. 2013).

Outros compostos fenólicos contendo moléculas com um núcleo cumarínico, são obtidas a partir do ácido 4-cumárico (também conhecido como ácido *p*-cumárico). Este ácido pode ser obtido pela desaminação dos aminoácidos aromáticos *L*-tirosina (**6**) ou *L*-fenilalanina (**1**) (Figura 7) da glicose. Algumas enzimas PAL convertem *L*-fenilalanina (**1**) para ácido cinâmico (**2**) e a enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H) para produzir o ácido *p*-cumárico (**7**). O uso da tirosina (**6**) como substrato, produz o ácido *p*-cumárico (**7**) em uma única etapa e é realizado pela tirosina amônialase (TAL) (VANNELLI et al. 2007; SUN et al. 2015).

Quadro 1 - Diferentes classificações e aplicações de cumarinas

Classificação	Exemplo	Aplicação	Referência
Cumarina simples	Cumarina simples	Fixador de perfume; Pintura; Aditivo <i>spray</i> ; Aromatizante de alimentos;	MIYANO et al. 2014
	Umbelliferona	Leucemia; Antioxidante; Antimicrobiano;	ROHINI e SRIKUMAR 2014 HROBONOVÁ et al. 2013
Furanocumarina tipo linear	Imperatorin	Antiinflamatório; Antibacteriano; Antifúngico; Anticâncer; Anticonvulsivo;	VENUGOPALA et al. 2013
	Psoraleno	Carcinoma cervical; Doença de pele; Psoríase; Vitiligo;	ROHINI e SRIKUMAR 2014
Furanocumarina tipo angular	Angelicina	Talassemia; Anemia falciforme; Antiviral;	JEONG-CHO et al. 2013
Piranocumarina tipo linear	Xantiletina	Antibacteriano;	VENUGOPALA et al. 2013
Piranocumarina tipo angular	Aloxantoxicetina	Antibacteriano; Antiviral;	CAO et al. 2013;
Bicumarina	Dicumarol	Anticoagulante	MOLINA e ZANUSSO JÚNIOR 2014.

Figura 7 – Via biossintética proposta para a produção de cumarinas em plantas (1-5) e a partir do ácido *p*-cumárico na produção de escopoletina (7-12), ácido cafeico (7-8; 6-8) e vanilina (7-10; 13-14)



Fonte: Adaptado de KUMAR e PRUTHI, 2014 e COSTA et al., 2016

A escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina) (**12**), um importante composto cumarínico com propriedades antifúngicas (GNONLONFIN et al., 2012) e espasmolítica (SCHNEIDER et al., 2015), foi produzida por linhagens de *Escherichia coli* modificadas para converter ácido fenilpropanóide em estudos realizados por Lin et al. (2013), sendo produzida via rota de TAL, sem a produção do ácido cinâmico (**2**). Os autores utilizaram a 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase (4HPA3H) nativa de *E. coli* como substituto da enzima dependente de citocromo P450, para formar o ácido cafeico (**8**) a partir do ácido *p*-cumárico (**7**). O ácido cafeico (**8**), um intermediário na produção da escopoletina (**12**), é reconhecido por suas propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, antivirais, antimicrobianas e antiinflamatórias (WU et al., 2017; LIN e YAN 2012) e tem sido identificado em estudos com *Ganoderma* (HASNAT et al., 2015). Sua obtenção é comumente produzido pela extração de fontes vegetais, hidrólise química ou enzimática de derivados do ácido cafeoilquínico (LIN e YAN 2012). Estudos reportam a ação do ácido cafeico e seus derivados na indução da apoptose de células HL-60 e células hepatocarcinomas (CHEN et al., 2001; CHUNG et al., 2004), bem como agentes anti-HIV (BAILLY e COTELLE, 2005) e antidiabéticos (LIN e YAN, 2012).

Outro composto fenólico derivado do ácido cinâmico (**2**) (Figura 7) é o ácido ferulico (**9**). Obtido por meio da conversão do ácido cafeico (**8**) via S-adenosil metionina (SAM), o ácido ferúlico é um importante intermediário na síntese da vanilina (**14**) (KUMAR e PRUTHI, 2014). Utilizado como ingrediente aromatizante e de fragrância nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, a vanilina é o principal constituinte do aroma natural de baunilha (GALLAGE e MØLLER, 2015; FACHE e BOUTEVIN, 2016) e pode ser obtida por meio de conversão microbiana a partir do ácido ferúlico (**9**) (BENZ e MUHEIM, 1996). De acordo com Kumar e Pruthi (2014) *apud* Masai et al., (2002), estudos sobre a degradação do ácido ferulico em vanilina e outros compostos orgânicos em *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 confirmou que o ácido ferulico foi convertido em feruloyl-CoA (**10**) pela Feruloyl-CoA sintetase (FerA), e ainda em HMPMP-CoA (4-hidroxi-3-metoxifenil - β - hidroxipropionil-coenzima A) (**13**) com a ajuda de feruloil-CoA hidratases/liases de (FerB e FerB2). Na sequência, a vanilina é resultado da remoção de CH₃COSCoA (acetil coenzima A), conforme mostrado na Figura 7. Extraída naturalmente da vagem da orquídea *Vanilla planifolia*, apenas 1% da vanilina total produzida por ano é extraída da planta, sendo o restante oriundo se síntese química (PACHECO e DAMASIO, 2010). A vanilina possui propriedades

antioxidantes, antimicrobianas, antimutagênicas e anticarcinogênicas (SHYAMALA et al., 2007), sendo assim utilizada como intermediário na produção de herbicidas, agentes antiespumantes e drogas, como papaverina, *L*-dopa, *L*-metildopa e agentes antimicrobianos (PACHECO e DAMASIO, 2010).

2.2.2. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos de um único tipo ou diferentes tipos de monossacarídeos. Os polissacarídeos de aplicação industrial são extraídos de plantas, algas e fungos, como também obtidos via processos fermentativos envolvendo microrganismos (DA CUNHA et al., 2009).

Polissacarídeos obtidos via fontes naturais têm apresentado distintas atividades terapêuticas significativas e seus efeitos tóxicos sobre o corpo humano são relativamente pequenos (YU et al., 2018). Com relação aos fungos *Ganoderma*, os polissacarídeos são os principais componentes do fungo *G. sinense* (JIANG et al., 2017) e são descritos como agentes terapêuticos efetivos, com atividades antitumorais, imunomoduladoras (RUSSELL e PATERSON, 2006; JAROSZUK et al., 2014) e efeitos hipoglicêmicos (MA et al., 2015; WANG et al., 2017b). Conforme demonstrado por Zhao et al., (2010), polissacarídeos isolados de *G. lucidum* mostraram resultados satisfatórios quando avaliados com relação ao seu efeito inibitório na proliferação de células malignas de câncer de mama (MDA-MB-231). Também apresentaram atividade seletiva contra células tumorais (linhagens celulares de SiHa) e estimularam a produção de macrófagos derivados de TNF- α THP-1 exopolissacarídeos do fungo *G. applanatum* (OSÍNSKA-JAROSZUK et al., 2014). Com relação aos efeitos imunomoduladores dos polissacarídeos naturais, em 2010 foi aprovado na China um comprimido a partir de polissacarídeos do fungo *G. sinense* como medicamento terapêutico adjuvante para o tratamento de leucopenia e lesão hematopoiética, causada por quimioterapia/radioterapia concomitante durante o tratamento do câncer (JIANG et al., 2017). Dentre o conjunto de polissacarídeos que compõem este medicamento, encontram-se as β -glucanas (JIANG et al., 2017). Além de seus efeitos imunoestimulantes, β -glucanas extraídas de *G. lucidum* também tem mostrado propriedades antioxidantes potentes no tratamento da arteriosclerose (SARGOWO et al., 2017) e efeitos hipoglicêmicos relacionados a prevenção e tratamento de diabetes mellitus (KANAGASABAPATHY et al., 2014).

Os polissacarídeos de forma geral têm mostrado resultados satisfatórios no que diz respeito aos efeitos hipoglicêmicos. Compostos com efeitos hipoglicêmicos são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos utilizados, por exemplo, no controle da diabetes mellitus, uma das doenças endócrinas mais comuns do século XXI. Os medicamentos hipoglicemiantes mais eficazes são: insulina, derivados da sulfonilureia, biguanidas, tiazolidinedionas e inibidores de α glicosidase. Porém, esses agentes têm efeitos colaterais indesejáveis, como obesidade, pressão alta e doenças cardíacas (KANAGASABAPATHY et al., 2014). Polissacarídeos extraídos de *G. lucidum* tem sido relatados como agentes capazes de aumentar os níveis de insulina e diminuir os níveis de açúcar no plasma em camundongos (MA et al., 2015). De um modo geral, a ação dos polissacarídeos consiste na inibição da hiperglicemia, regulando a expressão de várias enzimas-chave na via do metabolismo da glicose, como a glucoquinase hepática, a fosfofrutoquinase, a glicose-6-fosfato desidrogenase, a glicose-6-fosfatase (G6Pase), entre outros. Eles também apresentam inibição da atividade da glicogênio sintase, diminuindo a produção de glicose hepática (MA et al., 2015).

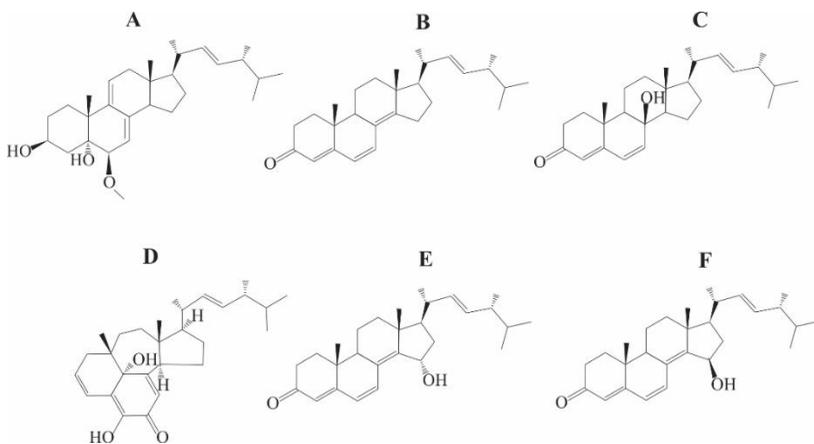
2.2.3. Terpenos e esteroides

Identificados em plantas e em fungos, os terpenos e esteroides compreendem um grupo de metabólitos secundário reconhecidos pelo seu potencial antiinflamatório, antimicrobiano e citotóxico contra várias linhas celulares de câncer humano (KO et al., 2008; THANG et al., 2013; ZHENG et al., 2018) e estão dentre os compostos comumente isolados e identificados em fungos do gênero *Ganoderma*. Artigos de revisão de constituintes químicos e atividades biológicas de *Ganoderma* descrevem o gênero como sendo uma “biofábrica” terapêutica (BABY et al., 2015).

As propriedades antitumorais dos esteroides e terpenos vem sendo muito estudada na literatura. Com relação as atividades antitumorais dos esteroides, Zheng et al. (2018) isolaram e identificaram três (3) esteroides do fungo *G. sinense*, nos quais foram testados quanto seu potencial inibidor da enzima isocitrato desidrogenase (IDH), uma das principais enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico. Mutações IDH têm sido associadas a muitos tipos de câncer, incluindo glioblastoma, sarcoma e leucemia mieloide aguda, sendo que distintos compostos com potencial inibidor da enzima tem sido testados, almejando novos agentes terapêuticos antineoplásicos (ZHENG et al., 2018). Dentre os três esteroides testados pelos autores (Figura 8) (22E, 24R) -ergosta-7,9 (11), 22-trieno-3 β , 5 α , 6 β -triol (A); ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen- 3-ona (B) e

cyathisterol (C), o composto C inibiu a enzima mutante IDH1, se ligando a um sítio alostérico e bloqueando a enzima em uma conformação cataliticamente inativa. De acordo com os autores, este composto, isolado possui boa potencialidade e seletividade para uso em terapias tumorais como um inibidor da IDH1 mutante (ZHENG et al., 2018). Ainda do fungo *G. sinense*, o esteroide isolado (22E, 24R) -6 β -metoxi ergosta-7,9 (11), 22-trieno-3 β , 5 α -diol, mostrou potencial inibição da enzima hexoquinase 2 (HK2), uma enzima que desempenha um papel fundamental na via glicolítica das células cancerígenas, uma vez que esta catalisa o primeiro passo da glicólise pela fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato (G-6-P) e promove a progressão tumoral em modelos de ratos (BAO et al., 2018). A busca por novos inibidores da enzima HK2 ocorre em virtude do seu nível de expressão em células cancerígenas ser maior do que em células normais (BAO et al., 2018).

Figura 8 – Esteroides isolados e identificados em fungos do gênero *Ganoderma* com propriedades terapêuticas



Fonte: Adaptado de Weng et al., (2010); Luo et al., (2017) e Zheng et al., (2018)

Outros testes envolvendo esteroides naturais tem sido realizados, dos quais é possível citar o uso do esteroide Ganotheaecolin A, (Figura 8D) um novo ergosterol com um sistema anelar de nafto [1,8-*ef*] azuleno isolado de *Ganoderma theaecolum*, na avaliação do potencial do fator neurotrófico (LUO et al., 2017), mostrando resultados promissores em concentrações de 10 μ M. O fator neurotrófico desempenha um importante papel na regulação da sobrevivência neural, na diferenciação, crescimento

e morte dos neuônios (HONG et al., 2011). Propriedades anti-envelhecimento testadas nos esteroides derivados do ergosterol Ganodermasides A e B (Figura 8E e Figura 8F respectivamente), mostraram características similares a substância já conhecida resveratrol, demonstrando o potencial destes esteroides na regulação da expressão de *UTH1*, (um gene do envelhecimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*), a fim de prolongar sua vida reprodutiva (WENG et al., 2010). Esteroides isolados de *G. lucidum* também mostraram boa atividade anti-inflamatória e anti-fúngica em estudos de Joseph et al., 2011.

Os triterpenos e os polissacarídeos são considerados os principais compostos bioativos de *Ganoderma*. Baby et al., (2015) listaram em um artigo de revisão, 379 compostos diferentes classificados como terpenos, meroterpenos e sesquiterpenos identificados em fungos do gênero *Ganoderma*. Além das propriedades antitumorais comumente citadas e já estabelecidas (THANG et al., 2013; HAKKIM et al., 2016), os terpenos de *Ganoderma* destacam-se pelo potencial anti-HIV-1, anti-hipertensivo, antiangiogênico, imunomodulador, antioxidante e antimicrobiano (XIA et al., 2014) assim como efeitos inibitórios da α -glicosidase (CHEN et al., 2018). Estudos de Russell e Paterson (2006) mostraram os efeitos inibitórios sobre a protease do HIV-1 e sobre a atividade da protease do HIV-2 ocasionados por triterpenos. Chen et al., (2018) verificaram em suas pesquisas que os terpenos Resinacein C, ácido ganodérico Y, lucialdeído C, ácido 7-oxo-ganodérico Z3, ácido 7-oxo-ganodérico Z e lucidiol isolados de *Ganoderma resinaceum* mostraram fortes efeitos inibitórios contra a α -glicosidase comparados com o controle positivo acarbose. Ainda em seus estudos, os autores verificaram por meio das relações estrutura-atividade dos triterpenos de *Ganoderma* na inibição da α -glicosidase, que a dupla ligação C-24 / C-25 é necessária para a inibição da enzima, e que o grupo ácido carboxílico em C-26 e o grupo hidróxi em C-15 desempenham papéis importantes no aumento dos efeitos inibitórios desses triterpenos (CHEN et al., 2018). Outros triterpenos como o ácido ganodérico A e o ganoderol B, também são conhecidos por inibir a aldose-redutase e a α -glicosidase (MA et al., 2015).

2.2.4. Outros compostos identificados em fungos do gênero *Ganoderma*

Alcalóides, vitaminas, minerais essenciais, aromas e ácidos graxos têm sido identificados a partir de várias espécies de *Ganoderma*. Os alcalóides colina e betaína foram isolados a partir de esporos de *G. lucidum* e ganoina, ganodina e ganoderpurina do micélio *G. capense*

(HUIE e DI, 2004; RUSSELL e PATERSON, 2006). Nobilonina, Berkedrimane B e Nigragilina foram isolados do corpo de frutificação de *G. applanatum* (ELKHATEEB et al., 2018). Os alcaloides são grupos de agentes bioativos usados no tratamento de tumores malignos e têm demonstrado efeitos citostáticos pronunciados em células tumorais (ZABOLOTNYI et al., 2016).

Compostos aromáticos produzidos por *G. applanatum* foram detectados em estudos comparativos de identificação em 20 linhagens de basidiomicetos (ABRAHAM e BERGER, 1994). Os autores identificaram 123 compostos aromáticos voláteis, principalmente álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e fenóis (ABRAHAM e BERGER, 1994). Os componentes aromáticos não voláteis de *G. tsugae* foram examinados em corpos frutíferos (MAU et al., 2001; TSENG et al., 2005), micélio e meio fermentado (TSENG et al., 2005). Variações nos componentes doce e amargo foram observadas nas diferentes formas de obtenção avaliadas (TSENG et al., 2005).

Os cogumelos contêm baixo teor de gordura em sua matéria seca, com constituintes de ácidos graxos de cadeia longa. Ácidos graxos de cadeia longa com mais de 23 átomos de carbono foram relatados em *G. applanatum* em níveis residuais (1 a 2%) (RUSSELL e PATERSON, 2006). O ácido oleico isolado do caldo de cultura de *G. lucidum* inibiu a liberação de histamina, que é uma atividade importante para o tratamento de inflamações, alergias e choque anafilático (TASAKA et al., 1988; RUSSELL e PATERSON, 2006). Além disso, pesquisas recentes demonstraram que alguns ácidos graxos isolados de esporos e caldo de cultura de *G. lucidum* inibiram a atividade da proliferação de células HL-60 (FUKUZAWA et al., 2008; GAO et al., 2012). Diferentes tipos de ácidos graxos também apresentaram propriedades larvicidas e repelentes (SIVAKUMAR et al., 2011).

Uma mistura de alcaloides, cumarinas, terpenos, poliquetóides, peptídeos e isoflavonóides foi identificada no extrato do fungo *G. applanatum*, no qual foi testado quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* em estudos de Elkhateeb et al., (2018). Estudos *in vitro* contra linhagem de células de câncer de cólon humano (Caco-2) mostraram resultados positivos na concentração de (IC₅₀) 160 ± 4,08µg·mL⁻¹, enquanto estudos *in vivo* do tumor sólido de Ehrlich revelaram uma diminuição no volume da massa tumoral desenvolvida após cinco dias de tratamento com *G. applanatum* na concentração de 200µg·mL⁻¹.

O potencial dos basidiomicetos na produção de compostos ativos é de considerável interesse no que diz respeito à sua utilização

biotecnológica, com estudos crescentes utilizando cogumelos. A conversão microbiana fornece uma abordagem alternativa à produção de compostos fenólicos, polissacarídeos, terpenos e esteroides para uso alimentício e terapêutico aceitos como “naturais”.

2.3. COMPOSTOS IDENTIFICADOS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO FUNGO *G. LIPSIENSE*

No que diz respeito aos fungos do gênero *Ganoderma*, a maioria dos estudos publicados na literatura relata o isolamento, a elucidação da estrutura e as propriedades biológicas de seus metabólitos. Estudos semelhantes ainda estão em desenvolvimento e novos compostos isolados são periodicamente adicionados à literatura (BABY et al., 2015). Uma busca recente com a palavra-chave "*Ganoderma*" na literatura mostrou poucas publicações para o fungo *G. lipsiense* (Batsch) F. Atk (MYCOBANK). De acordo com o Inventaire Natinal du Patrimone Naturel (INPN), *G. lipsiense* (Batsch) G.F. Atkinson (Figura 9) tem como classificação taxonômica: Domínio: *Biota*; Reino: *Fungi*; Filo: *Basidiomycota*; Classe: *Agaricomycetos*; Ordem: *Polyporales*; Família: *Ganodermataceae*; Gênero: *Ganoderma*; Espécie: *Ganoderma lipsiense* (Batsch) G.K. Atkinson.

Figura 9 – *Ganoderma lipsiense* em sua forma macroscópica

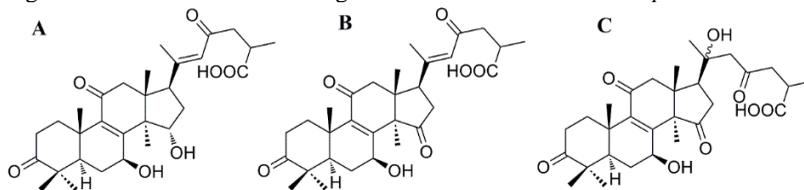


Fonte: Inventaire Natinal du Patrimone Naturel.

Autor: O. Roquinarc'h, com autorização de uso de imagem.

Poucos estudos de identificação para este fungo foram encontrados na literatura (até o momento). Todavia, os compostos identificados são conhecidos pelas suas importantes propriedades terapêuticas. Éster metílico do ácido ganoderico (RUSSELL e PATERSON, 2006), ácido ganoderênico A (**A**), ácido ganoderênico D (**B**) e ácido ganoderênico N (**C**) (em menores proporções) (Figura 10) foram isolados (RÖSECKE e KÖNIG, 2000) e identificados em extratos de *G. lipsiense*.

Figura 10 - Estrutura dos ácidos ganoderênicos isolados de *G. lipsiense*



Fonte: Adaptado de Rösecke and König (2000)

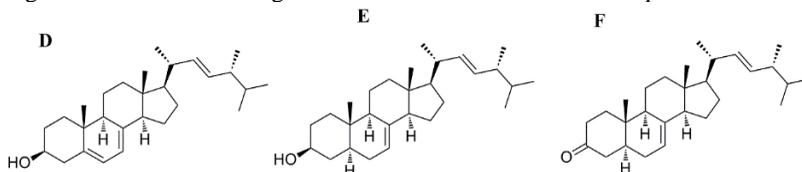
O ácido ganoderico A é um triterpeno usualmente identificado no gênero *Ganoderma* (SAKAMOTO et al., 2016; CAO et al., 2017), e tem demonstrado propriedades antioxidantes, citotóxicas, hepatoprotetoras e antitumorais (CAO et al., 2017). A literatura denota a ação do ácido ganoderico A contra várias células cancerosas, incluindo células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, em uma célula de câncer de próstata PC-3 (SAKAMOTO et al., 2016), linfoma e meningioma (CAO et al., 2017). Outras atividades biológicas, por exemplo, anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas são atribuídos aos ácidos ganodericos (CHUDZIK et al., 2015; MURATA et al., 2016).

Em estudos de Rösecke and König (2000), foram observadas a presença de triterpenos lanostano no extrato de diclorometano dos corpos frutíferos de *G. lipsiense*. Os triterpenos lanostano mostraram efeitos inibitórios na diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1 em estudos visando reduzir o nível de acúmulo de triglicérides intracelular (TG) (LEE et al., 2010).

A presença de esteróides do tipo ergostano também foi observada no extrato n-hexano de *G. lipsiense* (RÖSECKE e KÖNIG, 2000). Os autores identificaram ergosterol (**D**), ergosta-7,22-dien-3 β -ol (**E**) e ergosta-7,22-dien-3-ona (**F**) (Figura 11) no extrato de *G. lipsiense* (RÖSECKE e KÖNIG, 2000). O ergosterol é um precursor biológico da vitamina D2 (ergocalciferol) e o principal componente para manter a integridade das membranas celulares dos fungos (HASHIM et al., 2016).

Os componentes ergosterol e 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol também foram citados por Trigos e Medellin (2011) para *G. lipsiense*. Atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, cardiovasculares e reno-protetores são citadas como as propriedades farmacológicas do ergosterol (HASHIM et al., 2016).

Figura 11– Estrutura de ergosterol e derivados isolados de *G. lipsiense*



Fonte: Adaptado de Rösecke e König, (2000)

Alcalóides, glicosídeos, vitaminas saponinas, carotenóides, proteínas, carboidratos, ácidos graxos e compostos fenólicos foram observados em *G. lipsiense* em um estudo comparativo realizado por Singdevsachan et al., (2017). Altos valores de ácidos graxos, amido, β -caroteno, tiamina e flavonóides em corpos frutíferos de *G. lipsiense* foram observados quando comparados a *G. applanatum*, *G. chalconum* e *G. tsugae* (SINGDEVSACHAN et al., 2017). Os teores de compostos fenólicos, flavonóides e antioxidantes obtidos nos extratos etanólico, metanólico e aquoso também foram maiores para *G. lipsiense* quando comparados aos demais fungos *Ganoderma* estudados (SINGDEVSACHAN et al., 2017).

Três ésteres de ácido linoléico 3-5 foram identificados em *G. lipsiense* (RUSSELL e PATERSON, 2006). Ácidos graxos de cadeia longa têm demonstrado inibição na proliferação de células cancerígenas humanas, especialmente células HL-60 (FUKUZAWA et al., 2008; GAO et al., 2012). Além disso, os ácidos graxos de cadeia longa (C:19) exibem atividades antioxidantes e inibição da liberação de mieloperoxidase por neutrófilos (GAO et al., 2012). Os ácidos graxos são geralmente identificados e quantificados por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM). O efeito inibitório e mecanismo do extrato de *G. lipsiense* sobre o crescimento da linha celular de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) MDA-MB-231-HM em um modelo de camundongo foi avaliado por Qi et al. (2016). A taxa de inibição tumoral foi de 51,4% no camundongo tratado com extrato de *G. lipsiense* quando comparado ao controle negativo. Segundo os autores, isso demonstra uma possível inibição da proliferação maligna de células tumorais pela supressão da

angiogênese dos vasos sanguíneos em tecidos tumorais e pela regulação dos ciclos celulares, causada pelo extrato de *G. lipsiense*, inibindo o TNBC.

2.4. PROCESSOS FERMENTATIVOS E O USO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

A síntese microbiana de compostos em processos fermentativos está diretamente relacionada ao tipo de microorganismo, às condições de processo e ao tipo de substrato utilizado no processo. A identificação de compostos e propriedades bioativas do gênero *Ganoderma* já é conhecida. A maioria das pesquisas publicadas na literatura foi realizada com o corpo frutífero do cogumelo. No entanto, importantes compostos bioativos podem ser obtidos no micélio fúngico e no seu meio de cultura, reduzindo assim o tempo de processo.

Cultivo em estado sólido (FES) é um processo no qual microorganismos crescem em um ambiente com pouca ou nenhuma água livre (SOCCOL et al., 2017), mas com umidade suficiente apenas para a manutenção do crescimento de microorganismos e seu metabolismo (PANDEY, 2000; FARINAS, 2015). Além de fornecer suporte físico às células microbianas em FES, o substrato deve fornecer macro e micronutrientes necessários ao seu crescimento. A FES imita o *habitat* natural dos fungos filamentosos (SOCCOL et al., 2017), ideal para a formação diária de alguns biocompostos, bem como para os corpos frutíferos no cultivo de cogumelos. No entanto, esta técnica de fermentação também é favorável para a cultura micelial. Vários compostos de valor agregado podem ser produzidos em FES, incluindo enzimas, produtos do metabolismo secundário, antibióticos, biocombustíveis e vitaminas (KAPILAN, 2015; SOCCOL et al., 2017), com aplicações nos setores alimentício, farmacêutico, têxtil, bioquímico e de bioenergia (MIENDA et al., 2011; SOCCOL et al., 2017).

O substrato ideal para FES, direcionado aos bioprodutos de interesse comercial tem sido muito estudado. A escolha do substrato para o processo de FES depende de vários fatores, principalmente custos e disponibilidade (COSTA e TAVARES, 2017). Sua seleção deve estar relacionada ao tipo de biocomposto estimado, uma vez que seus constituintes podem servir como indutores do composto de interesse. Resíduos industriais e agroindustriais em meio sólido, como bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja, farelo de arroz, bagaço de mandioca, entre outros (PANDEY et al., 2000), têm sido utilizados para minimizar os custos envolvidos nos processos de fermentação.

O uso de arroz como substrato no processo de FES utilizando o cultivo de fungos tem demonstrado uma diversidade de biocompostos produzidos. O arroz é rico em nutrientes e é considerado uma excelente fonte de energia, proteínas, vitaminas, fibras e compostos bioativos (AHMED et al., 2017). Antioxidantes e compostos fenólicos (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015), inibidores enzimáticos (HASNAT et al., 2013; ABD EL-HADY et al., 2016) e produção de enzimas (KIM et al., 2010), além de algumas cumarinas foram identificadas em extratos de fungos cultivados em arroz. As cumarinas, 6-cloro-4-fenil-2H-cromen-2-ona e 6-cloro-2-oxo-4-fenil-2H-cromen-3-carboxilato foram identificadas em cultivos contendo arroz em sacos de polipropilenos com o cogumelo *Fomitopsis officinalis* (HWANG et al., 2013). Duas novas cumarinas, talacumarinas A e B (HE et al., 2014b) e 17 poliesters, dos quais seis são novos (HE et al., 2014a) foram isolados de *Talaromyces flavus* em FES contendo arroz. Do extrato bruto de *Pestalotiopsis* sp. cultivadas em arroz, 11 novos compostos foram isolados: 4 citosporonas, 5 novas cumarinas pestalasininas e um novo alcalóide pestalotiopsoide A, além dos compostos citosporona C, dothiorelona B e 3-hidroxi-metil-6,8-dimetoxicumarina (XU et al., 2009).

Entre os inibidores enzimáticos avaliados em culturas fúngicas contendo meio de arroz, o extrato de *G. lucidum* cultivado em arroz integral germinado mostrou inibição da enzima acetilcolinesterase (HASNAT et al., 2013). O extrato de *G. lucidum* cultivado em arroz apresentou inibição da fosforilação de MAPK e ativação de NF- κ B em estudos de colite em camundongos (HASNAT et al., 2015) em FES. *Aspergillus unguis* cultivado em meio sólido contendo arroz, inibiu 86% da ação da enzima α -glicosidase em relação à acarbose, utilizado como controle positivo (ABD EL-HADY et al., 2016).

Os inibidores enzimáticos podem ser produzidos por processos em FES (HASNAT et al., 2013; ABD EL-HADY et al., 2016) ou por cultivo submerso (FS) (RODRIGUES et al., 2005). Atualmente, a maioria dos processos biotecnológicos é realizada em FS, com alto teor de água livre. As técnicas de FS apresentam vantagens relacionadas à instrumentação e controle do processo (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), separação da biomassa após fermentação, mistura e aeração, tornando os processos mais favoráveis (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017). No entanto, muitos pesquisadores têm trabalhado muito para desenvolver modificações no projeto de novos biorreatores, a fim de minimizar os principais interferentes nos processos de aumento de escala em FES. Segundo Soccol et al. (2017), os pedidos de patente mais recentes para

engenharia de biorreatores focaram em sistemas de controle aprimorado, aparelhos de agitação e adaptações para processos contínuos (SOCCOL et al., 2017). Até o momento, os biorreatores usados em FES são classificados com base no sistema de mistura em que são usados: leito fixo (bandejas perfuradas) ou biorreatores agitados (tambor horizontal ou tambor agitado). Outras classificações também podem ser encontradas de acordo com o tipo de aeração (com ou sem aeração forçada) (SOCCOL et al., 2017). Culturas utilizando sacos plásticos especialmente no cultivo de cogumelos também são observadas (HWANG et al., 2013).

Apesar das vantagens citadas na literatura de processos em FES, uma avaliação econômica do processo global deve ser realizada a fim de determinar sua viabilidade para uma finalidade específica (COSTA e TAVARES, 2017).

2.5. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

O consumo dos fungos como alimento humano, especialmente os basidiomicetos, é uma prática milenar muito usual em países orientais (ISLAM et al., 2016), sejam estes em sua forma macroscópica (*in natura*), na forma de chás bem como na forma de cápsulas e comprimidos (WACHTEL-GALOR et al., 2011). Distintos artigos da literatura têm demonstrado a diversidade de moléculas bioativas produzidas pelos basidiomicetos, como terpenos, esteroides, compostos fenólicos, nucleotídeos e seus derivados, glicoproteínas e polissacarídeos, tanto na forma macroscópica como na forma de micélio.

Dentre a gama de compostos fenólicos produzidos pelos fungos, podem ser citadas as cumarinas (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; ISLAM et al. 2015; ELKHATEEB et al., 2018), o ácido cafeico, vanilina, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido clorogênico e ácido *p*-hidroxibenzóico (HWANG et al., 2013; HE et al., 2014b; SCHMIDT et al., 2014). As cumarinas são derivados do ácido cinâmico e exibem atividades biológicas distintas, por exemplo: antitumoral, antimicrobiana, antifúngica e anticoagulante, além do uso em perfumaria. Com base em um levantamento bibliográfico, poucos são os fungos basidiomicetos que produzem cumarinas. *F. officinalis*, *P. euosmus*, *G. lucidum*, *G. coclear* e *P. chryso sporium* podem ser citados (COSTA et al., 2016).

Terpenos e esteroides são normalmente identificados em fungos do gênero *Ganoderma* (BABY et al., 2015), um fungo utilizado durante muitos anos na cultura oriental como um agente potencial na prevenção e tratamento de doenças. Mais de 370 terpenos e derivados terpênicos e 33 esteroides foram listados por Baby et al., (2015) sendo produzidos pelos

fungos *Ganoderma*, dentre os 431 compostos derivados de fungos do gênero *Ganoderma*. Estes compostos mostram importantes propriedades terapêuticas, especialmente no que se refere as atividades antitumorais, imunoreguladoras.

Distintos trabalhos foram realizados em fungos do gênero *Ganoderma*, a fim de identificar os compostos responsáveis por suas propriedades terapêuticas. A maioria dos estudos foi direcionada a *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. lingzhi*, *G. sinense* e *G. capense*. No entanto, outros fungos do gênero apresentam potencial de produção de importantes compostos bioativos.

Referente aos compostos identificados em *G. lipsiense*, poucos são os trabalhos publicados na literatura. Até o momento, os terpenos: ácido ganoderênico A, ácido ganoderênico D e ácido ganoderênico N; esteróides: ergosterol, ergosta-7,22-dien-3 β -ol e ergosta-7,22-dien-3-ona e alguns ácidos graxos foram identificados para esta espécie (RÖSECKE e KÖNIG, 2000). Outros constituintes, como compostos fenólicos, alcalóides, vitaminas e carboidratos foram observados em sua constituição. A maioria dos trabalhos de identificação de compostos publicados com *G. lipsiense* remetem o uso do basidiocarpo do fungo. A formação de basidiocarpos leva tempo para ser obtida e as culturas miceliais são uma opção para se obter compostos bioativos em um intervalo menor de tempo.

Os maiores desafios deste trabalho foram a seleção de um fungo basidiomiceto e um substrato apropriado para o seu cultivo, visando a produção dos biocompostos de interesse. A literatura descreve o arroz como substrato interessante para a produção de biocompostos. Nessa perspectiva, a principal contribuição deste trabalho foi identificar compostos bioativos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* em sua forma micelial, cultivados em arroz vermelho e em meio sintético e analisar as atividades biológicas pelos extratos obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais relacionados ao cultivo microbiano, extração dos compostos, análises de pH, fenólicos totais, cumarinas e inibição enzimática deste estudo foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Biomassas (LEBIO) da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Etapas de purificação, análises de atividade antibacteriana foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da FURB. A análise de identificação de compostos fenólicos em HPLC-ESI-MS/MS do estudo cinético foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e as análises de cromatografia gasosa (CG-EM) foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Análises de quantificação por HPLC foram realizadas no Laboratório de Processos Analíticos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da FURB. A análise de Ressonância Magnética Nuclear e a análise por Infravermelho foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental do Departamento de Química da FURB. As análises antiparasitárias foram realizadas no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Para garantir condições estéreis de crescimento dos fungos *Ganoderma*, os meios de cultura, vidrarias e utensílios de laboratório foram esterilizados previamente em autoclave a 121 °C (Autoclave vertical PRISMATEC) durante 15 minutos e 30 minutos para os meios de cultivo envolvendo o uso de arroz, sendo os procedimentos de inoculação e repique dos fungos realizados em cabinas de segurança biológica (VECO, FUV 12).

Basicamente, os estudos aqui realizados foram focados na produção de biocompostos pelo fungo *G. lipsiense* em meio sólido e líquido, sendo caracterizados e identificados, quando possível, com relação à produção de compostos fenólicos, terpenos e esteroides e ácidos graxos, assim como avaliar sua potencialidade com relação à atividade antimicrobiana, antiparasitária e inibidora da enzima α -glicosidase. A produção dos biocompostos e análises foram desenvolvidas mediante quatro (4) conjuntos de atividades:

Etapa 1: Selecionar um fungo basidiomiceto com potencial de produção de biocompostos, com ênfase em cumarinas, por meio de testes qualitativos e quantitativos específicos. Avaliar, identificar e quantificar

pela cinética de produção em FES, os compostos fenólicos produzidos e aferir sua ação antibacteriana;

Etapa 2: Realizar um cultivo em FES do fungo *G. lipsiense* em maior quantidade visando purificar, caracterizar e identificar os biocompostos apolares sintetizados pelo fungo, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas, análise de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Avaliar a atividade antibacteriana das frações purificadas e a atividade antiparasitária do esteroide identificado e dos extratos bruto e frações purificadas;

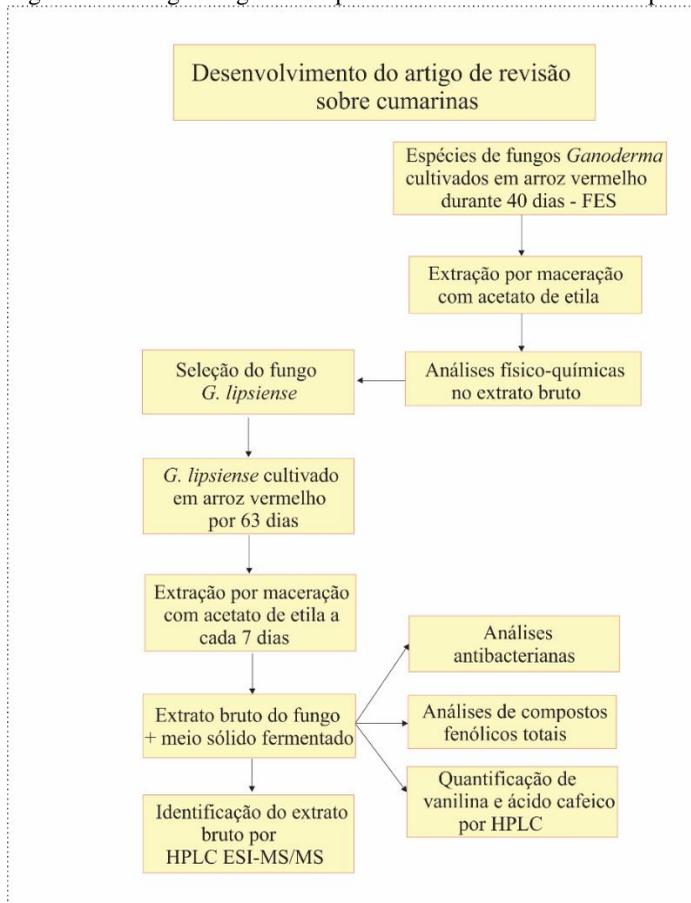
Etapa 3: Realizar um cultivo em FS do fungo *G. lipsiense* em maior quantidade em meio sintético, visando purificar, caracterizar e identificar os biocompostos apolares sintetizados pelo fungo, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas e comparar aos biocompostos produzidos pelo fungo na **Etapa 2**. Avaliar a atividade antiparasitária do extrato bruto e das frações purificadas;

Etapa 4: Cultivar o fungo *G. lipsiense* em FS utilizando meio a base de arroz vermelho avaliando seu efeito inibitório em relação à enzima α -glicosidase comparativamente aos extratos brutos obtidos nas **Etapas 2 e 3**. Avaliar a cinética de inibição enzimática ocasionada pelo extrato bruto. Caracterizar e identificar por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas os compostos presentes nas frações apolares do extrato micelial.

3.1. ETAPA 1: SELEÇÃO DO FUNGO *GANODERMA* PRODUTOR DE BIOCOMPOSTOS POR MÉTODOS QUALI E QUANTITATIVOS; CINÉTICA DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRODUZIDOS POR *G. LIPSIENSE*

A Figura 12 mostra um diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 1 desta pesquisa de tese.

Figura 12 – Diagrama geral dos procedimentos referentes à Etapa 1.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.1. Fungos e meio de cultivo

Os fungos *G. lucidum* (CCIBt 2994), *G. applanatum* (CCIBt 2978) e *G. lipsiense* (CCBt 2689) adquiridos do Instituto de Botânica (SP, Brasil), foram cultivados em placas contendo extrato de malte esterilizado (1%) Kasvi®, peptona bacteriológica (0,1%) Kasvi® e batata-dextrose ágar (BDA - 3,9%) Himedia® por 28 dias de incubação a 28 °C e posteriormente armazenados a 4 °C com repiques periódicos a cada 3 meses.

3.1.2. Caracterização do substrato sólido

A caracterização do arroz vermelho (Rio Grande do Sul) utilizado como substrato neste estudo, foi realizada de acordo com os métodos de análise de alimentos estabelecidos pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) para carboidratos (ALI 040/IV), cinzas totais (ALI 018/IV), fibras totais (ALI 044/IV), gorduras totais (ALI 032/IV) umidade (ALI 012/IV). Proteínas foram determinadas pela metodologia descrita por THIEX et al., (2002). O arroz vermelho foi caracterizado quanto ao seu teor de carboidratos, cinzas totais, fibras totais, gordura total, proteínas e umidade.

3.1.3. Preparo do meio de cultivo sólido

Os ensaios para fermentação em estado sólido foram realizados em biorreatores tipo frascos cilíndricos de 500 mL contendo 25 g de arroz vermelho e 75 mL de água destilada, e esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Após resfriamento, 15 mL de uma suspensão micelial de cada fungo, previamente preparado por um processo conhecido como fragmentação líquida, foram inseridos nos frascos contendo o meio de cultura esterilizado e incubados por 40 dias a 28 °C. A suspensão micelial foi preparada transferindo as culturas fúngicas das placas preparadas no item 3.1.1 asépticamente para um agitador contendo 130 mL de água esterilizada, fragmentando assim o micélio, de modo a resultar em uma colonização acelerada do meio.

3.1.4. Cinética da produção de biocompostos

O preparo do meio de cultivo utilizado no estudo cinético da produção de biocompostos pelo fungo *G. lipsiense* seguiu os procedimentos do item 3.1.3, e incubados por 63 dias a 28 °C com extrações semanais, nos intervalos de tempo de 7 dias.

3.1.5. Extração dos biocompostos do meio de cultivo sólido

A extração dos biocompostos do meio fermentado foi realizada com solvente acetato de etila. O meio fermentado (arroz cultivado juntamente com os fungos) foi macerado com acetato de etila (1:4) e deixado em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. Na sequência, o extrato foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e evaporado em um evaporador rotativo a vácuo na temperatura de 45 °C. O mesmo procedimento de extração foi utilizado para o meio controle, contendo apenas arroz vermelho, na ausência de inoculação.

3.1.6. Rendimento extrativo (%)

Os extratos fúngicos, após maceração, foram evaporados até remoção completa do solvente e pesados para se obter o rendimento. Os resultados para o rendimento extrativo são apresentados como uma porcentagem do extrato bruto de fungo cultivado em arroz vermelho em determinado intervalo de tempo.

3.1.7. Análise de pH

A determinação do pH foi realizada através do método potenciométrico utilizando eletrodo de vidro, após agitação de 1 g de amostra fermentada com 10 mL de água destilada em um misturador de vórtice na velocidade máxima. As leituras do sobrenadante foram realizadas em triplicata com um pHmetro (Tecnal, Brasil).

3.1.8. Métodos de análises de detecção dos biocompostos

Dois métodos quali e quantitativos foram utilizados para a seleção de um fungo com potencial de produção de biocompostos, em especial cumarinas: cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de sílica gel e espectrofotometria de UV-Visível (UV-Vis).

3.1.8.1. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada

A presença dos biocompostos cumarinas, gorduras, alcaloides e terpenos e esteroides foi avaliada no extrato bruto por CCD, utilizando uma pequena fração de cada amostra aplicada em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (HPTLC - MERCK®). Como fase móvel

foi testado hexano:acetato de etila (80:20). As fases móveis e os reagentes de pulverização de visualização foram utilizadas como indicado em Wagner e Bladt (1996). Como revelador de cumarinas, antraquinonas, xantonas e pesticidas foi utilizado reagente hidróxido de potássio (KOH), elaborado a partir da dissolução de 2 g de hidróxido de potássio em 5 mL de água destilada e completado até 50 mL com etanol (JORK et al., 1990).

3.1.8.2. Detecção da presença e quantificação de cumarinas nos extratos por espectrofotometria UV

A análise qualitativa e quantitativa da presença de cumarina nos extratos foi realizada utilizando o método espectrofotométrico por espectrofotometria UV-Vis (SHIMADZU UV-1650 PC). A análise qualitativa foi realizada aplicando-se o método de varredura nos extratos diluídos em acetato de etila ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). UV-Vis foram obtidos usando λ variando de 250 a 400 nm. Para uma análise quantitativa, utilizou-se uma versão modificada de Soares e Silva (2012). Uma curva de calibração usando um padrão de 1,2 benzo-pirona (cumarina simples; Sigma-Aldrich) foi realizada a partir de nove diluições da solução padrão de cumarina ($38\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) variando de 1,87 a $29,88\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As soluções foram analisadas em triplicata a 315 nm, obtendo-se a Equação (5) com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9906$). Em todas as análises, a concentração dos extratos foi de $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

$$Y = 0,0176X + 0,1052 \quad (5)$$

3.1.9. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais do extrato de *G. lipsiense* foi estimado pelo ensaio colorimétrico e modificado (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006), utilizando o ácido gálico como padrão, sendo 0,5 mL de extrato ($2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) misturados com 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), deixando reagir no escuro por 3 min antes da adição de 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio. A mistura reacional foi agitada em vórtice e incubada no escuro a temperatura ambiente durante 1 h. A absorbância da amostra foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-Vis-1650 PC). O teor total de fenólicos foi determinado como μg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato, a partir da diluição do padrão de ácido gálico, variando de 7,8 -

250 mg·mL⁻¹. As soluções foram analisadas em triplicata, obtendo-se a Equação 6, com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9982$).

$$Y = 142,52 X - 26,031 \quad (6)$$

3.1.10. Identificação de compostos fenólicos por métodos qualitativos

Análises de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos bruto foram realizadas em um cromatógrafo Agilent® 1200, com TurbolonSpray® como uma fonte de ionização, acoplado a um espectrofotômetro de massas Qtrap® 3200, com uma coluna Phenomenex® Synergi 4 µ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm ID, tamanho da partícula de 4 µm) a temperatura de 30 °C. As condições cromatográficas utilizadas foram modificadas da versão descrita por Tenfen et al. (2017). Os eluentes foram formados pela mistura A (MeOH/H₂O na proporção 95:5, v·v⁻¹) e B (H₂O ultrapura/ácido fórmico (0.1%)) como segue: estágio 1 - 10% solvente A e 90% B (modo isocrático) por 5 min; estágio 2 - gradiente linear dos solvents A e B (de 10 até 90% de A) por 2 min; estágio 3 - 90% solvente A e 10% B (modo isocrático) por 3 min; estágio 4 - gradiente linear dos solventes A e B (de 90 até 10% de A) por 7 min com uma vazão de 250 µL·min⁻¹ da fase móvel. Em todas as análises, foi injetado um volume de 5 µL na concentração de 1 mg·mL⁻¹.

Este método foi baseado nas fórmulas moleculares, no padrão de fragmentação e tempos de retenção dos compostos nas amostras, que foram comparados aos padrões comercialmente disponíveis. Para a identificação dos compostos, foram analisados 45 padrões de compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzóico, 4-metilumbeliferona, apigenina, aromadendrina, ácido cafeico, carnosol, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, ácido elágico, epicatequina, eriodictyol, ácido ferúlico, fustin, galanga, gálico ácido, hispudulina, isoquercetina, kaempferol, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, miricetina, naringenina, naringina, ácido *p*-anísico, ácido *p*-cumárico, pinocembrina, ácido protocatecuico, quercetina, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido salicílico, escopoletina, sinaldeído ácido sinápico, siringaldeído, ácido siríngico, taxifolina, umbeliferona, ácido vanílico e vanilina) dissolvidos em metanol (1 mg·L⁻¹) aplicando as mesmas condições descritas anteriormente.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massa com uma fonte de ionização por eletropulverização usando o modo de ionização negativa com os seguintes parâmetros de fonte: interface de pulverização iônica a 400 °C; voltagem da pulverização iônica de 4500 V; cortina de gás, 10 psi; gás nebulizador, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; e gás de colisão, médio. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi usado para registrar e processar os dados. Pares de íons foram monitorados no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM).

3.1.11. Teor de ácido cafeico e vanilina

As análises quantitativas de ácido cafeico e vanilina foram realizadas utilizando um cromatógrafo Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000, equipado com um detector de arranjos de iodo (DAD). A coleta dos dados e análises foram realizadas utilizando o software Chromeleon™ (version 7.2). A separação dos compostos foi realizada em uma coluna C₁₈ (120 Å, 4,6 x 250 mm) Acclaim™ 120 (Dionex Bonded Silica Products). A temperatura do forno foi mantida a 30°C. As condições cromatográficas usadas foram adaptadas dos métodos descritos por Wen et al., (2005) para o ácido cafeico e Huesgen (2011) para vanilina. As amostras utilizadas foram previamente dissolvidas em acetonitrila para obter a concentração desejada.

Para o ácido cafeico, a detecção foi realizada a 320 nm. O volume de injeção foi de 10 µL de amostra na concentração de 50 mg·mL⁻¹ e a vazão da fase móvel se manteve em 0,5 mL·min⁻¹. A fase móvel A foi água + 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) e a fase B foi acetonitrila + 0,09% TFA. As condições do gradiente foram as seguintes: 0-5 min 25% B; 5-10 min 25-30% B; 10-16 min 30-45% B; 16-18 min 45% B; 18-25 min 45-80% B; 25-30 min 80% B; e em 30-40 min 80-25% B. Para a vanilina, a detecção foi realizada a 230 nm. O volume de injeção foi de 3 µL de amostra na concentração de 10 mg·mL⁻¹ e a taxa de fluxo da fase móvel se manteve em 1 mL·min⁻¹. A fase móvel A foi água + 0,1% (TFA), e a fase B foi acetonitrila + 0,09% TFA. As condições do gradiente foram as seguintes: 0 min 5% B; 0-12 min 65% B; 12-14 min 90% B; 14-16 min 90% B; at 16,01 min 5% B; e em 21 min 5% B.

A determinação do teor de ácido cafeico e vanilina no extrato de *G. lipsiense* foi realizada elaborando as curvas de calibração do padrão, utilizando ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) e vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) (Sigma-Aldrich) em acetonitrila. As curvas de concentração versus resposta para a calibração foram plotadas usando cinco soluções com diferentes concentrações de ácido cafeico

(4,687-75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e vanilina (3,125-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Cada determinação foi realizada em duplicata.

3.1.12. Avaliação da atividade antibacteriana

3.1.12.1. Microorganismos e meios de cultivo

Os ensaios antibacterianos foram realizados com as bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As cepas foram inoculadas no meio de infusão de cérebro coração (BHI) a 37 °C por 24 h, e posteriormente semeados em ágar sangue a 37 °C por 24 h a fim de reativar as linhagens bacterianas.

3.1.12.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios antibacterianos foram realizados nos extratos brutos referente aos dias 21, 42, 63 e no meio controle (apenas arroz vermelho) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com o método recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012). Para isso, fez-se o uso da técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços.

A amostra foi diluída até 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em PBS e inserida no primeiro micropoço da placa, sendo em seguida transferida para o poço adjacente contendo caldo Muller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações de amostra variando entre 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O inóculo bacteriano, foi preparado na escala 0,5 de McFarland ($5\cdot 10^5$ UFC / mL) e adicionado (5 μL) a cada micropoço. Alguns poços de cada microplaca foram reservados para realização dos controles negativos aos quais continham caldo MH + H₂O/DMSO 10% mais a bactéria em estudo. Para o controle de esterilidade do meio de cultura, foi utilizado caldo MH. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico gentamicina, em concentrações variando de 0,31 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todo o procedimento foi realizado em triplicata e em condições assépticas em capela de fluxo laminar.

As microplacas foram incubadas a 37 °C \pm 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 μL de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), em cada micropoço. Após duas horas, se observada a formação de “botão” bacteriano avermelhado no fundo de cada

micropoço, indica a viabilidade da bactéria e inatividade do extrato. A CIM foi determinada como a última concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

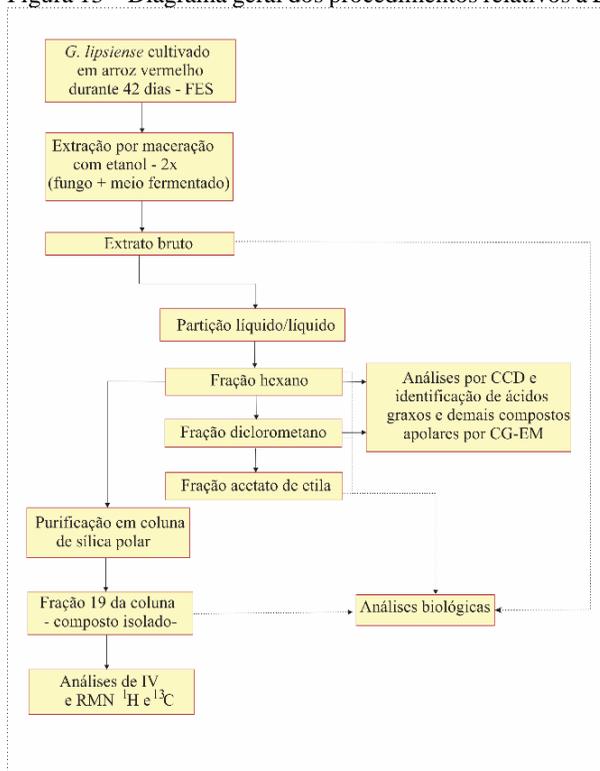
3.1.13. Análises estatísticas

Os resultados obtidos são representados como sua média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (95% de confiança) para comparação entre as amostras.

3.2. ETAPA 2: CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *G. LIPSIENSE* NO SISTEMA FES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS E DO ESTEROIDE IDENTIFICADO

Nesta etapa, o fungo *G. lipsiense* foi cultivado em grande quantidade no sistema de cultivo sólido (em arroz vermelho), visando a purificação do extrato bruto de modo a caracterizar e identificar os biocompostos presentes na fração apolar da amostra. Atividades antimicrobianas e antiparasitárias foram realizadas no extrato bruto e nos extratos purificados, assim como no esteroide identificado. A Figura 13 mostra um diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 2 desta pesquisa de tese.

Figura 13 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 2 desta pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1. Fungo e meio de cultivo sólido

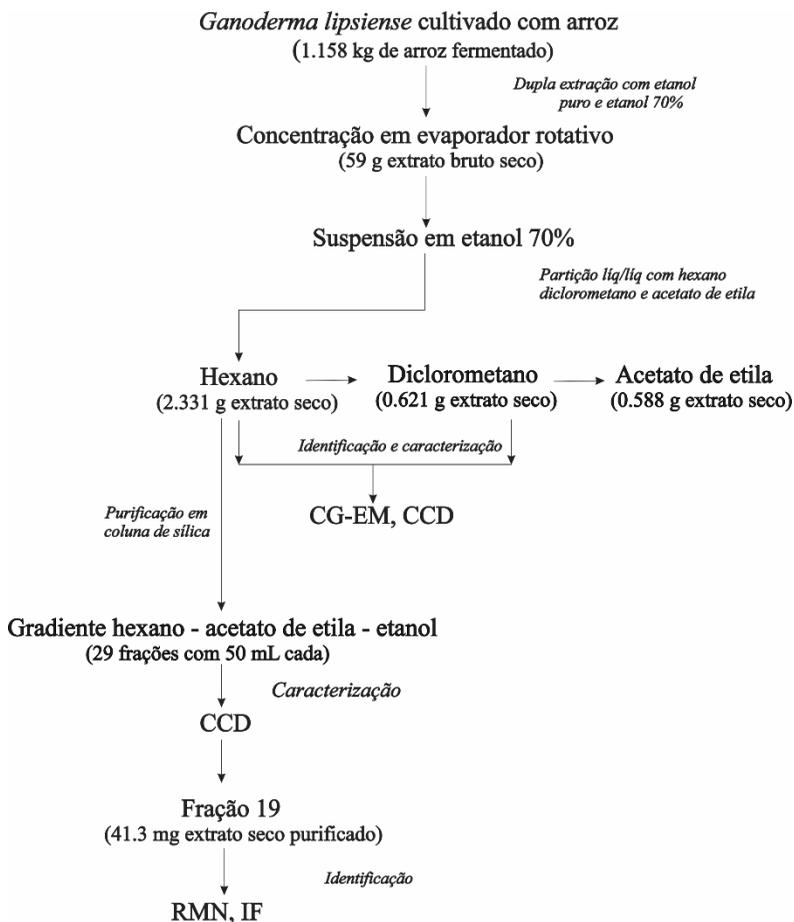
O fungo *G. lipsiense* CCIBt 2689 foi cultivado e armazenado conforme método descrito no item 3.1.1. Os ensaios para FES foram realizados em biorreatores tipo frascos cilíndricos de 500 mL contendo 30 g de arroz vermelho e 90 mL de água destilada, e esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. A inoculação do micélio fúngico se procedeu nas mesmas condições descritas no item 3.1.3. Foram inoculados no total 21 frascos, por 42 dias a 28 °C.

3.2.2. Obtenção e purificação do extrato bruto

A obtenção do extrato bruto proveniente da FES, seguiu os seguintes procedimentos: o arroz colonizado juntamente com o micélio fúngico de *G. lipsiense* (630 g de arroz seco geraram 1,158 kg de arroz após colonizado), foi homogeneizado e esmagado em graal e pistilo para extração dos biocompostos provenientes da fermentação. A extração foi realizada por maceração simples com etanol (1:2 m/v) durante 48 horas a temperatura ambiente. A mistura foi filtrada com um filtro a vácuo e o meio fermentado juntamente com o fungo foi submetido a uma segunda extração por maceração simples com etanol 70% (1:1 m/v) por 24 horas. A amostra foi submetida a uma nova filtração e o solvente foi evaporado a 45 °C utilizando um evaporador rotativo. Os procedimentos de extração, purificação e identificação estão detalhados na Figura 14. O extrato bruto seco total do cultivo de *G. lipsiense* em arroz (rendimento = 5,09%), foi novamente dissolvido em 0,5 L de etanol 70% e partionado (1:1 v/v) com hexano, gerando 2,331 g de extrato de hexano seco (rendimento = 3,95%), diclorometano, gerando 0,621 g de extrato de diclorometano seco (rendimento = 1,05%) e acetato de etila, gerando 0,588 g de extrato acetato de etila seco (rendimento = 0,99%). Os extratos provenientes das frações foram secos em estufa de circulação de ar à 45°C por 3 horas. O extrato proveniente da fração hexano foi purificado em coluna de sílica (2 x 16 cm) com um gradiente de eluição hexano – acetato de etila - etanol, proporcionando 29 frações de 50 mL cada.

Os mesmos procedimentos experimentais para extração e partição líquido/líquido do extrato bruto com hexano, diclorometano e acetato de etila foram realizados com o arroz vermelho (controle), de modo a diferenciar os ácidos graxos presentes no arroz dos ácidos graxos produzidos pelo fungo durante o cultivo.

Figura 14 – Diagrama geral do processo de extração, purificação e identificação dos compostos do extrato de *G. lipsiense* em FES cultivado em arroz vermelho



CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; CCD = cromatografia de camada delgada; RMN = ressonância magnética nuclear; IF = infravermelho. Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3. Caracterização e identificação dos biocompostos

3.2.3.1. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada

A avaliação da presença de cumarinas, alcalóides, terpenos e esteroides e aldeídos foram realizadas nas frações de hexano e diclorometano provenientes da partição do extrato bruto e nas frações obtidas na purificação em coluna de sílica, utilizando uma pequena fração da amostra em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (HPTLC - MERCK®). As fases móveis e os reagentes de pulverização de visualização foram utilizadas como indicado em Wagner e Bladt (1996) e comparados com os compostos de referência. O revelador KOH foi utilizado como revelador de cumarinas, conforme descrito no item 3.1.8.1. O resorcinol sulfúrico, composto por orcinol 0,4 g /100 mL e ácido sulfúrico 1:19 em etanol, foi utilizado como revelador específico para açúcares (MENDES et al., 2006), visualizado após aquecimento das placas a 110 °C por 5 segundos. O anisaldeído sulfúrico foi utilizado como revelador específico para antioxidantes, esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, componentes de óleos essenciais ou terpenos, antibióticos (macrolídeos, heptaene e tetraciclina) e micotoxinas (tricotecenos), composto por 1 mL de 4-metoxibenzaldeído (anisaldeído) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado em 100 mL de ácido acético glacial, visualizado também após aquecimento das placas a 110 °C por 5 segundos (JORK et al., 1990). Cloreto férrico- solução a 2% em etanol, foi utilizado como revelador específico de fenóis (GROCHANKE et al., 2016).

3.2.3.2. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos compostos por CG-EM foi realizada nas frações totais de hexano e diclorometano provenientes da partição obtida do extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz e do arroz vermelho (controle). A análise foi realizada em CG-EM- Agilent™ 7890A GC System, HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox 30 m x 250 µm x 0.25 µm) que foi aquecido até 40 °C por 2 minutos, então 3 °C·min⁻¹ para 145 °C por 0 min e então 10 °C para 250 °C por 10 minutos. A vazão de gás hélio foi 1 mL·min⁻¹ e a temperatura do injetor de 250 °C. O volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção (*Split ratio*) de 10:1. O perfil de ácidos graxos foi analisado nas frações em comparação com o controle (apenas

arroz vermelho nas condições utilizadas para inoculação e extraído nas mesmas condições da amostra fermentada).

Os componentes obtidos do extrato foram caracterizados e identificados pelas análises dos espectros de massas em comparação com os espectros sugeridos pela biblioteca NIST 2008 (National Institute of Standards and Technology, US).

3.2.3.3. Identificação do composto purificado da fração 19

Análises de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram realizadas na fração 19 obtida da coluna de fracionamento. A fração 19 foi obtida no gradiente de eluição na proporção hexano:acetato de etila (65:35) e foi selecionada para identificação em virtude das características de cristalização em forma de agulhas apresentadas pela amostra após evaporação do solvente. Esta fração também apresentou características de “isolada” em análises de cromatografia de camada delgada, com visualização de apenas uma banda quando revelado com anisalaldeído sulfúrico.

As análises de IV foram realizadas no espectrofotômetro Bruker™ (Vertex 70) e medidas em ATR Platinum™ com faixa de espectro de 4000 cm^{-1} - 500 cm^{-1} .

A amostra 19 submetida à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C foi dissolvida em clorofórmio delterado (CDCl_3) e foi transferida para tubos de RMN de 3 mm. A análise de RMN foi conduzida no equipamento Bruker Ultrashield™ (300-MHz) e todas as análises foram realizadas utilizando sequências de pulso padrão do equipamento Bruker e a temperatura foi mantida a $24\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4. Atividades biológicas

3.2.4.1. Atividade antibacteriana

Os ensaios antibacterianos foram realizados com as bactérias Gram-negativa *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e bactéria Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923). A avaliação antibacteriana foi realizada nas amostras da partição líquido/líquido, obtidas pela extração com hexano, diclorometano e acetato de etila e na fração 19 da coluna de purificação. Os procedimentos metodológicos e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), seguiram conforme descrito nos itens 3.1.12.1 e 3.1.12.2 respectivamente.

3.2.4.2. Teste de viabilidade celular sobre a *Giardia duodenalis*

O teste de viabilidade celular foi realizado contra trofozoítos do parasita *G. duodenalis* (ATCC 30888; Portland-1) doada gentilmente pelo professor Dr. Mário Stendel do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] conforme Mosmann (1983) e modificado por Neiva et al. (2014). Este teste detecta o metabolismo de células vivas e se baseia na capacidade de células viáveis de *G. duodenalis* em metabolizar o sal MTT através da enzima mitocondrial desidrogenase succínica em cristais de cor azul púrpura, de nome formazan, que se concentram no citoplasma celular.

Os ensaios foram realizados em tubos eppendorf 1,5 mL em seis replicatas, nos quais alíquotas dos extratos bruto, da fração hexano e da fração 19 da coluna de purificação, foram diluídos no meio TYI-S-33 (KEISTER, 1983) nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Um inóculo contendo 5×10^5 de trofozoítos/mL do parasita foi adicionado em cada tubo. Após 72 h de incubação a 37°C, as avaliações foram feitas pelo método do MTT, conforme descrito: os trofozoítos foram lavados com tampão fosfato por duas vezes e posteriormente adicionados 100 μL de MTT na concentração de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão fosfato e incubados por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as partículas insolúveis de coloração roxa foram solubilizadas com 100 μL /tubo de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% de N,N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placa ELISA (Anthos 2020, Áustria). Os resultados foram calculados pela média da absorbância de 6 poços e expressos na porcentagem de viabilidade celular de acordo com a Equação 7.

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \left[\frac{(\text{abCA} - \text{abB})}{(\text{abCC} - \text{abB})} \right] * 100 \quad (7)$$

Onde:

abCA = Absorbância das células das amostras

abB = Absorbância do branco

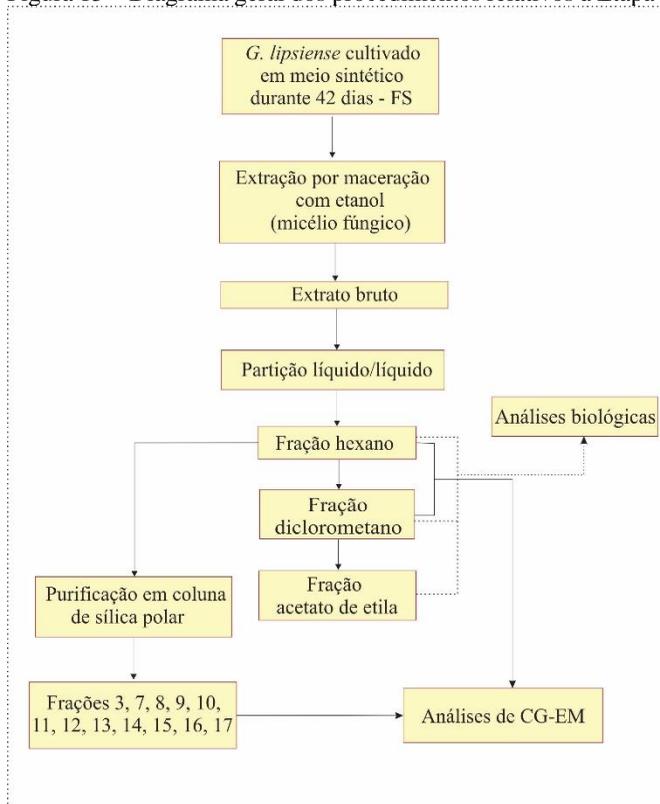
abCC = Absorbância de células controle

Cada teste inclui um controle positivo (metronidazol 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e um controle negativo (meio TYI-S-33).

3.3. ETAPA 3: IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS PELO FUNGO *G. LIPSIENSE* EM MEIO SINTÉTICO

Na Etapa 3 o fungo *G. lipsiense* foi cultivado em grande quantidade no sistema de cultivo submerso em meio sintético, visando a purificação do extrato bruto micelial de modo a caracterizar e identificar os biocompostos presentes na fração apolar da amostra. A Figura 15 mostra um diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 3 desta pesquisa de tese.

Figura 15 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 3 desta pesquisa



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1. Fungo e meio de cultivo líquido

O fungo *G. lipsiense* CCIBt 2689 foi cultivado e armazenado conforme método descrito no item 3.1.1. O meio de cultivo sintético utilizado neste estudo foi adaptado de Rubel et al. (2014) e consiste em: glicose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,833 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A inoculação do micélio fúngico se procedeu nas mesmas condições descritas no item 3.1.3. Os frascos inoculados foram cultivados estaticamente por 42 dias em $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Nesta etapa, o fungo *G. lipsiense* foi cultivado em maior quantidade para ensaios de purificação, caracterização e identificação de compostos. No total, foram cultivados 60 frascos nas condições e meio de cultivo descritos acima, a fim de se obter um volume substancial de micélio.

3.3.2. Extração dos biocompostos do micélio fúngico

Para a extração dos biocompostos do micélio fúngico, estes foram primeiramente filtrados por filtração à vácuo em funil de Büchner de modo a separar o micélio do meio de cultivo, sendo o micélio fúngico congelado e posteriormente liofilizado ($50,19 \text{ g}$ de micélio após liofilizado). Após liofilização, o micélio seco foi triturado e extraído por maceração simples com etanol (1:2 m/v) durante 48 horas a temperatura ambiente. A mistura foi filtrada com um filtro a vácuo e o micélio triturado foi submetido a uma segunda extração por maceração simples com etanol 70% (1:1 m/v) por 24 horas. A amostra foi submetida a uma nova filtração e o solvente foi evaporado a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando um evaporador rotativo. O extrato bruto seco total do micélio de *G. lipsiense* em meio sintético ($4,370 \text{ g}$; rendimento = $8,70\%$), foi novamente dissolvido ($3,783 \text{ g}$) em $0,5 \text{ L}$ de etanol 70% e particionado (1:1 v/v) com hexano, gerando $0,621 \text{ g}$ de extrato de hexano seco (rendimento = $16,41\%$), diclorometano, gerando $0,92 \text{ g}$ de extrato de diclorometano seco (rendimento = $24,32\%$) e acetato de etila, gerando $0,035 \text{ g}$ de extrato acetato de etila seco (rendimento = $0,92\%$). Os extratos provenientes das frações foram secos em estufa de circulação de ar à 45°C por 3 horas. O extrato proveniente da fração hexano foi purificada em coluna de sílica ($2 \times 17 \text{ cm}$) com um gradiente de eluição hexano - acetato de etila - etanol, proporcionando 29 frações de 50 mL cada. O método de extração utilizado seguiu os procedimentos mostrados na Figura 14 da Etapa 2 desta pesquisa.

3.3.3. Caracterização química qualitativa por cromatografia de camada delgada

A avaliação da presença de cumarinas e terpenos e esteroides foram realizadas nas frações de hexano e diclorometano provenientes da partição do extrato bruto e nas frações obtidas na purificação em coluna de sílica, utilizando uma pequena fração da amostra em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (HPTLC - MERCK®) conforme descrito no item 3.2.3.1. A presença do esteroide identificado na Etapa 2 também foi avaliada nas frações analisadas. As placas foram eluídas com hexano:acetato de etila (90:10).

3.3.4. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos compostos por CG-EM foi realizada no extrato das frações hexano, diclorometano e nas frações 3, 7-17 obtidas pelo fracionamento da fração hexano em coluna de sílica do extrato bruto. As análises de identificação nas frações hexano e diclorometano foram realizadas em CG-EM- Agilent™ 7890A GC System, HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox 30 m x 250 µm x 0.25 µm) que foi aquecido até 40 °C por 2 minutos, então 3 °C·min⁻¹ para 145 °C por 0 min e então 10 °C para 250 °C por 10 minutos. O fluxo de gás hélio foi 6 mL·min⁻¹ e a temperatura do injetor de 250 °C. O volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção (*Split ratio*) de 10:1. A identificação destas frações seguiu o mesmo método descrito para as frações em FES da Etapa 2 para fins de comparação dos compostos.

As frações 3,7-17 foram identificadas em CG-EM- Agilent™ 7890A GC System, HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox 30 m x 250 µm x 0.25 µm) que foi aquecido até 50 °C por 0 minutos, então 4 °C/min para 180 °C por 0 min e então 20 °C para 280 °C por 0 minutos. O fluxo de gás hélio foi 6 mL/min e a temperatura do injetor de 250 °C. O volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção (*Split ratio*) de 30:1. O método utilizado na identificação das frações foi modificado de Paiva dos Santos (2007), utilizado em análises de identificação de compostos naturais em óleos essenciais.

Os componentes obtidos do extrato foram caracterizados e identificados pela análise dos espectros de massas em comparação com os espectros sugeridos pela biblioteca NIST 2008 (National Institute of Standards and Technology, US).

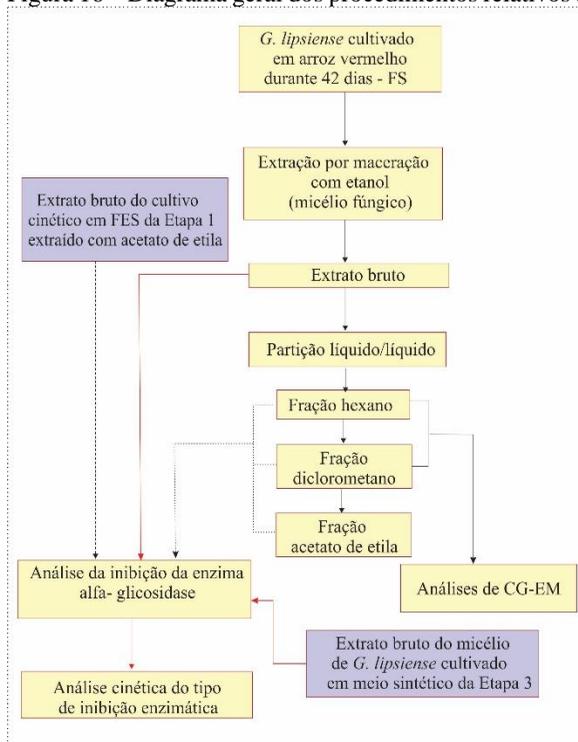
3.3.5. Teste de viabilidade celular sobre a *Giardia duodenalis*

O efeito dos extratos bruto e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila sobre trofozoítos de *G. duodenalis* (ATCC 30888; Portland-1) foi avaliado pelo método de MTT conforme descrito no item 3.2.4.2.

3.4. ETAPA 4: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA α -GLICOSIDASE PELO EXTRATO DO FUNGO *G. LIPSIENSE* EM CULTIVOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS E CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS

A Etapa 4 remete à avaliação do potencial inibitório da enzima α -glicosidase pelo extrato bruto do fungo *G. lipsiense* cultivado em meio sólido da Etapa 1, como também dos extratos bruto e purificado do micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio líquido a base de arroz vermelho (*mBA*) e do micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio sintético (*mSin*) da Etapa 3. A caracterização e identificação geral dos compostos presentes nas frações hexano e diclorometano do *mBA* também foi realizada na Etapa 4. A Figura 16 mostra um diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 4 desta pesquisa de tese.

Figura 16 – Diagrama geral dos procedimentos relativos à Etapa 4 desta pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.1. Fungo e meio de cultivo líquido

O fungo *G. lipsiense* CCIBt 2689 foi cultivado e armazenado conforme método descrito no item 3.1.1. O meio de cultura líquido concentrado a base de arroz foi preparado com 150 g de arroz vermelho previamente cozido a 100 °C por 30 min com água destilada e posteriormente moído com 600 mL de água destilada em moinho de bolas e filtrado com gase para remoção das partículas maiores. A produção dos biocompostos foi realizada em frascos de vidro cilíndricos de 500 contendo 100 mL de meio líquido a base de arroz (20% m/v do preparo concentrado) em água destilada e autoclavado a 121 °C durante 30 minutos. A inoculação do micélio fúngico se procedeu nas mesmas condições descritas no item 3.1.3. Os frascos inoculados foram cultivados de maneira estática por 42 dias em 28 °C.

3.4.2. Extração dos biocompostos do micélio fúngico

A extração do micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* seguiu os procedimentos descritos no item 3.3.2. O extrato bruto micelial total foi novamente dissolvido em etanol 70% e partionado (1:1 v/v) com hexano, diclorometano e acetato de etila. Estas frações foram utilizadas nos ensaios de avaliação da inibição enzimática e estudos de identificação dos compostos das frações apolares em cromatografia gasosa (CG-MS).

3.4.3. Ensaio inibição da enzima α -glicosidase - curva padrão e preparo das soluções

3.4.3.1. Preparo das soluções

Solução Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M - pH 6,8

Dissolveu-se 3,4 gramas de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 25 mL de água destilada. Dissolveu-se 4,35 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) em 25 mL de água destilada. Para o preparo da solução tampão, adicionar 25 mL da solução de KH_2PO_4 e 24,85 mL da solução de K_2HPO_4 em um balão volumétrico de 500 mL, ajustar o volume com água destilada e aferir o pH.

Solução de Carbonato de Sódio 1 M - Na_2CO_3

Dissolveu-se 10,6 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em 100 mL de água destilada.

Solução de *p*-Nitrofenil- α -D- Glicopiranosídeo (pNPG)

Dissolveu-se 0,03 g de pNPG em 10 mL de água destilada para obter a concentração de $10 \text{ mM}\cdot\text{L}^{-1}$. As concentrações de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, foram obtidas pela diluição da concentração de $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pelo acréscimo de água destilada.

Solução de Enzima α -Glicosidase

Dissolveu-se a enzima α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* tipo I, ≥ 10 unidades $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato pH 6,8 para concentração de $0,625 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.4.3.2. Curva padrão de pNP

Para os ensaios de cinética enzimática, se faz necessário o cálculo da formação de produto liberado em cada reação. Para isso, foi realizada a curva padrão de *p*-nitrofenol (pNP), utilizando concentrações variadas ($0,625 - 0,0013 \text{ mM}$) de produto e diluídas em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 6,8). A coloração amarela foi mensurada pela leitura da absorbância a 410 nm. Os dados foram plotados em um gráfico de valor de absorbância por quantidade de produto obtendo a curva padrão, conforme Equação 8 com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9805$).

$$y = 0,1735x \quad (8)$$

3.4.4. Ensaio inibição da enzima α -glicosidase *in vitro*

A atividade de inibição da enzima α -glicosidase foi avaliada pelo método modificado descrito por Zhipeng et al. (2011). O extrato fúngico foi dissolvido em MeOH, variando as concentrações ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A mistura reacional continha $570 \mu\text{L}$ de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 6,8), $50 \mu\text{L}$ da enzima α -glicosidase ($0,625 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e $20 \mu\text{L}$ de extrato bruto micelial. A mistura foi agitada em baixa velocidade em agitador tipo vortex e incubada em banho maria a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min, seguido da adição de $15 \mu\text{L}$ de *p*-Nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (pNPG, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Uma nova incubação foi realizada a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, no qual a reação foi parada após adição de $650 \mu\text{L}$ de carbonato de sódio (1 M). A coloração amarela produzida, devido a formação do *p*-nitrofenol (pNP) foi mensurada pela leitura da absorbância a 410 nm. O controle negativo foi conduzido de maneira idêntica ao acima descrito, substituindo o extrato fúngico por metanol. Acarbose ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi utilizada como controle

positivo e o branco da amostra foi conduzido nas mesmas condições descritas, mas na ausência de enzima. O percentual de inibição da enzima foi calculado conforme Equação 9.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{abs. do controle negativo} - \text{abs. da amostra}}{\text{abs. do controle negativo}} \times 100 \quad (9)$$

Em virtude da baixa solubilidade da amostra testada em DMSO, foi utilizado metanol como solvente e ultrassom (aprox. 30 segundos) para sua solubilização. A influência do metanol na ação da enzima foi avaliada em diferentes concentrações de substrato *p*NPG (10, 5, 2,5 e 1,25 mM), comparativamente ao teste na ausência de metanol, nas mesmas condições descritas anteriormente neste item. Os dados foram plotados em um gráfico de valor de substrato por quantidade de produto. Cada experimento foi realizado em triplicata com os respectivos brancos.

As concentrações do extrato micelial do fungo cultivado no arroz vermelho e em meio sintético que inibiram a hidrólise do substrato *p*NPG em 50% (IC₅₀) são determinadas pela regressão dos dados obtidos pelo efeito de concentrações crescentes deste composto nos ensaios, nos valores de inibição.

3.4.5. Cinética de inibição e determinação do tipo de inibição enzimática

Diferentes concentrações (0,5; 0,25; 0,125 mg·mL⁻¹) de inibidores (extrato bruto dos micélios cultivados por FS em *m*BA e *m*Sin) foram avaliados em relação ao percentual de inibição da enzima α -glicosidase na concentração de *p*NPG 5mM de modo a verificar o seu comportamento ao longo do tempo de 60 minutos. A regressão dos dados destas análises foram realizados com o auxílio do software Excel.

Para avaliar o tipo de inibição ocasionado pelos inibidores, foram realizados ensaios variando a concentração de substrato *p*NPG (10; 5; 2,5 e 1,25 mM) em relação a formação de produto ocasionada pelos inibidores na concentração de 0,5 mg·mL⁻¹ ao longo do tempo de 60 minutos. Análises por regressões não-lineares em relação aos tipos de inibição: competitiva, não-competitiva e incompetitiva foram avaliadas. Os ajustes dos dados foram realizados pelas equações geradas pelas curvas de regressão da concentração de produto formado (*p*NP) versus o tempo de reação, para encontrar os valores de velocidade da reação e determinar os parâmetros cinéticos K_m, V_{max} e K_i, utilizando o programa MatLAB 2013a, determinando assim o tipo de inibição ocasionada.

3.4.6. Identificação de compostos apolares por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM)

A identificação dos compostos por CG-EM foi realizada nas frações totais de hexano e diclorometano provenientes das partições obtidas dos extratos bruto de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*, utilizando CG-EM- Agilent™ 7890A GC System, HP-5MS (5% Phenyl Methyl Silox 30 m x 250 μm x 0.25 μm) que foi aquecido até 40 °C por 2 minutos, então 3 °C·min⁻¹ para 145 °C por 0 min e então 10 °C para 250 °C por 10 minutos. A vazão de gás hélio foi 1 mL·min⁻¹ e a temperatura do injector de 250 °C. O volume de injeção foi de 1 μL com uma proporção (*Split ratio*) de 10:1.

Os componentes obtidos do extrato foram caracterizados e identificados pela análise dos espectros de massas em comparação com os espectros sugeridos pela biblioteca NIST 2008 (National Institute of Standards and Technology, US).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas Etapas 1, 2, 3 e 4 realizados de acordo com o Capítulo 3 – **MATERIAL E MÉTODOS** são descritos a seguir.

Inicialmente, os dados referentes à **Etapa 1** - Seleção do fungo *Ganoderma* produtor de biocompostos por métodos quali e quantitativos; cinética de identificação e quantificação dos compostos fenólicos produzidos por *G. lipsiense* são apresentados, no qual se buscou por meio de métodos de triagem inicial, a escolha de um fungo com potencial na produção de biocompostos com ênfase em cumarinas e a identificação dos compostos fenólicos produzidos por meio de análise cinética.

A **Etapa 2** - Caracterização, purificação e identificação dos biocompostos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* no sistema FES e avaliação da atividade antimicrobiana e antiparasitária das frações purificadas e do esteroide identificado mostra o fungo selecionado na **Etapa 1** cultivado em arroz vermelho em maior quantidade, para extração e purificação do extrato bruto, buscando a identificação dos compostos apolares produzidos pelo *G. lipsiense* após 42 dias em FES. O composto identificado assim como as frações purificadas foram submetidos a testes biológicos *in vitro*, de modo a avaliar seu potencial antibacteriano e antiparasitário.

Na **Etapa 3** - Identificação dos biocompostos produzidos por FS pelo fungo *G. lipsiense* em meio sintético, o cultivo do fungo foi realizado em maior quantidade, sendo utilizado nesta etapa da pesquisa, apenas o micélio fúngico para análises de caracterização, purificação e identificação dos biocompostos produzidos por *G. lipsiense*. Os biocompostos identificados nesta etapa foram comparados aos biocompostos identificados na **Etapa 2**. Análises biológicas de atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* foram avaliadas no extrato bruto e nas frações hexano, diclorometano e acetato de etila.

O extrato bruto proveniente do cultivo cinético da **Etapa 1**, o extrato bruto do micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mSin* da **Etapa 3** e o extrato bruto do micélio de *G. lipsiense* cultivado *mBA* foram analisados quanto ao potencial efeito inibitório da enzima α -glicosidase na **Etapa 4** - Avaliação do potencial inibitório da enzima α -glicosidase pelo extrato do fungo *G.lipsiense* em cultivos sólidos e líquidos e

caracterização e identificação dos biocompostos produzidos por FS. O tipo de inibição enzimática ocasionada pelos extratos também foi avaliado, assim como análises de identificação por CG-EM dos compostos presentes nas frações hexano e diclorometano extraídos a partir do extrato bruto por partição líquido/líquido do micélio cultivado em *mBA*. Os biocompostos identificados na Etapa 4 foram comparados aos identificados na **Etapa 3**. O esteroide identificado na **Etapa 2** também foi avaliado quanto ao potencial inibidor enzimático.

4.1. ETAPA 1: SELEÇÃO DO FUNGO *GANODERMA* PRODUTOR DE BIOCOMPOSTOS POR MÉTODOS QUALI E QUANTITATIVOS; CINÉTICA DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRODUZIDOS POR *G. LIPSIENSE*

Distintas investigações envolvendo espécies de *Ganoderma* para a obtenção de biocompostos têm sido desenvolvidas (HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; CHAN et al., 2017; SINGDEVSACHAN et al., 2017). Na etapa inicial desta pesquisa, os fungos *G. lucidum*, *G. applanatum* e *G. lipsiense* foram avaliados quanto ao seu potencial de produção de biocompostos, em especial cumarinas, quando cultivados em arroz vermelho por 40 dias. O arroz vermelho, utilizado como substrato, foi caracterizado conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização do arroz vermelho (m/m, %).

Parâmetros	Arroz
Carboidratos	74,29
Cinzas totais	1,44
Fibras totais	0,76
Gorduras totais	1,97
Proteínas	6,96
Umidade (105 °C)	12,83

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se que o arroz vermelho contém altas concentrações de carboidratos (74,29%) e tem uma relação C:N de aproximadamente 10 (Tabela 2). Esta relação foi favorável ao desenvolvimento dos fungos *Ganoderma*, conforme mostra a Figura 17. A relação C:N ideal para o crescimento varia de acordo com o gênero fúngico, uma vez que os fungos requerem diferentes nutrientes em diferentes concentrações para crescer (COSTA e NAHAS, 2012).

A escolha do substrato ideal é fundamental para a produção de biocompostos de interesse, assim como os métodos de purificação, caracterização e identificação. Para fornecer informações sobre a identificação da cumarina, são necessários métodos analíticos qualitativos e quantitativos. Os métodos de análise de cumarina incluem cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada (CCD), ensaios colorimétricos e espectrofotométricos (UV-Vis) (da SILVA et al., 2008; SPROLL et al., 2008; ALVARENGA et al., 2009). No entanto, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) parece ser o método

preferencial de escolha para análises de cumarina nos extratos (KOLLROSER e SCHOBBER, 2002; WANG et al. 2007; SPROLL et al., 2008) e análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C para a identificação dos compostos de isolamento (HE et al., 2014b; WANG et al., 2015).

Figura 17 – *Ganoderma lipsiense* cultivado em arroz vermelho após 21 dias de cultivo



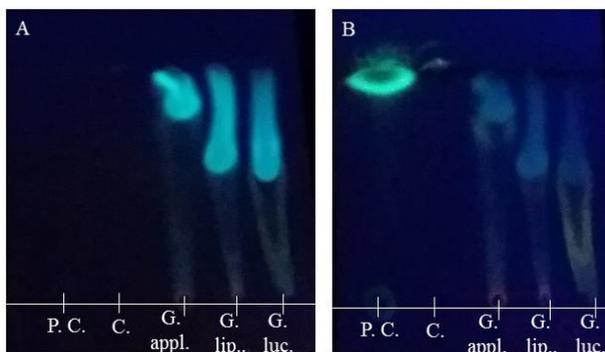
Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de cumarinas obtidas dos extratos fúngicos de *G. lucidum*, *G. applanatum* e *G. lipsiense* foi avaliada inicialmente por cromatografia de camada delgada (CCD) e pelo método espectrofotométrico (UV-Vis). A propriedade de fluorescência dos extratos fúngicos neste estudo, foi investigada por CCD e comparada ao padrão de cumarina e ao meio controle (arroz). Conforme mostrado na Figura 18, foi possível a visualização de uma mancha com forte fluorescência azul sob exposição a uma lâmpada ultravioleta (UV - 365 nm) para todos os extratos fúngicos. A intensidade da fluorescência azul foi reduzida após as placas terem sido expostas ao revelador testado - hidróxido de potássio etanólico (KOH). Segundo a Farmacopéia Brasileira (2000), as placas de CCD devem ser visualizadas em lâmpada ultravioleta (UV-365 nm) antes e após sua revelação, avaliando assim suas diferenças. A avaliação destas diferenças é fundamental para a compreensão inicial da classificação da cumarina analisada, uma vez que cada classificação (Quadro 1) apresenta distintas características de fluorescência, dentre elas sua coloração e instante de aparição.

De acordo com Wagner e Bladt (1996), as cumarinas não substituídas, como é o caso da 1,2 benzopirona utilizada como padrão nesta pesquisa, fluorescem amarelo esverdeado em luz UV-365 nm somente após sua revelação com reagente KOH ou vapor de amônia. Isto

pode ser observado na Figura 18A, quando os extratos foram expostos em luz UV, sem revelação, o padrão de cumarina (P.C.) não aparece. Sua coloração amarelo-esverdeado fica evidente após revelação com KOH (Figura 18B). A fluorescência intensa azul, ou azul-esverdeada são indicativo de cumarinas simples, furano e piranocumarinas (WAGNER e BLADT, 1996).

Figura 18 - Placa de cromatografia de camada delgada para fungos do gênero *Ganoderma* após 40 dias de cultivo



Extratos de *G. applanatum* (G. appl), *G. lipsiense* (G.lip.), *G. lucidum* (G. luc.) e meio de controle (arroz) (C), expostos a lâmpada ultravioleta UV-365 nm (A) e após a revelação com KOH (B). P.C: padrão de cumarina. Eluente: hexano: acetato de etila (80:20). Fonte: Elaborado pelo autor.

Os fungos *G. lucidum* e *G. lipsiense* apresentaram valor de fator de retenção (R_f) semelhantes, R_f 0,53 e 0,55 respectivamente (Figura 18A), e diferente de *G. applanatum* (R_f 0,76). O padrão de cumarina mostrou R_f 0,87 após a vaporização com KOH (Figura 18B). Diferentes cumarinas apresentam fluorescência azul (Farmacopéia Brasileira, 2000). Entretanto, seu R_f é variável em relação ao tipo de estrutura e eluente utilizado. Azul brilhante são característicos de manchas cromatográficas de daphnoretin, escopoletina, isofraxidina e umbeliferona (WAGNER e BLADT, 1996). No entanto, espécies que produzem drogas cumarínicas contêm frequentemente outros compostos fenólicos, como ácidos carboxílicos, por exemplo ácido ferúlico e ácido cafeico, que também apresentam fluorescência azul (WAGNER e BLADT, 1996).

A prospecção química ainda mostrou a presença de terpenos/esteroides, compostos fenólicos e alcalóides para todos os extratos fúngicos. Para o meio controle, foi observada a presença de compostos fenólicos em sua constituição.

A avaliação quantitativa da presença de cumarinas foi mensurada pelo método espectrofotométrico de UV-Vis. Dados relativos ao pH e ao rendimento extrativo (%) do extrato bruto fúngico também foram obtidos e encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados para pH, rendimento extrativo (%) e quantificação de cumarinas totais obtidos para os extratos fúngicos após 40 dias de cultivo e para o meio controle (arroz)

Amostra	pH	Rendimento (%)	Cumarinas totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>G. lucidum</i>	6,14 ^{ab} \pm 0,06	5,36 ^b \pm 0,09	0,113 \pm 0,003
<i>G. applanatum</i>	5,08 ^c \pm 0,16	6,14 ^a \pm 0,05	0,117 \pm 0,004
<i>G. lipsiense</i>	5,52 ^{bc} \pm 0,72	3,36 ^c \pm 0,04	0,111 \pm 0,003
Controle (arroz)	6,71 ^a \pm 0,07	1,25 ^d \pm 0,03	0,110 \pm 0,007

Os valores foram expressos por média \pm desvio padrão das triplicatas. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferenças significativas ao nível de 5% de significância. Fonte: Elaborado pelo autor

Em geral, uma variação significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de pH e no (%) de rendimento extrativo foi observada para *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. lipsiense* e meio controle (Tabela 2). Distintas espécies fúngicas apresentam a característica de auto-regulação do pH do substrato, estabilizando-o no valor considerado ótimo para seu desenvolvimento (VIEIRA et al., 2008) e síntese dos compostos de interesse. Esta auto-regulação pode ser observado neste estudo, uma vez que os extratos dos diferentes fungos mostraram variações de pH na faixa de 5,08 a 6,14 para um mesmo tempo de cultivo, com uma grande redução de pH para *G. applanatum* quando comparado ao meio controle. Estudos de adaptação microbiana a diferentes valores de pH, baseados na regulação da expressão gênica em fungos filamentosos, leveduras e bactérias (DENISON, 2000; PEÑALVA e ARST, 2012), sugerem que genes associados à susceptibilidade de serem influenciados pelo pH ambiental incluem os envolvidos na produção de enzimas (por exemplo, permeases) e metabólitos. Este sistema regulatório é fundamental na patogenicidade fúngica, na produção de toxinas fúngicas, antibióticos e enzimas secretadas (PEÑALVA e ARST, 2012).

Com relação ao rendimento extrativo, os extratos fúngicos apresentaram variações na faixa de 3,36 - 6,14 (%), sendo maiores para os fungos *G. applanatum* e *G. lucidum*.

Avaliando as técnicas iniciais utilizadas (CCD e espectrofotometria - UV-Vis) para quantificação dos níveis de cumarinas, não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) com relação a

quantificação nos extratos testados (Tabela 2) no período estudado, inclusive no meio controle, quando analisados em 315 nm. Apesar do método espectrofotométrico utilizado para quantificação de cumarinas não ter apresentado características da presença destas estruturas quando comparado ao meio controle no comprimento de onda avaliado, a investigação para uma possível identificação do composto responsável pela fluorescência na amostra foi realizada. Para tanto, era necessário a seleção de um fungo para a continuação dos estudos. Apesar dos resultados apresentados pelo fungo *G. applanatum* ter maior rendimento extrativo (6,14%), os valores para cumarinas totais ($0,117 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) não apresentaram diferença quando comparado com *G. lipsiense* ($0,111 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *G. lucidum* ($0,113 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), assim como ao meio controle ($0,110 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isto sugere que, apesar do rendimento extrativo ser superior aos demais, o teor efetivo dos compostos quantificados em 315 nm não apresentou diferença.

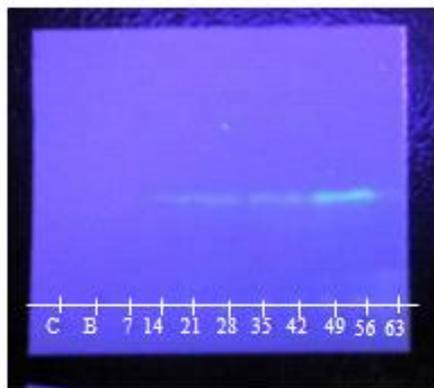
Com relação à produção de cumarinas por *G. lucidum*, esta já foi relatada anteriormente quando cultivado em arroz integral (HASNAT et al., 2015). Ao cultivar em arroz vermelho, o fungo apresentou inicialmente características de produção de cumarinas, assim como os demais fungos (Figura 18A). No entanto, o fungo *G. lipsiense* mostrou crescimento mais estável e com características morfológicas mais regulares ao longo do tempo, comparativamente aos demais fungos avaliados. Estas alterações nas demais espécies testadas poderiam vir a comprometer a confiabilidade no isolamento na cepa fúngica. Em consulta, por meio de imagem, ao Instituto de Botânica referente ao *G. lucidum* adquirido, fomos informados de uma possível modificação no fungo, uma vez que o seu crescimento não apresentava características de fungos do gênero *Ganoderma*.

Poucos artigos foram publicados até o momento, utilizando o fungo *G. lipsiense*. Tal informação foi muito relevante na seleção do fungo para a continuação dos estudos. Terpenos, esteróides e ácidos graxos foram identificados em *G. lipsiense* (RÖSECKE e KÖNIG, 2000). No entanto, os compostos identificados são conhecidos por conter propriedades terapêuticas importantes. Apesar de não apresentar diferenças significativas no teor de cumarinas totais pelo método utilizado (Tabela 2), a continuação dos estudos buscando mais informações relativas ao tempo de cultivo e a identificação dos compostos fenólicos produzidos foi realizada com o fungo *G. lipsiense*.

4.1.1. Estudo cinético da produção de compostos fenólicos

Os parâmetros pH, rendimento extrativo, compostos fenólicos totais e cumarinas totais do extrato de *G. lipsiense* foram monitorados durante 63 dias (Tabela 3), com extrações a cada 7 dias. No que diz respeito à produção de cumarinas utilizando fungos basidiomicetos, poucos são os estudos de produção disponíveis e cada um apresenta diferentes intervalos de tempo de cultivo. A partir dos ensaios cinéticos de cultivo e extração, foi possível verificar uma mancha azul fluorescente a partir de 14 dias, quando exposto a uma lâmpada ultravioleta ($\lambda=365$ nm) (Figura 19). No entanto, sua intensidade era reduzida após revelação com KOH, conforme mostrado nos ensaios preliminares de produção de cumarinas (Figura 18B) para os fungos *G. lipsiense*, *G. applanatum* e *G. lucidum*.

Figura 19 – Cromatografia de camada delgada para extratos do fungo *G. lipsiense*



Período em dias (7-63) (R_f 0,55). Meio controle (arroz) (B). CCD exposta à lâmpada ultravioleta UV-365 nm antes da exposição ao revelador KOH. Padrão de cumarina (C). Eluente: hexano: acetato de etila (80:20). Fonte: Elaborado pelo autor.

No geral, foi observado um aumento no rendimento extrativo (%) ao longo do tempo (Tabela 3). Tal resultado já era esperado, devido ao aumento da biomassa fúngica e dos compostos fúngicos produzidos. A literatura mostra uma variação considerável na relação carbono:nitrogênio (C:N) nos substratos agrícolas comumente utilizados em bioprocessos (ZAGHI et al., 2010). Valores similares à relação C:N obtidos neste estudo (10:1) foram relatados para *G. lucidum* (relação C:N de 30:1, seguido de 10:1) (YUAN et al., 2012) e *Agaricus brasiliensis*

(relação C:N de 11:1) (ZAGHI et al., 2010) como adequado para crescimento micelial.

Tabela 3– Resultados para pH, rendimento extrativo (%), compostos fenólicos totais e cumarinas totais obtidos para o meio controle (arroz vermelho) e extratos de *G. lipsiense* durante 63 dias.

Amostra (dias)	pH	Rendimento (%)	Fenólicos totais (mg·g ⁻¹)	Cumarinas totais (µg·mL ⁻¹)
Controle	6,71 ^a ± 0,07	4,98 ^{ab} ± 0,01	40,71 ^{ab} ± 1,91	0,110 ^b ± 0,007
7	4,62 ^e ± 0,04	4,66 ^b ± 0,06	32,91 ^{bcd} ± 3,28	0,115 ^{ab} ± 0,004
14	5,20 ^{cde} ± 0,06	6,81 ^{ab} ± 0,01	21,05 ^e ± 4,94	0,115 ^{ab} ± 0,003
21	4,85 ^{de} ± 0,21	7,00 ^{ab} ± 0,01	26,61 ^{de} ± 3,02	0,114 ^{ab} ± 0,005
28	4,77 ^{de} ± 0,06	7,85 ^a ± 0,07	19,80 ^e ± 3,38	0,114 ^{ab} ± 0,005
35	4,44 ^e ± 0,07	6,73 ^{ab} ± 0,21	21,08 ^e ± 0,66	0,112 ^{ab} ± 0,008
42	5,52 ^{bcd} ± 0,72	6,05 ^{ab} ± 0,02	25,61 ^{de} ± 2,82	0,145 ^a ± 0,006
49	5,84 ^{bc} ± 0,26	6,39 ^{ab} ± 0,01	28,99 ^{cde} ± 0,86	0,109 ^b ± 0,009
56	6,07 ^{ab} ± 0,27	5,82 ^{ab} ± 0,07	43,89 ^a ± 1,97	0,111 ^b ± 0,015
63	5,87 ^{bc} ± 0,16	4,85 ^{ab} ± 0,02	38,58 ^{abc} ± 0,20	0,111 ^{ab} ± 0,008

Média ± desvio padrão das triplicatas. Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não foram encontradas diferenças significativas no nível de significância de 5%. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além das fontes ideais de carbono, nitrogênio e nutrientes para o crescimento dos fungos para este estudo, o arroz vermelho foi escolhido como substrato devido aos teores de ácido *p*- cumárico presentes em sua constituição (ITO et al., 2014) e posteriormente confirmados (Tabela 4), o que o torna um possível substrato indutor para a síntese de cumarinas (Figura 7).

Os valores obtidos por espectrofotometria para cumarinas totais apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) ao longo de 63 dias (Tabela 3), incluindo o meio controle, sendo o maior valor obtido para cumarinas totais (0,145 µg·mL⁻¹) em 42 dias. Apesar da fluorescência do composto produzido iniciar a partir de 14 dias, é possível que a quantidade produzida seja relativamente baixa, não sendo possível mensurá-la por espectrofotometria. Além do mais, o arroz contém compostos fenólicos em sua constituição (WALTER e MARCHESAN, 2011) conforme quantificados na Tabela 3. Esta mistura de compostos fenólicos pode ter sido mensurada nos ensaios de quantificação de cumarinas totais por espectrofotometria, uma vez que fenólicos como ácido *p*-cumárico ($\lambda_{\max} = 313,2$ nm); vanilina ($\lambda_{\max} = 317,3$ nm); ácido cafeico ($\lambda_{\max} = 325,8$ nm); cumarina ($\lambda_{\max} = 315,9$ nm) dissolvidos em acetato de etila, absorvem em comprimentos de onda semelhantes, de

acordo com ensaios laboratoriais (varreduras em espectrofotômetro) realizados.

Uma variação significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de pH e compostos fenólicos totais também foi observada ao longo de 63 dias (Tabela 3). O valor de pH em 7 dias, mostrou uma redução de 2 pontos em comparação ao pH inicial. Não foram observadas diferenças significativas entre o meio controle e os extratos dos dias 56 e 63 (Tabela 3). O pH em um intervalo de 42 dias (7 – 49 dias) mostrou diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$), com valores de pH entre 4,44 e 5,84. Muitos basidiomicetos mostram capacidade autotamponante, estabilizando o pH do meio em um valor considerado ótimo para seu desenvolvimento e síntese dos compostos (VIEIRA et al., 2008). O uso de fontes de carbono e nitrogênio presentes no substrato consumido no processo de glicólise para crescimento micelial pode levar a uma redução nos valores de pH, como observado em estudos de Haider e Martin (1967) com *Epicoccum nigrum*.

Não foram observadas diferenças significativas quando comparado o meio controle e os extratos dos dias 56 e 63 (Tabela 3) para o teor de compostos fenólicos totais, com máximos valores em 56 dias ($43,89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Variações significativas ($p \leq 0.05$) foram encontradas no teor de compostos fenólicos entre 7 e 49 dias, corroborando com o perfil observado para os valores de pH. Fatores ambientais como temperatura, umidade, oxigênio e pH podem afetar a dinâmica do sistema e consequentemente ocasionar danos no crescimento das células fúngicas e reações metabólicas. A produção de enzimas oxidativas como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, comumente expressas por diferentes fungos e envolvidas na biodegradação de fenóis (BERNATS e JUHNA, 2015) pode ter contribuído para a variação do pH e da redução do teor de compostos fenólicos. Apesar da relação indicativa entre o pH e o teor de compostos fenólicos ser observado, experimentos com valores extremos de pH são necessários para confirmar esta relação. Neste estudo, o extrato do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho apresentou variações de pH na faixa de 4,44 - 6,07, corroborando com a literatura, que apresenta variação de pH favorável de 5 a 9 para o crescimento micelial de *Ganoderma* (JAYASINGHE et al., 2008).

Buscando maior entendimento do uso dos compostos fenólicos presentes no arroz e sua possível biotransformação ocasionada pelo fungo, estudos de identificação utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC), acoplados à espectrofotometria de massas foram realizados, fazendo uso de alguns padrões de compostos fenólicos mais

estudados em produtos naturais e das cumarina de interesse inicial, conforme será discutido no item 4.1.2.

4.1.2. Identificação dos compostos fenólicos do extrato de *G. lipsiense* em arroz vermelho

Os compostos fenólicos presentes no extrato bruto proveniente do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho, foram obtidos utilizando o método de cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrofotometria de massas (HPLC-ESI-MS/MS). A identificação foi baseada nas fórmulas moleculares, no padrão de fragmentação e nos tempos de retenção dos compostos nas amostras (Figura 20), os quais foram comparados aos 45 padrões de compostos fenólicos comercialmente disponíveis e cadastrados no equipamento. A Tabela 4 resume os seis compostos fenólicos identificados nos extratos de *G. lipsiense* e no meio controle, com base em seu tempo de retenção, desprotonação [M-H] e massa molecular, assim como os compostos fenólicos identificados nos diferentes intervalos de tempo.

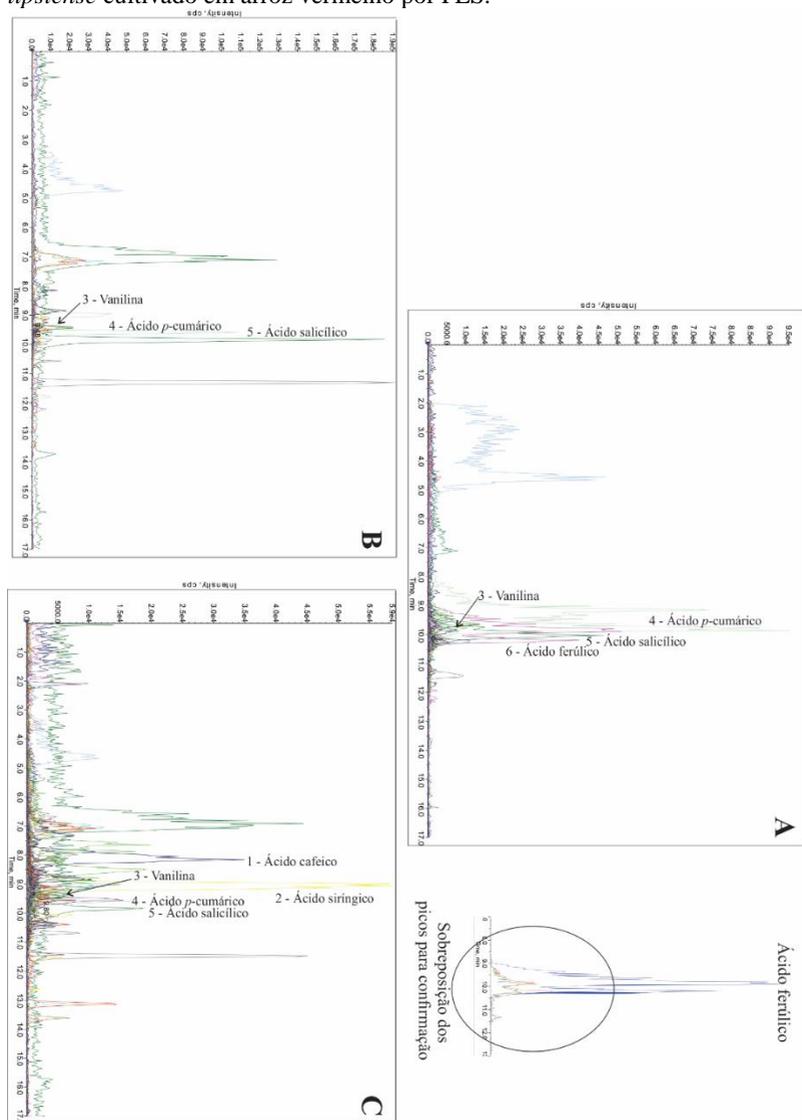
Tabela 4– Compostos fenólicos identificados no extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho e no meio controle (arroz) nos diferentes dias de cultivo/extração

Composto	T.R.* (min)	Massa Calculada	Massa		MS/MS (m/z)
			Experimental	[M-H]	
1	Ácido cafeico	8,15	180,16	178,93	135,00
2	Ácido siríngico	9,09	198,17	196,94	182,00
3	Vanilina	9,44	152,13	150,96	136,00
4	Ácido <i>p</i> -cumárico	9,59	164,04	162,93	119,10
5	Ácido salicílico	9,84	138,12	136,94	93,00
6	Ácido ferúlico	9,92	194,18	192,96	134,00

Composto	Tempo – em dias									
	Arroz	7	14	21	28	35	42	49	56	63
1	Ácido cafeico	-	-	-	-	+	+	+	-	-
2	Ácido siríngico	-	-	-	+	+	+	+	-	-
3	Vanilina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Ácido <i>p</i> -cumárico	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	Ácido salicílico	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6	Ácido ferúlico	+	-	-	-	-	-	-	-	-

T.R.* = Tempo de retenção (min); (+) presença do composto; (-) ausência do composto. Fonte: Elaborado pelo autor

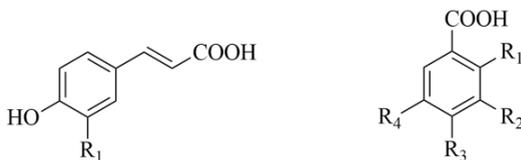
Figura 20 – Espectros de cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrofotometria de massas (HPLC-ESI MS/MS) do extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho por FES.



Espectros: A = meio controle (arroz); B = extrato bruto 7 dias; C = extrato bruto 35 dias. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 21 mostra as estruturas dos compostos fenólicos identificados.

Figura 21 – Compostos fenólicos identificados no extrato de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho e no meio controle



	R ₁		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ácido cafeico	OH	Ácido siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	Vanilina	H	OCH ₃	OH	H
Ácido ferúlico	OCH ₃	Ácido Salicílico	OH	H	H	H

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos fenólicos identificados (Tabela 4) como ácido cafeico (1), ácido siríngico (2), vanilina (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido salicílico (5) e ácido ferúlico (6) são relatados na literatura por suas importantes propriedades biológicas (LIN et al., 2012; WU et al., 2017; CHOI e KIM, 2018). No meio de controle (Tabela 4), foram identificados: vanilina (3), ácido *p*-cumárico (4), ácido salicílico (5) e ácido ferúlico (6). Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico são citados como os principais ácidos fenólicos do arroz (ITO et al., 2014) e têm sido identificados em diferentes tipos de arroz (TIAN et al., 2004; ZHOU et al., 2004).

O ácido *p*-cumárico (4) e o ácido salicílico (5) foram identificados no arroz e no extrato bruto até o dia 49, e a vanilina (3) foi identificada em todas as amostras analisadas neste estudo (Tabela 4). O ácido siríngico (2) e o ácido cafeico (1) foram identificados após 21 e 35 dias, respectivamente. A literatura denota que o ácido siríngico, um derivado do fenol simples, tem demonstrado potencial agente terapêutico, com efeitos hepatoprotetores, efeitos antitrombóticos, efeitos antimicrobianos e anticâncer (CHOI e KIM, 2018). O ácido siríngico e o ácido cafeico neste estudo não foram identificados no arroz vermelho. Estes resultados sugerem que o fungo *G. lipsiense* produziu o ácido siríngico e o ácido cafeico a partir do cultivo em arroz vermelho. Os compostos fenólicos presentes no arroz incluem derivados dos ácidos benzóico e hidroxicinâmico, principalmente ácidos ferúlico (6) e *p*-cumárico (4) (WALTER e MARCHESAN, 2011), identificado na amostra controle

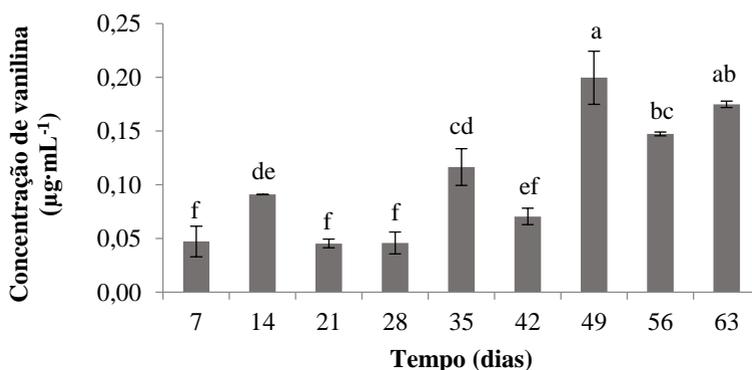
neste estudo (Tabela 4). Os ácidos cinâmicos são frequentemente encontrados em tecidos vegetais, obtidos a partir do metabolismo de *L*-fenilalanina e *L*-tirosina (DEWICK, 2002) e são precursores na síntese de diferentes intermediários, entre eles o ácido cafeico. O ácido cafeico foi identificado no extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho aos 35, 42 e 49 dias e quantificado ($0,687 \pm 0,004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,637 \pm 0,004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,977 \pm 0,003 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente), com valores mais altos em 49 dias. Nas plantas, as rotas de conversão do ácido cafeico pelo ácido cinâmico por hidroxilação sequencial em duas etapas nas posições 4- e 3- do anel benzílico são bem conhecidas (DEWICK, 2002; LIN et al., 2012). No entanto, algumas bactérias e fungos filamentosos também convertem o ácido *p*-cumárico em ácido cafeico, como evidenciado em estudos com *Pycnoporus cinnabarinus* (ALVARADO et al., 2003). Estudos de bioconversão com *Escherichia coli* mostraram a conversão do ácido *p*-cumárico em ácido cafeico por meio da enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase (4HPA3H) (LIN e YAN, 2012).

Com relação aos fungos basidiomicetos, o ácido cafeico foi previamente identificado em corpos de frutificação de *G. applanatum* (KARAMAN et al., 2010), *Ganoderma adspersum* (TEL-ÇAYAN et al., 2015) e *Laetiporus sulphureus* (OLENNIKOV et al., 2011). Com o uso de técnicas de fermentação, é possível obter ácido cafeico em tempo reduzido, visando altos rendimentos e baixos custos de produção quando comparado às técnicas tradicionais de cultivo de corpos frutíferos. É possível que neste estudo *G. lipsiense* tenha convertido o ácido *p*-cumárico (**4**) em ácido cafeico (**1**), uma vez que o ácido *p*-cumárico foi identificado no controle (arroz) e nas amostras até 49 dias, sendo esta biossíntese já conhecida na literatura. No entanto, as cumarinas inicialmente analisadas: cumarina simples, 4-metilumbeliferona, escopoletina e umbeliferona, não foram identificadas nos extratos brutos analisados por HPLC-ESI-MS/MS.

Além do ácido cafeico e das cumarinas, outros compostos fenólicos podem ser obtidos por reações de hidroxilação e metilação envolvendo o ácido *p*-cumárico, dentre eles o ácido ferúlico (DEWICK, 2002; KUMAR e PRUTHI, 2014). O ácido ferúlico pode ser obtido a partir do ácido cafeico via *S*-adenosilmetionina (SAM) (DEWICK, 2002) e usado como um precursor na produção de vanilina (DEWICK, 2002; KUMAR e PRUTHI, 2014). A vanilina foi identificada em todas as amostras analisadas, inclusive no meio controle (Tabela 4), com uma variação significativa ($p \leq 0,05$) em seu teor ao longo dos dias, conforme mostra a Figura 22. Observa-se que, dentro das condições estudadas, os maiores valores de vanilina foram em 49 dias ($0,019 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 63 dias

(0,017 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isto sugere que o arroz utilizado como substrato foi eficaz na indução da produção de vanilina pelo fungo *G. lipsiense*, uma vez que o teor da vanilina no arroz vermelho, identificado por HPLC-ESI-MS/MS (Tabela 4), sugerem apenas quantidades traços, ficando abaixo do limite de detecção do método utilizado e impossibilitando sua quantificação.

Figura 22 - Quantificação da vanilina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do extrato bruto de *G. lipsiense* em FES durante 63 dias



*Média \pm desvio padrão. Meio controle = não detectado

A produção biotecnológica de vanilina abrange diferentes derivados, como ácido ferúlico, eugenol, curcumina e glicose. O ácido ferúlico é o substrato mais explorado para a produção de vanilina (GALLAGE e MØLLER, 2015). Benz e Muheim (1996) descreveram quatro vias microbianas diferentes para a conversão do ácido ferúlico em vanilina: (i) redução ao álcool correspondente, relatado para ocorrer em fungos degradadores de madeira, como *Pycnoporus cinnabarinus* I-937; (ii) desmetilação em ácido cafeico; (iii) metabolismo via hidratação do ácido ferúlico, conforme identificado em *Pseudomonas acidovarans* (BENZ e MUHEIM, 1996); e (iv) descarboxilação a vinilguaiaicol como intermediário (BENZ e MUHEIM, 1996; KARMAKAR et al., 2000). A descarboxilação oxidativa do ácido ferúlico foi relatada em vários microorganismos, incluindo *Pseudomonas* spp. (BENZ e MUHEIM, 1996) e *Bacillus coagulans* BK07 (KARMAKAR et al., 2000). Kumar e Pruthi (2014) relataram que o ácido ferúlico é convertido em feruloil-CoA pela feruloyl-CoA sintetase (FerA) e, posteriormente, em HMPMP-CoA (4-hidroxi-3-metoxifenil- β -hidroxipropionil-coenzima A) com a ajuda

das hidratases / liases feruloyl-CoA (FerB e FerB2) (KUMAR e PRUTHI, 2014) (Figura 2).

Neste estudo, a vanilina foi identificada no extrato bruto do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho. Estes resultados são de particular interesse, uma vez que é o primeiro relato de identificação da vanilina em uma cultura de *G. lipsiense*. A partir desta constatação é possível traçar estratégias de otimização para a produção da vanilina por *G. lipsiense* no tempo de 49 dias de cultivo, visando atingir maior produtividade. No entanto, o mecanismo de conversão para a obtenção da vanilina pelo fungo não é claro. Deste modo, estudos adicionais sobre bioconversão e biologia molecular precisam ser realizados para verificar a rota de conversão neste caso.

Além dos compostos identificados (Tabela 4) nos extratos bruto, alguns isômeros dos compostos: ácido mandélico, ácido 4-hidroximetilbenzóico, ácido *p*-anísico, ácido gálico e catequina/epicatequina foram observados. No entanto, como os tempos de retenção não são compatíveis com os padrões, não foi possível afirmar a presença dos mesmos nas amostras.

4.1.3. Análises antibacterianas

A atividade antibacteriana do extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho dos dias 21, 42 e 63 e no meio controle (arroz vermelho) foi testada contra três organismos patogênicos, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo os resultados mostrados na Tabela 5.

Tabela 5– Atividade antibacteriana do extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho

Microrganismo	CIM* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
	Controle (arroz)	21 dias	42 dias	63 dias
<i>E. coli</i>	1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>P. aeruginosa</i>	1000	1000	500	250
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Gentamicina**	2,5	2,5	2,5	2,5

*CIM = Concentração Inibitória Mínima. ** Controle positivo. Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados deste estudo revelaram que o extrato de *G. lipsiense* apresentou moderada atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*, com a maior atividade observada entre 42 dias ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 63 dias ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), enquanto que o extrato bruto em 21 dias não diferiu em

relação ao arroz vermelho. Este fato está associado aos compostos produzidos por *G. lipsiense* no arroz vermelho, uma vez que o meio controle (arroz) apresentou baixa atividade antibacteriana ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). *Escherichia coli* e *S. aureus* apresentaram alta resistência ao extrato bruto como também ao meio controle (arroz), produzindo apenas efeitos fracos nos tempo avaliados.

Em estudos publicados na literatura sobre a atividade antimicrobiana de fungos do gênero *Ganoderma*, o extrato etanólico de *G. lucidum* exibiu atividade moderada contra *P.aeruginosa*, conforme relatado por Kamra e Bhatt (2012) e por Singdevsachan et al. (2017). Heleno et al. (2013) também obtiveram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* (CIM $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em estudos com *G. lucidum*. O óleo volátil obtido de *Ganoderma pfeifferi* apresentou valores de CIM de $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente (AL-FATIMI et al., 2016) enquanto australato de metila de *G.australe* apresentou valores de CIM de $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa* e *E. coli* e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus* (SMANIA et al., 2007). Além disso, os corpos frutíferos de *G. applanatum* mostraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* enquanto *G. lipsiense* apresentou atividade apenas contra *Vibrio cholerae* (MTCC 3904) (SINGDEVSACHAN et al. 2017). Além dos estudos realizados nos corpos de frutificação dos fungos *Ganoderma* (HELENO et al., 2013; SINGDEVSACHAN et al. 2017), extratos miceliais de *G. lucidum* mostraram maior atividade antibacteriana em relação a *P. aeruginosa* e *E. coli* em comparação aos extratos do corpo de frutificação do mesmo fungo em estudos de Mehta e Jandaik (2012).

Embora os extratos brutos de *G. lipsiense* tenha apresentado atividade antimicrobiana moderada, os resultados aqui relatados são importantes, uma vez que as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas* estão entre as causas mais comuns de pneumonia (LISTER et al., 2009), agindo como patógeno oportunista em humanos com sistemas imunológicos enfraquecidos. As bactérias *P. aeruginosa* atualmente apresentam resistência a vários antibióticos (YAYAN et al., 2015) e novos agentes antimicrobianos de diferentes fontes biológicas são continuamente procurados (LISTER et al., 2009).

4.2. ETAPA 2: CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *G. LIPSIENSE* NO SISTEMA FES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPARASITÁRIA DAS FRAÇÕES PURIFICADAS E DO ESTEROIDE IDENTIFICADO

Estudos de caracterização de compostos descritos na literatura produzidos por fungos *Ganoderma* mostram uma mistura de moléculas de diferentes tipos, quantidades e tamanhos obtidos a partir do seu corpo de frutificação, do micélio fúngico, como também em extratos brutos de cultivos sólidos e líquidos. Uma vez que na Etapa 1 foram identificados os compostos fenólicos produzidos por *G. lipsiense* em FES, na Etapa 2 buscou-se identificar biocompostos produzidos pelo fungo nas frações apolares do extrato bruto.

Substâncias como terpenos e esteroides foram observadas por CCD, no extrato nas frações hexano e diclorometano obtidas via extração líquido/líquido. Além das substâncias citadas, foram observados na amostra a presença de uma mancha azul fluorescente, quando revelado em luz UV, e ácidos graxos (características físicas e olfativas), nos quais foram identificados por cromatografia gasosa acoplado a espectrofotometria de massas (CG-EM). A identificação dos biocompostos presentes na fração apolar do extrato bruto proveniente do cultivo de *G. lipsiense* por FES, foi realizada de modo a verificar a ação do arroz na síntese de compostos apolares com propriedades biológicas e terapêuticas já descritas na literatura.

O arroz é um cereal que contém ácidos graxos em sua constituição, conforme caracterizado na Tabela 1. A caracterização dos ácidos graxos do arroz antes do cultivo e do extrato bruto fúngico (arroz mais o fungo *G. lipsiense*) mostraram a identificação de 19 ácidos graxos nas frações de partição com hexano e diclorometano em FES, assim como no meio controle, conforme listados na Tabela 6, de acordo com o seu tempo de retenção. Dentre os ácidos graxos identificados no extrato bruto do cultivo em FES, foram previamente identificados 4 ácidos graxos no arroz (controle).

Avaliando os resultados referentes ao perfil de ácidos graxos da Tabela 6, pode-se observar que o extrato apresenta ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos de cadeia longa. Dentre os compostos identificados, os ácidos: oleico, palmítico, linoleico, linoleico etil éster, hexadecanóico etil éster e oleato de etila, foram os componentes mais abundantes. Os ácidos graxos presentes no arroz vermelho também foram extraídos e identificados por CG-EM. Isto sugere que, ácidos graxos identificados no

extrato de *G. lipsiense*, como ácidos pentadecanóico, palmitoleico, hexadecanóico, oleico, eicosanóico, são característicos do metabolismo fúngico como também produzidos da modificação dos ácidos graxos presentes no arroz pela ação do fungo.

Tabela 6 – Ácidos graxos identificados no extrato de *G. lipsiense* em cultivo sólido (FES)

Nº	Composto	F.M.	T.R. (min)	A.R.% F.H.	A.R.% F.D.	A.R.% Cont.
1	Ácido tetradecanóico (ácido mirístico)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	41,6	0,46	0,34	0,14
2	Ácido tetradecanóico, etil éster	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	42,1	0,54	0,39	-
3	Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	43,0	0,55	0,40	-
4	Ácido pentadecanóico, etil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	43,4	0,76	0,46	-
5	Ácido palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	44,1	0,24	-	-
6	Ácido n-hexadecanóico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	44,4	19,01	11,79	13,97
7	Etil 9-hexadecanoato	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	44,4	-	0,672	-
8	Ácido hexadecanóico, etil éster	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	44,6	10,34	9,28	-
9	Ácido heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	45,3	0,33	-	-
10	Ácido heptadecanóico, etil éster	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	45,6	0,45	0,32	-
11	Ácido linoleico metil éster	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	45,7	-	-	0,07
12	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	46,1	-	12,40	75,62
13	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	46,3	25,22	9,31	-
14	Ácido linoleico, etil éster	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	46,3	9,10	11,25	-
15	Oleato de etila	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	46,4	10,46	8,14	-
16	Ácido octadecanóico, etil éster	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	46,6	2,99	2,31	-
17	Ácido eicosanóico	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	48,1	0,25	-	-
18	Ácido 6-octadecenóico (Z)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	48,2	0,68	-	-
19	Ácido 9,12 octadecadienóico (Z,Z), 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	52,5	-	2,002	-

Similaridade > 90% comparado com a biblioteca NIST. F.M. fórmula molecular; T.R. tempo de retenção; A.R. área relativa do pico calculada pelo CG-EM (%); F.H. fração hexano; F.D. fração diclorometano; Cont. meio controle (arroz). (-) ausência de identificação. Fonte: Elaborado pelo autor

Apesar da fração de gorduras produzida pelos fungos *Ganoderma* ser baixa, na faixa de 2 - 6% em sua matéria seca (SMIDERLE et al., 2012; RATHORE et al., 2017; SINGDEVSACHAN et al., 2017), os ácidos graxos identificados na literatura têm mostrado potencial aplicação terapêutica, como antibacteriano, antiinflamatório (BATOVSKA et al., 2009; KURTYS et al., 2016; UMERSKA et al., 2016; MITRA et al., 2017), larvicida, repelente (SIVAKUMAR et al., 2011) assim como na inibição da proliferação de células de câncer (FUKUZAWA et al., 2008). A ação antibacteriana e antiinflamatória de alguns ácidos graxos tem sido

extensivamente estudada nos últimos anos (BATOVSKA et al., 2009; KURTYS et al., 2016; UMERKA et al., 2016; MITRA et al., 2017) e muitos dos ácidos graxos identificados neste estudo são citados na literatura por conterem propriedades biológicas distintas. Em estudos de Shameem et al. (2017), o ácido pentadecanóico isolado de *Morchella esculenta* e *Verpa bohemica* apresentou atividade inibitória contra *B. subtilis*, *E. coli* e *Proteus vulgaris* (SHAMEEM et al., 2017), assim como o ácido tetradecanóico nos estudos de Sivakumar et al. (2011), que apresentou significativa atividade larvicida e repelente contra os mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, vetores principais responsáveis por muitas doenças (SIVAKUMAR et al., 2011).

Os ácidos graxos também têm demonstrado atividade inibitória em linhagens celulares de câncer. Em estudos realizados por Fukuzawa et al., (2008), os ácidos graxos de cadeia longa foram analisados para avaliação da atividade inibitória na proliferação de células HL-60. O ácido nonadecanóico apresentou a maior atividade inibitória, seguido do ácido heptadecanóico e dos ácidos hexadecanóicos, respectivamente (FUKUZAWA et al., 2008). A mistura de ácidos graxos de cadeia longa também foi sugerida como constituintes ativos de inibição na proliferação de células cancerígenas humanas e apoptose de células HL-60 em extratos obtidos de esporos de *G. lucidum* (GAO et al., 2012).

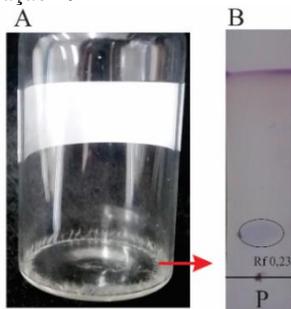
Apesar dos ácidos palmítico e linoleico terem sido identificados no arroz antes do cultivo e no extrato após o cultivo fúngico (Tabela 6), os ácidos palmítico, oleico, linoleico, mirístico, pentadecanóico e octadecanóico tem sido comumente identificados em extratos de distintos cogumelos, como *Trametes versicolor* (KAMIYAMA et al., 2013), *G. lucidum* (TASKIN et al., 2013; OHIRI e BASSEY, 2016), *Pleurotus ostreatus*, *P. squamosus*, *Lactarius salmonicolor*, *Flammulina velutipes*, *Russula anthracina* e *Boletus reticulatus* (ERGÖNÜL et al., 2013), o que torna possível sua produção por *G. lipsiense* também em arroz vermelho.

4.2.1. Elucidação estrutural do composto presente na fração 19

Dentre as 29 frações obtidas da coluna de purificação da fração hexano da partição do extrato bruto realizado em FES, no qual as proporções e rendimento obtido em cada fração encontram-se na Tabela 1A do Apêndice A, a fração 19 mostrou-se como um sólido cristalino branco e com características de ser uma substância terpênica ou esteroidal (cristalização em forma de agulhas). Esta fração também se mostrou com alto grau de isolamento observado pela CCD (Figura 23). Ao ser avaliado por CCD, utilizando como eluente a mistura de

hexano:acetato de etila (80:20), apresentou valor de R_f de 0,23. Ao ser revelado utilizando como revelador anisaldeído sulfúrico, o composto apresentou-se como uma mancha de coloração violeta. Tais características levaram à estudos de caracterização e identificação do composto.

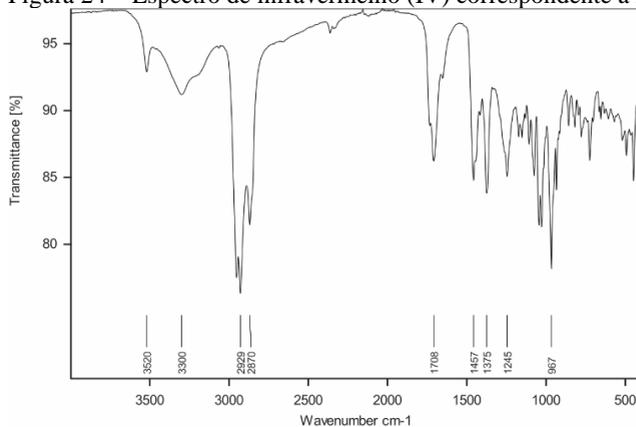
Figura 23 – Composto cristalizado da fração 19 (A) e CCD (B) do composto da fração 19



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro de infravermelho (Figura 24) mostrou absorção em 3520 cm^{-1} e 3300 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxil. Entre outras absorções, observa-se uma banda intensa em 2929 cm^{-1} , que são características do grupamento C-H. A Tabela 7 mostra as principais bandas obtidas e suas ligações correspondentes.

Figura 24 – Espectro de infravermelho (IV) correspondente a fração 19



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Dados do espectro de IV da fração 19

Bandas características (cm⁻¹)	Ligações correspondentes
3520, 3300, 1245	OH
2929, 2870	C – H
967	C = C

Fonte: Elaborado pelo autor

A fração 19 foi submetida à análise por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução (KAISER, 2000). A análise de ¹H mostrou um perfil de substância esteroideal, com vários grupos funcionais. Foi observado um par de dupletos com integral para um hidrogênio cada, centrados em 6,53 e 6,27 ppm, e constante de acoplamento de 8,5 Hz. Observando esta constante de acoplamento, pode ser concluído que os hidrogênios envolvidos nesta ligação estão em posição *cis*, e foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H6 e H7, respectivamente. Observa-se que estes sinais estão com o deslocamento maior que o comum, e suspeitou-se de estes hidrogênios estão próximos a átomos de oxigênio, sugerindo um composto polioxigenado, com presença de hidroxilas em C5 e C8. A configuração proposta para as hidroxilas em C5 e C8 foi deduzida baseada em informações da literatura. Segundo Rivera et al. (2009), quando ambos grupos hidroxila encontram-se em posição α , o deslocamento químico esperado para os sinais de hidrogênio são em torno de 6,5 e 6,3 ppm. Se estivessem em posição β , estes deslocamentos estariam deslocados para campo alto, em cerca de 5,74 e 5,60 ppm. Ainda, é mais comum observar substituições na posição α de ergosteróis polihidroxilados nas posições C5 e C8 (ZHU et al., 2000).

A presença de uma segunda dupla ligação foi indicada pelos multipletos em 5,23 e 5,19 ppm. Estes sinais foram atribuídos à ligação dupla entre os carbonos 23 e 22, respectivamente, e segundo a literatura, esta ligação está em posição *trans* (RIVERA et al., 2009). Além disso, o deslocamento do hidrogênio metínico em 3,99 ppm permitiu a sugestão da ocorrência de um composto 3β , 5α oxigenado, presente nos A/B *trans*-esteróis (YAOITA et al., 1998), reforçando a hipótese de um composto poli-oxigenado. O espectro de ¹H-RMN mostrou ainda seis sinais em campo alto, atribuídos à duas metilas terciárias em 0,90 ppm (Me-19) e 0,83 ppm (Me-18) e quatro metilas secundárias em 1,02 ppm (Me-28), 0,91 (Me-21), 0,86 (Me-26) e 0,82 (Me-27), sendo compatíveis com o esqueleto ergostano. A Tabela 8 mostra os valores obtidos de ¹H RMN

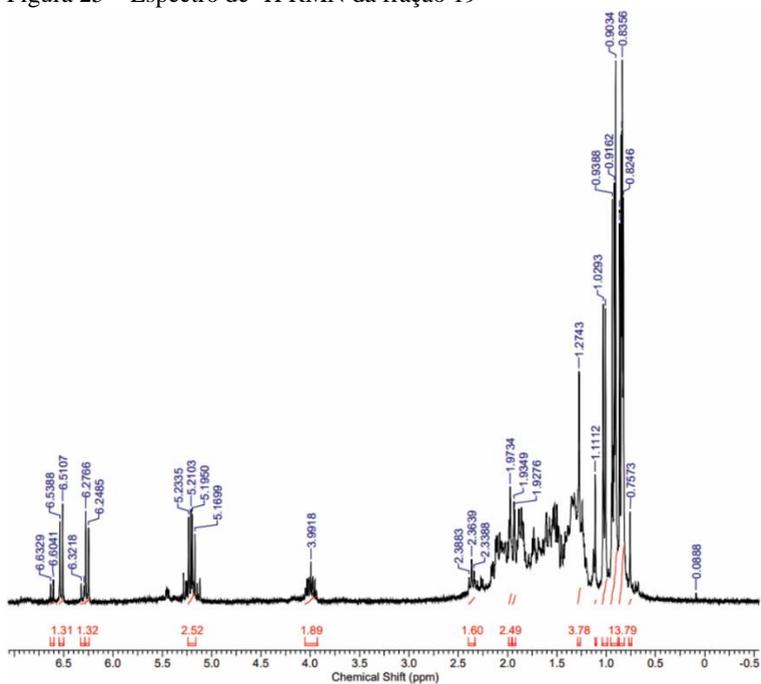
(Figura 25) para a fração 19 comparativamente aos dados do esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, já descrito na literatura (RIVERA et al., 2009; MALAK et al., 2013).

Tabela 8 – Deslocamento Químico de ^1H RMN da fração 19 com o esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol proposto

^1H RMN		
Posição	Composto existente (ppm)	Composto fração 19 (ppm)
3	3,91 (m)	3,99 (m)
6	6,60 (d, $J=8,5$)	6,53 (d, $J=8,5$)
7	6,33 (d, $J=8,5$)	6,27 (d, $J=8,5$)
14	1,19 (m)	1,11 (m)
18	0,82 (s)	0,83 (s)
19	0,89 (s)	0,90 (s)
21	0,92 (d, $J=6,3$)	0,91 (d, $J=6,3$)
22	5,18 (m)	5,19 (m)
23	5,22 (m)	5,23 (m)
26	0,85 (d)	0,86 (d)
27	0,81 (d)	0,82 (d)
28	1,01 (d, $J=6,6$)	1,02 (d, $J=6$)

Fonte: Elaborado pelo autor

Apesar da RMN de ^1H apresentar alta sensibilidade e com tempo analítico mais curto para aquisição dos dados, é rotina obter espectros em uma dimensão (1D) de ^1H e ^{13}C para um determinado composto, mesmo que o tempo de medida exigido para a análise deste carbono seja muito grande devido a baixa sensibilidade inerente ao núcleo de ^{13}C (1,59% relativa ao ^1H) (KAISER, 2000). Além do mais, está comprovado que os dados de deslocamento químico de ^{13}C são de extrema importância para uma determinação estrutural e que a concentração da amostra é um fator limitante para a determinação estrutural por RMN (KAISER, 2000). Tal fundamento pôde ser observado neste estudo. A análise de ^{13}C foi realizada duas vezes para a fração 19, visto que a quantidade de amostra analisada pela primeira vez era insuficiente para elucidar a estrutura.

Figura 25 – Espectro de ^1H RMN da fração 19

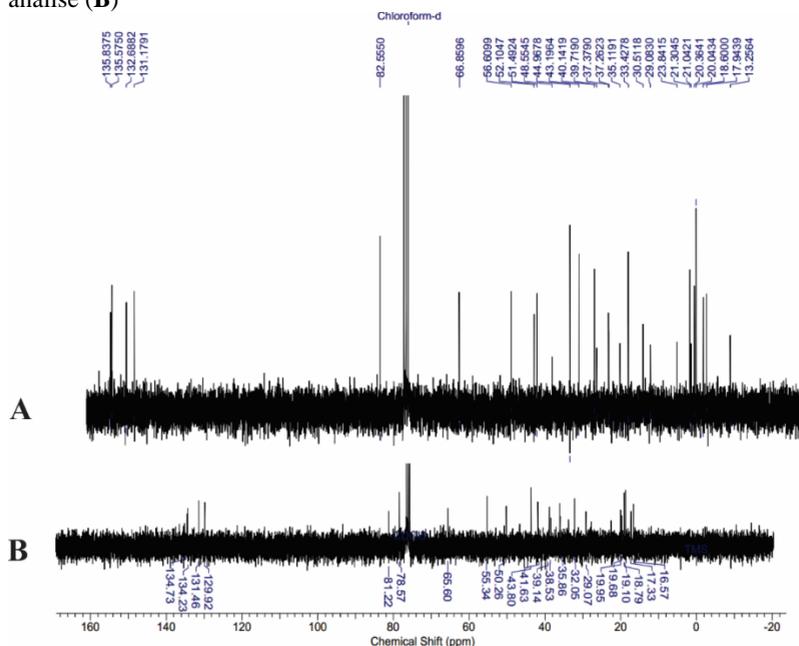
Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os dois espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C obtidos (Figura 26) é possível confirmar as evidências encontradas no espectro de ^1H . Foram observados quatro sinais correspondentes aos carbonos olefínicos das ligações duplas, três correspondentes aos carbonos oxigenados e os demais vinte e um aos carbonos alifáticos do esqueleto ergostano, resultando em 28 sinais. Dentre os deslocamentos mais importantes, foram observados os sinais em 134,7 e 129,9 ppm, correspondentes aos carbonos olefínicos H6 e H7, e os sinais em 134,2 e 131,4 ppm, correspondentes aos carbonos olefínicos H23 e H22, confirmando a presença das duas ligações duplas. Foram observados três sinais correspondentes aos carbonos hidroxilados: 65,6 ppm, que foi atribuído ao β -OH na posição 3, e os sinais em 81,22 e 78,5 ppm, atribuídos aos carbonos C5 e C8, conforme mostrados na Tabela 9.

A comparação dos demais sinais dos espectros com a literatura sugeriu a identificação do composto como sendo ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol (RIVERA et al., 2009) (Figura 27), identificado anteriormente no cogumelo *Lentinus edodes* (Shiitake) e no ascomiceto

Geosmithia lavendula (MALAK et al., 2013). A Tabela 10 mostra os sinais obtidos para ^{13}C referente a fração 19 do cultivo sólido de *G. lipsiense* em arroz vermelho comparativamente aos sinais identificados por Rivera et al., (2009) em *Lentinus edodes*, propondo assim sua estrutura.

Figura 26 – Espectros de ^{13}C RMN da fração 19: segunda análise (A); primeira análise (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Deslocamentos para ^{13}C RMN fundamentais para elucidação da estrutura descritos na literatura e comparados aos identificados no composto da fração 19

Posição	^{13}C RMN	
	Composto existente (ppm)	Composto fração 19 (ppm)
3	66,5	65,6
5	82,2	81,2
6	135,4	134,7
7	130,7	129,9

Continuação da Tabela 9

8	79,4	78,5
22	132,3	131,4
23	135,2	134,2

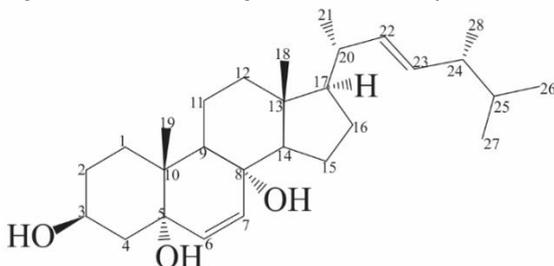
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 10 – Deslocamentos para ^{13}C RMN descritos na literatura e comparados aos identificados no composto da fração 19

Posição	^{13}C RMN	
	Composto existente (ppm)	Composto fração 19 (ppm)
1	34,7	35,1
2	39,3	39,7
4	36,9	37,2
9	51,7	51,4
10	37	37,3
11	20,6	21,3
12	30,1	30,5
13	44,6	44,9
14	56,2	56,6
15	23,4	23,8
16	28,6	29,0
17	33,1	33,4
18	12,9	13,2
19	18,2	18,6
20	42,8	43,1
21	17,6	17,9
24	39,7	40,1
25	51,1	52,1
26	19,9	20,0
27	19,6	20,3
28	20,9	21,0

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27 - Esteróide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol sugerido na fração 19



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Kaiser (2000), a técnica de RMN é extremamente eficaz, o que torna este método um importante aliado na identificação de compostos. No entanto, para a elucidação de um composto, se faz necessário um conjunto de técnicas distintas de identificação e análise comprobatórias (CCD, IV, CG-EM, HPLC-MS, ^{13}C e ^1H RMN), uma vez que, mesmo sendo eficaz, limitações dos equipamentos, dificuldades de assinalamento para moléculas estruturalmente complexas e na maioria das vezes, a baixa quantidade de amostra analisada são problemas que podem ocorrer em análises de RMN (KAISER, 2000). A comparação dos dados obtidos pelo conjunto das análises de forma individual, com dados de estruturas já descritas na literatura merece sempre cautela, mesmo se tratando de compostos já descritos.

Além da identificação fúngica, o esteróide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol tem sido identificado em raízes da planta *Trichosanthes kirilowii* (VINH et al., 2015) e folhas de *Trichosanthes baviensis* (NHIEM et al., 2015). Até o momento, propriedades inibitórias significativas da enzima tirosinase (IC_{50} 6.9 ± 2.2 μM) foram atribuídas ao presente composto (NHIEM et al., 2015). A busca por novas propriedades biológicas se faz necessário, uma vez que os esteróides de origem natural têm apresentado propriedades terapêuticas importantes, como por exemplo antitumorais (ZHENG et al., 2018) e antiparasitários (LENZI et al., 2018).

4.2.2. Atividades biológicas

A atividade antibacteriana dos extratos hexano, diclorometano, acetato de etila e da fração 19 do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho foram testados contra três organismos patogênicos, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo dos resultados mostrados na Tabela 11

e comparados os resultados obtidos para o extrato bruto e para o arroz vermelho (controle) descritos na Etapa 1.

Tabela 11– Atividade antibacteriana do extrato bruto, dos extratos hexano, diclorometano e acetato de etila e do esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol de *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho

Microrganismo	CIM* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	Controle (arroz)	E.B.	F.H.	F.D.	F.A.	Est.
<i>E. coli</i>	1000	> 1000	1000	1000	1000	> 1000
<i>P. aeruginosa</i>	1000	500	1000	500	>1000	> 1000
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	> 1000
Gentamicina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

*CIM = Concentração Inibitória Mínima. Controle positivo Gentamicina. E.B. = extrato bruto; F.H. = fração hexano; F.D. = fração diclorometano; F.A. = fração acetato de etila; Est. = esteroide. Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando as atividades antibacterianas das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, uma moderada atividade ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi obtida para as frações diclorometano e acetato de etila, enquanto que o extrato da fração hexano não mostrou diferença em relação ao arroz vermelho. O esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol não mostrou atividade antibacteriana para nenhuma das bactérias testadas.

A Tabela 11 nos mostra que os biocompostos responsáveis pela atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* do extrato bruto se concentraram principalmente na fração diclorometano, indicando ser compostos de baixa polaridade. Para *S. aureus*, o extrato bruto não mostrou atividade inibitória. No entanto, a fração acetato de etila, obtida pela extração líquido/líquido do extrato bruto, inibiu o seu crescimento na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tal característica indica que a potencialidade bem como a quantidade destes compostos com ação contra *S. aureus* presentes no extrato bruto não é elevada, uma vez que sua atividade foi possível de ser observada apenas quando concentrando estes compostos para uma mesma polaridade. Ao contrário da atividade antibacteriana, a fração hexano e o composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol mostraram potencial antiparasitário no teste de viabilidade celular da *G. duodenalis*, conforme Tabela 12.

O extrato da fração hexano do cultivo de *G. lipsiense* mostrou elevado potencial de inibição contra a *G. duodenalis* (3,30% de células vivas) na concentração de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido do extrato bruto (4,29% de células vivas) na mesma concentração (Tabela 12) após 72 horas nos

estudos *in vitro*. Em relação ao esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, este mostrou potencial inibitório no desenvolvimento do parasita apenas na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reduzindo 93,4% dos trofozoitos e não mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos demais extratos avaliados na mesma concentração. O arroz vermelho mostrou atividade antiparasitária apenas na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reduzindo 30,18% dos trofozoitos. Até o presente momento, este é o primeiro relato de atividade antiparasitária contra trofozoitos de *G. duodenalis* em relação ao composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol assim como à extratos do fungo *G. lipsiense*.

Tabela 12 – Avaliação da viabilidade celular de *G. duodenalis* em relação ao extrato bruto, a fração hexano purificada e ao composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol do cultivo de *G. lipsiense* por FES

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	E.B.	F.H.	Esteróide	Controle (arroz)
500	4,29 ^a \pm 2,04	3,30 ^a \pm 5,65	6,60 ^a \pm 4,98	69,82 ^b \pm 9,75
100	4,62 ^a \pm 2,55	7,26 ^a \pm 4,58	105,94 ^b \pm 1,14	108,27 ^b \pm 14,66
40 (Metronidazol)	0,058 \pm 0,01	0,058 \pm 0,01	0,058 \pm 0,01	0,058 \pm 0,01

Média \pm desvio padrão. Controle positivo - metronidazol. E.B. = extrato bruto; F.H. = fração hexano. Os resultados correspondem ao valor percentual (%) de células parasitárias vivas. Letras iguais em uma mesma linha indicam que não foram encontradas diferenças significativas no nível de significância de 5%. Fonte: Elaborado pelo autor.

A ação de esteroides isolados de fungos basidiomicetos e avaliados como agentes antiparasitários, tem sido relatado especialmente contra *Leishmania amazonenses* (LELIEBRE-LARA et al., 2016), *Leishmania panamensis* (CORREA et al., 2006) e *Trypanosoma cruzi* (RAMOS-LIGONIO et al., 2012) a partir de *T. versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* e *P. ostreatus* respectivamente. O esteroide identificado do cultivo de *G. lipsiense* não apresentou atividade contra *G. duodenalis* na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No entanto, ao observar os resultados obtidos para os demais extratos nesta concentração, percebe-se que não houve diferença significativa entre o extrato bruto e a fração hexano. Tal resultado sugere que a ação antiparasitária é decorrente não somente do composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, mas também da ação conjunta dos compostos apolares produzidos pelo fungo *G. lipsiense*. Além do esteroide identificado, outros terpenos e esteroides foram caracterizados no extrato de *G. lipsiense* por CCD em outras frações da coluna de fracionamento, como por exemplo na fração 17. No entanto, a baixa similaridade dos

terpenos e esteroides sugeridos nos testes de identificação por CG-EM e a baixa quantidade de amostra obtida nas frações purificadas não isoladas, impossibilitou a identificação de outras estruturas.

A atividade antiparasitária obtida a partir de extratos e compostos isolados fúngicos em relação ao parasita *G. duodenalis* ainda é limitada (YARAHMADI et al., 2016). Quitosanas extraídas de *Penicillium viridicatum* e *Penicillium aurantiogriseum* mostraram potencial efeito contra cistos de *G. intestinalis* (YARAHMADI et al., 2016). No entanto, as amostras analisadas nesta pesquisa em relação ao parasita, foram apenas na forma trofozoita de *G. duodenalis* e não na forma de cisto. O trofozoito de *G. duodenalis* emprega processos endocíticos para obter nutrientes e outras substâncias, como proteínas e lipídios, do ambiente intestinal circundante (RAYAN et al., 2005). Uma pesquisa realizada por Rayan et al., (2005), mostrou que ácidos graxos saturados de cadeia média, em especial o ácido dodecanoico (conhecido como ácido láurico) tem potencial indutor na morte de trofozoitos de *G. duodenalis* por meio do acúmulo do ácido graxo no citoplasma do parasita, resultando assim na ruptura da membrana celular. Sabe-se que ácidos graxos de cadeia longa e seus derivados podem afetar organismos unicelulares, interagindo com suas membranas lipídicas e resultando em perturbações da fase lipídica, causando assim alterações na permeabilidade da membrana (ROHRER et al., 1986). Para Rohrer et al. (1986), os ácidos graxos interagem com a membrana do trofozoito de uma maneira estereoquimicamente específica, o que torna a ação dos ácidos graxos dependente do arranjo geométrico da ligação dupla.

Além da ação antiparasitária, os ácidos graxos têm sido descritos como potentes antibacterianos (BATOVSKA et al., 2009; KURTYS et al., 2016; UMERSKA et al., 2016; MITRA et al., 2017). Distintos ácidos graxos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* foram identificados na fração hexano e diclorometano, conforme mostrado anteriormente na Tabela 6 e com propriedades biológicas e terapêuticas já descritas. Ácidos graxos insaturados, como linoleico, linolênico e oleico mostraram efeito contra *G. lamblia* em estudos de Rohrer et al. (1986), e o ácido pentadecanóico apresentou atividade inibitória contra *B. subtilis*, *E. coli* e *Proteus vulgaris* (SHAMEEM et al., 2017). Estes ácidos graxos também foram identificados nas frações hexano e diclorometano deste estudo, o que podem ter vindo a contribuir para o aumento na ação antiparasitária dos extratos analisados.

O fungo *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho por FES, mostrou sintetizar uma diversidade de biocompostos. Nesta etapa, dentro das condições disponíveis, foi possível a identificação de distintos ácidos

graxos e um esteroide, ainda inédito para este gênero e espécie. Também foi possível verificar que a fração hexano não mostrou muito potencial em relação a atividade antibacteriana, mas mostrou elevada atividade antiparasitária contra *G. duodenalis*. Já as frações diclorometano e acetato de etila, mostraram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, uma bactéria Gram-negativa e uma Gram-positiva. Tais resultados demonstram as diferentes vertentes de aplicação biológica dos biocompostos produzidos por *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho.

4.3. ETAPA 3: IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS PELO FUNGO *G. LIPSIENSE* EM MEIO SINTÉTICO

A Etapa 3 deste estudo consiste na identificação dos biocompostos produzidos no micélio do fungo *G. lipsiense* cultivado em *mSin*, visando comparar aos resultados obtidos na Etapa 2. Desta forma é possível verificar a influência do meio e da forma de cultivo na síntese de biocompostos.

4.3.1. Identificação dos compostos do micélio de *G. lipsiense*

Dentre as vantagens relacionadas à instrumentação e controle do processo da FS em relação a FES, está a mistura e aeração do meio de cultivo, ocasionada pela agitação e inserção de ar (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017). A investigação da produção dos biocompostos produzidos por *G. lipsiense* por FS foi realizada em cultivos estáticos, buscando reduzir a influência da transferência de oxigênio no metabolismo fúngico ocasionado pela agitação do meio líquido, para posteriormente comparar ao processo FES da Etapa 2. Esta condição gera baixa transferência de oxigênio para o interior do líquido, de maneira que o fungo cresça inicialmente na superfície do meio de cultivo, onde a transferência de oxigênio é maior.

Substâncias como terpenos e esteroides foram observadas via CCD, no extrato nas frações hexano e diclorometano obtidas via extração líquido/líquido. Além das substâncias citadas, a mancha azul fluorescente, já visualizada no cultivo em FES, também foi observada. Isto indica que os compostos responsáveis por tal fluorescência são provenientes do metabolismo fúngico, não sofrendo interferências em relação ao meio de cultivo utilizado.

Os compostos presentes nas frações hexano e diclorometano estão descritos na Tabela 13 e foram identificados por CG-EM. A fração hexano mostrou uma diversidade de compostos com características de terpenos e esteroides quando avaliado por CCD. Esta fração foi purificada em coluna de sílica, com um gradiente de eluição hexano:acetato de etila:etanol, e desta purificação, 12 frações (3, 7-17) foram analisadas e identificadas (Tabela 14) por CG-EM. Foram considerados apenas os compostos identificados com mais de 90% de similaridade ao espectro de massas dos compostos sugeridos pela comparação à biblioteca NIST.

Tabela 13 – Compostos identificados nas frações hexano e diclorometano do extrato micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mSin*

Nº	Composto	F.M.	T.R. (min)	A.R.% F.H.	A.R.% F.D.
1	Octenol	C ₈ H ₁₆ O	11,5	-	2,77
2	Álcool fenetílico	C ₈ H ₁₀ O	17,6	-	0,16
3	Niacina (vitamina B ₃)	C ₆ H ₅ NO ₂	23,5	-	0,20
4	(E,E)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	26,9	-	0,22
5	4-Metoxi-6-metil-2H-pirano-2-ona	C ₇ H ₈ O ₃	28,2	-	0,72
6	4-Quinolinacarboxialdeído	C ₁₀ H ₇ NO	33,6	-	0,41
7	Pirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	41,3	-	0,90
8	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	41,5	-	0,28
9	Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	42,9	1,40	0,77
10	Ácido pentadecanóico, etil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	43,4	0,41	-
11	Pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	43,8	-	3,44
12	Ácido hexadecanóico, Z-11-	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	44,0	0,41	-
13	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	44,0	-	0,55
14	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	44,2	6,46	3,47
15	9-hexadecenoato de etila	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	44,4	0,63	-
16	Ácido hexadecanóico, etil éster	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	44,5	4,95	-
17	Ácido heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	45,2	0,98	0,62
18	Ácido heptadecanóico, etil éster	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	45,6	1,01	-
19	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	46,0	9,81	6,45
20	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	46,0	-	2,80
21	Ácido linoleico, etil éster	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	46,2	14,94	-
22	Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	46,2	-	1,42
23	Oleato de etila	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	46,3	4,37	-
24	Ácido octadecanóico, etil éster	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	46,5	2,33	-
25	1-ciclohexilnoneno	C ₁₅ H ₂₈	46,8	-	0,61
26	(7R, 8S) -cis-anti-cis-7,8- Epoxitriciclo [7.3.0.0 (2,6)] dodecano	C ₁₂ H ₁₈ O	47,5	-	1,06
27	Ciclopropano-octanal, 2-octil-	C ₁₉ H ₃₆ O	48,8	-	0,51
28	Ácido 9-Octadecenóico, (E)-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	52,0	-	0,19
29	2-Metil-Z,Z-3,13-octadecadienol	C ₁₈ H ₃₆ O	52,4	-	0,90
30	Esqualeno	C ₃₀ H ₆₂	55,5	1,91	-
31	Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3 beta, 22E) – (Lichesterol)	C ₂₈ H ₄₄ O	57,3	-	0,09

Similaridade > 90% comparado com a biblioteca NIST. F.M. fórmula molecular; T.R. tempo de retenção; A.R. área relativa do pico calculada pelo CG-EM (%); F.H. fração hexano; F.D. fração diclorometano. (-) ausência do composto. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao comparar os dados da Tabela 13 aos compostos identificados no cultivo em FES (Tabela 6), no mesmo tempo de cultivo e nos mesmos procedimentos de extração, purificação e identificação, observa-se similaridade na identificação dos ácidos graxos: ácido pentadecanóico,

ácido palmítico, ácido linoleico e oleato de etila. Ao contrário do cultivo em FES foram identificados, além dos ácidos graxos, distintos compostos com propriedades terapêuticas já descritas na literatura, dentre eles o esqualeno, um triterpeno poliinsaturado com propriedades antioxidantes, anti-câncer e um importante intermediário na biossíntese de esteroides (SPANOVA e DAUM, 2011).

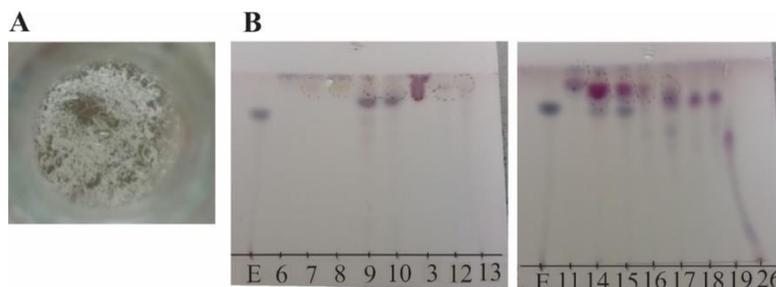
Ao contrário dos resultados obtidos no cultivo em FES, uma diversidade de compostos além dos ácidos graxos, foram identificados no micélio fúngico, especialmente na fração diclorometano. Destacam-se o octenol, conhecido como álcool de cogumelos, considerado um bio-pesticida do tipo repelente/inseticida contra mosquitos (BPDB, 2018) além da niacina ou ácido nicotínico, uma vitamina do complexo B, com notável capacidade de aumento do colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) e redução do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) (SHAH et al., 2013).

Compostos do grupo pirrol também foram identificados na fração diclorometano. O grupo pirrol 1,2-a-pirazina é um grupo de potentes antibióticos de ocorrência natural (AWLA et al., 2016). O composto pirrol [1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro- é considerado um agente antioxidativo (SER et al., 2015) e o composto pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil) é considerado antibacteriano (AWLA et al., 2016). Além de antioxidante e antibióticos, as pirrolizidinas exibem uma ampla gama de bioatividades que incluem atividades antitumorais e antiangiogênicas (SER et al., 2015).

As frações obtidas pela purificação em coluna de sílica do extrato micelial da partição com hexano foram analisadas por CCD, revelando a presença de cumarinas, terpenos e esteroides. Terpenos e esteroides tendem a cristalizar em forma de agulhas quando secos, conforme pode ser observado claramente na fração 10 da coluna (Figura 28 A). O esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol identificado na Etapa 2, também foi produzido pelo fungo *G. lipsiense* no cultivo em *mSin*, sendo identificado nas frações 14 e 15 da coluna de purificação, conforme mostrado na Figura 28 B.

Além dos compostos identificados na Tabela 13, a purificação em coluna de sílica da fração hexano possibilitou a identificação por CG-EM de 30 compostos com similaridade acima de 90%, nos quais estão descritos na Tabela 14, juntamente com seu tempo de retenção, propriedades biológicas e aplicações. As proporções correspondentes ao solvente utilizado e o rendimento extrativo de cada fração da coluna, encontram-se na Tabela 2A do Apêndice A.

Figura 28 – CCD das frações purificadas em coluna de sílica e reveladas com anisaldeído sulfúrico

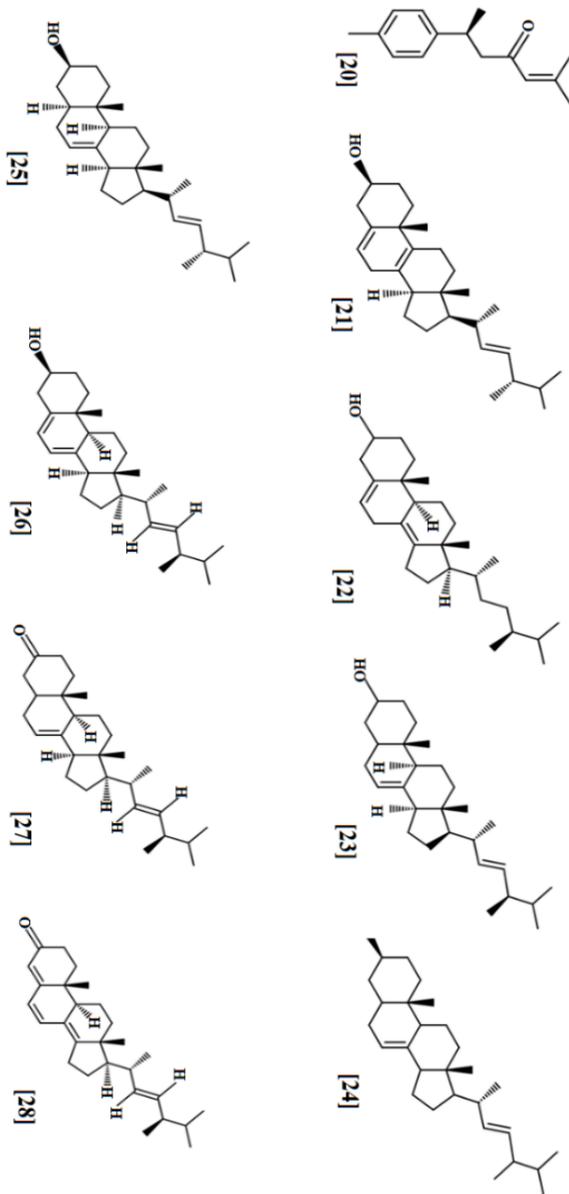


E = esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol. Eluente: hexano: acetato de etila (90:10). R_f = 0,78. Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme a Tabela 14, os compostos identificados no extrato micelial de *G. lipsiense* demonstram importantes atividades biológicas e terapêuticas. Dentre estas propriedades, destacam-se os antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes, seguido das atividades antitumorais e anti-hipercolesterolêmicas. A maioria dos compostos identificados por CG-EM são ácidos graxos e esters de ácidos graxos, de cadeia média e longa. Ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos de cadeia média, com 6-12 carbonos, como o ácido decanóico etil ester, conhecido como ácido cáprico etil ester, são frequentemente utilizados como ingredientes flavorizantes na indústria alimentícia, responsáveis pelos aromas frutados e doces (HU et al., 2018) além de sua atividade antibacteriana e anti-inflamatória (HUANG et al., 2014).

No total, foram identificados oito (8) esteroides dentre as frações analisadas (Figura 29). Os esteroides estão entre os produtos da indústria farmacêutica amplamente comercializados. Atualmente, os esteroides produzidos são utilizados especialmente para a produção de medicamentos anti-inflamatórios, imunossupressores, diuréticos, anabólicos, contraceptivos e análogos de progesterona. Os esteróides produzidos também são utilizados nos tratamentos de alguns tipos de câncer e osteoporose, para evitar doenças coronarianas, como agentes antifúngicos, agentes anti-obesidade, prevenção e tratamento de infecções por HIV e AIDS. Em virtude da complexidade das moléculas, a síntese química dos esteroides é difícil. Com isso, a produção de drogas e hormônios esteroidais se encaixa dentre uma das aplicações bem-sucedidas da tecnologia microbiana em processos industriais de larga escala (MOORE et al., 2011).

Figura 29 – Esteroides identificados no extrato micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mSin*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14 – Compostos identificados por CG-EM nas frações purificadas da coluna de fracionamento do extrato micelial de *G. lipsiense* em *mSin* e suas aplicações descritas na literatura

Nº	Composto	F.M.	T. R.	Propriedades e aplicações	Fonte
Ácidos graxos e Ésteres de ácidos graxos					
1	Ácido decanoico, etil éster	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	20,53	Antibacteriano, anti-inflamatório	HUANG et al., 2014
2	Ácido dodecanoico, etil éster	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	26,48	Antibacteriano, antiviral, antioxidante, candidicida, anti-hipercolesterolêmica	GIDEON, 2015
3	Ácido tetradecanoico, etil éster	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	31,88	Antioxidante, antimicrobiano, anti-tumoral, cosméticos, anti-hipercolesterolêmica,	GIDEON, 2015; SIVAKUMAR et al., 2011
4	Ácido pentadecanoico, etil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	33,87	Antibacteriano	SHAMEEM et al., 2017
5	Ácido pentadecanoico, 14- metil, metil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	34,28	Não foi encontrado	
6	Ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	34,69	Anti-inflamatório, Antioxidante, Pesticida, Larvicida, Hemolítico	APARNA et al., 2012; ABUBAKAR e MAJINDA, 2016
7	Etil 9-hexadecenoato	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	34,90	Aroma	NYKÄNEN e SUOMALAINEN, 1983
8	Ácido hexadecanoico, etil éster (ácido palmítico, etil éster)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35,01	Anti-hipercolesterolêmica, Lubrificante, Antimicrobiano, FlavORIZANTE, Antioxidante, Hemolítico	GIDEON, 2015; TYAGI e AGARWAL, 2017

Continuação da Tabela 14

9	Ácido heptadecanóico, etil éster	$C_{19}H_{38}O_2$	35,83	Agente anti-células tumorais	FUKUZAWA et al., 2008
10	11-ácido octadecenóico, metil éster	$C_{19}H_{36}O_2$	35,88	Não foi encontrado	
11	Ácido esteárico, metil éster	$C_{19}H_{38}O_2$	36,07	Agente neuroprotetivo	LEE et al., 2016
12	Ácido 9,12 octadecadienóico (Z,Z) (ácido linoleico)	$C_{18}H_{32}O_2$	36,11	Antioxidante, Hepatoprotetor, Anti-inflamatório, Inseticida, Anticancerígeno, Antidiabético, Antiartrite	KRISHNAMOORTHY e SUBRAMANIAM, 2014
13	Ácido linoleico, etil éster	$C_{20}H_{36}O_2$	36,31	Anti-hipocolesterolêmica, Nematicida, Antiartrítico, Anti-androgênico, Hepatoprotetor,	TYAGI e AGARWAL, 2017
14	Oleato de etila	$C_{20}H_{38}O_2$	36,34	Antibacteriano	ANKITA et al., 2015 <i>apud</i> AKIN-OSANAIYE et al., 2011
15	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	36,49	Anti-hipercolesterolêmica, Dermatogênica, Anti-inflamatório, Antibacteriano	GIDEON, 2015; ABUBAKAR e MAJINDA, 2016
16	Ácido octadecanóico, etil éster	$C_{20}H_{40}O_2$	36,50	Não foi encontrado	
17	Ácido octadecanóico (ácido esteárico)	$C_{18}H_{36}O_2$	36,60	Antibacteriano e Antifúngico	GOPALAKRISHNAN e UDAYAKUMAR, 2014
Aldeído					
18	9,17-Octadecadienal, (Z)-	$C_{18}H_{32}O$	36,45	Antimicrobiano, Antiinflamatório	ADEYEMI et al., 2017; KRISHNAMOORTHY e SUBRAMANIAM, 2014

Continuação da Tabela 14

Álcool Poliinsaturado				
19	9,12-Octadecadien-1-ol, (Z,Z)-	$C_{18}H_{34}O$	36,86	Flavorizante, Fungicida, Pesticida, Perfumaria KALSUM et al., 2016
Sesquiterpeno				
20	Ar-tumerona	$C_{15}H_{20}O$	28,44	Agente anti-células tumorais, Anti-angiogênico ARATANEHEMUGE et al., 2002; AMALRAJ et al., 2017
Esteroides				
21	Ergosta-5,8,22-trien-3 beta-ol (lichestero)	$C_{28}H_{44}O$	34,37	Antidiabética, Anti-hiperlipidêmica, Hepatoprotetora, Anti-inflamatório, Anti-fotoidade KURO et al., 2016
22	Ergosta-5,8(14)-dien-3-ol	$C_{28}H_{46}O$	34,50	Não foi encontrado
23	7,22-Ergostadienol	$C_{28}H_{46}O$	34,70	Intermediário na síntese de 7,22-Ergostadienona FAGUNDES et al., 2018
24	Ergosta-7,22-dien-3-ol (3beta,22E)	$C_{28}H_{46}O$	34,77	Reduzir o colesterol, Anti-inflamatório SINGARIYA et al. 2015; PEREIRA et al., 2014
25	Ergosta-7,22-dien-3-ol (3beta, 5alpha, 22E)	$C_{28}H_{46}O$	34,80	Antibacteriano, Antifúngico ZHU et al., 2017
26	Ergosterol	$C_{28}H_{44}O$	35,14	Antiparasitário, Antitumoral Antimicrobiana, precursor da vitamina D2 ALEXANDRE et al., 2017; GAŠECKA et al., 2018

Continuação da Tabela 14

27	7,22-Ergostadienona	$C_{28}H_{44}O$	37,00	Anti-inflamatório	PRADHAN, 2018
28	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	$C_{28}H_{40}O$	37,28	Efeito diurético, imunossupressivo, Agente anti-tumoral	ZHAO et al., 2011; SUN et al., 2013
Outros compostos					
29	<i>trans</i> -Decalina, 2-metil-	$C_{11}H_{20}$	11,08	Intermediários na biossíntese de estatinas	LI et al., 2014; CAMPBELL e VEDERAS, 2010
30	<i>cis</i> -Decalina, 2-syn-metil-	$C_{11}H_{20}$	12,36		

O efeito do composto ar-turmerone [20] é muito estudado em linhas celulares de câncer e tem demonstrado atividade apoptótica nas células K562 (eritroleucemia), L1210 (leucemia linfóide), U937 (linfoma) (JI et al., 2004), Molt 4B (leucemia) e HL-60 (leucemia) (ARATANECHEMUGE et al., 2002). Além da atividade em células de câncer, ar-turmerone também mostra propriedades antidermatópicas (JANKASEN et al., 2013).

Distintos metabólitos secundários produzidos principalmente por fungos e actinomicetos, contêm em sua constituição um esqueleto funcional de decalina (LI et al., 2014). Este composto geralmente está correlacionado com grupos altamente multifuncionalizados ou arquitetonicamente complexos, nos quais tem demonstrando uma diversidade estrutural e funcional surpreendente (LI et al., 2014). A decalina pode ser biossintetizada a partir de derivações biossintéticas de isoprenóides (via do mevalonato) e policetídeos (via do acetato), em sua forma *cis* ou *trans*. As decalinas derivadas de isoprenóides pertencem aos sesquiterpenóides e diterpenóides naturais (LI et al., 2014), nos quais são intermediários na biossíntese de importantes estatinas como a lovastatina, mevastatina, equisetina, tricosetinas e solanipironas com propriedades biológicas do tipo anti-hipercolesterolêmica e inibidora de HIV-integrase (CAMPBELL e VEDERAS, 2010).

Além dos compostos descritos na Tabela 14, foram sugeridos compostos com núcleos de cumarinas, nas frações 17 (T.R. 36,74 min e 17,27% de área de pico), 15 (T.R. 13,96 min e 0,44% de área de pico) e 14 (T.R. 12,51 min e 0,74% de área de pico). No entanto, a similaridade das estruturas era inferior a 90%. Estas sugestões obtidas pelo CG-EM corroboram com as manchas amarelas observadas em luz UV, após revelação com KOH, nas análises de CCD. No entanto, a quantidade de amostra obtida na fração 17 (14 mg), no qual o composto mostrou-se mais isolado e em maior proporção, não possibilitava uma nova separação, dentro das técnicas disponíveis, para análises de RMN.

A mancha azul visível em luz UV, foi observada fortemente nas frações 7 e 8. Contudo, não foi possível a identificação do composto responsável por tal fluorescência pelo método utilizado, uma vez que a similaridade dos compostos sugeridos responsáveis por tal característica pelo CG-EM foi inferior a 90%.

4.3.2. Análises antiparasitárias

A atividade antiparasitária do extrato bruto e das frações hexano, diclorometano e acetato de etila do micélio de *G. lipsiense* em *mSin* foram

testados contra o parasita *G. duodenalis*, sendo dos resultados mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Avaliação da viabilidade celular de *G. duodenalis* em relação ao extrato bruto, fração hexano, diclorometano e acetato de etila do cultivo de *G. lipsiense*

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	E.B.	F.H.	F.D.	F.A.
500	5,61 ^a ± 2,80	4,81 ^a ± 1,98	4,95 ^a ± 1,14	5,61 ^a ± 1,14
100	6,27 ^a ± 4,57	5,61 ^a ± 2,16	6,10 ^a ± 1,89	97,49 ^b ± 9,13
40 (metronidazol)	0,058 ± 0,01	0,058 ± 0,01	0,058 ± 0,01	0,058 ± 0,01

Média ± desvio padrão. Controle positivo - metronidazol. E.B. = extrato bruto; F.H. = fração hexano; F.D.= fração diclorometano; F.A.= fração acetato de etila. Os resultados correspondem ao valor percentual (%) de células parasitárias vivas. Letras iguais em uma mesma linha indicam que não foram encontradas diferenças significativas no nível de significância de 5%. Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato da fração hexano se mostrou mais ativo na inibição contra a *G. duodenalis* (4,81% de células vivas) na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, assim como na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5,61% de células vivas) (Tabela 15) após 72 horas nos estudos *in vitro*. A fração diclorometano também se mostrou muito ativa nas duas concentrações testadas, não mostrando diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos extratos bruto e da fração hexano avaliados nas mesmas concentrações. A fração acetato de etila teve atividade inibitória apenas na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, equiparando-se ao extrato bruto na mesma concentração, inibindo 94,39% dos trofozoítos vivos de *G. duodenalis*. Estes resultados demonstram que os compostos com atividade anti-giardial tendem a ter características apolares e que os meios de cultivo (arroz e sintético) e tipos de cultivo (FS e FES) se mostram adequados na síntese de compostos antiparasitários contra *G. duodenalis*, uma vez que comparando os dados da Tabela 15 aos dados obtidos para o extrato bruto e fração hexano do cultivo em FES (Tabela 12), observa-se resultados similares em relação a inativação dos trofozoítos do parasita.

Conforme mencionado na Etapa 2, estes são os primeiros relatos da atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* em relação ao fungo *G. lipsiense*. Tal atividade pode ser decorrente de compostos como o ergosterol, descrito na literatura como um agente antiparasitário e identificado no micélio de *G. lipsiense* neste estudo (Tabela 14), como também da ação conjunta com o esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, no qual mostrou atividade antiparasitária na Etapa 2 e identificado no micélio fúngico por CCD, neste estudo. Além do ergosterol e do

ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, a atividade antiparasitária pode ser decorrente dos demais esteroides produzidos pelo fungo, bem como da ação de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, já descritos na literatura como agentes antiparasitários (ROHRER et al., 1986). Os resultados obtidos na Etapa 3 são de fundamental importância com relação à obtenção de produtos naturais com propriedades biológicas e terapêuticas, uma vez que muitos destes compostos e propriedades foram identificadas pela primeira vez para esta espécie fúngica.

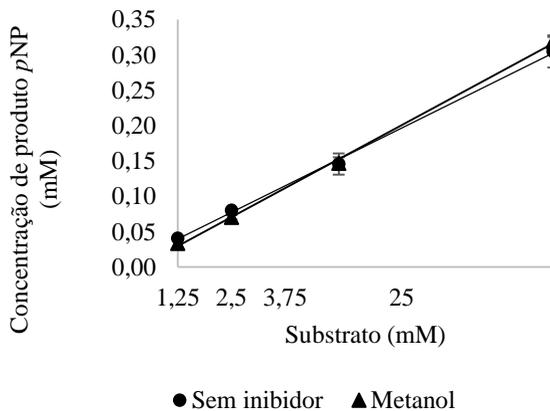
4.4. ETAPA 4: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DA ENZIMA α -GLICOSIDASE PELO FUNGO *G. LIPSIENSE* EM CULTIVOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR FS

Os compostos obtidos a partir de processos biotecnológicos envolvendo fungos têm demonstrado potencial ação na prevenção e no tratamento de distintas doenças. Além das propriedades antibacterianas contra *P. aeruginosa* (Etapa 1 e 2) e *S. aureus* (Etapa 2) e atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* (Etapa 2), o potencial inibitório da enzima α -glicosidase também foi explorado no extrato bruto dos cultivos de *G. lipsiense* em FES e FS. A enzima α -glicosidase é uma enzima chave na hidrólise de oligossacarídeos, sendo muito estudada visando aplicação na área medicinal, especialmente no controle dos níveis de açúcar no sangue para o tratamento da diabetes mellitus, uma doença endócrina crescente no século XXI (YIN et al., 2014; DEL VALLE et al., 2016; MAJOUJI et al., 2016; WANG et al., 2017b).

Em virtude da baixa solubilidade dos extratos em DMSO durante a implementação do método, uma alteração no solvente utilizado no teste de inibição enzimática foi realizada, diluindo as amostras em metanol e deixadas em contato com um banho com ultrassom por 30 segundos. De modo a garantir que a enzima não estivesse sofrendo alguma influência inibitória pelo metanol, testes variando a concentração de substrato *p*NPG (10; 5; 2,5 e 1,25 mM) foram realizados na ausência e presença de metanol, avaliando a formação do produto *p*NP formado após 30 minutos de reação resultando nas equações $Y = 0,03x + 0,0021$ (Equação 10) (R^2 0,9986) e $Y = 0,03x - 0,0113$ (Equação 11) (R^2 0,9989) para ausência (10) e presença (11) de metanol respectivamente. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 30.

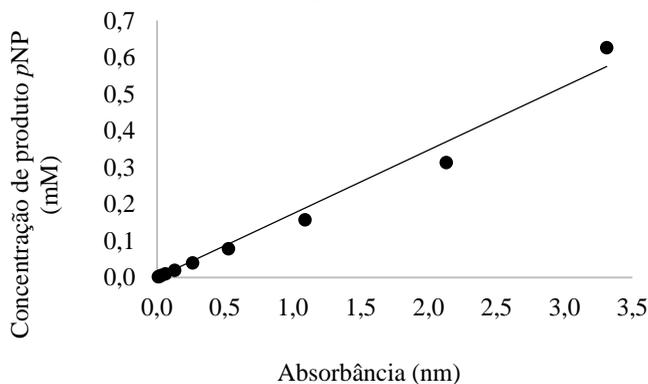
Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos após 30 minutos de reação quando avaliado a formação de produto proveniente da hidrólise do substrato *p*NPG em diferentes concentrações, especialmente na concentração de 5mM, utilizada no teste de inibição. Isto demonstra que, a baixa quantidade de metanol utilizada no teste, não provoca inibição na enzima α -glicosidase. Para o cálculo da formação de produto gerado e graficado na Figura 30, fez-se anteriormente uma curva de calibração do produto *p*NP formado (mM) pela absorbância, conforme Figura 31, resultando a equação de regressão: $Y = 0,1735x$ (Equação 12) e coeficiente de determinação (R^2) 0,9805.

Figura 30 – Curvas de formação de produto *p*NP na ausência e presença de metanol após 30 minutos de reação e variando a concentração de substrato



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Curva de calibração do produto *p*NP

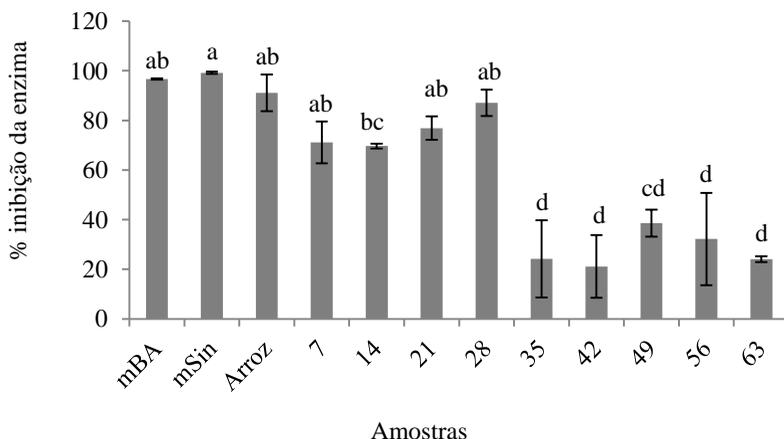


Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito inibitório da α -glicosidase no extrato bruto do cultivo cinético da Etapa 1 deste estudo com *G. lipsiense* em FES, do micélio fúngico cultivado em *m*Sin (Etapa 3) e do micélio fúngico cultivado em *m*BA, nesta etapa, é mostrado na Figura 32. Uma variação significativa ($p \leq 0,05$) na inibição da enzima α -glicosidase pode ser observada nas amostras analisadas (Figura 32). Quando avaliado a inibição da enzima

no extrato bruto do cultivo em FES da Etapa 1, é possível observar uma oscilação nos percentuais inibitórios ao longo do tempo, com maior percentual de inibição da enzima em 28 dias de cultivo (87,04%), não apresentando diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao arroz vermelho (controle), que também mostra inibição enzimática (91,12%). Reduções no percentual de inibição enzimática foram observados a partir de 35 dias de cultivo. Tal redução pode estar associada a alteração dos biocompostos produzidos pelo fungo e observado no extrato bruto (Figura 20) a partir de 35 dias.

Figura 32 – Inibição da enzima α -glicosidase em extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em FES e FS na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

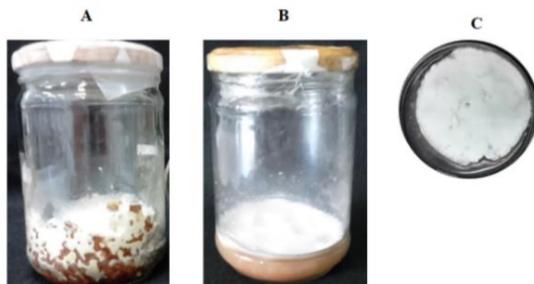


Valores correspondentes as médias \pm desvio padrão das triplicatas. Letras iguais indicam que não foram encontradas diferenças significativas ao nível de significância de 5%. mBA = micélio de *G. lipsiense* cultivado em arroz por FS; mSin = micélio *G. lipsiense* cultivado em meio sintético por FS; Arroz = apenas arroz. Período entre 7-63 corresponde ao extrato bruto em FES obtido nos respectivos tempos em dias. Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato bruto proveniente do uso do arroz como substrato para o cultivo sólido de *Aspergillus unguis* também mostrou inibição enzimática da α -glicosidase (86%) em estudos de ABD El-Hady et al., (2016). Avaliando os dados disponíveis na literatura, é possível verificar que muitos pesquisadores têm estudado a relação dos cereais com a inibição da enzima α -glicosidase (YAO et al., 2010; PRAMAI et al., 2017) e

observações obtidas a partir de estudos realizados por Yao et al. (2010), mostraram uma relação significativa entre a atividade inibitória da α -glicosidase com o teor de compostos fenólicos totais presentes em arroz preto. No entanto, esta relação entre o teor total de compostos fenólicos (Tabela 4) e a atividade inibitória da enzima (Figura 32) não foi observada neste estudo. Apesar do arroz ser considerado um bom substrato para a síntese de biocompostos fúngicos, com propriedades antimicrobianas e antiparasitárias verificadas nos Estudos 1 e 2, este, se não separado do micélio fúngico na etapa de extração dos cultivos em FES, acaba provocando interferência nos testes de inibição enzimática. Já é descrito na literatura a influência ocasionada pelo meio e pelo tipo de cultivo (FES ou FS) na síntese de compostos microbianos (ROY, et al., 2013; ANUSHA et al., 2017). Isto pode ser comprovado quando avaliado os resultados de inibição da enzima α -glicosidase do extrato bruto dos micélios de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e em FES (Figura 32) para o mesmo tempo (42 dias). A Figura 33 mostra a colonização de *G. lipsiense* em arroz vermelho por FES e FS e o micélio fúngico obtido pelo cultivo submerso.

Figura 33 – *G. lipsiense* cultivado em arroz vermelho por FES (A) e FS (B). Micélio fúngico cultivado em *mBA* (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato bruto proveniente do micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*, inibiu 96,6% da enzima α -glicosidase, não apresentando diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao extrato bruto *mSin*, que inibiu 99,1% da enzima na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, enquanto que no cultivo em arroz por FES, houve apenas 21,11% de inibição da enzima para o mesmo período (42 dias). A partir destes dados, a eficiência do inibidor de α -glicosidase dos micélios cultivados em *mBA* e *mSin* foi

comparada com base nos seus valores de IC_{50} (Tabela 6). Os maiores valores de IC_{50} indicam menor eficiência na atividade de inibição.

Tabela 16 – Inibição da enzima α -glicosidase pelos micélios de *G. lipsiense* em FS

Extrato bruto	IC_{50} (mg·mL ⁻¹) da enzima α -glicosidase
Micélio do cultivo em <i>mBA</i>	0,269 ^a ± 8,25
Micélio do cultivo em <i>mSin</i>	0,218 ^a ± 9,67
Acarbose	0,19 ^a ± 3,82

Média ± desvio padrão. Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não foram encontradas diferenças significativas no nível de significância de 5%. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores obtidos para atividade inibitória da enzima foram similares para o micélio de *G. lipsiense* em *mBA* ($IC_{50} = 0,269$ mg·mL⁻¹) e *mSin* ($IC_{50} = 0,218$ mg·mL⁻¹), e similares aos obtidos para Acarbose ($IC_{50} = 0,19$ mg·mL⁻¹). Acarbose, assim como o composto 1-Deoxinojirimicina (DNJ) têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças como diabetes mellitus, sendo produzidos pelas bactérias *Actinoplanes* sp. SE50/110 (SCHWIENSTEK et al., 2012) e *Streptomyces lavendulae* (KOJIMA et al., 1995) e *B. subtilis* (ZHU et al., 2010). Os ensaios de IC_{50} da Acarbose apresentados neste estudo foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke, do Laboratório de eletroforese capilar LABEC, do Departamento de Química da UFSC de Florianópolis e com seu aluno de doutorado Diogo Alexandre Siebert do mesmo grupo.

O esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -trioi da Etapa 2 também foi avaliado quanto o potencial inibidor da enzima α -glicosidase, não mostrando nenhuma inibição enzimática na concentração de 1 mg·mL⁻¹ avaliada.

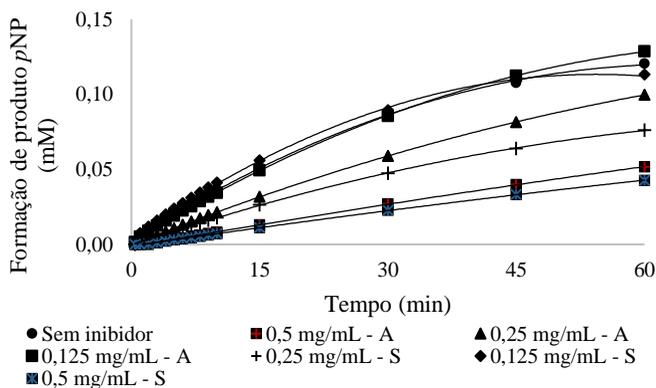
Distintos extratos fúngicos têm exibido propriedades inibitórias da enzima α -glicosidase, dentre eles extratos de *Cladosporium* sp. (SINGH et al., 2014), *A. unguis* (ABD EL-HADY et al., 2016), *Aspergillus oryzae* (KANG et al., 2013), *G. lucidum* (KIM e NHO, 2004; FATMAWATI et al., 2011), *Ganoderma leucocontextum* (WANG et al., 2017b) e *Tremella fuciformis* (KARDONO et al., 2013). No entanto, a inibição desta enzima ainda não havia sido reportada para *G. lipsiense*.

4.4.1. Medidas de velocidade enzimática com variação na concentração de inibidor

Experimentos avaliando a inibição enzimática em um intervalo de tempo (60 minutos) foram realizados com os micélios cultivados em *mBA* e *mSin*. Os resultados de formação de produto ao longo do tempo, obtidos para o micélio de *G. lipsiense* nas concentrações 0,125; 0,25 e 0,5 mg·mL⁻¹, utilizando como substrato *pNPN* (5 mM), estão mostrados na Figura 34. As equações de regressão e os seus respectivos coeficientes de determinação estão descritos na Tabela 17.

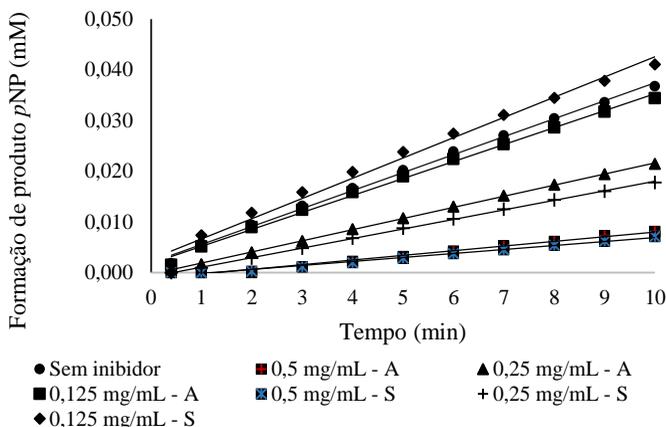
A formação de produto *pNP* obtido pela atividade da α -glicosidase (Figura 34) tendeu a diminuir com o aumento da concentração do extrato bruto. Observa-se que a capacidade de inibição enzimática ocasionada pelo extrato bruto do micélio em *mBA*, na concentração de 0,25 mg·mL⁻¹, reduziu de forma significativa durante 60 minutos de reação, enquanto o extrato bruto micelial do cultivo em *mSin*, na mesma concentração, manteve a inibição enzimática mais estável, com melhor atividade inibitória e menor formação de produto. Ambos os inibidores, perderam totalmente a capacidade de inibição da α -glicosidase quando avaliados na concentração de 0,125 mg·mL⁻¹, equiparando-se a velocidade média inicial da reação (V_m) (coeficiente angular) (Tabela 18) quando na ausência do inibidor. A V_m da reação foi obtida pela regressão linear (Figura 35) de 10 pontos experimentais para cada amostra durante os primeiros 10 minutos da reação.

Figura 34 – Cinética de formação de produto *pNP* em diferentes concentrações de inibidores, no tempo de 60 minutos



Dados da legenda: A = cultivo em *mBA*; S = cultivo em *mSin*. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Cinética de formação de produto *pNP* em diferentes concentrações de inibidores, no tempo de 10 minutos



Dados da legenda: A = cultivo em *mBA*; S = cultivo em *mSin*. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 17 - Equações de regressão e coeficientes de determinação da inibição enzimática em distintas concentrações de inibidor no tempo de 60 minutos

Concentração (mg·mL ⁻¹)	FS <i>mBA</i>	
	Equação	R ²
0,5	$Y = -2,0 \times 10^{-6}x^2 + 0,001x - 0,0015$	0,999
0,25	$Y = -1,0 \times 10^{-5}x^2 + 0,0023x - 0,0004$	0,999
0,125	$Y = -2,0 \times 10^{-5}x^2 + 0,0035x + 0,0018$	0,999
Concentração (mg·mL ⁻¹)	FS <i>mSin</i>	
	Equação	R ²
0,5	$Y = -2,0 \times 10^{-6}x^2 + 0,0008x - 0,0011$	0,999
0,25	$Y = -1,0 \times 10^{-5}x^2 + 0,002x - 0,0008$	0,999
0,125	$Y = -4,0 \times 10^{-5}x^2 + 0,004x + 0,0036$	0,997
Sem inibidor	$Y = -3,0 \times 10^{-5}x^2 + 0,0036x + 0,0024$	0,9995

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18 - Equações de regressão e coeficientes de determinação da inibição enzimática em distintas concentrações de inibidor no tempo de 10 minutos

Concentração (mg·mL ⁻¹)	FS <i>mBA</i>	
	Equação	R ²
0,5	Y = 0,0008 x-0,0009	0,9886
0,25	Y = 0,0022 x-0,0003	0,9996
0,125	Y = 0,0033 x+0,0018	0,9980
Concentração (mg·mL ⁻¹)	FS <i>mSin</i>	
	Equação	R ²
0,5	Y = 0,0009 x-0,0012	0,9832
0,25	Y = 0,0019 x-0,0008	0,9996
0,125	Y = 0,0040 x+0,0027	0,9836
Sem inibidor	Y = 0,0035 x+0,0024	0,9968

*Valores em negrito correspondem a velocidade inicial da reação durante os primeiros 10 minutos. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima α -glicosidase e tipo de inibição pelo micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e *mSin*

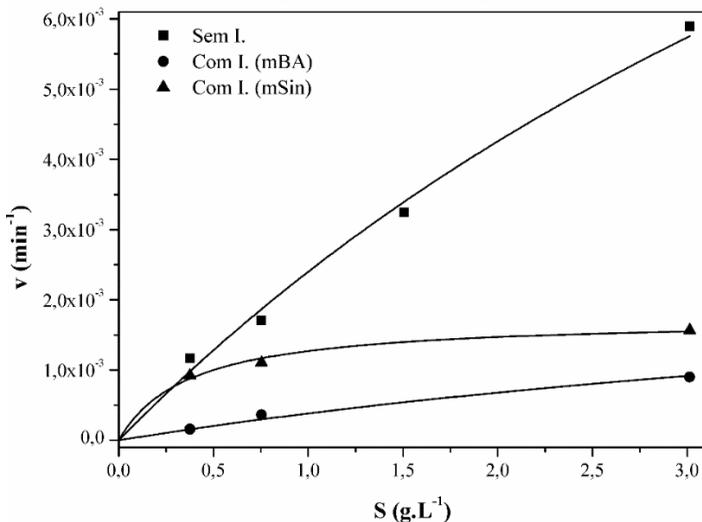
A avaliação do tipo de inibição enzimática ocasionado pelo extrato bruto do micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e *mSin* foi realizada por meio da análise dos modelos de inibição: competitiva, não competitiva e incompetitiva utilizando o programa MatLAB 2013a. Os resultados experimentais obtidos pelo estudo cinético da enzima α -glicosidase, na ausência de inibidor, foram ajustados graficamente pelo modelo de Michaelis e Menten. Os parâmetros obtidos para velocidade máxima (V_{max}) e K_m (Tabela 19) foram obtidos por ajustes não-lineares. Em relação ao tipo de inibição, os modelos não-lineares mostraram melhores ajustes aos dados experimentais para os tipos de inibição incompetitiva (*mBA* e *mSin*) (Figura 36) e competitiva (*mBA*) (Figura 37), no qual foi possível a estimativa dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_m e as constantes de inibição (K_i) para cada caso, conforme mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos de inibição da α -glicosidase pelo extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e *mSin*

Amostra	K_m ($g \cdot L^{-1}$)	V_{max} ($l \cdot min^{-1}$)	K_i ($g \cdot L^{-1}$)	R^2
Inibição incompetitiva				
α -glicosidase sem inibidor	5,01	0,015	-	-
<i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i>	18,46	0,010	0,127	0,991
<i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mSin</i>	2,12	0,010	0,105	0,990
Inibição competitiva				
α -glicosidase sem inibidor	4,17	0,013	-	-
<i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mBA</i>	27,12	0,013	0,984	0,988
<i>G. lipsiense</i> cultivado em <i>mSin</i>	10,00	0,013	0,615	0,939

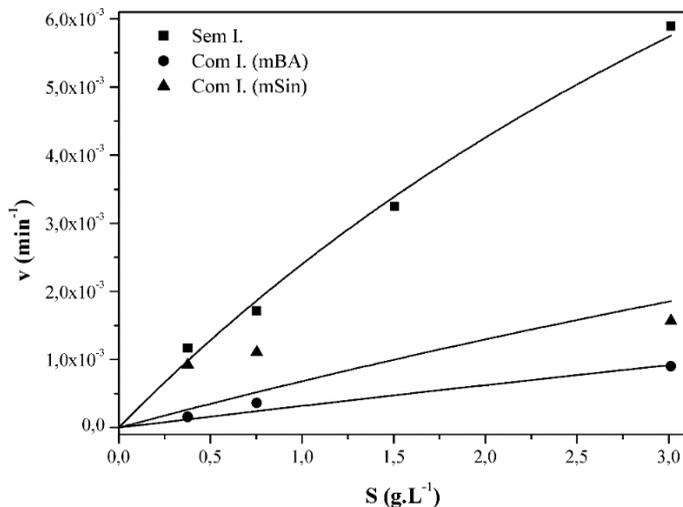
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 – Representação gráfica dos dados experimentais da enzima α -glicosidase na ausência de inibidor e pelo extrato bruto micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e *mSin* para inibição incompetitiva



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 - Representação gráfica dos dados experimentais da enzima α -glicosidase na ausência de inibidor e pelo extrato bruto micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* e *mSin* para inibição competitiva



Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os ajustes dos dados experimentais aos modelos de inibição enzimática, percebe-se que os melhores ajustes se referem a inibição incompetitiva para o extrato bruto micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mSin*. Inibidores dessa classe se combinam exclusivamente com o complexo enzima-substrato, formando o denominado complexo enzima-substrato-inibidor (ESI), reduzindo a atividade enzimática e a formação de produtos. Neste tipo de inibição, o inibidor interage com a enzima em uma região diferente do sítio de ligação ao substrato. Desta forma, o aumento da quantidade de substrato no meio não contribui para que o efeito inibitório seja reduzido. Em uma inibição incompetitiva, os valores de K_m e V_{max} diminuem em comparação aos valores de K_m e V_{max} sem inibidor. Este comportamento pode ser claramente observado para o extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em *mSin*. O valor de K_i também foi menor na inibição incompetitiva para o extrato de *G. lipsiense* cultivado em *mSin* ($0,105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) quando comparado a inibição competitiva ($0,615 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Menores valores de K_i indicam maiores valores de inibição. Isso indica que a afinidade de ligação enzima-inibidor excede a afinidade de ligação do enzima-substrato (MAJOULI et al., 2016).

Em relação ao extrato bruto micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*, os valores de K_m e V_{max} também alteram em relação aos valores na

ausência de inibidor. No entanto, o valor de K_m (27,12 g·L⁻¹) aumenta consideravelmente em relação ao valor de K_m sem inibidor (4,17 g·L⁻¹). Aumentos nos valores de K_m são características de inibição competitiva, onde os inibidores se ligam exclusivamente a enzima livre e competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Dessa forma, a enzima se liga ao substrato ou ao inibidor e o aumento da concentração de substrato pode contornar o problema deste tipo de inibição. Os ajustes dos dados experimentais ao modelo competitivo são apresentados na Figura 37.

Já é descrito na literatura que o substrato utilizado em um processo mostra influência direta na síntese de biocompostos por fungos basidiomicetos (FIGUEIRÓ e GRACIOLLI, 2011). Tal influência foi aqui demonstrada. O fungo *G. lipsiense* quando cultivado em *mSin*, mostra claramente que, em conjunto, os biocompostos por ele produzidos inibem a enzima de forma incompetitiva. Em contrapartida, para o *G.lipsiense* em *mBA*, o tipo de inibição competitiva se mostrou mais adequado, dentro das características do modelo, apesar de ter menor ajuste dos dados (R^2) e maior valor da constante de inibição (K_i) quando comparado a inibição incompetitiva. Novos estudos envolvendo o tipo de inibição após uma separação dos compostos do extrato bruto de *G.lipsiense* em *mBA* se faz necessário, a fim de esclarecer o tipo de inibição ocasionado pelo micélio de *G. lipsiense* quando cultivado em arroz vermelho, uma vez a constituição do arroz como substrato é complexa, e esta pode ter contribuído para a produção de compostos que atuam de maneiras distintas na enzima α -glicosidase.

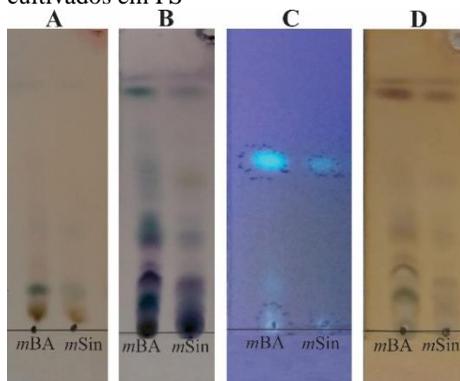
4.4.3. Caracterização do extrato bruto e inibição enzimática nas frações purificadas do extrato bruto

As análises de inibição e do tipo de inibição enzimática realizadas até o momento, referem-se ao extrato bruto micelial do fungo *G. lipsiense*. A caracterização dos extratos brutos por cromatografia de camada delgada (CCD) (Figura 38) mostra a presença de açúcares, terpenos e esteroides, cumarinas como também de outros compostos fenólicos em sua constituição. Todas estas classes de compostos observadas já foram relatadas na literatura como inibidores de α -glicosidase (YAO et al. 2010; MA et al., 2015; CHEN et al., 2018).

É possível observar uma diversidade de biocompostos no micélio de *G. lipsiense* quando comparam-se os cultivos em *mBA* e *mSin* (Figura 38), especialmente no que se refere aos terpenos e esteroides (Figura 38B) e compostos fenólicos (Figura 38D). Vale ressaltar que, as manchas azuis fluorescentes visualizadas em luz UV (Figura 38C) não

aparecem quando reveladas com os demais reveladores aqui testados. No que se refere aos açúcares (Figura 38A), não foram observadas diferenças entre os dois extratos brutos analisados.

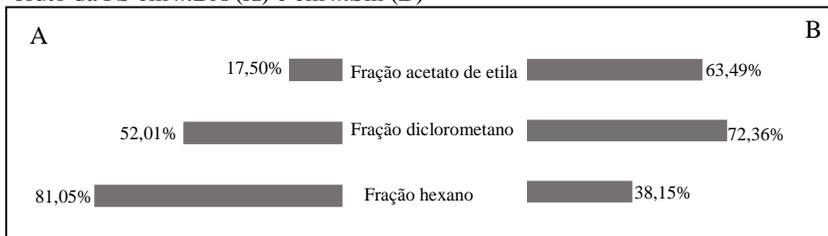
Figura 38 – Cromatografia de camada delgada (CCD) nos micélios fúngicos cultivados em FS



CCD contendo micélio fúngico cultivado por FS em *mBA* e em *mSin* e reveladas com: Resorcinol sulfúrico (A), Anisaldeído sulfúrico (B), luz UV (C) e cloreto férrico em HCl (D). Eluição hexano:acetato de etila (80:20). Fonte: Elaborado pelo autor.

De modo a investigar a classificação dos compostos responsáveis pela ação inibitória enzimática, tendo como base a sua polaridade, as frações hexano, diclorometano e acetato de etila obtidas da partição líquido/líquido a partir do extrato bruto micelial cultivado em *mBA* e em *mSin* da Etapa 3, foram avaliadas, conforme Figura 39.

Figura 39 – Percentual de inibição enzimática nas frações purificadas dos extratos bruto da FS em *mBA* (A) e em *mSin* (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que a fração hexano das partições do extrato bruto dos cultivos em *mBA* inibiu 81,05% da enzima α -glicosidase, enquanto que

as partições do extrato bruto micelial cultivado em *mSin* mostraram maior inibição nas frações diclorometano (72,36%) e acetato de etila (63,49%), na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estes resultados sugerem que, dentro do extrato bruto de *G. lipsiense* em *mBA*, os compostos classificados como baixa polaridade ou apolares, tendem a ser os responsáveis pelos níveis mais altos de inibição enzimática (Figura 39). Em contrapartida, os dados obtidos da separação do extrato bruto micelial do *mSin* indicam que o elevado efeito inibitório da enzima (99,1% na concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) pode ser decorrente de uma interação sinérgica entre os compostos, especialmente entre os compostos presentes nas frações diclorometano e acetato de etila. A mistura de constituintes bioativos e seus subprodutos contidos em vários produtos naturais produzem efeitos sinérgicos. No entanto, os mecanismos responsáveis pela atividade sinérgica ainda não estão bem elucidados, devido à natureza complexa dos extratos naturais (SONAM e GULERIA, 2017). O efeito sinérgico presente entre os compostos naturais e entre os compostos naturais com os compostos sintéticos tem sido muito estudado, especialmente no tratamento de doenças como o câncer (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006).

Os compostos presentes nas frações hexano e diclorometano da partição do extrato bruto de *G. lipsiense* cultivado em *mBA* foram identificados por CG-EM, e estão descritos na Tabela 20. Análises usando CG-EM e comparando os dados com os espectros da biblioteca NIST e com similaridade acima de 90%, mostraram ácidos graxos saturados e insaturados nas frações hexano e diclorometano. De acordo com Artanti et al., (2012), ácidos graxos insaturados, como ácido oleico, linoleico e linolênico e suas formas metil ester, isolados do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. TSC13, mostraram maiores atividades inibitória da enzima α -glicosidase quando comparado aos ácidos graxos saturados. Para Su et al., (2013), o ácido oleico mostrou melhor atividade inibitória da α -glicosidase, seguido do ácido linoleico, ambos por inibição competitiva. Elevados valores de inibição enzimática também foram descritos por Nguyen e Kim, (2015) para o ácido oleico ($\text{IC}_{50} = 14,87 \text{ }\mu\text{M}$) isolados de órgãos internos do pepino do mar *Stichopus japonicas*.

Tabela 20 - Compostos identificados nas frações hexano e diclorometano do extrato micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*

Composto	F.M.	T.R. (min)	A.R.% F.H.	A.R.% F.D.
1 Ácido hexadecanóico, metil éster	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	43,7	1,32	2,16
2 Ácido n-hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	44,1	-	1,81
3 Ácido hexadecanóico, etil éster	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	44,5	1,32	-
4 Ácido heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	45,27	-	0,62
5 Ácido linoleico, metil éster	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	45,5	0,86	1,30
6 2-metilctacosano	C ₂₉ H ₆₀	45,6	1,29	-
7 9-Ácido octadecenoíco	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	45,99	-	2,60
8 Ácido linoleico, etil éster	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	46,2	2,70	-
9 Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	46,3	1,67	-
10 Ácido octadecanóico, etil éster	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	46,5	0,40	-

Similaridade > 90% comparado com a biblioteca NIST. F.M. fórmula molecular; T.R. tempo de retenção; A.R. área relativa do pico calculada pelo CG-EM (%); F.H. fração hexano; F.D. fração diclorometano. (-) ausência do composto. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ácidos oleico e linoleico foram identificados nas frações hexano e diclorometano do micélio de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*. No entanto, não é possível afirmar que estes ácidos são os responsáveis pela inibição enzimática, uma vez que estes ácidos também foram identificados no extrato das partições do micélio cultivado em *mSin* (Tabela 13). Um estudo mais detalhado envolvendo a purificação e análise dos compostos se faz necessário a fim de confirmar a ação dos ácidos graxos oleico e linoleico extraídos do micélio de *G. lipsiense* em relação a inibição da enzima α -glicosidase, bem como a ação de outros compostos não identificados presentes na fração hexano do extrato micelial de *G. lipsiense* cultivado em *mBA*.

A análise comparativa entre os compostos identificados nas frações hexano e diclorometano das partições dos cultivos em FES (Tabela 6) e FS do micélio em *mSin* (Tabela 13) e *mBA* (Tabela 20), mostra que apenas os ácidos hexadecanóico, etil ester; ácido linoleico, etil ester; ácido octadecanóico, etil ester e ácido palmítico foram identificados nos diferentes tipos e meios de cultivo concomitantemente, pelo método utilizado. O *mSin* promoveu uma diversidade de biocompostos não identificados quando cultivado em arroz vermelho pelo mesmo método de cultivo. No entanto, o arroz utilizado como substrato, também mostrou maior diversidade de compostos quando cultivado em FES. Tais resultados comprovam que a síntese dos biocompostos pelo mesmo microrganismo, é diretamente influenciada pelo tipo e meio de cultivo, conforme já descrito na literatura.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas relacionadas à produção e desenvolvimento tecnológico envolvendo fungos do gênero *Ganoderma* têm atraído muita atenção no que se refere à busca por novos agentes com propriedades biológicas e terapêuticas. O fungo *G. lucidum* é o mais estudado dentro do gênero, em virtude da diversidade de compostos por ele produzidos e descritos na literatura. O fungo *G. lipsiense* ainda é pouco estudado, frente aos estudos com *G. lucidum* e *G. applanatum*. No entanto, compostos já identificados em corpos de frutificação de *G. lipsiense* (RÖSECKE e KÖNIG, 2000) demonstram grande potencial biológico e terapêutico. De forma geral, foi possível mostrar neste estudo de tese, a diversidade de compostos bioativos produzidos pelo fungo *G. lipsiense* com atividades biológicas quando cultivado em meio a base de arroz vermelho e em meio sintético (Tabela 21). Dentre as atividades biológicas testadas, propriedades antiparasitárias e inibidoras da enzima α -glicosidase ainda não haviam sido reportadas para esta espécie na literatura.

O uso do arroz vermelho se mostrou um substrato interessante para o cultivo de *G. lipsiense*. Seu uso tem sido descrito como um substrato estimulante na produção de antioxidantes, compostos fenólicos, inibidores enzimáticos, produção de enzimas e cumarinas (KIM et al., 2010; HASNAT et al., 2013; HASNAT et al., 2015; ABD EL-HADY et al., 2016) em processos envolvendo fungos filamentosos. Apesar da literatura descrever o uso do arroz como um substrato utilizado na produção de cumarinas em cultivos de *F. officinalis* (HWANG et al., 2013), *T. flavus* (HE et al., 2014b), *Pestalotiopsis* sp (XU et al., 2009) e *G. lucidum* (HASNAT et al., 2013), para o fungo *G. lipsiense* o arroz não mostrou influência na produção de moléculas de cumarinas inicialmente almejadas e avaliadas nesta pesquisa: cumarina simples, 4-metilumbeliferona, escopoletina e umbeliferona, uma vez que estas não foram identificadas nas análises por HPLC-ESI-MS/MS dos extratos bruto. No entanto, uma fluorescência azul foi observada tanto no cultivo sólido com arroz, como nos cultivos líquidos em meio sintético e em meio a base de arroz vermelho, mas sem êxito em seu isolamento e identificação por CG-EM. A literatura (WAGNER e BLADT, 1996) cita que ácidos carboxílicos ligados a um fenol, como o ácido cafeico e ácido clorogênico mostram fluorescência azul ou azul-esverdeada em UV 365 nm. O ácido cafeico foi identificado nos extratos bruto do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho no estudo cinético. No entanto, os resultados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS identificaram sua presença apenas entre 35 e 49 dias e as manchas fluorescentes são perceptíveis a partir de 7 dias,

com aumento de intensidade até 63 dias. Além do mais, ensaios de cromatografia de camada delgada mostraram valores de referência distintos para ácido cafeico e para o composto da amostra, descartando a hipótese da fluorescência ser decorrente da produção de ácido cafeico.

De acordo com as vias biossintéticas descritas na literatura (DEWICK, 2002; LIN et al. 2013), algumas cumarinas, ácido cafeico e vanilina podem ser obtidos a partir de rotas metabólicas envolvendo o ácido *p*-cumárico, um composto fenólico constituinte do arroz. Neste caso, a presença do ácido *p*-cumárico no substrato poderia atuar como um agente indutor na produção destes compostos. Em se tratando de uma conversão microbiana, o ácido *p*-cumárico pode ter sido o agente de estímulo para a produção de ácido cafeico, identificado entre 35 e 49 dias de cultivo. No entanto, para a afirmação da bioconversão do ácido cafeico a partir do ácido *p*-cumárico se faz necessário a avaliação da presença da enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilase (4HPA3H) descrita como responsável por tal rota de conversão (LIN et al. 2013). Porém, pode-se afirmar que o fungo produziu o ácido cafeico assim como o ácido siríngico na presença de arroz, uma vez que estes ácidos não foram identificados no substrato (arroz), quando utilizado técnicas de identificação envolvendo HPLC-ESI-MS/MS. O cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho também se mostrou interessante na produção de vanilina, chegando a atingir maiores valores em 49 dias ($0,019 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 63 dias ($0,017 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), enquanto no arroz, o teor de vanilina ficou abaixo do limite de detecção do método utilizado, o que impossibilitou sua quantificação no meio controle. Ácido cafeico, ácido siríngico e vanilina foram identificados pela primeira vez para esta espécie de *Ganoderma*. Em se tratando de cumarinas, compostos contendo núcleos de cumarinas foram sugeridos apenas nas análises de CG-EM após purificação em coluna do micélio de *G. lipsiense* quando cultivado por FS em meio sintético. Tais observações sugerem que o fungo *G. lipsiense* mostra potencial de produção de moléculas de cumarinas. No entanto, este potencial está relacionado a sua produção de maneira intracelular e na ausência de arroz.

Além dos compostos fenólicos identificados, o esteroide ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, identificado no cultivo em FES, também é inédito para o gênero *Ganoderma*. Este composto foi identificado anteriormente no cogumelo *L. edodes* (Shiitake) e no ascomiceto *G. lavendula* (MALAK et al., 2013) e até o momento, propriedades inibitórias significativas da enzima tirosinase ($\text{IC}_{50} 6.9 \pm 2.2 \mu\text{M}$) haviam sido atribuídas ao presente composto (NHIEM et al., 2015). Neste estudo, o esteroide identificado foi avaliado quanto às atividades antibacterianas,

antiparasitárias e inibitórias da enzima α -glicosidase. Dentre as atividades testadas, o composto mostrou atividade somente contra *G. duodenalis*, reduzindo 93,4% dos trofozoitos vivos na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. É a primeira vez que a atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* é atribuída ao composto ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, bem como ao fungo *G. lipsiense*. Além do esteroide identificado, outros compostos produzidos por *G. lipsiense* presentes no extrato bruto e na fração hexano indicam possuir atividade antiparasitária contra *G. duodenalis*, um parasita causador da giardíase, uma doença negligenciável muito comum em regiões de clima tropical (LENZI et al., 2018). Com relação às atividades antibacterianas, os extratos brutos e purificados por partição líquido/líquido do cultivo do fungo *G. lipsiense* cultivado em arroz por FES, produziram compostos capazes de atuar como moderados agentes antibacterianos contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Ainda no meio de cultivo sólido, o fungo *G. lipsiense* produziu maior diversidade de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos quando comparado ao micélio cultivado em meio a base de arroz vermelho por FS, sendo a maioria dos ácidos graxos identificados, em ambos os casos, de importância terapêutica (FUKUZAWA et al., 2008; SIVAKUMAR et al., 2011; SHAMEEM et al., 2017). A comparação dos resultados obtidos (Tabela 21) demonstra que o cultivo em arroz utilizando FES, favoreceu a produção de compostos apolares, especialmente ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos. No micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio sintético, além de importantes ácidos graxos, identificados também no micélio cultivado em meio a base de arroz vermelho, foram identificados esteroides, sesquiterpenos e outros compostos intermediário da síntese de estatinas. A maioria dos compostos identificados no micélio cultivado em meio sintético tem sido retratada na literatura pelo amplo potencial terapêutico, especialmente como antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidantes, além de atividades antitumorais e anti-hipercolesterolêmicas. Estes resultados mostram o potencial do fungo *G. lipsiense* na produção de compostos bioativos obtidos na forma micelial, não sendo necessário a obtenção do basidiocarpo fúngico para sua extração.

Em relação ao cultivo de *G. lipsiense* em arroz por FES, os extratos se mostraram promissores em se tratando de agentes antimicrobianos e antiparasitários. No caso da atividade antiparasitária, o micélio fúngico cultivado em meio sintético mostrou elevadas atividades contra trofozoitos do parasita, não diferindo significativamente dos extratos do cultivo em FES. No entanto, o cultivo sólido não foi favorável para a inibição da enzima α -glicosidase. Isso ocorre porque cereais como o

arroz, podem atuar como inibidores enzimáticos da α -glicosidase (YAO et al., 2010; PRAMAI et al., 2017), fato demonstrado neste estudo. O arroz vermelho inibiu 91,12% da enzima, não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao extrato micelial de *G. lipsiense* em meio a base de arroz (96,6%) e meio sintético (99,1%). Apesar de ambos os extratos miceliais inibirem a enzima, com baixos valores de IC_{50} (0,269 $mg \cdot mL^{-1}$ para o meio a base de arroz e 0,218 $mg \cdot mL^{-1}$ para meio sintético), os diferentes tipos de inibição enzimática observados para cada extrato e os diferentes percentuais inibitórios das amostras após purificação por partição, indicam que o fungo produziu compostos diferentes quando cultivado em meio a base de arroz vermelho e meio sintético. A literatura descreve a influência do meio e condições de cultivo na síntese de compostos microbianos. Esta diferença de compostos produzidos pelo fungo quando cultivado em meios distintos também foi comprovada quando avaliado os compostos identificados nas frações hexano e diclorometano por CG-EM para o extrato micelial de *G. lipsiense* cultivado em meio a base de arroz vermelho e meio sintético.

Tabela 21 – Comparativo das variáveis analisadas *versus* tipo de cultivo e meio utilizado com o fungo *G. lipsiense*

Variáveis	FES	FS (arroz vermelho)	FS (sintético)
Identificação de compostos	<p>Identificação de 6 compostos fenólicos - ácido cafeico, ácido siríngico e vanilina foram produzidos pelo fungo e são inéditos para a espécie fúngica;</p> <p>Identificação de 18 ácidos graxos e derivados – 4 ácidos graxos no arroz e 14 ácidos graxos e derivados produzidos pelo fungo nas frações hexano e diclorometano da partição líquido/líquido do extrato bruto;</p> <p>Identificação do esteroide ergosta-6,22-dieno-3β,5α,8α-trioi – inédito para o gênero fúngico.</p>	<p>A identificação de compostos fenólicos não foi realizada;</p> <p>Identificação de 10 ácidos graxos e derivados produzidos pelo fungo, dos quais 7 ácidos graxos e derivados foram identificados no cultivo em FES;</p>	<p>A identificação de compostos fenólicos não foi realizada;</p> <p>Identificação de 31 compostos - ácidos graxos e derivados, triterpeno, álcool e vitamina, dos quais 14 ácidos graxos e derivados foram identificados no cultivo em FES;</p> <p>Identificação de 30 compostos nas frações purificadas em coluna - ácidos graxos e derivados, aldeído, álcool poliinsaturado, sesquiterpeno, esteroides e intermediários na síntese de estatinas. A maioria dos compostos identificados são inéditos para a espécie fúngica.</p>

Continuação da Tabela 21

Atividades antibacterianas	<p>Atividade contra <i>P. aeruginosa</i> nos extratos bruto dos dias 42 e 63 no cultivo cinético;</p> <p>Atividade contra <i>P. aeruginosa</i> no extrato bruto e na fração diclorometano purificada do extrato bruto;</p> <p>Atividade contra <i>S. aureus</i> na fração acetato de etila purificada do extrato bruto.</p> <p>Esteróide isolado e identificado não apresentou atividade antibacteriana;</p> <p>Meio controle (arroz) não mostrou atividade antibacteriana.</p>	Não foi avaliada	Não foi avaliada
Atividades antiparasitárias	<p>Atividade contra <i>G. duodenalis</i> no extrato bruto e na fração hexano purificada nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;</p> <p>Esteróide isolado e identificado mostrou atividade contra <i>G. duodenalis</i> na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;</p> <p>Meio controle (arroz) mostrou atividade antiparasitária baixa na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.</p>	Não foi avaliada	<p>Atividade contra <i>G. duodenalis</i> no extrato bruto, na fração hexano e a fração diclorometano purificadas nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e na fração acetato de etila purificada na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;</p> <p>A atividade antiparasitária do extrato bruto e da fração hexano não diferiu significativamente dos resultados obtidos para o cultivo em FES.</p>
Atividades inibitórias da enzima α -glicosidase	<p>O meio controle (arroz) mostrou alta inibição enzimática;</p> <p>Esteróide isolado e identificado não apresentou atividade inibitória;</p> <p>Extratos bruto fermentados mostraram perda de inibição enzimática ao longo do cultivo, com redução significativa a partir de 35 dias.</p>	<p>O micélio mostrou inibição enzimática (> 95%) com valores para IC_{50} de 0,269 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;</p> <p>Inibição enzimática do tipo competitiva;</p> <p>Prevalência de compostos apolares (fração hexano) com atividade inibitória da enzima indicando efeito predominante de compostos apolares.</p>	<p>O micélio mostrou inibição enzimática (> 95%) com valores para IC_{50} de 0,218 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;</p> <p>Inibição enzimática do tipo incompetitiva;</p> <p>Prevalência de compostos de baixa e média polaridade (frações diclorometano e acetato de etila) com atividades inibitórias da enzima indicando efeito sinérgico.</p>

Fonte: Elaborado pelo autor.

O comparativo mostrado na Tabela 21, evidencia que o fungo *G. lipsiense* possui potencial de produção de compostos bioativos e que cultivo em meio sintético foi favorável para a produção de distintas classes de compostos não identificados quando cultivado em arroz vermelho. No entanto, no que se refere à atividade antiparasitária, ambos os tipos de cultivo (FES e FS) e meios (arroz vermelho e sintético) mostram potencial contra *G. duodenalis*. Em se tratando de inibição enzimática da α -glicosidase, os cultivos em FES não foram favoráveis para a produção de compostos bioativos com tal habilidade.

6. CONCLUSÕES

Após a realização desta pesquisa, pode-se concluir que:

Os fungos *G. lucidum*, *G. applanatum* e *G. lipsiense* têm capacidade de se multiplicar em meio sólido contendo arroz vermelho. Porém, em meio sólido (FES utilizando arroz vermelho), não foi possível identificar a presença de cumarinas pelas técnicas utilizadas neste estudo. No entanto, foram identificados compostos como ácido cafeico, ácido siríngico e vanilina produzidos pelo fungo *G. lipsiense*. Esses três compostos fenólicos identificados são inéditos, até o momento, para esta espécie fúngica.

Além disso, a identificação do esteroide, ergosta-6,22-dieno-3 β ,5 α ,8 α -triol, também inédito para o gênero fúngico, foi obtido por meio da caracterização e identificação de compostos apolares dos extratos de *G. lipsiense*. É a primeira vez que a atividade antiparasitária contra *G. duodenalis* é reportada para o esteroide identificado, bem como em extratos do fungo *G. lipsiense*. O potencial antibacteriano do extrato do fungo *G. lipsiense* nos estudos em FES, também foi constatado, sendo este contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Os cultivos realizados na ausência de arroz (meio sintético) e na presença de arroz (FES e FS) comprovaram, por meio de estudos de caracterização e identificação, a influência do meio de cultivo na produção de diversos biocompostos. Os estudos de inibição enzimática da α -glicosidase mostraram que o arroz, quando empregado como substrato em FES, não favorece o metabolismo do fungo para a síntese de biocompostos com propriedades inibitórias. Tal conclusão se deve ao fato de que, o cereal inibiu a enzima e sua atividade inibidora reduziu com o passar do tempo de cultivo. Com base nas condições avaliadas neste estudo, a inibição da enzima indica ser decorrente de compostos celulares constituintes do micélio do fungo *G. lipsiense*. O micélio do fungo cultivado em *mBA*, expressa em sua maioria, compostos inibidores da enzima de características apolares, atuando preferencialmente de forma competitiva com o substrato, enquanto o micélio cultivado em meio sintético atua de maneira incompetitiva.

Com relação aos compostos identificados no micélio de *G. lipsiense* cultivado em meio sintético, parte deles foram identificados pela primeira vez na espécie fúngica e são reconhecidos na literatura por

suas importantes propriedades biológicas e terapêuticas. As cumarinas, moléculas de alvo inicial desta pesquisa, foram sugeridas no micélio fúngico por CG-EM. Tais sugestões levam a supor que o arroz vermelho não foi relevante para a produção de cumarinas pelo fungo *G. lipsiense*.

Esta pesquisa envolvendo o fungo *G. lipsiense* abriu uma diversidade de novas linhas de trabalho, sejam estas em FES ou em FS, visando a obtenção de compostos bioativos com propriedades biológicas e terapêuticas relacionadas a agentes antiparasitários, antibacterianos e inibidores da enzima α -glicosidase, visando o tratamento de doenças como, infecções ocasionadas por bactérias patogênicas, giardíase e diabete mellitus, além da produção de compostos fenólicos de importância comercial e terapêutica.

Como sugestões para trabalhos futuros, visando melhorar as condições de processo para aumento da produtividade, propõem-se aprofundamento nos itens:

Verificar a influência de outras espécies de arroz na produção de compostos fenólicos como o ácido cafeico, o ácido siríngico e a vanilina, bem como sua influência na produção de cumarinas pelo fungo *G. lipsiense*;

Isolar novos compostos presentes na fração hexano do cultivo em FES e testar quanto a atividade antiparasitária contra *G. duodenalis*, assim como testar as demais frações obtidas da partição líquido/líquido;

Realizar estudos de otimização para a produção de compostos com atividade antiparasitária e inibidores da enzima α -glicosidase, avaliando também o caldo micelial do cultivo em FS;

Avaliar a citotoxicidade do fungo em relação a células viáveis para futuros estudos *in vivo* no tratamento de doenças como giardíase e diabete mellitus;

Realizar novos estudos antiparasitários em cistos de *G. duodenalis* buscando minimizar os problemas de transmissão da giardíase e não somente seu tratamento no hospedeiro;

Estudar novos métodos de extração e purificação dos compostos bioativos obtidos a partir dos cultivos em FES e FS do fungo *G. lipsiense*, testando novos solventes e técnicas extrativas, com vistas a identificação de novos compostos de alta polaridade.

REFERÊNCIAS

ABD EL-HADY, F.K.; ABDEL-AZIZ, M.S.; SHAKER, K.H.; EL-SHAHID, Z.A. Effect of Media Composition on Potentiality Improving α -Glicosidase Inhibitory Activity for the Soft Coral Associated Fungus *Aspergillus unguis* SPMD-EGY. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.38, p.173-180, 2016.

ABRAHAM, B.G.; BERGER, R.G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2344-2348, 1994.

ABUBAKAR, M.N.; MAJINDA, R.R.T. GC-MS Analysis and Preliminary Antimicrobial Activity of *Albizia adianthifolia* (Schumach) and *Pterocarpus angolensis* (DC). **Medicines**, v.3, p.1-9, 2016.

ADAMS, M.; CHRISTEN, M.; PLITZKO, I.; ZIMMERMANN, S.; BRUN, R.; KAISER, M.; HAMBURGER, M. Antiplasmodial Lanostanes from the *Ganoderma lucidum* mushroom. **Journal of Natural Products**, v.73, p.897-900, 2010.

ADEYEMI M.; EKUNSEITAN, D.A.; ABIOLA, S.S.; DIPEOLU, M.A.; EGBEYALE, L.T.; SOGUNLE, O.M. Phytochemical Analysis and GC-MS Determination of *Lagenaria breviflora* R. Fruit. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v.9, p.1045-1050, 2017.

AGUIRRE-PRANZONI, C.; ORDEN, A.A.; BISOGNO, F.R.; ARDANAZ, C.E.; TONN, C.E.; KURINA-SANZ, M. Coumarin metabolic routes in *Aspergillus* spp. **Fungal Biology**, v.115, p.245-252, 2011.

AHMED, S.; MUSTAFA, G.; ARSHAD, M.; RAJOKA, M.I. Fungal Biomass Protein Production from *Trichoderma harzianum* Using Rice Polishing. **Biomed Research International**, v.2017, p.1-9, 2017.

AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; LINDEQUIST, U. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Volatile Oil of *Ganoderma pfeifferi* Bres. **Medicines**, v.3, p.1-8, 2016.

ALEXANDRE, T.R.; LIMA, M.L.; GALUPPO, M.K.; MESQUITA, J.T.; NASCIMENTO, M.A.; dos SANTOS, A.L.; SARTORELLI, P.; PIMENTA, D.C.; TEMPONE, A.G. Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.23, p.1-10, 2017.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. **Introducción a La Microbiología**. Ed. Omega, S.A. Plató, Barcelona, 1985.

ALVARADO, I.E.; NAVARRO, D.; RECORD, E.; ASTHER, M.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Fungal biotransformation of *p*-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 157-160, 2003.

ALVARENGA, F. C. R.; GARCIA, E. F.; BASTOS, E. M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M. G. R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 442-448, 2009.

AMALRAJ, A.; PIUS, A.; GOPI, S.; GOPI, S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.7, p.205-233, 2017.

ANAGNOSTOPOULOU, M.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, p.19-25, 2006.

ANKITA, S.; TRIBHUWAN, S.; REKHA, V. GC-MS analysis of bioactive phytoconstituents from *Rumex Vesicarius* L. **International Research Journal of Pharmacy**, v.6, p.269-272, 2015.

ANUSHA, N.C.; HIRZUN, M.Y.; UMIKALSOM, M.S.; LING, T.C.; ARIFF, A.B. Comparative study on lipase production using solid state and submerged fermentation systems by several fungal strains and the predicted molecular characteristics. **Minerva Biotechnologica**, v.29, p.53-61, 2017.

ARAGONÈS, G.; DANESI, F.; DEL RIO, D.; MENA, P. The importance of studying cell metabolism when testing the bioactivity of phenolic compounds. **Trends Food Science Technology**, v.69 p.230-242, 2017.

ARATANEHEMUGE, Y.; KOMIYA, T.; MOTEKI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; HIBASAMI, H. Selective induction of apoptosis by ar-turmerone isolated from turmeric (*Curcuma longa* L) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line. **International Journal of Molecular Medicine**, v.9, p.481-484, 2002.

ARTANTI, N.; TACHIBANA, S.; KARDONO, L.B.S. SUKIMAN, H. Isolation of α -glucosidase Inhibitors Produced by an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. TSC13 from *Taxus sumatrana*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.15, p.673-679, 2012.

APARNA, V.; DILEEP, K.V.; MANDAL, P.K.; KARTHE, P.; SADASIVAN, C.; HARIDAS, M. Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. **Chemical Biology and Drug Design**, v.80, p.434-439, 2012.

ASLAM K, KHOSA MK, JAHAN N, NOSHEEN S Synthesis and applications of coumarin. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.23, p.449-454, 2010.

AWLA, H.K.; KADIR, J.; OTHMAN, R.; RASHID, T.S.; WONG, M.Y. Bioactive Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Isolate UPMRS4 and Antifungal Activity against *Pyricularia oryzae*. **American Journal of Plant Sciences**, v.7, p.1077-1085, 2016.

BABY, S.; JOHNSON, A.J.; GOVINDAN, B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v.114, p.66-101, 2015.

BAILLY, F.; COTELLE, P. Anti-HIV Activities of Natural Antioxidant Caffeic Acid Derivatives: Toward an Antiviral Supplementation Diet. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.1811-1818, 2005.

BAO, F.; YANG, K.; WU, C.; GAO, S.; WANG, P.; CHEN, L.; LI, H. New natural inhibitors of hexokinase 2 (HK2): Steroids from *Ganoderma sinense*. **Fitoterapia**, v.125, p.123-129, 2018.

BATOVSKA, D.I.; TODOROVA, I.T.; TSVETKOVA, I.V.; NAJDENSKI, H.M. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, p.43-47, 2009.

BENZ, I.; MUHEIM, A. Biotechnological Production of Vanillin. In: **Flavor Science. Recent Developments**. No 197; Taylor, A.J.; Mottram, D.S. The Royal Society of Chemistry. Great Britain, Special Publication, 1996.

BERNATS, M.; JUHNA, T. Factors Governing Degradation of Phenol in Pharmaceutical Wastewater by White-rot Fungi: A Batch Study. **The Open Biotechnology Journal**, v.9, p. 93-99, 2015.

BORZANI, W. Cinética de reações enzimáticas. In: Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. **Biotecnologia Industrial**, v.1, 1º Ed, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BPDB: BIO-PESTICIDES DATABASE. University of Hertfordshire. Octenol. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/Reports/2063.htm>. Acesso em: 09 de nov. de 2018.

CAMPBELL, C.D.; VEDERAS, J.C. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers**, v.93, p.755-763, 2010.

CAO, J.L.; SHEN, S.L.; YANG, P.; QU, J. A catalyst-free one-pot construction of skeletons of 5-methoxyseselin and alloxanthoxyletin in water. **Organic Letters**, v.15, p.3856–3859, 2013.

CAO, F.R.; XIAO, B.X.; WANG, L.S.; TAO, X.; YAN, M.Z.; PAN, R.L.; LIAO, Y.H.; LIU, X.M.; CHANG, Q. Plasma and brain pharmacokinetics of ganoderic acid A in rats determined by a developed UFLC–MS/MS method. **Journal of Chromatography B**, v.1052, p.19-26, 2017.

CHAN, K.M.; YUE, G.G.; LI, P.; WONG, E.C.; LEE, J.K.; KENNELLY, E.J.; LAU, C.B. Screening and analysis of potential anti-tumor components from the stipe of *Ganoderma sinense* using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry

with multivariate statistical tool. **Journal of Chromatography A**, v.3, p.162-167, 2017.

CHEN, Y.J.; SHIAO, M.S.; WANG, S.Y. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. **Anti-cancer Drugs** v.12 p.143–149, 2001.

CHEN, Z.; YANG, Z.; GU, Z. Determination of Volatile Flavor Compounds in *Ganoderma lucidum* by HSSPME-GC-MS. **Food Research and Development**, v.2, 2010.

CHEN, X.Q.; ZHAO, J.; CHEN, L.X.; WANG, S.F.; WANG, Y. Lanostane triterpenes from the mushroom *Ganoderma resinaceum* and their inhibitory activities against α -glucosidase. **Phytochemistry**, v.149, p.103-115, 2018.

CHOI, J.H.; KIM, S. Mechanisms of attenuation of clot formation and acute thromboembolism by syringic acid in mice. **Journal of Functional Foods**, v.43, p.112-122, 2018.

CHUDZIK, M.; SZLACHETA, I.K.; KRÓL, W. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. **Molecules**, v.20, p.1610-1625, 2015.

CHUNG, T.W.; MOON, S.K.; CHANG, Y.C.; KO, J.H.; LEE, Y.C.; CHO, G.; KIM, S.H.; KIM, J.G.; KIM, C.H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **FASEB J**, v.18, p.1670-1681, 2004.

CILERDZIC, J.; VUKOJEVIC, J.; STAJIC, M.; STANOJKOVIC, T.; GLAMOCLIIJA, J. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.1, p.312-319, 2014.

CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, (M100-S22/ v. 32, n. 3).

CÖR, D.; BOTIC, T.; KNEZ, Z.; GREGORI, A.; POHLEVEN, F. The effects of different solvents on bioactive metabolites and “in vitro”

antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body and primordia extracts. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.36, p.129-141, 2017.

CORREA, E.; CARDONA, D.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; FRANCO, A.E.; VÉLEZ, I.D.; ROBLEDO, S.; ECHEVERRI, F. Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. **Phytotherapy Research**, v.20, p.497-499, 2006.

CORTÉS, S.A.J.; MOSQUEDA, O.T. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundários de interés biotecnológico. **Química Viva** v.2, p.64-90, 2013.

COSTA, B.de O.; NAHAS, E. Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. **Brazilian Journal of Microbiology** v.43, p.332-340, 2012.

COSTA, T.M.; TAVARES, L.B.B.; De OLIVEIRA, D. Fungi as a source of natural coumarins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.15, p.6571-6584, 2016.

COSTA, T.M.; TAVARES, L.B.B. **Processo biotecnológico de obtenção de Lipases e Biossurfactantes. Cultivo em sistema sólido**. Novas Edições Acadêmicas, Saarbrücken, Deutschland / Niemcy, 2017.

DA CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos Da Biodiversidade Brasileira: Uma Oportunidade De Transformar Conhecimento Em Valor Econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DA SILVA, C. R.; GOMES, V. S.; KULKAMP, I.C.; KANIS, L.A. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.594-599, 2008.

DARU, J.; STIRLING, A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. **Journal of Organic Chemistry**, v.76, p.8749-8755, 2011.

DEL VALLE, P.; MARTÍNEZ, A.L.; FIGUEROA, M.; RAJA, H.A.; MATA, R. Alkaloids from the Fungus *Penicillium spathulatum* as α -Glicosidase Inhibitors[*]. **Planta Medica**, v.82, p.1286-1294, 2016.

DENISON, S.H. pH Regulation of Gene Expression in Fungi. **Fungal Genetics Biology**, v.29, p. 61-71, 2000.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**, 2nd ed , John Wiley & Sons, LTD, England, 2002.

DURIGAN, M. **Estudos genético-moleculares em *Giardia duodenalis*: caracterização da diversidade genética e análises populacionais em amostras clínicas e ambientais na região metropolitana de Campinas, São Paulo, Brasil**. 2015. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2015.

ELKHATEEB, W.A.; ZAGHLOL, G.M.; EL-GARAWANI, I.M.; AHMED, E.F.; RATEB, M.E.; MONEIM, A.E.A. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis through different pathways: *In vivo* and *in vitro* anticancer studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.101, p.264-277, 2018.

ERGÖNÜL, P.G.; AKATA, I.; KALYONCU, F.; ERGÖNÜL, B. Fatty Acid Compositions of Six Wild Edible Mushroom Species. **The Scientific World Journal**, p.1-4, 2013.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Coleção Biotecnologia, EDUCS, 2004.

FACHE, M.; BOUTEVIN, B.; Caillol, S. Vanillin production from lignin and its use as a renewable chemical. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.4, p.35-46, 2016.

FAGUNDES, M.B.; FALK, R.B.; FACCHI, M.M.X.; VENDRUSCOLO, R.G.; MARONEZE, M.M.; ZEPKA, L.Q.; LOPES, E.J.; WAGNER, R. Insights in cyanobacteria lipidomics: A sterols characterization from *Phormidium autumnale* biomass in heterotrophic cultivation. **Food Research International, In Press**, 2018.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2000. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, segundo fascículo.

FATMAWATI, S.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Ganoderol B: a potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Phytomedicine**, v.18, p.1053-1055, 2011.

FARINAS, C.S.; Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.52, p.179-188, 2015.

FIGUEIRÓ, G.G.; GRACIOLLI, L.A. Influencia da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia** de Lavras, v.35, p.924-930, 2011.

FUKUZAWA, M.; YAMAGUCHI, R.; HIDE, I.; CHEN, Z.; HIRAI, Y.; SUGIMOTO, A.; YASUHARA, T.; NAKATA, Y. Possible Involvement of Long Chain Fatty Acids in the Spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to Its Anti-tumor Activity. **Biological and Pharamceutical Bulletin**, v.31, n.10, p.1933-1937, 2008.

GALLAGE, N.J.; MØLLER, B.L. Vanillin–Bioconversion and Bioengineering of the Most Popular Plant Flavor and Its *De Novo* Biosynthesis in the Vanilla Orchid. **Molecular Plant**, v.8, p. 40-57, 2015.

GAO, P.; HIRANO, T.; CHEN, Z.; YASUHARA, T.; NAKATA, Y.; SUGIMOTO, A. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). **Fitoterapia**, v.83, n.3, p.490-499, 2012.

GAŞECKA, M.; MAGDZIAK, Z.; SIWULSKI, M.; MLECZEK, M. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. **European Food Research and Technology**, v.244, p.259-268, 2018.

GESTETNER, B.; CONN, E.E. The 2-hydroxylation of *trans*-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* desr. **Archieves of Biochemistry and Biophysics**, v.163, p. 617-624, 1974.

- GIDEON, V.A. GC-MS analysis of phytochemical components of *Pseudoglochidion anamalayanum* Gamble: An endangered medicinal tree. **Pelagia Research Library**, v.5, p.36-41, 2015.
- GNONLONFIN, G.J.B.; SANNI, A.; BRIMER, L. Review Scopoletin – A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.31, p.47-56, 2012.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Inhibitory Properties of Phenolic Compounds against enzymes linked with Human Diseases. In Phenolic Compounds – **Biological Activities**. SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; del ROSARIO, M.; InTech, 2017; Chapter 6, 99-118.
- GOPALAKRISHNAN, K.; UDAYAKUMAR, R. GC-MS Analysis of Phytocompounds of Leaf and Stem of *Marsilea quadrifolia* (L.). **International Journal of Biochemistry Research & Review**, v.4, p.517-526, 2014
- GROCHANKE, B.S; GEHRKE, I.T.S.; GOETTEMES-FIORIN, P.B.; BRUXEL, M.A.; BASSO, E.G.P.; HECK, T.G.; LUDWIG, M.S. Compostos fenólicos da casca de *Handroanthus heptaphyllus* (Mart.) Mattos e efeitos do extrato aquoso no perfil lipídico, glicêmico e na lipoperoxidação em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, p.264-272, 2016.
- HAIDER, K.; MARTIN, J.P. Synthesis and Transformation of Phenolic Compounds by *Epicoccum nigrum* in Relation to Humic Acid Formation. **Soil Science Society of America Journal**, v.31, p.766-772, 1967.
- HAKKIM, F.L.; AL-BULOSHI, M.; ACHANKUNJU, J. Chemical composition and anti-proliferative effect of Oman's *Ganoderma applanatum* on breast cancer and cervical cancer cells. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v.11, p.145-151, 2016.
- HASNAT MA, PERVIN M, LIM BO. Acetylcholinesterase inhibition and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. **Molecules** v. 18, p.6663-6678, 2013.

HASNAT, M.A.; PERVIN, M.; CHA, K.M.; KIM, S.K.; LIM, B.O. Anti-inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF- κ B pathways.

Phytochemistry, v.114, p.125-136, 2015.

HASHIM, S.N.N.S.; SCHWARZ, L.J.; DANYLEC, B.; MITRI, K.; YANG, Y.; BOYSEN, R.I.; HEARN, M.T.W. Recovery of ergosterol from the medicinal mushroom, *Ganoderma tsugae* var. Janniae, with a molecularly imprinted polymer derived from a cleavable monomer-template composite. **Journal of Chromatography A**, v.1468, p.1-9, 2016.

HASKINS, F.A.; WILLIAMS, L.G.; GORZ, H.J.; Light-induced *trans* to *cis* conversion of beta-*d*-glucosyl *o*-hydroxycinnamic acid in *Melilotus alba* leaves. **Plant Physiology**, v.39, p.777-781, 1964.

HAZALIN, N.A.M.N.; RAMASAMY, K.; LIM, S.M.; COLE, A.L.J.; MAJEED, A.B.A. Induction of apoptosis against cancer cell lines by four ascomycetes (endophytes) from Malaysian rainforest.

Phytomedicine, v.19, 609-617, 2012.

HE, J.W.; MU, Z.Q.; GAO, H.; CHEN, G.D.; ZHAO, Q.; HU, D.; SUN, J.Z.; LI, X.X.; LI, Y.; LIU, X.Z.; YAO, X.S. New polyesters from *Talaromyces flavus*. **Tetrahedron**, v.70, n.29, p.4425-4430, 2014 (a).

HE, J.W.; QIN, D.P.; GAO, H.; KUANG, R.Q.; YU, Y.; LIU, X.Z.; YAO, X.S. Two New Coumarins from *Talaromyces flavus*. **Molecules**, v.19, p.20880 – 20887, 2014 (b).

HELENO, S.A.; FERREIRA, I.C.F.R.; ESTEVES, A.P.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; MARTINS, A.; SOKOVIC, M.; QUEIROZ, M.J.R.P. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food Chemistry and Toxicology**, v.58, p. 95-100, 2013.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. **Phytotherapy Research**, v.20, p.239-249, 2006.

- HONG, C.J.; LIOU, Y.J.; TSAI, S.J. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. **Brain Research Bulletin**, v.86, p.287-297, 2011.
- HROBONOVÁ, K.; SPEVAK, A.; SPISSKÁ, L.; LEHOTAY, J.; CIZMÁRIK, J.; Application of umbelliferone molecularly imprinted polymer in analysis of plant samples. **Chemical Papers** v.67, p.477-483, 2013.
- HU, K.; JIN, G.J.; MEI, W.C.; LI, T.; TAO, Y.S. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum/S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. **Food Chemistry**, v.239, p.495-501, 2018.
- HUANG, W.C.; TSAI, T.H.; CHUANG, L.T.; LI, Y.Y.; ZOUBOULIS, C.C.; TSAI, P.J. Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. **Journal of Dermatological Science**, v.73, p.232-240, 2014.
- HUESGEN, A. G. Analysis of natural and artificial vanilla preparations. Agilent Application Solution. Application Note. Agilent Technologies Inc, USA, September, 1, 2011.URL(http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Natural_and_Artificial_Vanilla.pdf). July, 2017.
- HUIE, C.W.; DI, X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **Journal of Chromatography B**, v.812, p.241-257, 2004.
- HWANG, C.H.; JAKI, B.U.; KLEIN, L.L.; LANKIN, D.C.; McALPINE, J.B.; NAPOLITANO, J.G.; FRYLING, N.A.; FRANZBLAU, S.G.; CHO, S.H.; STAMETS, P.E.; WANG, Y.; PAULI, G.F. Chlorinated Coumarins from the Polypore Mushroom *Fomitopsis officinalis* and Their Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Natural Products**, v.76, p.1916-1922, 2013.
- INDRIANINGSIH, A.W.; TACHIBANA, S. α -Glicosidase inhibitor produced by an endophytic fungus, *Xylariaceae* sp. QGS 01 from *Quercus gilva* Blume. **Food Science and Human Wellness**, v.6, p.88-95, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
INVENTAIRE NATINAL DU PATRIMONE NATUREL (INPN).
Ganoderma lipsiense (Batsch) G.F. Atkinson. Disponível em:
https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/42547. Acesso em: 22 ago.17.

ISLAM, M.N.; JUNG, H.A.; SOHN, H.S.; KIM, H.M.; CHOI, J.S.
Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from
Artemisia capillaris. **Archives of Pharmacal Research**, v.36, p.542-
552, 2013.

ISLAM MR, OMAR M, MOYEN UDDIN PK, MIA MR,
KAMRUNNAHAR M. Phytochemicals and antibacterial activity
screening of three edible mushrooms *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma
lucidum* and *Lentinula edodes* accessible in Bangladesh. **American
Journal of Biology and Life Science**, v.3, p.31–35, 2015

ISLAM, T.; YU, X.; XU, B. Phenolic profiles, antioxidant capacities
and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed
in China. **LWT- Food Science and Technology**, v.72, p.423-431, 2016.

ITO, T.; SUZUKI, N.; NAKAYAMA, A.; ITO, M.; HASHIZUME, K.
Factors affecting phenolic acid liberation from rice grains in the sake
brewing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.118, p.
640-645, 2014.

JAIN, P.K.; JOSHI, H. Coumarin: Chemical and Pharmacological
profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, p.236-240,
2012.

JANKASEM, M.; WUTHI-UDOMLERT, M.; GRITSANAPAN, W.
Antidermatophytic Properties of Ar-Turmerone, Turmeric Oil, and
Curcuma longa Preparations. **International Scholarly Research
Notices**, v.2013, p.1-3, 2013.

JAROSZUK, M.O.; JASZEK, M.; DUDKA, M.M.; BLACHOWLCZ,
A.; REJCZAK, T.P.; JANUSZ, G.; WYDRYCH, J.; POLAK, J.;
WILKOLAZKA, A.J.; SZERSZÉN, M.K. Exopolysaccharide from
Ganoderma applanatum as a Promising Bioactive Compound with
Cytostatic and Antibacterial Properties. **BioMed Research
International**, p.1-10, 2014.

JAYASINGHE, C.; IMTIAJ, A.; HUR, H.; LEE, G.W.; LEE, T.S.; LEE, U.Y. Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. **Mycobiology**, v.36, p. 28-33, 2008.

JEONG-CHO, H.; JEONG, S.G.; PARK, J.E.; HAN, J.A.; KANG, H.R.; LEE, D.; SONG, M.J. Antiviral activity of angelicin against gammaherpesviruses. **Antiviral Research**, v100, p.75–83, 2013.

JEONG, S.C.; JEONG, Y.T.; YANG, B.K.; ISLAM, R.; KOYYALAMUDI, S.R.; PANG, G.; CHO, K.Y.; SONG, C.H. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. **Nutrition Research**, v.30, p.49-56, 2010.

JI, M.; CHOI, J.; LEE, J.; LEE, Y. Induction of apoptosis by ar-turmerone on various cell lines. **International Journal of Molecular Medicine**, v.14, p.253-256, 2004.

JIANG, Y.; CHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, M.; LUO, H.; HAO, C.; ZENG, P.; SUN, Y.; WANG, H.; ZHANG, L. Overview of *Ganoderma sinense* polysaccharide—an adjunctive drug used during concurrent Chemo/Radiation therapy for cancer treatment in China. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.96, p.865-870, 2017.

JING, L.; ZONG, S.; LI, J.; SURHIO, M.M.; YE, M. Purification, structural features and inhibition activity on α -glucosidase of a novel polysaccharide from *Lachnum* YM406. **Process Biochemistry**, v.51, p.1706-1713, 2016.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods**. Vol.1, VCH Verlagsgesellschaft, Alemanha, 1990.

JOSEPH, S.; JANARDHANAN, K.K.; GEORGE, V.; BABY, S. A new epoxidic ganoderic acid and other phytoconstituents from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry Letters**, v.4, p.386-388, 2011.

KAEWNARIN, K.; SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; LUMYONG, S. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and

hyperglycaemic inhibitory activities. **Journal of Functional Foods**, v.27, p.352-364, 2016.

KAISER, C.R. RMN 2d: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v.23, p.231-236, 2000.

KALSUM, N.; SETIAWAN, B.; WIRAWATI, C.U. Phytochemical studies and gcms analysis of *Propolis trigona* spp. from two regions in Lampung province of Indonesia. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.7, p.173-180, 2016.

KAMIYAMA1, M.; HORIUCHI, M.; UMANO, K.; KONDO, K.; OTSUKA, Y.; SHIBAMOTO T. Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 2, p. 85-91, 2013.

KAMRA, A.; BHATT, A.B. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmacy and. Pharmaceutical Sciences**, v.4, p. 359-362, 2012.

KANAGASABAPATHY, G.; MALEK, S.N.A.; KUPPUSAMY, U.R.; VIKINESWARY, S. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extractsof Fresh Fruiting Bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.

KANAGASABAPATHY, G. et al. AMP-activated protein kinase mediates insulin-like and lipo-mobilising effects of β -glucan-rich polysaccharides isolated from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.), Singer mushroom, in 3T3-L1 cells. **Food Chemistry**, v. 145, p. 198–204, 2014.

KANG, M.G.; YI, S.H.; LEE, J.S. Production and Characterization of a New α -Glicosidase Inhibitory Peptide from *Aspergillus oryzae* N159-1. **Mycobiology**, v.41, p.149-154, 2013.

KARAMAN, M.; JOVIN, E.; MALBAŠA, R.; MATAVULY, M.; POPOVIĆ, M. Medicinal and Edible Lignicolous Fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1473-1481, 2010.

KARDONO, L.B.S.; TJAHA, I.P.; ARTANTI, N.; MANUEL, J. Isolation, Characterization and α -glucosidase Inhibitory Activity of Crude Beta Glucan from Silver Ear Mushroom (*Tremella fuciformis*). **Journal of Biological Sciences**, v.13, p. 406-411, 2013.

KARMAKAR, B.; VOHRA, R. M.; NANDANWAR, H.; SHARMA, P.; GUPTA, K.G.; SOBTI, R.C. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p.195-202, 2000.

KAUR, R.; SINGH, V.; SHRI, R. Anti-amnesic effects of *Ganoderma* species: A possible cholinergic and antioxidant mechanism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.92, p.1055-1061, 2017.

KAPILAN, R. Solid state fermentation for microbial products: A review. **Arch. Appl. Sci. Res.**, v. 7, n. 8, p. 21-25, 2015.

KEISTER, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 487-488, 1983.

KIM, A.J.; CHOI, J.N.; KIM, J.; PARK, S.B.; YEO, S.H.; CHOI, J.H.; LEE, C.H. GC-MS based metabolite profiling of rice *Koji* fermentation by various fungi. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.74, p.2267-2272, 2010.

KIM, S.D.; NHO, H.J.; Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. **Journal of Microbiology**, v.42, p.223-227, 2004.

KIM, Y.M.; WANG, M.H.; RHEE, H.I. A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. **Carbohydrates research**, v.25, 339(3), p.715-717, 2004.

KLEINHOF, A.; HASKINS, F.A.; GORZ, H.J. *Trans*-o-hydroxycinnamic acid glucosylation in cell-free extracts of *Melilotus alba*. **Phytochemistry** v.6, p.1313-1318, 1967.

KLUPP, N. L.; KIAT, H.; BENSOUSSAN, A.; STEINER, G.Z.; CHANG, D.H. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of

Ganoderma lucidum for the treatment of cardiovascular risk factors of metabolic syndrome. **Scientific Reports**, 6, 1-10, 2016.

KO, H. H. et al. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 234–239, 2008.

KOJIMA, M.; TACHIKAKE, N.; KYOTANI, Y.; KONNO, K.; MARUO, S.; YAMAMOTO, M.; EZURE, Y. Effect of dissolved oxygen and pH on moranoline (1-deoxynojirimycin) fermentation by *Streptomyces lavendulae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, p.391-394, 1995.

KOLLROSER, M.; SCHOBER, C. Determination of Coumarin-type Anticoagulants in Human Plasma by HPLC-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with an Ion Trap Detector. **Clinical Chemistry**, v.48, p.84, 2002.

KOUKOL, J.; CONN, E.E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. **Journal of Biological Chemistry**, v.236, p.2692-2698, 1961.

KRISHNAMOORTHY, K.; SUBRAMANIAM, P. Phytochemical Profiling of Leaf, Stem, and Tuber Parts of *Solena amplexicaulis* (Lam.) Gandhi Using GC-MS. **International Scholarly Research Notices**, p.1-13, 2014.

KUCIK, C.J.; MARTIN, G.L.; SORTOR, B.V. Common Intestinal Parasites. **American Family Physician**, v.69, p.1161-1169, 2004.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v.4, p.86-93, 2014.

KUO, Y.H.; LIN, T.Z.; YOU, Y.J.; WEN, K.C.; SUNG, P.J.; CHIANG, H.M. Antiinflammatory and Antiphotodamaging Effects of Ergostatrien-3 β -ol, Isolated from *Antrodia camphorata*, on Hairless Mouse Skin. **Molecules**, v.21, p.1213, 2016.

KURTYS, E.; EISEL, U.L.M.; VERKUYL, J.M.; BROERSEN, L.M.; DIERCKX, R.A.J.O.; DE VRIES, E.F.J. The combination of vitamins

and omega-3 fatty acids has an enhanced anti-inflammatory effect on microglia. **Neurochemistry International**, v. 99, p. 206-214, 2016.

LEE, I.; KIM, H.; YOUN, U.; KIM, J.; MIN, B.; JUNG, H.; NA, M.; HATTORI, M.; BAE, K. Effect of Lanostane Triterpenes from the Fruiting Bodies of *Ganoderma lucidum* on dipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. **Planta Medica**, v.76, p.1558-1563, 2010.

LEE, R.H.C.; VASQUEZ, J.J.G.; COUTO e SILVA, A.; KLEIN, D.D.; VALIDO, S.E.; CHEN, J.A.; LERNER, F.M.; NEUMANN, J.T.; WU, C.Y.C.; LIN, H.W. Fatty acid methyl esters as a potential therapy against cerebral ischemia. **Oilseeds & fats Crops and Lipids**, v.23, p.1-6, 2016.

LELIEBRE-LARA V, FIDALGO LM, PFERSCHY-WENZIG EM, KUNERT O, LIMA CN, BAUER R. *In vitro* antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). **Molecules**, v.21, p.1–10, 2016.

LENZI, J.; COSTA, T.M.; ALBERTON, M.D.; GOULART, J.A.G.; TAVARES, L.B.B. Medicinal fungi: a source of antiparasitic secondary metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.5791-5810, 2018.

LI, GANG, KUSARI, S.; SPITELLER, M. Natural products containing ‘decalin’ motif in microorganisms. **Natural Products Report**, v.31, p.1175-1201, 2014.

LIN, Y.; YAN, Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. **Microbial Cell Factories**, v.11, p.1-9, 2012.

LIN, Y.; SUN, X.; YUAN, Q.; YAN, Y. Combinatorial biosynthesis of plant-specific coumarins in bacteria. **Metabolic Engineering**, v.18, p.69-77, 2013.

LISTER, P.D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 582-610, 2009.

LOJEWSKA, D.B.; SWIATKIEWICZ, S.; MUSZYNSKA, B. The use of Basidiomycota mushrooms in poultry nutrition—A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.230, p.59-69, 2017.

LUO, Q.; YANG, Z.L.; YAN, Y.M.; CHENG, Y.X. Ganotheaecolin A, a Neurotrophic Conjugated Ergosterol with a Naphtho[1,8-*ef*]azulene Scaffold from *Ganoderma theaecolum*. **Organic Letters**, v.19, p.718-721, 2017.

LV X, LIU D, HOU J, DONG P, ZHAN L, WANG L, DENG S, WANG C, YAO J, SHU X, LIU K, MA X (2013) Biostransformation of imperatorin by *Penicillium janthinellum*. Anti-osteoporosis activities of its metabolites. **Food Chemistry**, v.138, p.2260-2266. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.138

MA, K.; REN, J.; HAN, J.; BAO, L.; LI, L.; YAO, Y.; SUN, C.; ZHOU, B.; LIU, H.

Ganoboninketals a-C, antiplasmodial 3,4-seco-27-norlanostane triterpenes from *Ganoderma boninense* pat. **Journal of Natural Products**, v. 77, p.1847–1852, 2014.

MA, H.T.; HSIEH, J.F.; CHEN, S.T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, 114, 109-113, 2015.

MAJOULI, K.; HLILA, M.B.; HAMDY, A.; FLAMINI, G.; JANNET, H.B.; KENANI, A. Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). **Industrial Crops and Products**, v.82, p.23-28, 2016.

MALAK, L.G.; BISHAY, D.W.; ABDEL-BAKY, A.M.; MOHARRAM, A.M.; CUTLER, S.J.; ROSS, S.A. New Anthraquinone Derivatives from *Geosmithia lavendula*. **Natural Products Communication**, v.8, p.191-194, 2013.

MALEK, S.N.A.; KANAGASABAPATHY, G.; SABARATNAM, V.; ABDULLAH, N.; YAACOB, H. Lipid Components of a Malaysian Edible Mushroom, *Termitomyces heimii* Natarajan. **International Journal of Food Properties**, v.15, p.809-814, 2012.

MATOS MJ, SANTANA L, URIARTE E, ABREU OA, MOLINA E, YORDI EG (2015) **Coumarins – An Important Class of**

Phytochemicals. In: Rao V, Rao LG (ed) *Phytochemicals – Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, ISBN: 978-953-51-2170-1. pp 113-140. E-book. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/coumarins-an-important-class-of-phytochemicals>. Acesso em 25 Mar. 2016

MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. **Food Research International**, v.34, v.6, p.521-526, 2001.

MEDEIROS de SIQUEIRA, V. **Fungal biofilms: An overview.** In: Gupta V.K.; Mach R.L.; Sreenivasaprasad S (eds) *Fungal Biomolecules*, Wiley, Pais pp 3-10, 2015.

MEHTA, S.; JANDAİK, S. *In vitro* Comparative Evaluation of Antibacterial Activity of Fruiting Body and Mycelial Extracts of *Ganoderma lucidum* against Pathogenic Bacteria. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v.6, p.1997-2001, 2012.

MELO DE CARVALHO, C.S. Viabilidade do uso de resíduos agrícolas no cultivo de cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* (Curt:Fr.) P. Karst. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014, 59f.

MENA, P.; LLORACH, R. New Frontiers on the Metabolism, Bioavailability and Health Effects of Phenolic Compounds. **Molecules**, v.22, p.1-4, 2017.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolípídios em plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.568-575, 2006.

MENDOZA, G.; SUAREZ-MEDELLIN, J.; ESPINOZA, C.; RAMOS-LIGONIO, A.; FERNANDEZ, J.J.; NORTE, M.; TRIGOS, A. Isolation and Characterization of Bioactive Metabolites from Fruiting Bodies and Mycelial Culture of *Ganoderma oerstedii* (Higher Basidiomycetes) from Mexico. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.17, p.501-509, 2015.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, p. 21-26, 2011.

MITRA, S.; NATARAJAN, R.; ZIEDONIS, D.; FAN, X. Antioxidant and anti-inflammatory nutrient status, supplementation, and mechanisms in patients with schizophrenia. **Progress in neuro-physiopharmacology & biological Psychiatry**, v.78, p.1-11, 2017.

MIYANO, D.M.; LIMA, T.; SIMÕES, F.R.; LA-SCALEA, M.A.; OLIVEIRA, H.P.M.; CODOGNOTO, L. Electrochemical study of simple coumarin and its determination in aqueous infusion of *Mikania glomerata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.25, p.602-609, 2014.

MOLINA, F.T.; ZANUSSO JR., G. Anticoagulantes cumarínicos: ações, riscos e monitoramento da terapêutica. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.9, p.75-82, 2014.

MOORE, D.; ROBSON, G.D.; TRINCI, A.P.J. **21st Century Guidebook to Fungi**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN: 9780521186957, 2011. *E-book*. Disponível em: http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch17_17.htm. Acesso em: 10 de nov. 2018

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MURATA, C.; TRAN, Q.T.; ONDA, S.; USUKI, T. Extraction and isolation of ganoderic acid Σ from *Ganoderma lucidum*. **Tetrahedron Letters**, v.57, p.5368-5371, 2016.

MYCOBANK. *Ganoderma lipsiense*. Disponível em: [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycobankNr_=148315]. Acesso em: 27 outubro 2017.

NEIVA, V.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; CARTÁGENES, M.S.S.; COUTINHO-MORAES, D.F.; do AMARAL, F.M.M. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology

and *in vitro* evaluation of anti-Giardia activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p.215-224, 2014

NGUYEN, T.H.; KIM, S.M. α -Glicosidase Inhibitory Activities of Fatty Acids Purified from the Internal Organ of Sea Cucumber *Stichopus japonicas*. **Journal of Food Science**, v.80, p.841-847, 2015.

NHIEM, N.X.; YEN, H.T.; LUYEN, B.T.T.; TAI, B.H.; HOAN, P.V.; THAO, N.P.; ANH, H.L.T.; BAN, N.K.; KIEM, P.V.; MINH, C.V.; KIM, J.H.; NI, J.M.; KIM, Y.H. Chemical Components from the Leaves of *Trichosanthes baviensis* and their Tyrosinase Inhibitory Activity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 2015.

NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. **Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages**. Akademie-Verlag, Berlin, 1983.

NONG, X.H.; WANG, Y.F.; ZHANG, X.Y.; ZHOU, M.P.; XU, X.Y.; QI, S.H. Territrem and Butyrolactone Derivatives from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus Terreus*. **Marine Drugs**, v.12, p.6113-6124, 2014.

OBA, K.; CONN, E.E.; CANUT, H.; BOUDET, A.M. Subcellular localization of 2-(beta-d-glucosyloxy)-cinnamic acids and the related beta-glicosidase in leaves of *Melilotus alba* desr. **Plant Physiology**, v.68, p.1359-1363, 1981.

OHIRI, R.C.; BASSEY, E.E. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Constituent Oil from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), from Nigeria. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, p. 365-369, 2016.

OLENNIKOV, D.N.; TANKHAEVA, L.M.; AGAFONOVA, S.V. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 47:419-425, 2011.

OSÍŃSKA-JAROSZUK, M. et al. Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PACHECO, S.M.V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química Nova na Escola*, v.32, p.215-219, 2010.

PAGANO, M.C.; ROSA, L.H. **Fungal molecular taxonomy: An overview**. In: Gupta VK, Mach RL, Sreenivasaprasad S (eds) *Fungal Biomolecules*, Wiley, Pais, pp.313-321, 2015.

PAIVA dos SANTOS, R. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste do Brasil: *Cordia paiuhiensis* Fresen e *Triphasia trifolia* (Burm.f.) P. Wils.** 2007. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biotechnology**, v.35, p.1153-1169, 2000.

PEÑALVA, M.A.; ARST, JR., H.N. Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 426-446, 2002.

PENG, X.R.; LIU, J.Q.; WANG, C.F.; HAN, Z.H.; SHU, Y.; LI, X.Y.; ZHOU, L.; QIU, M.H. Unusual prenylated phenols with antioxidant activities from *Ganoderma cochlear*. **Food Chemistry**, v.171, n.15, p.251-257, 2015.

PENG, X.; ZHANG, G.; LIAO, Y.; GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase. **Food Chemistry**, v.190, p.207-2015, 2016.

PEREIRA, D.M.; CORREIA-DA-SILVA, G.; VALENTÃO, P.; TEIXEIRA, N.; ANDRADE, P.B. 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- κ B Activation. **Plos One**, v.9, 2014.

PHAN, C.W.; LEE, G.S.; MACREADIE, I.G.; MALEK, S.N.A.; PAMELA, D.; SABARATNAM, V. Lipid Constituents of the Edible Mushroom, *Pleurotus giganteus* Demonstrate Anti-Candida Activity. **Natural Product Communications**, v.8, p.1763-1765, 2013.

PILLAI, T.G.; JOHN, M.; THOMAS, G.S. Prevention of cisplatin induced nephrotoxicity by terpenes isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern Parts of India. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.63, p.157-160, 2011.

PRADHAN, A. **Identification of ganoderic acids and derivatives from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum***. Dissertação em Ciências. Central University of Punjab, Bathinda, India. 2018.

PRAMAI, P.; HAMID, N.A.A.; MEDIANI, A.; MAULIDIANI, M.; ABAS, F.; JIAMYANGYUEN, S. Metabolite profiling, antioxidant, and α -glucosidase inhibitory activities of germinated rice: nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics study. **Journal of Food and Drug Analysis**, In Press, 2017.

QI, Z.H.; MENG, J.; WANG, Z.L.; SUN, H.Z.; GONG, Y. Antitumor Effect of *Ganoderma lipsiense* Extract on Triple-negative Breast Cancer Model Mice and Mechanism Study. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi**, v.36, n.3, p.366-369, 2016.

RAGASA, C.Y.; TAN, M.C.S.; De CASTRO, M.E.; De Los REYES, M.M. Sterols from *Lentinus tigrinus*. **Pharmacognosy Journal**, v.10, p.1079-1081, 2018.

RAMOS-LIGONIO, A.; LÓPEZ-MONTEON, A.; TRIGOS, A. Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. **Phytotherapy Research**, v.26, p.938–943, 2012.

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

RAYAN, P.; STENZEL, D.; McDONNELL, P.A. The effects of saturated fatty acids on *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro. **Parasitology Research**, v.97, p.191-200, 2005.

RIBEIRO DA SILVA, R.; COELHO, G.D. Fungos, principais grupos e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, São Paulo, 2006.

RIVERA, A; BENAVIDES, O.L.; RIOS-MOTTA, J. (22E)-Ergosta-6,22-diene-3 β ,5 α ,8 α -triol: A new polyhydroxysterol isolated from *Lentinus edodes* (Shiitake). **Natural Product Research**, v. 23, No. 3, p. 293-300, 2009.

RODRIGUES, K.F.; COSTA, G.L.; CARVALHO, M.P.; EPIFANIO, R.A. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1617-1621, 2005.

ROHINI K, SRIKUMAR PS Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. **Journal of Thermodynamics Catalysis**, v.5, p.1-3. doi: 10.4172/2157-7544.1000130, 2014.

ROHRER, L.; WINTERHALTER, K.H.; ECKERT, J.; KÖHLER, P. Killing of *Giardia lamblia* by Human Milk Is Mediated by Unsaturated Fatty Acids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.30, p.254-257, 1986.

RONCERO-RAMOS, I.; DELGADO-ANDRADE, C. The beneficial role of edible mushrooms in human health. **Current Opinion in Food Science**, v.14, p.122-128, 2017.

RÖSECKE, J.; KÖNIG, W.A. Constituents of various wood-rotting basidiomycetes. **Phytochemistry**, v.54, p. 603-610, 2000.

ROUZBEHAN, S.; MOEIN, S.; HOMAIEI, A.; MOEIN, M.R. Kinetics of α -glucosidase inhibition by different fractions of three species of Labiatae extracts: a new diabetes treatment model. **Pharmaceutical Biology**, v.55, p.1483-1488, 2017.

ROY, S.; DUTTA, T.; SARKAR, T.S.; GHOSH, S. Novel xylanases from *Simplicillium obclavatum* MTCC 9604: comparative analysis of production, purification and characterization of enzyme from submerged and solid state fermentation. **SpringerPlus**, v.2, p.1-10, 2013.

RUBEL, R.; SANTOS, L.F.; SANTA, H.S.D.; VANDENBERGHE, L.P.S.; WOICIECHOWSKI, A.L.; CARVALHO, J.C, HABU, S.; VÍTOLO, F.M.D.; AUGUR, C.; SOCCOL, C.R. Analysis and glycosyl composition of the exopolysaccharide isolated from submerged

fermentation of *Ganoderma lucidum* CG144. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 83, p. 239-241, 2014.

RUKACHAISIRIKUL, V.; TANSAKUL, C.; SAITHONG, S.; PAKAWATCHAI, C.; ISAKA, M.; SUVANNAKAD, R. Hirsutane sesquiterpenes from the fungus *Lentinus connatus* BCC 8996. **Journal of Natural Products**, v.68, p.1674–1676, 2005.

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

SAKAMOTO, S.; NIKKAWA, N.; KOHNO, T.; SHIMIZU, K.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S. Immunochromatographic strip assay for detection of bioactive *Ganoderma* triterpenoid, ganoderic acid A in *Ganoderma lingzhi*. **Fitoterapia**, v.114, p.51-55, 2016.

SAINI, S.S.; ATRI, N.S. Exploring Mushroom Diversity for Pharmaceutical Utility. **From Ethnomycology to Fungal Biotechnology**, .41-49, 1999.

SANTOS, W.H.; SOUZA, M.; SIQUEIRA, L.; SILVA-FILHO, L.C. Synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarin derivatives catalyzed by NbCl₅. **Quimica Nova** v.36, p.1303-1307, 2013.

SANTOS, D. Blog do Professor Djalma Santos. Educação, Biologia e Afins, (2012). Disponível em: <https://djalmasantos.wordpress.com/2012/08/31/testes-sobre-fungos/>. Acesso em: 28 de maio de 2018.

SARGOWO, D. et al. The role of polysaccharide peptide of *Ganoderma lucidum* as a potent antioxidant against atherosclerosis in high risk and stable angina patients. **Indian Heart Journal**, p. 4–10, 2017.

SCHMIDT, C.G.; GONÇALVES, L.M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H.S.; FURLONG, E.B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, v.146, p.371-377, 2014.

SCHNEIDER, A.L.S.; BERTELLI, P.R.; BARRETO, M.L.; ABREU, N.V.; AGOSTINI, F.; SCHWAMBACH, J. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* J.A.

Schmidt (Solanaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, p.1103-1111, 2015.

SCHWIENTEK, P.; SZCZEPANOWSKI, R.; RÜCKERT, C.; KALINOWSKI, J.; KLEIN, A.; SELBER, K.; WEHMEIER, U.F.; STOYE, J.; PÜHLER, A. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. **BMC Genomics**, v.13, p.112, 2012.

SER, H.L.; PALANISAMY, U.D.; YIN, W.F.; MALEK, S.N.A.; CHAN, K.G.; GOH, B.H. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1-11, 2015.

SHAH, T.Z.; ALI, A.B.; JAFRI, S.A.; QAZI, M.H. Effect of Nicotinic Acid (Vitamin B3 or Niacin) on the lipid profile of diabetic and non – diabetic rats. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.29, p.1259-1264, 2013.

SHAMEEM, N.; KAMILI, A.N.; AHMAD, M.; MASOODI, F.A.; PARRAY, J.A. Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p.356-360, 2017.

SHARIF, S.; MUSTAFA, G.; MUNIR, H.; WEAVER, C.M.; JAMIL, Y.; SHAHID, M. Proximate Composition and Micronutrient Mineral Profile of wild *Ganoderma lucidum* and Four Commercial Exotic Mushrooms by ICP-OES and LIBS. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.4, p.703-708, 2016.

SIEBERT, D.A.; BASTOS, J.; SPUDEIT, D.A.; MICKE, G.A.; ALBERTON, M.D. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.27, p.459-465, 2017.

SINGARIYA, P.; MOURYA, K.K.; KUMAR, P. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of acetone extract of *Cenchrus ciliaris* (Dhama grass). **International Journal of Science and Nature**, v.6, p.652-661, 2015.

SINGDEVSACHAN, S.K.; AUROSHREE, P.; MISHRA, J.; BALIYARSINGH, B.; TAYUNG, K.; THATOI, H. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v.7, p.1-14, 2016.

SINGDEVSACHAN, S.K.; PATRA, J.K.; TAYUNG, K.; THATOI, H. Chemical Constituents, Antioxidative and Antibacterial Properties of Medicinal Mushrooms Collected from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v.87, n.2, p.559-570, 2017.

SINGH, B.; KAUR, T.; KAUR, S.; MANHAS, R.K.; KAUR, A. An Alpha-Glicosidase Inhibitor from an Endophytic *Cladosporium* sp. with Potential as a Biocontrol Agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p.2020-2034, 2014.

SHYAMALA, B.N.; NAIDU, M.M.; SULOCHANAMMA, G.; SRINIVAS, P. Studies on the Antioxidant Activities of Natural Vanilla Extract and Its Constituent Compounds through *in Vitro* Models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.7738-7743, 2007.

SIVAKUMAR, R.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M.; RAJASEKAR, P. Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 706-710, 2011.

SMANIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A.; PAULERT, R.; SMANIA, A.(Jr). Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p. 14-16, 2007.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; RUTHES, A. C.; CZELUSNIAK, P. A.; SANTANA

FILHO, A. P.; SASSAKI, G. L. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, n.87, p.368-376, 2012.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v.185, p.389-397, 2015.

SOARES AND SILVA, L.; SANTOS DA SILVA, L.; BRUMANO, L.; STRINGHETA, P.C.; PINTO, M.A.O.; DIAS, L.O.M.; MULLER, C.S.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L.; CASTRO, H.C.; AMARAL, M.P.H. Preparation of Dry extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, v.17, p.10344-10354, 2012.

SOARES, F.A. **Ensaio bioquímico e celulares para a identificação de novos inibidores de TcGAPDH seletivos à HsGAPDH**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SOCOL, C.R.; FERREIRA da COSTA, E.S.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in Solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation, In Press**, 2017.

SONAM, K.S.; GULERIA, S. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. **Annals of Pharmacology and Pharmaceutics**, v.2, p.1-6, 2017.

SPANOVA, M.; DAUM, G. Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.113, p.1299-1320, 2011.

SPROLL, C.; RUGE, W.; ANDLAUER, C.; GODELMANN, R.; LACHENMEIER, D.W. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. **Food Chemistry**, v.109, p.462-469, 2008.

SREESHMA L.S.; BINDU, R.N. GC-MS analysis in two species of *Biophytum* DC. (Oxalidaceae). **Journal of Pharmacy Research**, v.8, p.466-473, 2014.

STEFFENSKY M, MÜHLENWEG A, WANG ZX, LI SM, HEIDE L Identification of the Novobiocin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.44, p.1214-1222, 2000.

SU, C.H.; HSU, C.H.; NG, L.T. Inhibitory potential of fatty acids on key enzymes related to type 2 diabetes. **BioFactors**, v.39, p.415-421, 2013.

SUN, Y.; LIANG, X.; ZHAO, Y.; FAN, J. A Sensitive Spectrofluorometric Method for Determination of Ergosta-4,6,8(14),22-Tetraen-3-One in Rat Plasma, Feces, and Urine for Application to Pharmacokinetic Studies Using Cerium(III) as a Probe. **Applied Spectroscopy**, v.67, p.106-111, 2013.

SUN, X.; SHEN, X.; JAIN, R.; LIN, Y.; WANG, J.; SUN, J.; WANG, J.; YAN, Y.; YUAN, Q. Synthesis of chemicals by metabolic engineering of microbes. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p.3760-3785, 2015.

TASAKA, K.; AKAGI, M.; MIYOSHI, K.; MIO, M.; MAKINO, T. Anti-allergic constituents in the culture medium of *Ganoderma lucidum*. (I) Inhibitory effect of oleic acid on histamine release. **Agents and Actions**, v.23, p.153-156, 1988.

TASKIN, H.; KAFKAS, E.; CAKIROGLU, O.; BÜYÜKALACA, S. Determination of Volatile Aroma Compounds of *Ganoderma Lucidum* by Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-GC/MS). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (AJTCAM)**, v.10, n.2, 353-355, 2013.

TEL-ÇAYAN, G.; Öztürk, M.; Duru, M. E.; Rehman, M. U.; Adhikari, A.; Türkoğlu, A.; Choudhary, M. I. Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.749-754, 2015.

TENFEN, A.; SIEBERT, D.A.; SPUDEIT, D.; MENDES DE CORDOVA, C.M.; MICKE, G.A.; ALBERTON, M. D. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and antibacterial activity of *Eugenia platysema* against mollicutes strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v.7, p. 7-11, 2017.

THANG, T. D. et al. Triterpenoids and steroids from ganoderma mastoporum and their inhibitory effects on superoxide anion generation and elastase release. **Molecules**, v. 18, p. 14285–14292, 2013.

THIEX, N.J.; MANSON, H.; ANDERSON, S.; PERSSON, J.A. Determination of crude protein in animal feed, forage, grain and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, 2002, v.85, p.309-317, 2002.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4808-4813, 2004.

TRIGOS, A.; MEDELLIN, J.S. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: Three decades of myco-chemistry research. **Revista Mexicana de Micologia**, v.34, p.63-83, 2011.

TSENG, Y.H.; LEE, Y.L.; LI, R.C.; MAU, J.L. Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v.90, v.3, p.409-415, 2005.

TYAGI, T.; AGARWAL, M. Phytochemical screening and GC-MS analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. and *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.6, p.195-206, 2017.

UMERSKA, A.; CASSISA, V.; MATOUGUI, N.; JOLY-GUILLOU, M.L.; EVEILLARD, M.; SAULNIER, P. Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.108, p.100-110, 2016.

VALENCIA, E.Y.; CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p. 9-18, 2013

VANNELLI, T.; QI, W.W.; SWEIGARD, J.; GATENBY, A.A.; SARIASLANI, S.F. Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. **Metabolic Engineering**, v.9, p.142-151, 2007.

VAZIRIAN, M.; FARAMARZI, M.A.; EBRAHIMI, S.E.S.; ESFAHANI, H.R.M.; SAMADI, N.; HOSSEINI, S.A.; ASGHARI, A.; MANAYI, A.; MOUSAZADEH, S.A.; ASEF, M.R.; HABIBI, E.; AMANZADEH, Y. Antimicrobial Effect of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) and Its Main Compounds. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.16, p.77-84, 2014.

VEKARIYA, R.H.; PATEL, H.D. Recent advanced in the synthesis of coumarin derivatives via knoevenagel condensation: a review. **Synthetic Commun** v.40, p.2756-2788, 2014.

VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v.2013:963248, 2013

VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M.; TAVARES, L.B.B.; PAULERT, R.; SMÂNIA JR. A. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 561-568, 2008.

VILA NOVA PCC, VILEGAS JHY, LANÇAS FM, ARRUDA EJ, OLIVEIRA LCS Analysis of coumarin derivatives of citrus using high resolution gas chromatography with detection systems flame ionization mass spectrometry. **Journal of Biotecnology and Biodiversity**, v.3, p.25-31, 2012.

VINH, B.H.; THO, P.T.T.; TAI, B.H.; ANH, H.L.T.; TRUNG, T.N.; DUNG, H.V.; BAN, N.H.; MINH, C.V.; KIEM, P.V.; NHIEM, N.X. Sterols and triterpene from *Trichosanthes kirilowii*. **Vietnam Journal of Chemistry**, v.53, p.86-89, 2015.

WACHTEL-GALOR, S.; YUEN, J.; BUSWELL, J.A.; BENZIE, I.F.F. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). **A Medicinal Mushroom**. In: BENZIE IFF, WACHTEL-GALOR S. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition, Chapter 9, CRC Press/Taylor & Francis; 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**, 2 Ed. Editora Springer-Verlag Berlin, 1996.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.54, p. 371-377, 2011.

WANG, Y.; WANG, Y.; LI, P.; TANG, Y.; FAWCETT, J.P.; GU, J. Quantitation of Armillarisin A in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1860-1863, 2007.

WANG, J.; HUANG, S.; LI, C.; DING, W.; SHE, Z.; LI, C. A new coumarin produced by mixed fermentation of two marine fungi. **Chemistry of Natural Compounds**, v.51, p. 239-241, 2015.

WANG, C.; CHEN, Z.; PAN, Y.; GAO, X.; CHEN, H. Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides-chromium (III) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in normal mice. **Food and Chemical Toxicology**, *In press*, 2017(a).

WANG, K.; BAO, L.; MA, K.; ZHANG, J.; CHEN, B.; HAN, J.; REN, J.; LUO, H.; LIU, H. A novel class of α -glucosidase and HMG-CoA reductase inhibitors from *Ganoderma leucocontextum* and the anti-diabetic properties of ganomycin I in KK-A^y mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.127, p.1035-1046, 2017(b).

WEI, J.C.; WANG, Y.X.; DAI, R.; TIAN, X.G.; SUN, C.P.; MA, X.C.; JIA, J.M.; ZHANG, B.J.; HUO, X.K.; WANG, C. C27-Nor lanostane triterpenoids of the fungus *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on acetylcholinesterase. **Phytochemistry Letters**, v.20, p.263-268, 2017.

WEN, D.; LI, C.; DI, H.; LIAO, Y.; LIU, H. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6624-6629, 2005.

WENG, Y.; XIANG, L.; MATSUURA, A.; ZHANG, Y.; HUANG, Q.; QI, J. Ganodermasides A and B, two novel anti-aging ergosterols from spores of a medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* on yeast via *UTH1* gene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.999-102, 2010.

WHITEWAY, M.; TEBUNG, W.A.; CHOUDHURY, B.I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, R. Metabolic regulation in model ascomycetes – adjusting similar genomes to different lifestyles. **Trends in Genetics**, v.31, p. 445-453, 2015.

WU, Z.M.; YU, Z.J.; CUI, Z.Q.; PENG, L.Y.; LI, H.R.; ZHANG, C.L.; SHEN, H.Q.; YI, P.F.; FU, B.D. *In vitro* antiviral efficacy of caffeic acid against canine distemper virus. **Microbial Pathogenesis**, v.110, p.240-244, 2017.

XIA, Q.; ZHANG, H.; SUN, X.; ZHAO, H.; WU, L.; ZHU, D.; YANG, G.; SHAO, Y.; ZHANG, X.; MAO, X.; ZHANG, L.; SHE, G. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation and Biological Activity of Triterpenoids from *Ganoderma* spp. **Molecules**, v.19, p.17478-17535, 2014.

XU, J.; KJER, J.; SENDKER, J.; WRAY, V.; GUAN, H.; EDRADA, R.; MÜLLER, W.E.G.; BAYER, M.; LIN, W.; WU, J.; PROKSCH, P. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.7362-7367, 2009.

YANG, H.; TONG, J.; LEE, C.W.; HA, S.; EOM, S.H.; IM, Y.J. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. **Nature Communications**, v.6, p.1-13, 2015.

YAO, Y.; SANG, W.; ZHOU, M.; REN, G. Antioxidant and α -Glicosidase Inhibitory Activity of Colored Grains in China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.770-774, 2010.

YAOITA, Y., AMEMIYA, K., OHNUMA, H., FURUMURA, K., MASAKI, A., MATSUKI, T., Sterol constituents from five edible mushrooms. **Chemistry and Pharmaceutical Bulletin**, v.46, p. 944–950, 1998.

YARAHMADI, M.; FAKHAR, M.; EBRAHIMZADEH, M.A.; CHABRA, A.; RAHIMI-ESBOEI, B. The anti-giardial effectiveness of fungal and commercial chitosan against *Giardia intestinalis* cysts in vitro. **Journal of Parasitic Diseases**, v.40, p.75-80, 2016.

YAYAN, J.; GHEBREMEDHIN, B.; RASCHE, K. Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. **Plos One**, v.10, p.1-20. 2015.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. α -Glicosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, 3, 136-174, 2014.

YU, Y. et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, n. 235, p. 91–101, 2018.

YUAN, B.; CHI, X.; ZHANG, R. Optimization of exopolysaccharides production from a novel strain of *Ganoderma lucidum* CAU5501 in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p. 490-497, 2012.

ZABOLOTNYI, M.A.; PRYLUTSKYY, Y. I.; POLUYAN, N.A.; EVSTIGNEEV, M.P.; DOVBESHKO, G.I. Conformational, IR spectroscopic and electronic properties of conium alkaloids and their adducts with C60 fullerene. **Journal of Molecular Structure**, v.1118, p.167-171, 2016.

ZAGHI JR., L.L.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B. Carbon- Carbon-to-nitrogen ratios for nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p. 55-60, 2010.

ZHAO, L et al. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polisaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p.783-789, 2010.

ZHAO, Y.Y.; SHEN, X.; CHAO, X.; HO, C.C.; CHENG, X.L.; ZHANG, Y.; LIN, R.C.; DU, K.J.; LUO, W.J.; CHEN, J.Y.; SUN, W.J. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v.1810, p.384-390, 2011.

ZHENG, M. et al. Steroids from *Ganoderma sinense* as new natural inhibitors of cancer-associated mutant IDH1. **Bioorganic Chemistry**, v.

79, n. February, p. 89–97, 2018.

ZHIPENG, Y.; YONGGUANG, Y.; WENZHU, Z.; YIDING, Y.; BOQUN, L.; JINGBO, L.; FENG, C. **Food Chemistry**, v.129, p.1376-1382, 2011.

ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, v.87, p. 401-406, 2004.

ZHU, Y.; ZHU, Q.X.; JIA, Z.J. Epoxide sesquiterpenes and steroids from *Cremanthodium discoideum*. **Australian Journal of Chemistry**, v.53, p.831–834, 2000.

ZHU, Y.P.; YAMAKI, K.; YOSHIHASHI, T.; KAMEYAMA, M.O.; LI, X.T.; CHENG, Y.Q.; MORI, Y.; LI, L.T.; Purification and Identification of 1-Deoxynojirimycin (DNJ) in Okara Fermented by *Bacillus subtilis* B2 from Chinese Traditional Food (Meitaoza). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4097–4103, 2010.

ZHU, F.; LI, J.; XIE, W.; WANG, C.; LIU, Y. Identification and antibacterial activity of two steroids secreted by the fungus beetle *Xylographus bostrichoides* (dufour, 1843). **Bangladesh Journal of Botany**, v.46, p.1171-1176, 2017.

APÊNDICE A – Tabelas de gradiente de eluição e quantidade de amostra obtida das frações purificadas em coluna

Tabela 1A - Gradiente de eluição e quantidade de amostra obtida das frações purificadas do extrato hexano do cultivo de *G. lipsiense* em arroz vermelho por FES

Fração	Gradiente de eluição	Quantidade de amostra obtida (mg)
1	100 % hexano	2,9
2	98% hexano 2% acetato de etila	9,6
3	95% hexano 5% acetato de etila	257,3
4	95% hexano 5% acetato de etila	156,5
5	95% hexano 5% acetato de etila	69,4
6	95% hexano 5% acetato de etila	28,7
7	95% hexano 5% acetato de etila	2,9
8	95% hexano 5% acetato de etila	4,7
9	95% hexano 5% acetato de etila	1,8
10	95% hexano 5% acetato de etila	4,8
11	90% hexano 10% acetato de etila	1,1
12	90% hexano 10% acetato de etila	7,9
13	85% hexano 15% acetato de etila	4,5
14	85% hexano 15% acetato de etila	18,2
15	80% hexano 20% acetato de etila	1,3
16	80% hexano 20% acetato de etila	7,5
17	75% hexano 25% acetato de etila	43,4
18	75% hexano 25% acetato de etila	30,4
19	65% hexano 35% acetato de etila	41,3
20	65% hexano 35% acetato de etila	70,3
21	50% hexano 50% acetato de etila	41,9
22	50% hexano 50% acetato de etila	67,0
23	100% acetato de etila	53,3
24	100% acetato de etila	14,6
25	100% acetato de etila	12,5
26	100% acetato de etila	6,6
27	50% acetato de etila 50% etanol	1,4
28	100% etanol	7,8
29	100% etanol	216,8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2A - Gradiente de eluição e quantidade de amostra obtida das frações purificadas do extrato hexano micelial do cultivo de *G. lipsiense* em meio sintético

Fração	Gradiente de eluição	Quantidade de amostra obtida (mg)
1	100 % hexano	2,4
2	98% hexano 2% acetato de etila	1,0
3	95% hexano 5% acetato de etila	113,6
4	95% hexano 5% acetato de etila	12,0
5	95% hexano 5% acetato de etila	7,1
6	95% hexano 5% acetato de etila	2,3
7	90% hexano 10% acetato de etila	2,2
8	90% hexano 10% acetato de etila	9,8
9	85% hexano 15% acetato de etila	Não avaliado
10	80% hexano 20% acetato de etila	31,9
11	80% hexano 20% acetato de etila	19,4
12	75% hexano 25% acetato de etila	8,0
13	75% hexano 25% acetato de etila	5,1
14	70% hexano 30% acetato de etila	63,6
15	70% hexano 30% acetato de etila	34,1
16	60% hexano 40% acetato de etila	14,9
17	60% hexano 40% acetato de etila	12,0
18	60% hexano 40% acetato de etila	9,4
19	50% hexano 50% acetato de etila	12,8
20	50% hexano 50% acetato de etila	223,8
21	40% hexano 60% acetato de etila	5,6
22	40% hexano 60% acetato de etila	4,7
23	40% hexano 60% acetato de etila	3,2
24	80% hexano 20% acetato de etila	2,0
25	60% acetato de etila 40% etanol	17,9
26	40% acetato de etila 60% etanol	28,5
27	100% etanol	16,4
28	100% etanol	16
29	100% etanol	Não avaliado

Fonte: Elaborado pelo autor.