

ALEXANDRA LEHMKUHL GERBER

**ESTERÓIS E TRITERPENOS DE *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. COM  
PERSPECTIVAS DE USO MEDICINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
visando a obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Artur Smânia Júnior

FLORIANÓPOLIS  
2000

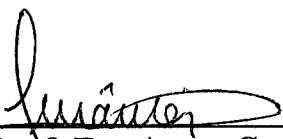
**"ESTERÓIS E TRITERPENOS DE *GANODERMA AUSTRALE* (FR.) PAT. COM PERSPECTIVAS DE USO MEDICINAL"**

**POR**

**ALEXANDRA LEHMKUHL GERBER**

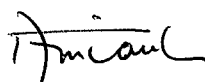
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora**

**Comissão Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Artur Smânia Júnior**  
**Orientador - MIP/CCB/UFSC**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Clárice Loguercio Leite**  
**BOT/CCB/UFSC**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti**  
**QMC/CFM/UFSC**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

**Florianópolis, março de 2000**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Artur Smânia Júnior, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, pela orientação desta dissertação.

Ao professor Franco Delle Monache, da *Università Cattolica del Sacro Cuore*, pela grande contribuição na parte química deste trabalho e identificação das substâncias.

À professora Clarice Loguercio Leite, do Departamento de Botânica, pelo incentivo e apoio durante toda a minha formação.

À professora Elza de Fátima Albino Smânia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, pela colaboração nos testes de atividade antibacteriana.

Ao professor Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química, pelo esclarecimento das minhas dúvidas na área de química.

Ao professor Fernando Cabral, do Departamento de Engenharia Mecânica, pela análise estatística dos resultados.

Ao meu namorado Rodrigo Silva Cabral por toda sua colaboração na elaboração das figuras apresentadas nesta dissertação.

Às amigas Maria Alice Neves e Carla Zenita do Nascimento pela amizade e contribuições para a conclusão desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Antibióticos: Nelson, Rodrigo, Carolina, Nádia e Caroline, pelo convívio e auxílio na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Sr. João Santana, secretário da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação, pelos serviços prestados.

A fundação CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que colaboram direta ou indiretamente na realização desta dissertação, expresso os meus agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
2.1. Meios de cultura.....	11
2.2. Coletas.....	11
2.3. Secagem.....	12
2.4. Isolamento das culturas dicarióticas.....	12
2.5. Identificação.....	13
2.6. Obtenção do extrato bruto metanólico e partição com solventes orgânicos.....	14
2.7. Fracionamento dos extratos obtidos dos basidiomas.....	15
2.7.1. Coluna 1.....	16
2.7.2. Coluna 2.....	18
2.7.3. Coluna 3.....	18
2.7.4. Coluna 4.....	19
2.8. Análise comparativa dos extratos e frações obtidos com padrões isolados de outras espécies de <i>Ganoderma</i> .....	19
2.9. Identificação das substâncias.....	20

2.10.	Avaliação da atividade antibacteriana .....	20
2.10.1.	Bactérias .....	20
2.10.2.	Método de difusão .....	21
2.11.	Extração de substâncias das culturas com solventes orgânicos.....	22
2.11.1.	Culturas em meio líquido .....	22
2.11.2.	Obtenção de extratos a partir dos caldos filtrados das culturas e dos micélios cultivados.....	23
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
3.1.	Coleta e identificação dos basidiomas.....	24
3.1.1.	Caracterização macro e micromorfológica dos basidiomas coletados.....	24
3.2.	Isolamento das culturas dicarióticas.....	26
3.3.	Obtenção do extrato bruto metanólico e partição com solventes orgânicos .....	29
3.4.	Fracionamento dos extratos obtidos dos basidiomas.....	29
3.5.	Análise comparativa dos extratos e frações obtidos com padrões isolados de outras espécies de <i>Ganoderma</i> .....	34
3.6.	Identificação das substâncias.....	37
3.7.	Atividade antibacteriana.....	38
3.8.	Extração de substâncias das culturas dicarióticas com solventes orgânicos .....	41
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH = Ácido acético glacial

CCD = Cromatografia em camada delgada

DBO = Demanda bioquímica de oxigênio

EtOAc = Acetato de etila

Ga0 =  $5\alpha$ -ergost-7-en- $3\beta$ -ol

Ga1 =  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol

Ga2 = 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ -ol

Ga3 = Novo triterpeno derivado do lanostano

MeOH = Metanol

RMN = Ressonância magnética nuclear

## RESUMO

*Ganoderma* Karst. (Ganodermatales, Basidiomycetes) é um gênero cosmopolita de fungos poróides degradadores de madeira. No Oriente, espécies de *Ganoderma* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, e algumas linhagens são comercialmente cultivadas para o uso medicinal. Os componentes responsáveis pelos efeitos farmacológicos das espécies de *Ganoderma* são principalmente polissacarídeos e triterpenóides. *G. australe* é uma espécie comum na Ilha de Santa Catarina. Poucos são os trabalhos sobre a composição química dessa espécie, assim como não foram encontrados na literatura estudos relacionando as substâncias produzidas por *G. australe* com atividade biológica. A partir de basidiomas dessa espécie foi obtido um extrato em metanol, o qual foi particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Esses extratos foram fracionados através de cromatografia em coluna de gel de sílica e as frações obtidas em cada coluna foram agrupadas pela análise em cromatografia em camada delgada. Foram identificados os esteróis: 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol e os triterpenos designados como: ácidos aplanoxídicos A, C, G e F. Um estudo preliminar sobre a atividade antibacteriana dos extratos e das frações obtidas foi realizado usando-se uma técnica de difusão em gel. Os extratos e suas frações foram ativos principalmente contra as espécies de bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Algumas frações do extrato em acetato de etila foram também ativas contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de bactérias Gram-negativas.

## SUMMARY

*Ganoderma* Karst. (Ganodermatales, Basidiomycetes) is a cosmopolitan genus of wood decaying polypore fungi. In the Orient *Ganoderma* species are used in folk medicine for treating several diseases, and some strains are commercially cultivated for medicinal use. The pharmacological effects of the *Ganoderma* species are mainly due to polysaccharides and triterpenoids. *G. australe* is a common species on the Santa Catarina Island. Literature is scarce on the chemical composition of this species and also on studies relating substances produced by *G. australe* and biological activity. From the basidioma of this species a methanol extract was obtained, which was partitioned successively with hexane, chloroform and ethyl acetate. These extracts were fractionated using silica gel column chromatography. The fractions obtained in each column were grouped by the analysis in thin layer chromatography. The following sterols were identified:  $5\alpha$ -ergost-7-en- $3\beta$ -ol,  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol, 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ -ol and the triterpenes named as: applanoxidic acids A, C, G e F. A preliminary study on the antibacterial activity of the extracts and chromatografic fractions obtained was carried out by agar diffusion method. The extracts and its fractions were active mainly against the Gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Some fractions of the ethyl acetate extract were active against Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Ganoderma* foi estabelecido por P. Karsten em 1881 com *Polyporus lucidus* W. Curtis: Fr. como única espécie que, por definição, tornou-se a espécie tipo do gênero (RYVARDEN, 1991). Esses fungos se desenvolvem sobre madeira, como saprófitas ou parasitas, fazendo parte do principal grupo de organismos responsáveis pela degradação da lignina, celulose e hemicelulose na natureza, sendo de enorme valor biológico na reciclagem de elementos (ADASKAVEG & GILBERTSON, 1994).

Os basidiosporos do gênero *Ganoderma* são tão particulares, com uma parede complexa composta por várias camadas, que DONK (1964) com base nesta característica removeu a tribo Ganodermatoideae da família Polyporaceae Corda para estabelecer a nova família Ganodermataceae Donk.

Segundo MELO (1986) as principais características que distinguem *Ganoderma* de outros gêneros são a distinta crosta, opaca ou brilhante, que cobre a superfície superior dos basidiomas e a estrutura da parede dos esporos. Apesar do gênero ser facilmente distinguível dos demais gêneros de políporos, o mesmo não ocorre entre as espécies. RYVARDEN (1991) afirma que existem cerca de 250 nomes disponíveis neste gênero e ressalta o caos taxonômico no qual ele se encontra, já que as diferenças morfológicas encontradas nos espécimes coletados levam freqüentemente à proposição de novas espécies, o que não necessariamente expressa a realidade biológica (espécie) encontrada na natureza. MONCALVO & RYVARDEN (1997) publicaram um estudo

nomenclatural da família Ganodermataceae no qual consideram que existem aproximadamente 118 espécies de *Ganoderma*. Esses autores recomendam que nenhuma nova espécie seja descrita em Ganodermataceae sem uma consideração cuidadosa dos nomes já existentes e que, aliado à taxonomia tradicional, sejam realizados estudos morfológicos comparativos, culturais, genéticos e moleculares.

STEYAERT (1972, 1975) salienta a confusão na identificação de duas espécies amplamente distribuídas: *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. e *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., mas as mantêm como espécies separadas com base em características macromorfológicas. Segundo esse autor, *G. applanatum* apresenta finas linhas de contexto entre as camadas de tubos, as quais não ocorrem em *G. australe*. Além disso, nesta última ocorrem deposições de substâncias melanóides no contexto, que nunca são encontradas em *G. applanatum*, sendo essas as características que permitem a distinção entre as duas espécies. YEH & CHEN (1990) destacam ainda que *G. applanatum* tem esporos menores do que *G. australe*, cujos esporos podem exceder a 10,0 µm, dimensão dificilmente alcançada pelos esporos de *G. applanatum*.

O gênero *Ganoderma* tem distribuição cosmopolita, com espécies exclusivamente tropicais ou temperadas. *G. australe*, segundo STEYAERT (1975), tem distribuição circumglobal nas zonas tropical e subtropical. Segundo LOGUERCIO-LEITE (1990a) essa espécie foi citada pela primeira vez para Santa Catarina por Léveillé em 1846.

Coletas sistemáticas de fungos degradadores de madeira têm sido realizadas na Ilha de Santa Catarina nos últimos 10 anos por pesquisadores do Laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, e dessa forma hoje tem-se um considerável conhecimento das espécies de *Ganoderma*

que ocorrem nessa região (HALMENSCHLAGER & LOGUERCIO-LEITE, 1993). *G. australe* é a espécie do gênero mais abundante na Ilha de Santa Catarina, sendo facilmente encontrada.

Espécies de *Ganoderma*, em especial *G. lucidum* (Fr.) Karst, são usadas na medicina popular oriental há milênios para o tratamento de diversas doenças humanas tais como hepatopatias, nefrites, úlceras gástricas, hipertensão, neurastenia, insônia, bronquite, asma, arteriosclerose, diabetes, neoplasias, anorexia, colesterol alto, envenenamento provocado pela ingestão de outras espécies de fungos e também no combate à debilidade causada por enfermidades prolongadas (JONG & BIRMINGHAM, 1992; SHIAO *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1997). Com base nessas informações, diversos estudos científicos têm sido desenvolvidos com o intuito de isolar e identificar as substâncias bioativas presentes nos basidiomas e no micélio dessas espécies. Essas pesquisas utilizam principalmente técnicas de cromatografia, espectroscopia e testes para determinação de atividades biológicas (JONG & BIRMINGHAM, 1992).

Os efeitos farmacológicos das espécies de *Ganoderma* são causados principalmente por polissacarídeos e triterpenos. Ao contrário dos polissacarídeos que são amplamente distribuídos em fungos, a maioria dos triterpenos encontrados em espécies de *Ganoderma* ainda não foi encontrada em outros gêneros de fungos (CHYR & SHIAO, 1991; CHEN *et al.*, 1999). *G. lucidum* tem atraído muita atenção nos últimos anos, por produzir muitos triterpenos altamente oxigenados e esteróis com várias atividades biológicas. Biogeneticamente, a maioria desses triterpenos é derivada do lanostano (triterpeno tetracíclico) (LIN, SHIAO, LEE, 1989; CONNOLLY, HILL, NGADJUI, 1994). Mais de 100 triterpenos oxigenados já foram identificados a partir do

micélio cultivado e dos basidiomas de *G. lucidum*. As primeiras estruturas triterpenóides elucidadas de *G. lucidum* foram os ácidos ganodéricos A e B, que têm sabor amargo (KUBOTA *et al.*, 1982).

O número de terpenóides isolados da natureza é superior a 22.000, sendo o reino Fungi uma rica fonte desses compostos. Em geral, não são conhecidas funções dos terpenóides em fungos (AYER & BROWNE, 1981; STERNER, 1995).

O termo terpenóide se refere a um grupo de substâncias que têm uma origem biossintética comum e que seguem a chamada “regra do isopreno” esboçada por Wallach em 1866. São classificados, de acordo com o número de unidades de isopreno ( $C_5$ ) que os formam, como monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ). Os terpenóides são sintetizados a partir do acetato, via mevanolato, através de uma série de reações conhecida como via isoprenóide (Figura 1) (UGAZ, 1994)

Os triterpenos são compostos com um esqueleto carbonado baseado em seis unidades de isopreno e que derivam biogeneticamente do esqualeno. Podem possuir esqueletos carbonados acíclicos, mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclicos, podendo conter grupamentos hidroxila, epoxi, cetona, aldeído e ácido carboxílico. Triterpenos de diversos tipos estruturais são amplamente distribuídos em procariontes e eucariontes (MAHATO & KUNDU, 1994; UGAZ, 1994; MAHATO & SEN, 1997).

A ampla ocorrência e a diversidade estrutural dos triterpenos têm sempre atraído a atenção para a avaliação de suas atividades biológicas. Em plantas, acredita-se que a função fisiológica desses compostos seja de defesa química contra patógenos e herbívoros. Por isso espera-se que os triterpenos devam atuar contra certos patógenos causadores de doenças humanas e animais. Entretanto, a aplicação de triterpenos como

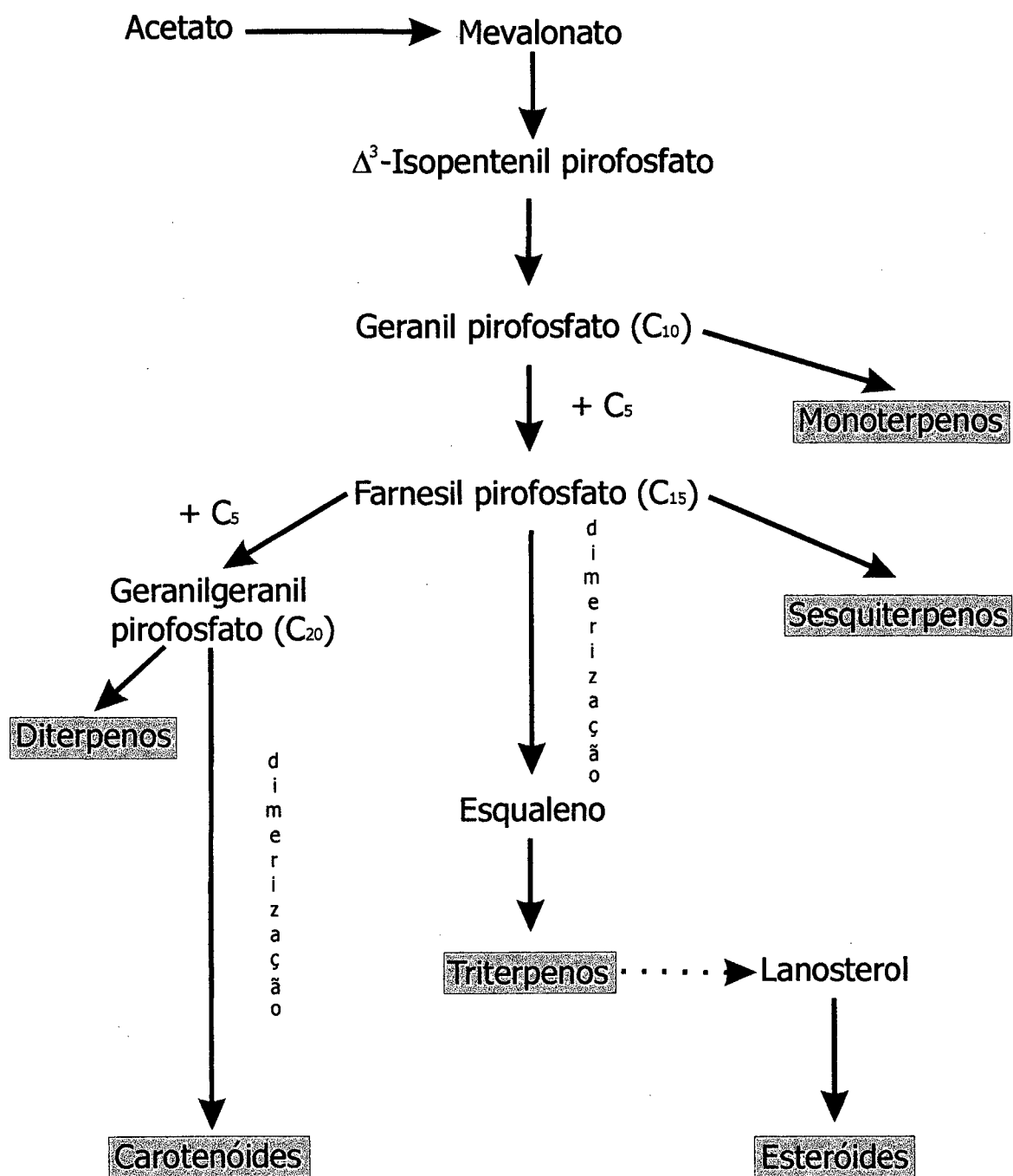


Figura 1 - Esquema geral da biossíntese de terpenóides (Modificado de UGAZ, 1994)

agentes terapêuticos de sucesso é limitada até o momento. Talvez esse fato possa ser atribuído, a princípio, pela natureza hidrofóbica da maioria desses compostos. O recente desenvolvimento nas técnicas de solubilização de drogas pode sobrepor esse problema e os diversos registros, nos últimos anos, das vantajosas atividades biológicas dos triterpenos apontam para seus variados potenciais. Entre as atividades biológicas de triterpenos são descritas atividades antitumoral, antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, anticolesterêmica, anti-hipertensiva, auxiliar no tratamento de artrites reumatóides, alergias de pele e problemas do fígado (DAS & MAHATO, 1983; MAHATO, NANDY, ROY, 1992; MAHATO & SEN, 1997).

Os esteróides são compostos biogeneticamente muito relacionados aos triterpenos, com um esqueleto de ciclopentanoperidrofenantreno igual ao dos triterpenos tetracíclicos. Os esteróides mais abundantes são os esteróis (UGAZ, 1994).

O ergosterol, conhecido como o principal esterol de espécies de fungos, foi identificado em *Claviceps purpurea* por Tanret em 1889. A principal distinção estrutural entre o ergosterol e o colesterol é a presença de um grupo 24 $\beta$ -metil na estrutura do primeiro, assim o ergosterol apresenta 28 carbonos enquanto o colesterol possui 27. A maioria dos Basidiomycetes contém o ergosterol como principal esterol, o qual se encontra acompanhado por diversos esteróis de 28 carbonos, que podem ser intermediários na formação do ergosterol e diferem dele principalmente no número e posição das ligações duplas. As etapas básicas na formação do ergosterol são as mesmas para diversos fungos, mas a seqüência de reações pode variar (WEETE, 1989).

Com relação aos estudos químicos realizados com *G. australe*, JAIN & GUPTA (1984) isolaram de basidiomas desse fungo o triterpeno lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,21-diol e os seguintes esteróides: ergosterol, palmitato de ergosterol e ergosta-7,22-dien-3-

one. MARTÍNEZ *et al.* (1991) estudaram a composição de ácidos graxos de *G. australe* e verificaram que mais de 75% dos ácidos graxos livres encontrados eram ácidos insaturados de 18 carbonos, principalmente os ácidos linoleico e oleico. Através da comparação estatística da composição de ácidos graxos em espécimes de *Ganoderma*, esses autores verificaram que existem diferenças de composição entre *G. australe* e *G. applanatum*, e esse resultado serviu como base para identificação de exemplares coletados no Chile.

Estudos sobre a bioatividade de alguns triterpenos isolados de *G. lucidum* confirmaram os efeitos evidenciados na medicina popular. Essa espécie é usada tradicionalmente no tratamento de bronquites, e KOHDA *et al.* (1985) comprovaram experimentalmente a ocorrência de inibição da liberação de histamina pela ação dos ácidos ganodéricos C e D. Alguns triterpenos obtidos de *G. lucidum* apresentaram atividade anti-hipertensiva, entre eles o ácido ganodérico F exerceu o maior efeito inibitório sobre a enzima angiotensina convertase, responsável pela hipertensão (MORIGIWA *et al.*, 1986). Os ácidos ganodérico Mf e ganodérmico T-O atuaram como inibidores da síntese de colesterol (LIN, SHIAO, YEH, 1988). Derivados dos ácidos ganodéricos B e C inibiram a biossíntese do colesterol em células de rato, formando um composto intermediário não prejudicial ao organismo, o qual não causou arteriosclerose (KOMODA *et al.*, 1989). O ácido ganodérico S alterou o mecanismo de agregação das plaquetas humanas (WANG *et al.*, 1989, 1991). Derivados polioxigenados do lanosterol mostraram efeito citotóxico contra células de hepatoma (HTC) *in vitro* (TOTH, LUU, OURISSON, 1983). LIN, TOME, WON (1991) demonstraram que um derivado do lanostano e um derivado do ergosterol têm uma atividade inibitória potente contra células de hepatoma humano PLC/PFR/5 e KB *in vitro*, comprovando o efeito

citotóxico dos derivados polioxigenados do ergosterol. Os ácidos ganodéricos A, B, G, H e um composto de 6 carbonos de *G. lucidum* apresentaram ação analgésica muito maior que a do ácido acetilsalicílico (KOYAMA *et al.*, 1997). LEE *et al.* (1998) verificaram que os ácidos ganodéricos A e C inibiram a proteína farnesil tranferase, que está associada à promoção de tumores. KIM, KIN, CHOI (1994) avaliaram extratos aquosos e metanólicos de *G. lucidum* contra HIV e observaram forte atividade antiviral. Triterpenos isolados dos esporos de *G. lucidum* apresentaram uma significativa atividade anti-HIV-1-protease (MIN *et al.*, 1998). EL-MEKKAWY *et al.* (1998) também verificaram a atividade anti-HIV-1 e anti-HIV-1-protease de triterpenos isolados a partir do extrato metanólico de basidiomas de *G. lucidum*. Polissacarídeos e peptidioglicanos extraídos de *G. lucidum* apresentaram propriedades hipoglicemiantes (HIKINO *et al.*, 1989; HIKINO & MIZUNO, 1989). Dessa espécie também foi isolada uma proteína imunomodulatória denominada Ling Zhi-8 (KINO *et al.*, 1989; VAN DER HEM *et al.*, 1995).

Além dos diversos estudos com *G. lucidum*, outras espécies de *Ganoderma* têm sido pesquisadas com o objetivo de se obterem novos fármacos. Polissacarídeos e peptoglicanos isolados de *G. applanatum* e de *G. tsugae* Murr. apresentaram atividade antitumoral (WANG *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1994; MIZUNO, 1999), assim como alguns triterpenos polioxigenados identificados em *G. applanatum* (CHAIRUL *et al.*, 1991; CHAIRUL, CHAIRUL, HAYASHI, 1994). Foi observado em modelo animal que extratos obtidos de *G. tsugae* aumentaram a capacidade imunológica por intensificar o poder das células *natural killer* (NK), responsáveis pela fagocitose de microrganismos patogênicos (WON, LIN, WU, 1992). YEN & WU (1999) observaram uma atividade antioxidante tão forte quanto a do  $\alpha$ -tocoferol no extrato metanólico obtido a partir de



basidiomas de *G. tsugae*.

Com relação à atividade antibacteriana de espécies de *Ganoderma*, COLETTO & MONDINO (1990) verificaram que tanto o micélio quanto o caldo de cultivo de *G. lucidum* foram ativos contra *Bacillus subtilis*. Esses autores também estudaram dois isolados de *G. resinaceum* (Boud.) Pat., um deles (141) foi ativo contra *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*, enquanto o outro (142) não demonstrou atividade. COLETTO, PIZZINAT, ROSSI (1993) trabalhando com uma cepa de *G. lucidum*, diferente daquela estudada por COLETTO & MONDINO (1990), verificaram que o micélio dessa espécie foi ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Comparando os resultados dos trabalhos desses autores, percebe-se que existem diferenças na atividade antibacteriana entre cepas de uma mesma espécie de *Ganoderma*. KIM *et al.* (1996) ao analisarem a atividade anti-*Helicobacter pylori* de diversas espécies de fungos, observaram que a fração éter de *G. lucidum* inibia mais fortemente o crescimento da bactéria, e através de cromatografia em coluna de gel de sílica esses autores conseguiram isolar sete componentes, dentre os quais o denominado como P3 foi o mais potente inibidor.

Como pode ser observado, são descritas na literatura diversas ações farmacológicas relacionadas com substâncias isoladas de espécies de *Ganoderma* que ocorrem no Oriente, no entanto as espécies tropicais são ainda pouco estudadas. Além disso, deve ser enfatizado que entre os estudos descritos, poucos referem-se à atividade antibacteriana de espécies desse gênero. Nesse sentido, é importante enfatizar que atualmente torna-se cada vez mais difícil encontrar microrganismos capazes de produzir novos antibióticos, assim a procura por essas substâncias deixou de ser restrita a produtos do metabolismo microbiano e outros organismos passaram a ser pesquisados para esse fim. O problema da resistência bacteriana aos antimicrobianos e a necessidade

real de novos agentes antibacterianos dirigidos contra novos patógenos oportunistas têm levado laboratórios farmacêuticos a investirem na pesquisa sistemática de novos antibióticos (SILVER & BOSTIAN, 1993; KUNIN, 1995).

Tendo em vista o exposto acima, aliado ao pouco conhecimento sobre as substâncias produzidas por *G. australe*, bem como de suas possíveis atividades biológicas, direcionamos este trabalho com o objetivo de coletar, identificar e descrever morfologicamente basidiomas de *G. australe*; obter culturas dicarióticas desses basidiomas; efetuar o fracionamento biomonitorado, através de testes de atividade antibacteriana, das substâncias extraídas dos basidiomas; e ainda verificar a ocorrência de triterpenóides isolados de outras espécies de *Ganoderma* nos basidiomas e em culturas dicarióticas de *G. australe*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar-batata para o isolamento e manutenção das culturas dicarióticas; caldo de batata para a obtenção de biomassa fúngica para os testes com culturas; ágar e caldo de Mueller-Hinton para os testes de atividade antibacteriana. Os meios mencionados foram produzidos pelos Laboratórios Difco, exceto o caldo de batata que foi preparado no laboratório de acordo com a seguinte receita:

**Ingredientes:** 200,0 g de batatas descascadas, 20,0 g de bacto-dextrose (glicose) e H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p 1000,0 ml

**Preparo:** pesar 200,0 g de batatas (descascadas), adicionar 700,0 ml de água deionizada e cozinhar durante 25 minutos. Coar em gaze, adicionar a glicose e completar o volume para 1000,0 ml com água destilada. Ajustar o pH para 6,5 (CHYR & SHIAO, 1991) com soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico 1 N. Autoclavar a  $120^{\circ} \pm 0,1$  durante 20 minutos

### 2.2 Coletas

Foram coletados basidiomas com características macroscópicas compatíveis com as descritas para *G. australe*. Os basidiomas foram retirados integralmente de seus substratos com o auxílio de uma faca e envoltos em jornal, onde foram anotados o

número da coleta, data, local e tipo de substrato. Após as coletas os basidiomas foram levados para secagem, isolamento das culturas dicarióticas e identificação no Laboratório de Micologia, Departamento de Botânica (UFSC).

### **2.3 Secagem**

Os basidiomas foram secos a temperatura ambiente, parcialmente envoltos em jornal sobre uma mesa. O tempo de secagem variou de acordo com o tamanho do basidioma, sendo o tempo mínimo de uma semana.

### **2.4 Isolamento das culturas dicarióticas**

Os isolamentos das culturas dicarióticas foram efetuados no dia posterior às coletas. A manutenção dos basidiomas a temperatura ambiente por 24 horas visou reduzir os riscos de contaminação das culturas por bactérias e/ou outros fungos, através da diminuição da umidade dos basidiomas.

Uma pequena porção de cada basidioma coletado foi cortada com auxílio de uma lâmina de barbear. Em uma capela de fluxo laminar foi retirado, de cada basidioma um fragmento da parte mais interna do contexto, que não estava em contato direto com o meio ambiente. A porção de contexto foi colocada sobre uma placa de Petri esterilizada, onde foi seccionada em quatro partes e cada parte foi colocada em um tubo de ensaio contendo ágar-batata.

Após a inoculação os tubos foram colocados em estufa DBO na temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ . O controle de pureza das culturas dicarióticas foi feito inicialmente a olho nu pelas características macroscópicas. Quando as culturas cobriram cerca da metade da superfície do ágar, foram montadas lâminas com pequenas porções de micélio de cada

cultura, uma gota de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 5% e mais uma gota de solução aquosa de floxina a 1% (GILBERTSON & RYVARDEN, 1986). Essas lâminas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 1000 vezes. A presença de hifas fibuladas, associadas às características macroscópicas, foram indicativos da pureza das culturas. Poda cada tubo de cultura aberto foram efetuados dois repiques para novos tubos contendo ágar-batata, esse procedimento visou a manutenção das culturas puras. Essas culturas foram mantidas na geladeira até o momento do uso. As culturas foram periodicamente observadas quanto às suas características macroscópicas, sendo repicadas a cada três meses e estão depositadas na coleção do Laboratório de Antibióticos (MIP/UFSC).

## **2.5 Identificação**

A identificação dos basidiomas foi feita independentemente do êxito na obtenção das culturas dicarióticas e baseou-se na metodologia tradicional, com análises macro e micromorfológicas e posterior comparação desses resultados com referências bibliográficas.

As características macromorfológicas observadas foram a forma, o tipo e o tamanho do basidioma, a coloração das superfícies superior e inferior, do contexto e dos tubos, o número de poros por milímetro, a profundidade dos tubos e a espessura do contexto (LOGUERCIO-LEITE, 1990b). A análise da coloração foi feita usando-se como referência o catálogo de cores de MUNSELL (1975). Com o auxílio de uma régua com escala milimetrada, sob o microscópio estereoscópico, foram contados o número de poros por milímetro (mm) e medidas a profundidade dos tubos e espessura do contexto.

As análises micromorfológicas foram realizadas utilizando-se pequenas porções do basidioma que foram cortadas à mão livre, sob o microscópio estereoscópico, com auxílio de lâminas de barbear. Os cortes obtidos dessa forma foram montados em lâminas com as seguintes soluções: (a) solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 5% e solução aquosa de floxina a 1% e (b) reagente de Melzer (SINGER, 1975), sendo então observadas em microscópio óptico. Foram observados o tipo de sistema hifal, características das hifas, cistídios ou outros elementos estéreis (se presentes), basídios e/ou basidiolos e basidiosporos. Hifas, elementos estéreis, basídios e basidiosporos foram medidos utilizando-se uma ocular provida de escala micrometrada. Foram tomadas vinte medidas por estrutura de cada exemplar observado. Foram efetuados desenhos das estruturas com o auxílio de uma câmara clara acoplada ao microscópio óptico. As medidas e desenhos foram feitos em aumento de 1000 vezes.

Os resultados obtidos foram comparados com dados bibliográficos. A identificação dos materiais baseou-se nos trabalhos de STEYAERT (1972, 1975).

Após estes procedimentos uma amostra de cada basidioma identificado como *G. australe* foi incluída no Herbário FLOR como *voucher* e alguns deles foram processados no Laboratório de Antibióticos, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFSC).

## **2.6 Obtenção do extrato bruto metanólico e partição com solventes orgânicos**

Quatro dos basidiomas coletados, secos e identificados como *G. australe* foram cortados em pequenos pedaços com auxílio de uma serra elétrica, num total de 675,6 g de material para extração. Esses pedaços foram colocados em um Erlenmeyer com capacidade de 6000,0 ml, ao qual foram adicionados cerca de 2500,0 ml de MeOH,

quantidade suficiente para cobrir os pedaços. Após cinco dias de extração com o MeOH, o solvente foi filtrado e evaporado com auxílio de um evaporador rotatório. O MeOH recuperado foi recolocado no Erlenmeyer para uma nova extração. Esse processo foi repetido por quatro vezes. O resíduo do extrato em MeOH foi pesado e ressuspensão em MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1). O extrato metanólico foi particionado sucessivamente com hexano, CHCl<sub>3</sub> e EtOAc.

A partição foi efetuada em funil de separação. Ao extrato metanólico ressuspensão, foram adicionados 20,0 ml de hexano por 16 vezes, dessa forma obteve-se o extrato em hexano. O MeOH da suspensão MeOH-H<sub>2</sub>O foi evaporado e procedeu-se a extração da fase aquosa com CHCl<sub>3</sub>. O extrato em CHCl<sub>3</sub> foi obtido adicionando-se 30,0 ml de solvente por 31 vezes à fase aquosa. Como etapa final da partição foram adicionados 30,0 ml de EtOAc por 26 vezes à fase aquosa remanescente, assim foi obtido o extrato em EtOAc.

## **2.7 Fracionamento dos extratos obtidos dos basidiomas**

Os extratos em hexano, CHCl<sub>3</sub> e EtOAc foram fracionados através de cromatografia em coluna de gel de sílica (Carlo Erba).

Como havia uma grande quantidade de extrato em CHCl<sub>3</sub>, o mesmo foi pré-fracionado por filtração em leito de sílica. Foram solubilizados 7,57 g de extrato em CHCl<sub>3</sub>:MeOH (3:4), que foram misturados a 10,0 g de sílica. Deixou-se evaporar o solvente dessa mistura. Em um funil com placa de vidro sinterizado de 4,0 cm de diâmetro foram adicionados 13,26 g de sílica ativada com hexano. Sobre a camada de gel de sílica foi colocado o extrato em CHCl<sub>3</sub> adsorvido à sílica. O extrato foi filtrado sucessivamente com 100,0 ml de hexano, 440,0 ml de CHCl<sub>3</sub>, 500,0 ml de CHCl<sub>3</sub>:

MeOH (8:2) e 200,0 ml de MeOH. Dessa forma foram obtidas quatro frações. As frações  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (8:2) foram fracionadas através de cromatografia em coluna de gel de sílica. Devido ao baixo rendimento, as frações hexano (<0,01 g) e MeOH (0,08 g) não foram fracionadas.

Foram efetuadas quatro colunas para o fracionamento dos extratos obtidos a partir da partição do extrato metanólico. Essas colunas foram denominadas da seguinte forma: coluna 1 - extrato em hexano, coluna 2 - extrato em  $\text{CHCl}_3$  filtrado com  $\text{CHCl}_3$ , coluna 3 - extrato em  $\text{CHCl}_3$  filtrado com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (8:2), coluna 4 - extrato em EtOAc. O procedimento geral de fracionamento empregado está sumarizado na Figura 2.

As colunas cromatográficas foram eluídas com sistemas de solventes no modo gradiente crescente de polaridade e frações (eluato) de aproximadamente 10,0 ml foram recolhidas em tubos de ensaio. Após análise através de cromatografia em camada delgada (CCD) as frações recolhidas em cada coluna foram reunidas de acordo com as similaridades de  $R_f$ . As CCDs foram feitas em placas analíticas de gel de sílica 60f<sub>254</sub> com 0,2 mm de espessura (Merck, Darmstadt, Alemanha), as quais foram eluídas em sistemas de solventes semelhantes aqueles usados nas colunas. A observação dessas placas foi feita a olho nu quanto à presença de manchas coloridas, sob luz ultravioleta (UV) a 254 e 366 nm, e finalmente borrifadas com revelador anisaldeído-sulfúrico (solução de 0,5% de  $\rho$ -anisaldeído em  $\text{MeOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{SO}_4$  na proporção de 85:10:5) e aquecidas a 110°C (HOUGHTON & RAMAN, 1998)

### 2.7.1 Coluna 1

Uma coluna de vidro com 50,0 cm de comprimento por 2,4 cm de diâmetro foi usada, em etapas distintas para o fracionamento dos extratos. Nesse caso a coluna foi



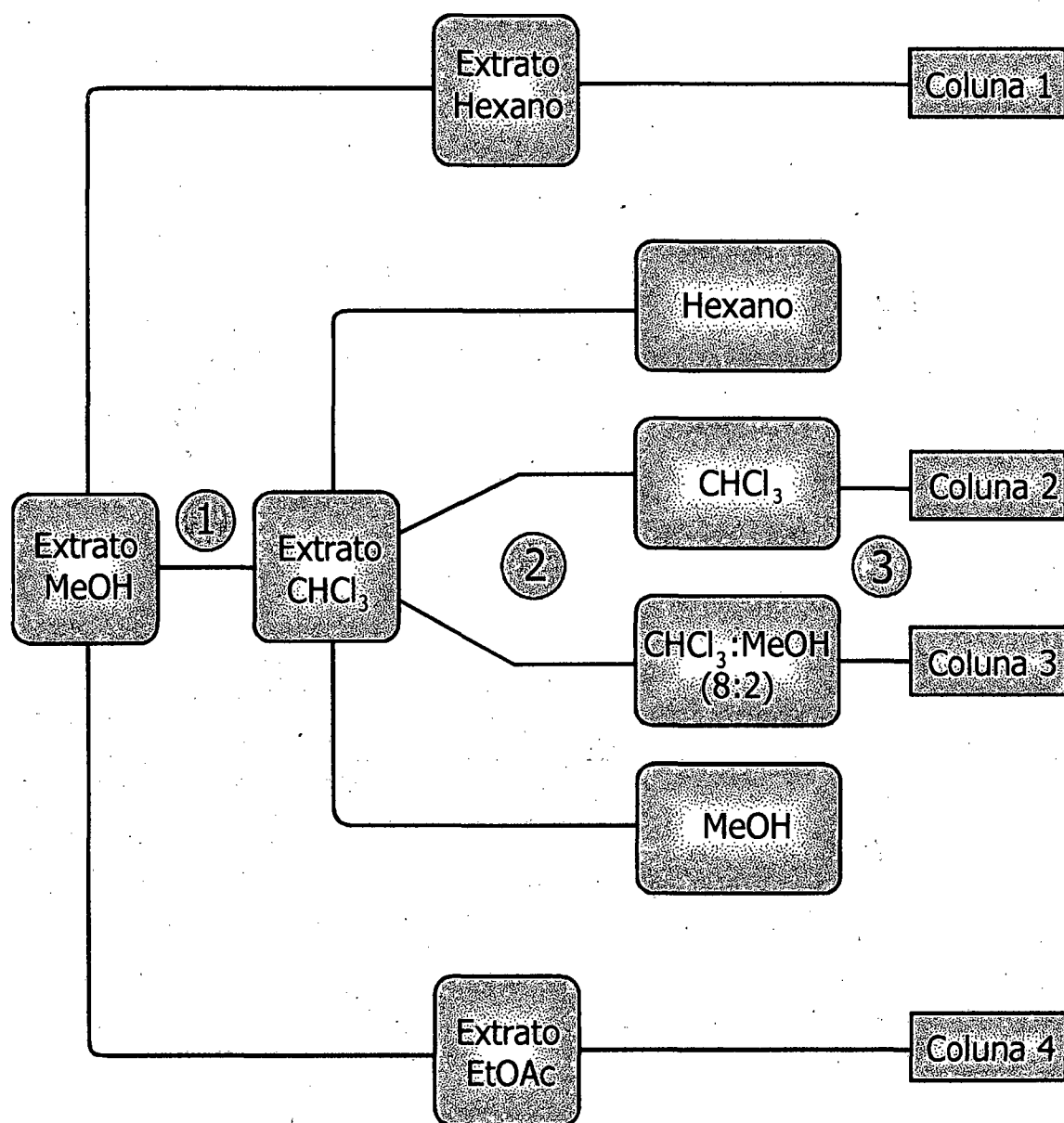


Figura 2 – Esquema do fracionamento do extrato metanólico obtido a partir dos basídiomas de *G. australe* (1) partição com hexano,  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc; (2) filtração do extrato em  $\text{CHCl}_3$  com hexano,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (8:2) e MeOH; (3) cromatografias em colunas de gel de sílica dos extratos em hexano,  $\text{CHCl}_3$  filtrado com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (8:2) e EtOAc.

preenchida com 71,28 g de gel de sílica ativado com 150,0 ml de hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1). Em 10,0 ml desse mesmo sistema de solventes foram solubilizados 2,0 g do extrato em hexano, que foram aplicados no topo da coluna sílica, utilizando-se uma pipeta Pasteur.

A eluição foi feita no modo gradiente crescente de polaridade, com os seguintes sistemas de solventes: hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1),  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1→8:2) e MeOH. As frações eluídas foram recolhidas em 30 tubos de ensaio e posteriormente agrupadas através de análise em CCD.

### 2.7.2 Coluna 2

O extrato em  $\text{CHCl}_3$  filtrado com  $\text{CHCl}_3$  (2,19 g) foi solubilizado com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:1) e misturado a 3,75 g de gel de sílica. Deixou-se evaporar o solvente dessa mistura.

Uma coluna de vidro (item 2.7.1) foi preenchida com 70,71 g de gel de sílica ativado com 150,0 ml  $\text{CHCl}_3$ . Após o empacotamento da coluna, o extrato misturado com a sílica foi adicionado sobre o gel de sílica com o auxílio de um funil de vidro.

A eluição foi feita no modo gradiente crescente de polaridade, com os seguintes sistemas de solventes:  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (98:2→8:2), MeOH: $\text{CHCl}_3$  (8:2) e MeOH. As frações eluídas foram recolhidas em 23 tubos de ensaio e posteriormente agrupadas através de análise em CCD.

### 2.7.3 Coluna 3

O extrato em  $\text{CHCl}_3$  filtrado com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2) (4,60 g) foi solubilizado com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:7) e misturado a 8,12 g de gel de sílica. Deixou-se evaporar o solvente dessa mistura.

Uma coluna de vidro (item 2.7.1) foi preenchida com 66,80 g de gel de sílica ativado com 120,0 ml  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1). Após o empacotamento da coluna, o extrato

misturado com a sílica foi adicionado sobre o gel de sílica com o auxílio de um funil de vidro.

A eluição foi feita no modo gradiente crescente de polaridade, com os seguintes sistemas de solventes:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1→6:4),  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (65:28:7,5) e MeOH. As frações eluídas foram recolhidas em 46 tubos de ensaio e posteriormente agrupadas através de CCD.

#### **2.7.4 Coluna 4**

O extrato em EtOAc (3,20 g) foi solubilizado com MeOH e misturado a 5,19 g de gel de sílica. Deixou-se evaporar o solvente dessa mistura.

Uma coluna de vidro (item 2.7.1) foi preenchida com 70,0 g de gel de sílica ativado com 150,0 ml  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1). Após o empacotamento da coluna, o extrato misturado com a sílica foi adicionado sobre o gel de sílica com o auxílio de um funil de vidro.

A eluição foi feita no modo gradiente crescente de polaridade, com os seguintes sistemas de solventes:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1→7:3),  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (65:28:7,5) e MeOH. As frações eluídas foram recolhidas em 60 tubos de ensaio e posteriormente agrupadas através de análise em CCD.

### **2.8 Análise comparativa dos extratos e frações obtidos com padrões isolados de outras espécies de *Ganoderma***

Os extratos obtidos a partir dos basidiomas, as frações obtidas nas colunas de números 1 a 4 e os extratos obtidos a partir das culturas em meio líquido foram submetidos a CCD, conforme descrito no item 2.7, juntamente com padrões previamente isolados de basidiomas de outras espécies de *Ganoderma* no Laboratório

de Antibióticos (MIP/UFSC) e que foram identificadas pelo Professor Franco Delle Monache, da *Università Cattolica del Sacro Cuore* (Roma - Itália). Foram usados os seguintes padrões: 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol (denominado como Ga0), 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (Ga1) (KAC *et al.*, 1984), 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (Ga2) (DELLE GRECA *et al.*, 1990) e um novo triterpeno derivado do lanostano, cuja estrutura ainda será publicada (Ga3). A abreviatura Ga refere-se a *G. applanatum*.

As frações obtidas serão mantidas para estudos químicos posteriores e para realização de outros testes de atividade biológica.

## 2.9 Identificação das substâncias

As frações obtidas das colunas 1, 2, 3 e 4, que segundo a CCD continham substâncias com  $R_f$  similar ao dos padrões, foram enviadas ao Professor Delle Monache para confirmação dos resultados. Também foram enviadas para o referido Professor as frações que, nos cromatogramas após o uso do revelador, apresentavam manchas com coloração característica para terpenóides.

Nos cromatogramas das frações mais polares da coluna 4 não foi possível visualizar manchas definidas. Independente deste fato, as frações dessa coluna que apresentaram boa atividade no teste de difusão, também foram encaminhadas ao Professor Delle Monache.

## 2.10 Avaliação da atividade antibacteriana

### 2.10.1 Bactérias

Para a realização dos testes de difusão com os extratos e frações obtidos, foram utilizadas quatro espécies de bactérias: *Bacillus cereus* proveniente do Laboratório

Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN), *Escherichia coli* ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockeville, MD, EUA) 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As cepas provenientes da ATCC são indicadas para a realização de testes de difusão (TRAUB & LEONHARD, 1995).

O inóculo consistiu em uma suspensão dessas bactérias, diluída em caldo de Mueller-Hinton, correspondendo a aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml. Para isso uma cultura de 18 horas de *B. cereus* foi diluída em solução salina 0,9% a  $10^4$ , *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram diluídas a  $10^5$  e *E. coli* a  $10^6$  (SMÂNIA *et al.*, 1995).

### 2.10.2 Método de difusão

O método de difusão em gel foi utilizado para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e das frações obtidas. Para isso, volumes de 18,0 ml de ágar de Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (13,0 x 100,0 mm). Após a solidificação do meio foram feitos orifícios de 7,0 mm de diâmetro conforme o número de extratos que foram testados (até 6 por placa). As bactérias-teste (inóculo preparado de acordo com o item 2.10.1) foram semeadas em toda a superfície do meio com auxílio de um *swab* de algodão.

Como não se obteve um rendimento suficiente de todas as frações para os testes com as quatro bactérias, estabeleceu-se que as frações obtidas em quantidades de até 10,0 mg seriam avaliadas apenas contra *S. aureus*, enquanto aquelas com rendimento entre 10,0 e 50,0 mg seriam avaliadas também contra *E. coli*. A escolha das espécies de bactérias usadas nos testes baseou-se em CLEELAND & GRUNBERG (1986) que recomendam, para realização de uma triagem primária da atividade antibacteriana, o uso

de uma cepa bacteriana Gram-positiva e outra Gram-negativa, sendo as primeiras escolhas *S. aureus* e *E. coli*.

Os extratos e frações utilizados foram ressuspensos em solução de hidróxido de amônio 0,1 N. Os orifícios foram preenchidos, em condições assépticas, com 50,0 µl dos compostos a serem testados, diluídos nas concentrações de 100,0 mg/ml para os extratos e 60,0 mg/ml para as frações, afim de que correspondessem, no local de aplicação da amostra, respectivamente a 5,0 e 3,0 mg.

Esses sistemas montados foram incubados por 20 horas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ . As placas foram analisadas com relação à presença de inibição do crescimento da estirpe indicadora. O resultado foi considerado positivo quando foi constatado um halo de inibição com diâmetro igual ou superior a 9,0 mm (SMÂNIA *et al.* 1995). Soluções de hidróxido de amônio 0,1 N e 1,0 N foram usadas como controle negativo e discos impregnados com os antibióticos eritromicina e tetraciclina (Pimenta Abreu Reagentes Biológicos) como controle positivo.

## **2.11 Extração de substâncias das culturas com solventes orgânicos**

### **2.11.1 Culturas em meio líquido**

As culturas puras, obtidas a partir dos basidiomas coletados (item 2.4), foram repicadas para placas de Petri contendo ágar-batata. Depois da cultura atingir o diâmetro da placa (100,0 mm), foram retiradas 12 porções de micélio (inóculo) de igual tamanho (15,0 mm de diâmetro), com o auxílio de um tubo de ensaio esterilizado. Essas porções foram colocadas em seis garrafas de Roux (dois inóculos por garrafa) contendo 150,0 ml de caldo de batata. As culturas foram mantidas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 30 dias (CHYR & SHIAO, 1991) em estufa DBO.

Após o período de incubação cada cultura (três garrafas/cultura) foi filtrada em funil com gaze para separar o micélio do caldo de cultivo, dos quais foram efetuadas extrações com  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc.

### **2.11.2 Obtenção de extratos a partir dos caldos filtrados das culturas e dos micélios cultivados**

Os metabólitos do fungo presentes no filtrado de cada caldo de cultivo foram extraídos primeiramente com  $\text{CHCl}_3$  e posteriormente com EtOAc em funil de separação. Foram efetuadas três extrações consecutivas com 50,0 ml de cada um dos solventes. O solvente foi evaporado e o resíduo obtido foi pesado.

A massa miceliana, obtida de cada cultura, foi pesada (peso fresco) e triturada com o auxílio de um liquidificador, acrescida de 150,0 ml de água deionizada. Essa suspensão foi extraída exaustivamente com  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc, em funil de separação. O solvente foi evaporado e o resíduo pesado.

Os extratos obtidos em  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc do micélio e do caldo de cada uma das três culturas foram comparados através de CCD. Posteriormente foram feitos cromatogramas comparando os extratos de cultura com os extratos dos basidiomas e os padrões, para verificar se as substâncias encontradas nos basidiomas e os padrões também ocorriam nas culturas.

Em virtude do pequeno rendimento desses extratos não foram realizados testes de atividade antibacteriana.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Coleta e identificação dos basidiomas

Todos os quinze basidiomas coletados foram identificados como *G. australe* (Tabela 1).

##### 3.1.1 Caracterização macro e micromorfológica dos basidiomas coletados

Basidiomas perenes, sésseis a pseudoestipitados, dimidiados a amplamente aderidos, aplanados, semicirculares a triquetrosos (Figura 3). Superfície superior do pileo glabra, concentricamente a irregularmente sulcada, sem laca, marrom-avermelhada (4/3 5YR, 4/6 7.5YR<sup>1</sup>), marrom-avermelhada-escura (3/4, 3/2 5YR), marrom-escura (3/2 7.5YR) a marrom-forte (5/6 7.5YR). Margem fina a grossa, lobulada, 1,5 - 8,0 mm de zona estéril, branca (8/2 2.5Y), marrom muito pálida (8/3 10YR) a amarela (8/6 5Y). Superfície himenial branca (8/2 2.5Y), marrom muito pálida (7/4, 7/3 10YR), amarela (8/6 5Y) a cinza-clara (7/2 10YR). Poros circulares, 4 - 6 por mm, dissepimentos grossos; tubos multiestratificados, com até 2,0 cm de profundidade, não intercalados por camadas de contexto, marrom-avermelhado-escuros (3/4 7.5YR, 3/4, 3/3, 3/2 5YR,), às vezes com aspecto acinzentado pela presença de micélio branco; contexto fibroso, compacto, marrom-avermelhado-escuro (3/4 7.5YR, 3/4, 3/3 5YR) a marrom-forte (5/6 7.5YR), com até 1,0 cm de espessura, uma linha escura de dimensões variáveis o separa da cobertura do pileo.

---

<sup>1</sup> Código das cores (MUNSELL, 1975).



TABELA 1 – Relação dos basidiomas coletados e identificados como *Ganoderma australe*

Local	Coletor	Data	Substrato	FLOR <sup>a</sup>
<b>Ilha de Santa Catarina</b>				
Campus Universitário, Horto Botânico	A.L. Gerber	02/04/98	Dicotiledônea viva	11721
				11722
Campus Universitário, CFM	A.L. Gerber & M.A. Neves	03/04/98	Árvore cortada	11723
				11724
Morro da Lagoa da Conceição	A.L. Gerber, A. Smânia & E.A. Smânia	16/04/98	Tronco de <i>Schizolobium parahyba</i> (garapuvu) em decomposição	11725
				11726
				11727
				11728
				11729
Córrego Grande, Estrada Geral	M.A. Neves	05/05/98	Árvore cortada	11730
				11731
Campus Universitário, Horto Botânico	A.L. Gerber & C.L. Leite	27/05/98	Dicotiledônea morta	11731
				11742
Campus Universitário, CFM	A.L. Gerber	05/02/99	Árvore cortada	11742
Campus Universitário, Horto Botânico	A.L. Gerber	02/04/99	Árvore caída	11743
<b>Correia Pinto</b>				
CELUCAT S. A.	A. Giachini & M.A. Neves	03/06/98	Tronco de <i>Pinus</i> em decomposição	11741
<b>Ilha de Ratonés Grande</b>				
	M. Queiroz	18/04/99	<i>Didimapanax angustisserum</i>	11748

<sup>a</sup> Número do herbário no qual os *vouchers* estão depositados

Sistema hifal trimítico; hifas generativas fibuladas, de paredes delgadas, hialinas, 2,0 - 3,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro; hifas esqueléticas, de paredes grossas a sólidas, marrons, 2,0 - 6,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro; hifas ligadoras, de paredes grossas, hialinas, ramificadas, 1,0 - 3,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Cistídios ou outros elementos estéreis ausentes. Basídios e/ou basidiolos não observados. Basidiosporos elipsóides, truncados no ápice, de paredes duplas, marrom dourados, 7,0 - 11,5 x 4,0 - 6,5  $\mu\text{m}$ , inamilóides, indextrinóides (Figura 4).

### 3.2 Isolamento das culturas dicarióticas

Foram efetuados isolamentos de todos os basidiomas coletados. Foram obtidas culturas dicarióticas dos seguintes basidiomas: FLOR 11723, 11727, 11728, 11729, 11730, 11741, 11742, 11743 e 11748.

Das culturas obtidas, a maioria perdeu a viabilidade após o primeiro mês de armazenagem na geladeira. Dessas, três permaneceram viáveis e foram designadas como isolados MIP-G98012, MIP-G99013 e MIP-G99015 (Tabela 2), sendo essas as culturas que foram utilizadas para a obtenção dos extratos.

TABELA 2 – Relação dos números de herbário dos basidiomas e dos números das culturas mantidas no Laboratório de Antibióticos

Número de herbário	Número da cultura <sup>a</sup>
FLOR 11741	MIP-G98012
FLOR 11742	MIP-G99013
FLOR 11748	MIP-G99015

<sup>a</sup> MIP = Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

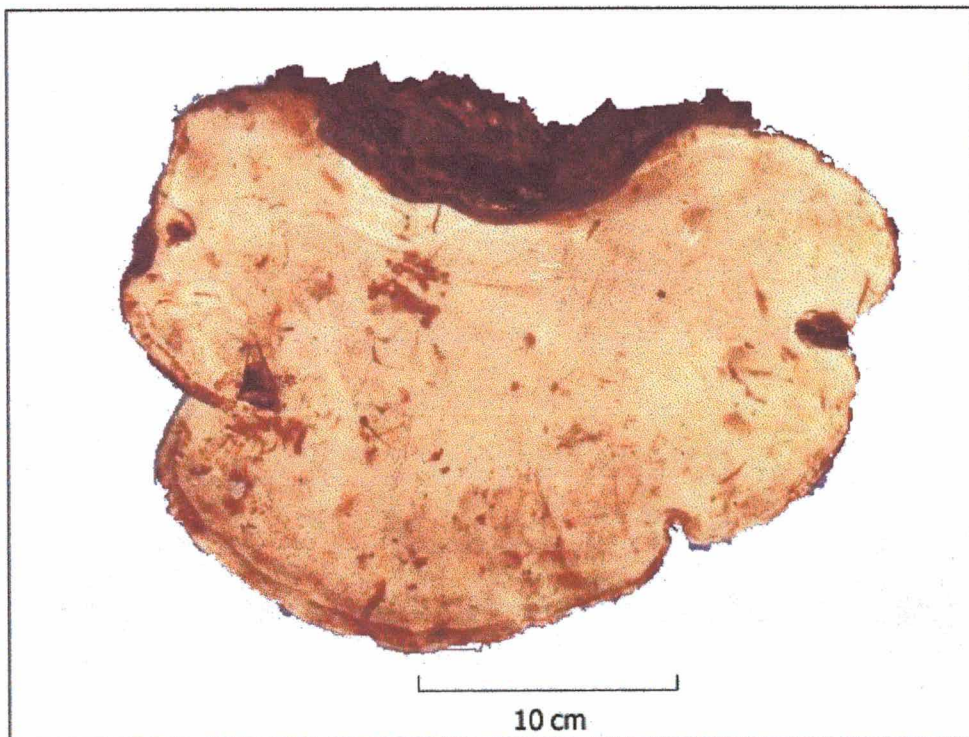
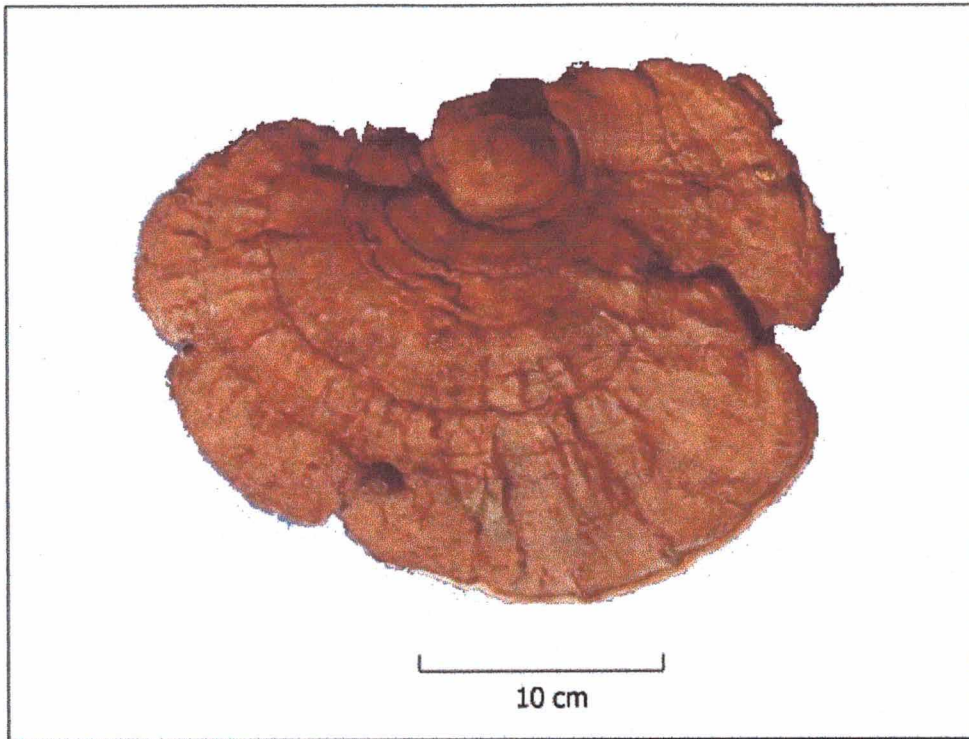


Figura 3 - Superfícies superior e inferior do basidioma FLOR 11727.

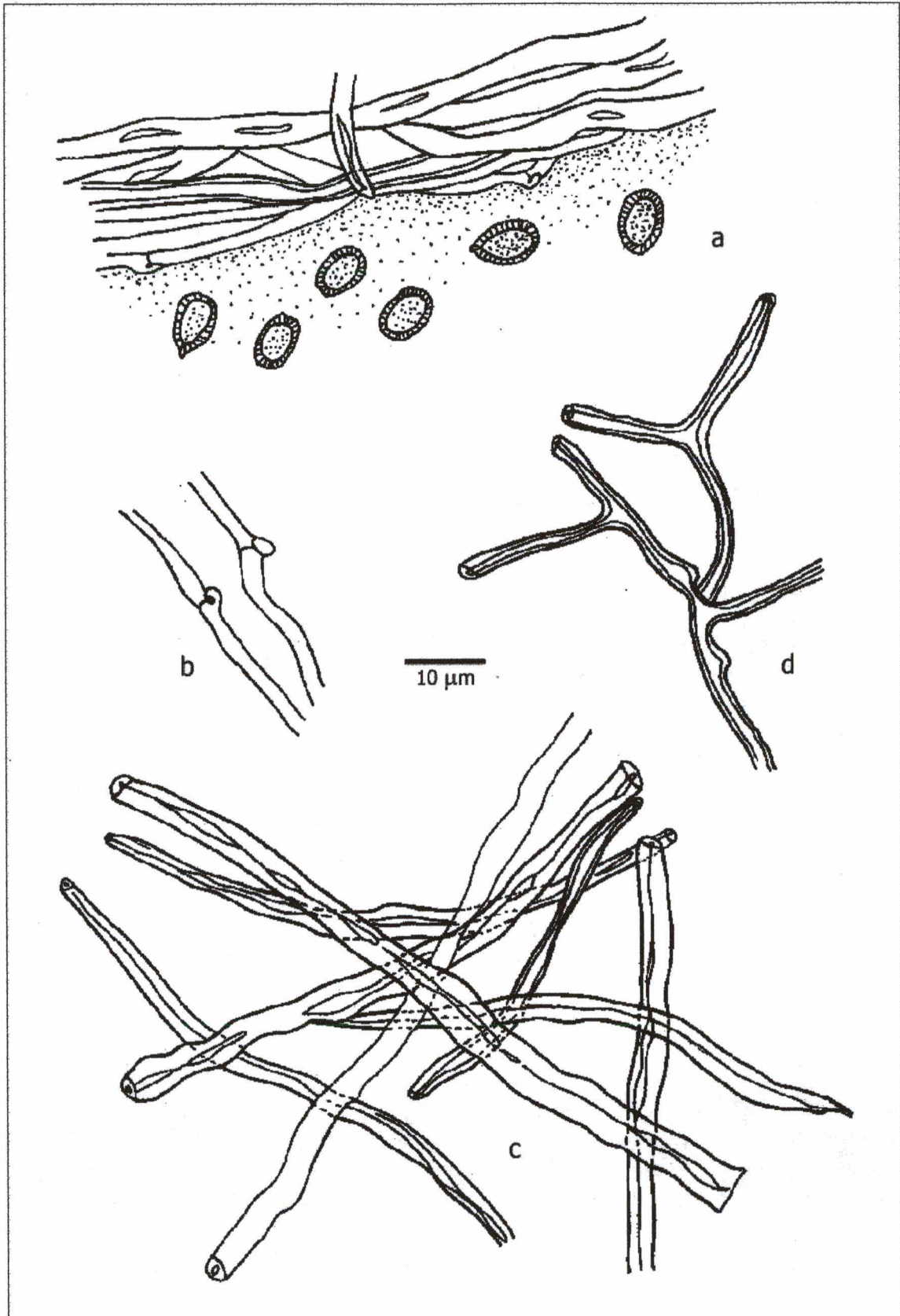


Figura 4 – Aspectos microscópicos de *G. australe*: a. himênio colapsado, basidiosporos; b. hifas generativas; c. hifas esqueléticas; d. hifas ligadoras.



### **3.3 Obtenção do extrato bruto metanólico e partição com solventes orgânicos**

Os basidiomas, identificados pelos números de herbário, FLOR 11723, 11727, 11728, 11729, foram utilizados para a obtenção do extrato metanólico. Esses basidiomas, após terem sido cortados, resultaram em 675,6 g de material para extração. Após um período de vinte dias, durante os quais os pedaços dos basidiomas permaneceram imersos em MeOH, foram obtidos 35,8 g de extrato seco.

Do total de 35,8 g de extrato metanólico, foram utilizados 34,3 g para a partição sucessiva em hexano,  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc. Após exaustivas extrações foram obtidos: 2,58 g de extrato em hexano, 9,89 g de extrato em  $\text{CHCl}_3$  e 4,63 g de extrato em EtOAc

### **3.4 Fracionamento dos extratos obtidos dos basidiomas**

Através dos cromatogramas apresentados nas Figuras 5a e 5b, pode-se verificar a diferença de composição dos extratos em hexano,  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc, obtidos através da partição do extrato metanólico.

Como foi obtida uma quantidade considerável do extrato em  $\text{CHCl}_3$ , optou-se por fazer um pré-fracionamento desse extrato (item 2.8). O resultado desse procedimento é ilustrado no cromatograma “c” da Figura 5. Pode ser observado que realmente houve uma separação prévia entre as substâncias menos polares e mais polares que compunham o extrato em  $\text{CHCl}_3$  original.

As figuras 6, 7 e 8 esquematizam os processos de separação utilizados com os extratos em hexano,  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc, respectivamente, bem como o rendimento desses processos desde o extrato inicial até as frações obtidas em cada coluna.

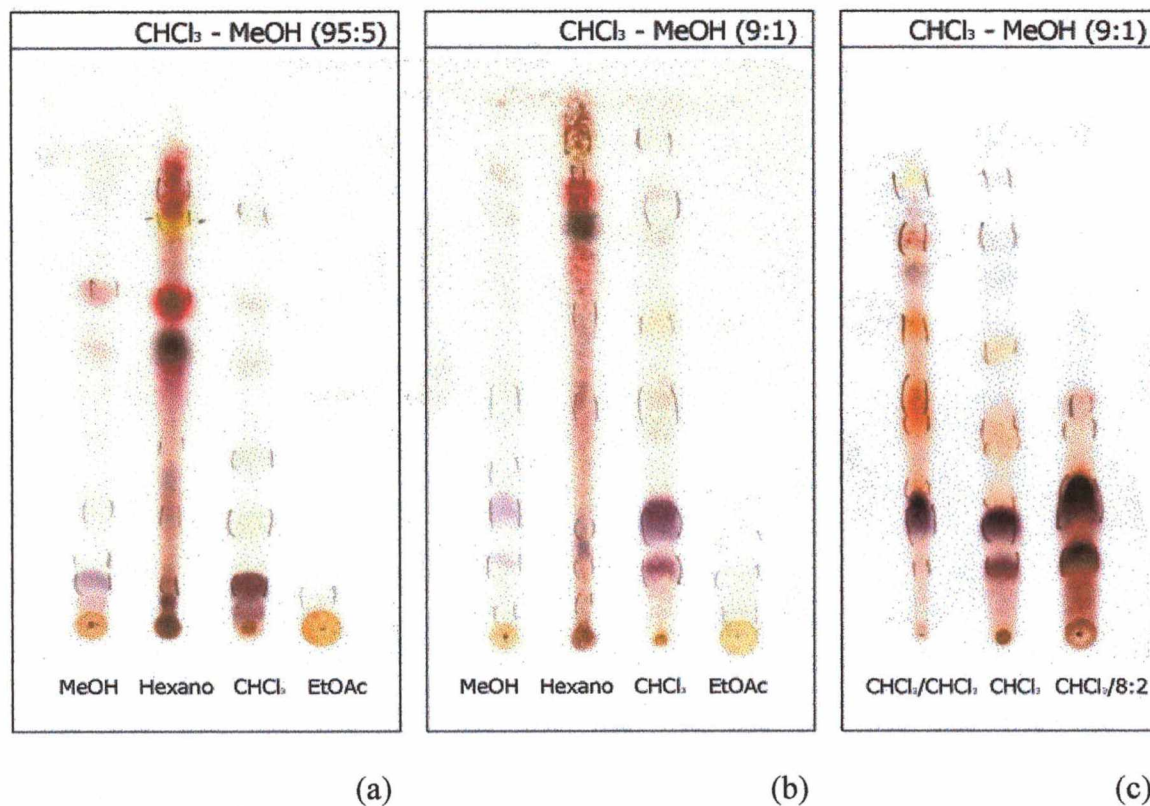


Figura 5 – Cromatogramas (a) extratos em MeOH, hexano, CHCl<sub>3</sub> e EtOAc, sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5); (b) extratos em MeOH, hexano, CHCl<sub>3</sub> e EtOAc sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1); (c) extrato em CHCl<sub>3</sub> filtrado com CHCl<sub>3</sub>, extrato em CHCl<sub>3</sub> e extrato em CHCl<sub>3</sub> filtrado com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (8:2), sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1).

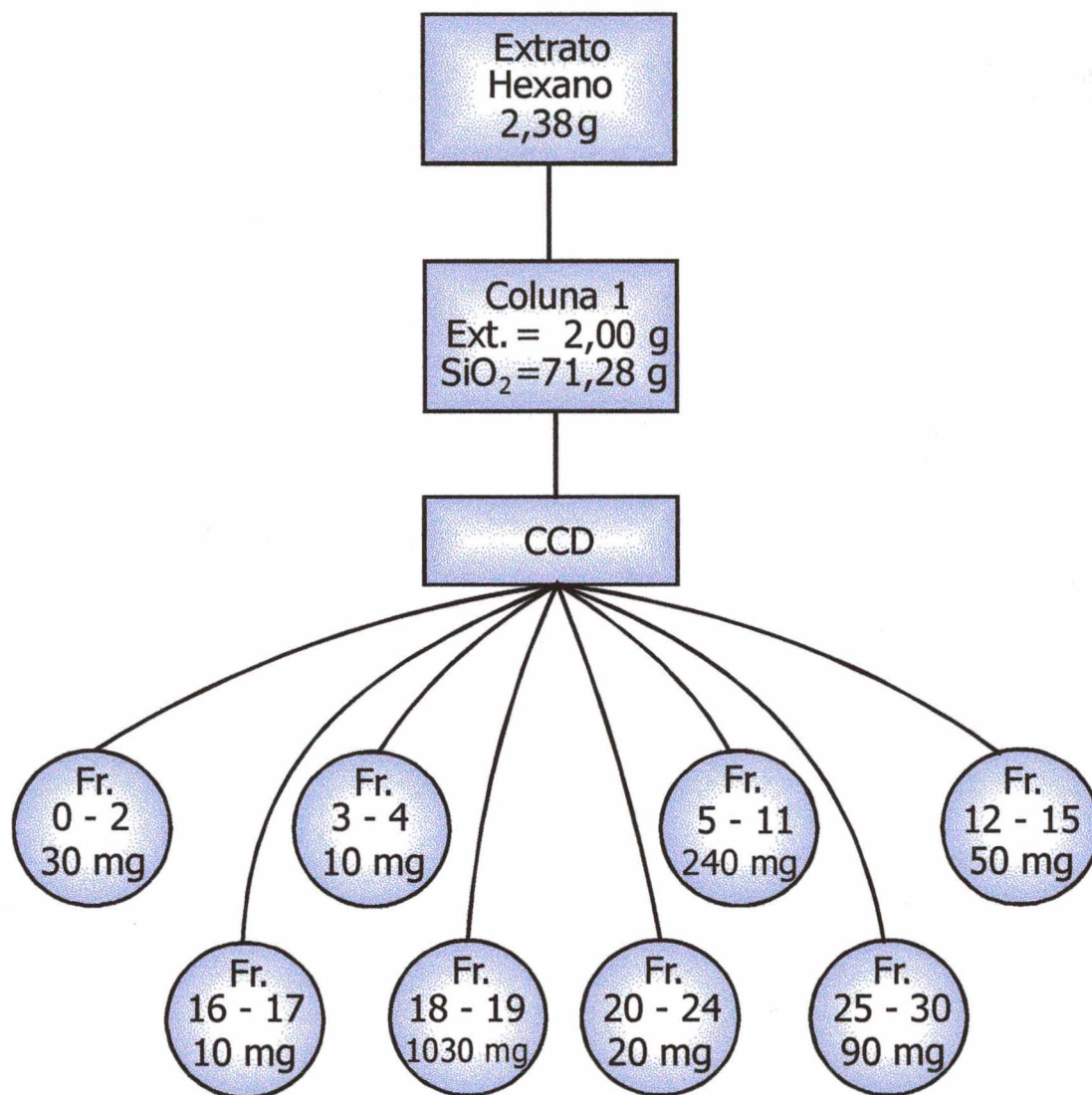


Figura 6 – Esquema do fracionamento do extrato em hexano através de cromatografia em coluna de gel de sílica. Nos círculos são mostradas as frações agrupadas pela análise em CCD, com seus respectivos rendimentos (Ext. = quantidade do extrato utilizada na coluna; SiO<sub>2</sub> = quantidade de gel de sílica empregada na coluna; Fr. = frações).



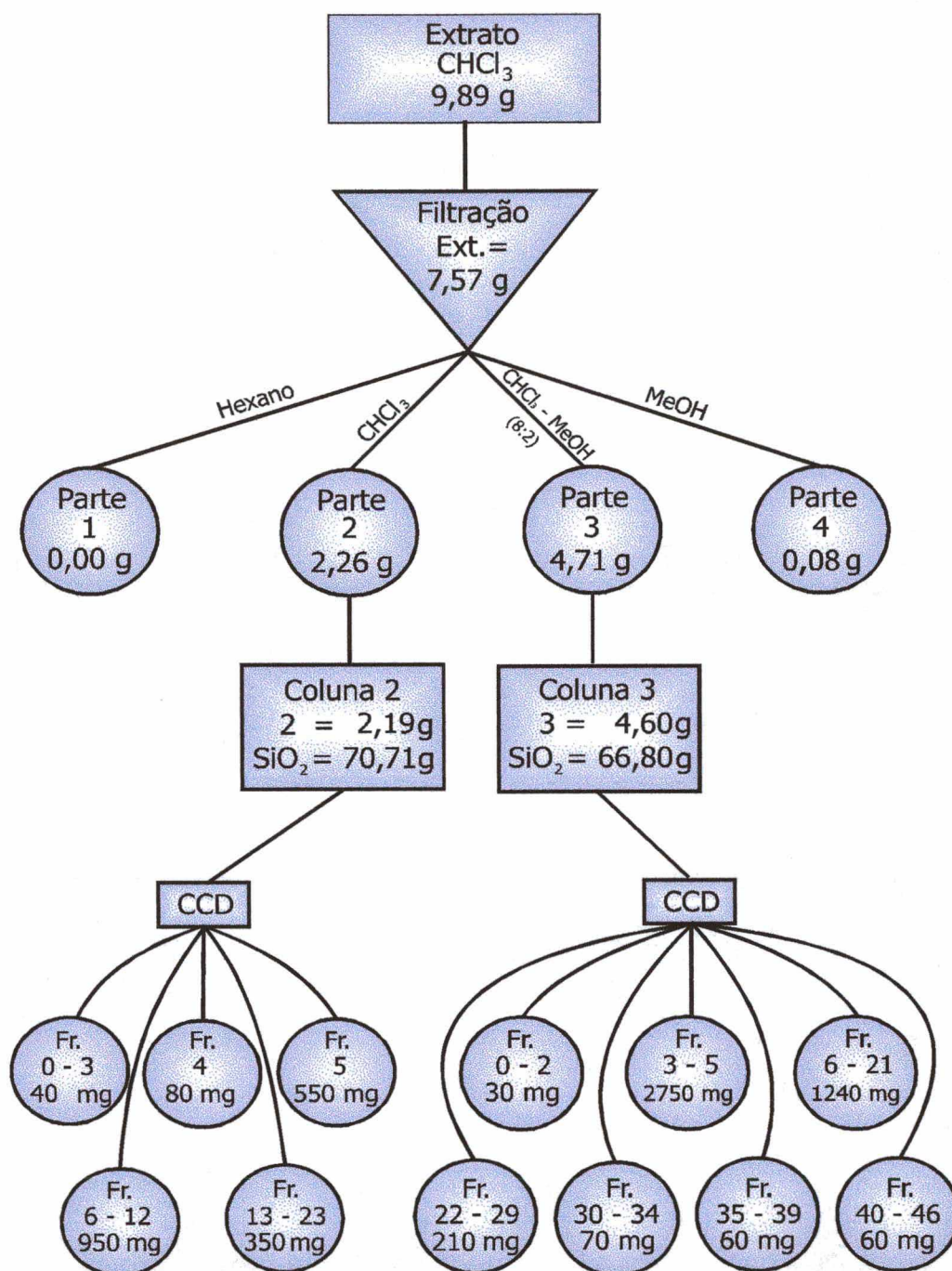


Figura 7 – Esquema do fracionamento do extrato em  $\text{CHCl}_3$  por filtração e através de cromatografias em coluna de gel de sílica. Partes 1, 2, 3 e 4 correspondem ao produto da filtração do extrato com os solventes indicados. Nos círculos inferiores são mostradas as frações agrupadas pela análise em CCD, com seus respectivos rendimentos. (Ext. = quantidade do extrato utilizada na filtração e nas colunas; 2 e 3 = quantidade dos filtrados utilizadas nas respectivas colunas;  $\text{SiO}_2$  = quantidade de gel de sílica empregada nas colunas; Fr. = frações)



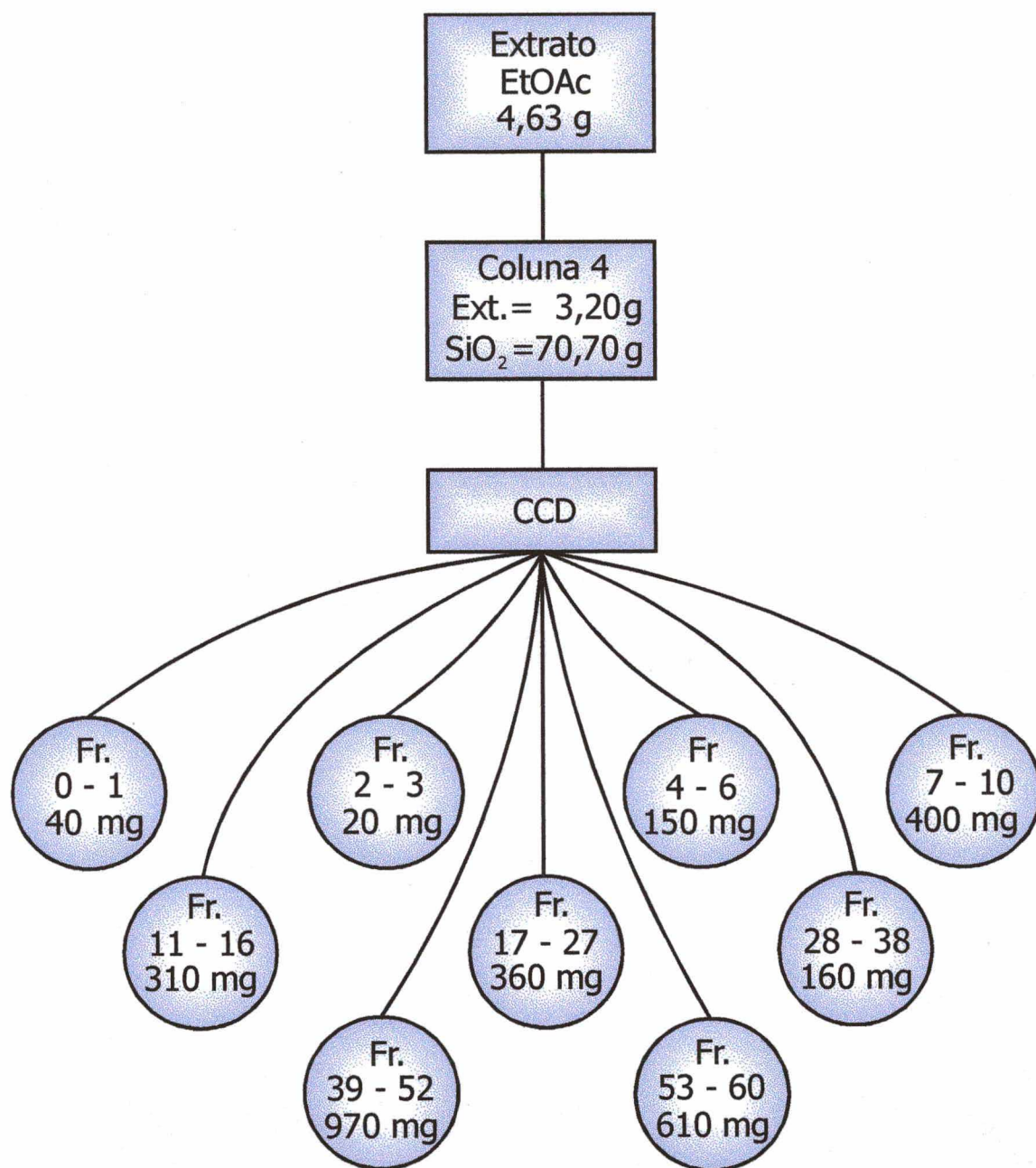


Figura 8 – Esquema do fracionamento do extrato em EtOAc através de cromatografia em coluna de gel de sílica. Nos círculos são mostradas as frações agrupadas pela análise em CCD, com seus respectivos rendimentos (Ext. = quantidade do extrato utilizada na coluna; SiO<sub>2</sub> = quantidade de gel de sílica empregada na coluna; Fr. = frações).

### 3.5 Análise comparativa dos extratos e frações obtidos com padrões isolados de outras espécies de *Ganoderma*

Nessa etapa, a técnica de CCD foi usada para comparar os extratos e as frações, obtidas nas colunas 1, 2, 3 e 4, com os padrões Ga0, Ga1, Ga2 e Ga3. As substâncias Ga0 e Ga1 apresentam estruturas muito similares, diferindo apenas no número de ligações duplas, Ga0 apresenta uma dupla ligação no carbono 7, enquanto Ga1 apresenta duas ligações duplas nos carbonos 7 e 22. Em consequência disso não é possível distingui-las pela CCD.

Como pode ser verificado na figura 9, o extrato em hexano e as frações 18-19 da coluna 1, contêm substâncias com  $R_f$  similares aos de Ga0/Ga1. Além disso, nesse cromatograma observa-se uma mancha correspondente a Ga2, porém essa última é menos intensa tanto no extrato em hexano quanto na fração 18-19.

No cromatograma das frações da coluna 2 (Figura 10a) verifica-se uma mancha bastante intensa com  $R_f$  correspondente ao de Ga0/Ga1 na fração 4, uma mancha menos intensa também pode ser observada nessa posição na fração 5. As frações 4 e 5 também apresentam manchas com  $R_f$  similar ao de Ga2.

Os cromatogramas das colunas 1 (Figura 9), coluna 2 (Figura 10b), coluna 3 (Figura 11a) e coluna 4 (Figura 11b) mostram a comparação dos extratos e frações obtidas com o padrão Ga3. Como pode ser observado, nas frações da coluna 1 não aparecem manchas que poderiam corresponder a Ga3. Entretanto, nas frações 6-12 (coluna 2), 3-5 (coluna 3) e 4-6 (coluna 4) encontram-se substâncias com  $R_f$  similar ao de Ga3, mas essas manchas não permitem uma interpretação clara. Estudos químicos realizados pelo Professor Delle Monache não demonstraram a presença dessa substância nas frações analisadas.

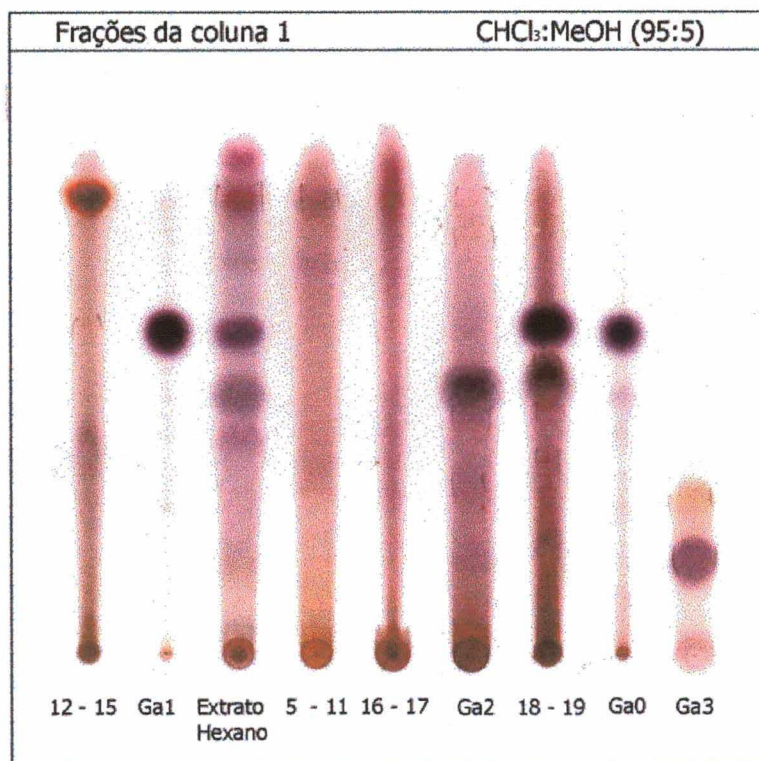


Figura 9 – Cromatograma das frações obtidas na coluna 1 comparando-as com os padrões Ga0, Ga1, Ga2 e Ga3. Sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5).



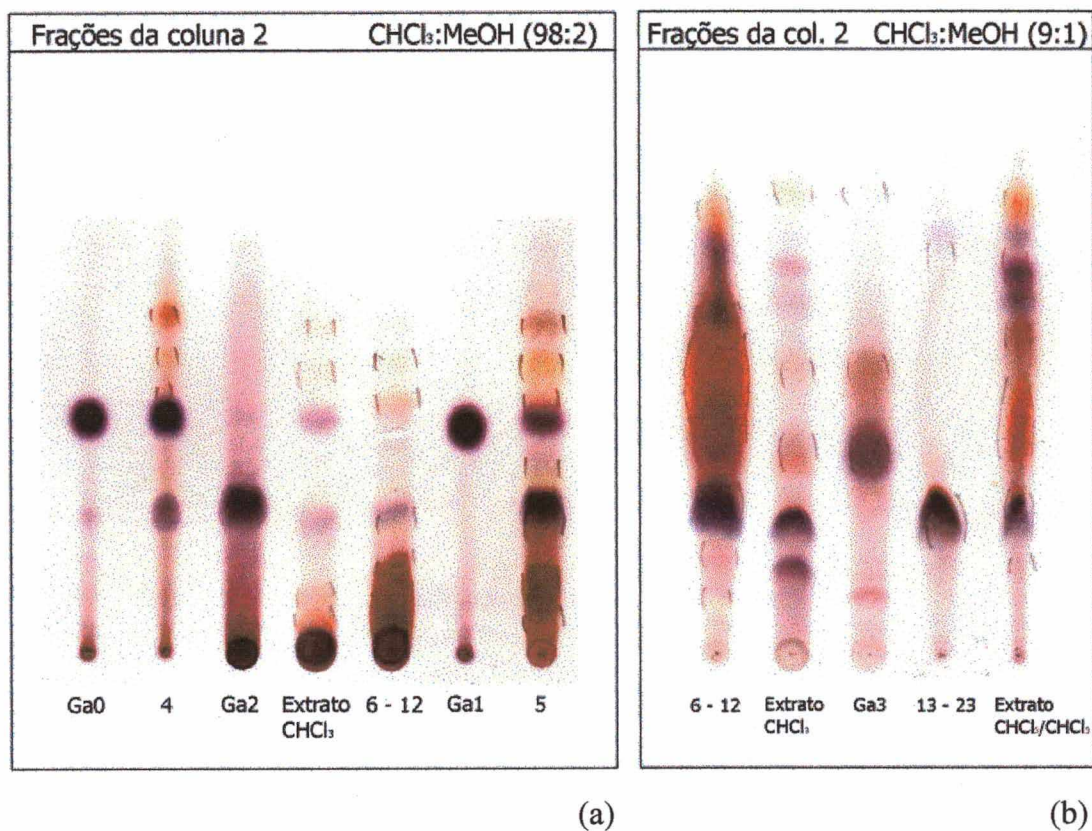


Figura 10 - Cromatograma das frações obtidas na coluna 2 comparando-as com os padrões Ga0, Ga1 e Ga2 (a) e Ga3 (b). Sistemas de solventes: (a) CHCl<sub>3</sub>: MeOH (98:2) e (b) CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1).

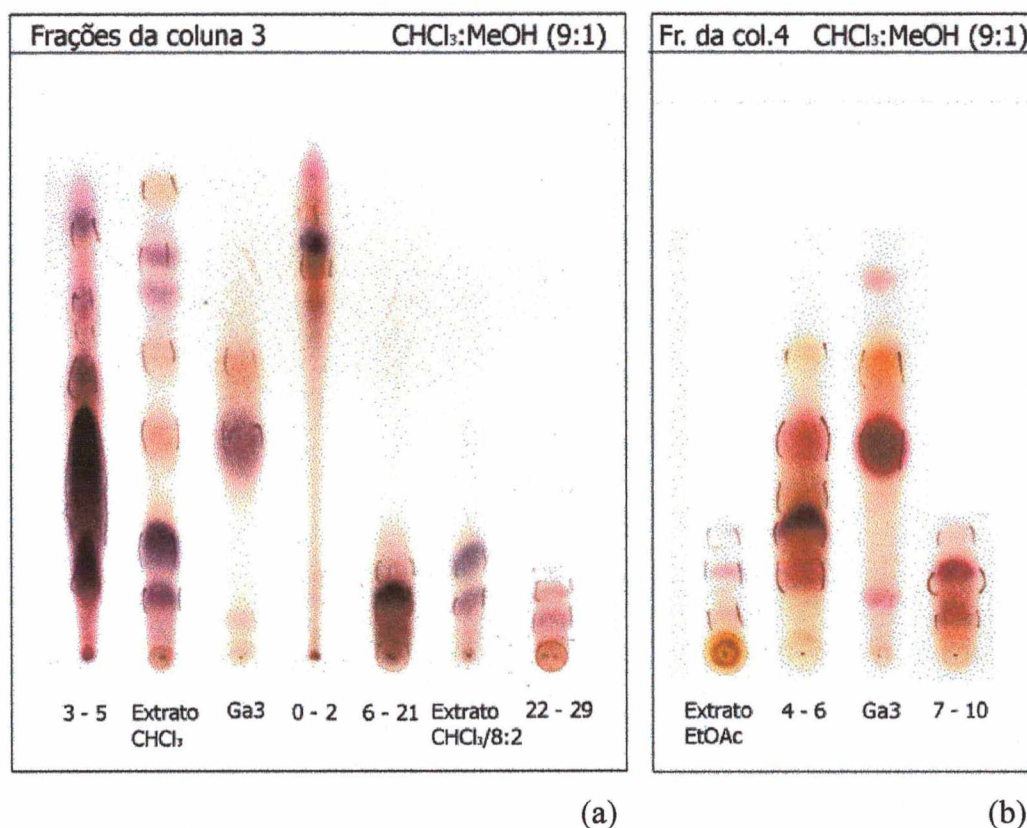


Figura 11 – Cromatogramas das frações obtidas nas colunas 3 (a) e 4 (b) comparando-as com o padrão Ga3. Sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1)

### 3.6 Identificação das substâncias

As frações que exibiram, em CCD, manchas com  $R_f$  similares aos dos padrões utilizados e as que pelo teste de difusão foram ativas contra as bactérias testadas, foram enviadas ao Professor Delle Monache para identificação das substâncias, através de métodos espectroscópicos de RMN.

Entre as frações da coluna 1, verificou-se que a fração 5-11 continha metil-ésteres de ácidos graxos saturados, a fração 12-15 apresentava ácidos graxos saturados e insaturados, a fração 18-19 era composta principalmente por ácidos graxos saturados e insaturados, e também pelos esteróis Ga1 e Ga2 em quantidades mínimas. Assim, ficaram confirmados os resultados obtidos com a análise em CCD da fração 18-19 com os padrões, sendo que nessa fração encontra-se Ga1 e não Ga0, segundo a

identificação realizada pelo Professor Delle Monache.

Foram analisadas as frações 4, 5, 6-12 e 13-23 da coluna 2. Na fração 4 foi identificado Ga1, e não foram identificados sinais de Ga2. A partir da fração 5 foi purificada uma substância através de cristalização com acetona, a qual foi identificada como Ga0. No licor mãe (acetona) remanescente do processo de cristalização mencionado acima, foi detectada uma pequena quantidade de Ga2, sendo seu componente principal uma mistura de ácidos do tipo aplanoxídico (triterpenos polioxigenados derivados do lanostano). Na fração 6-12 foram identificados os ácidos aplanoxídicos C (principal componente), F e G. A fração 13-23 é composta pelos ácidos aplanoxídicos G e A, sendo o A o mais abundante. A estrutura dos ácidos aplanoxídicos A e C foi publicada por CHAIRUL *et al.* (1991) e dos ácidos F e G por CHAIRUL *et al.* (1994).

Verificou-se que a fração 6-21 da coluna 3 é composta por uma mistura complexa de ácidos aplanoxídicos, cujas estruturas não foram determinadas.

As frações 4-6, 7-10, 11-16 e 17-27 da coluna 4 foram analisadas, mas não foi possível identificar nenhuma substância. Essas frações foram reservadas para trabalhos futuros.

### **3.7 Atividade antibacteriana**

Um estudo preliminar da atividade antibacteriana dos extratos e frações obtidos foi realizado utilizando-se o método de difusão em gel. Os resultados desse teste estão apresentados na Tabela 3, na qual também estão relacionadas as substâncias identificadas que compõem as frações ativas. Para simplificar a interpretação dos resultados os seguintes números foram utilizados: 0 (inativa), que significa ausência de zona de inibição do crescimento bacteriano ou zona de inibição menor que 9,0 mm; 1



(parcialmente ativa), que significa zona de inibição entre 9,0 e 12,0 mm; 2 (ativa), que significa zona de inibição entre 13,0 e 18,0 mm; 3 (muito ativa) que significa zona de inibição maior que 18,0 mm (SMÂNIA *et al.*). O efeito da eritromicina e da tetraciclina sobre *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 está de acordo com o descrito para essas cepas-referência para testes de difusão (TRAUB & LEONHARD, 1995).

TABELA 3 - Atividade antibacteriana dos extratos e das frações de *G. australe* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Extrato ou Fração <sup>a</sup>	Sa <sup>b</sup>	Ec	Bc	Pa	Componentes
Extrato MeOH	3 <sup>c</sup>	0	1	1	
Extrato Hexano	2	0	1	0	
<b>Coluna 1</b>					
Fr. 1-2	0	0	+	+	◆
Fr. 3-4	0	+	+	+	◆
Fr. 5-11	3	0	3	0	Metil-ésteres de ácidos graxos saturados
Fr. 12-15	2	0	+	+	Ácidos graxos saturados e insaturados
Fr. 16-17	2	+	+	+	★
Fr. 18-19	2	0	3	0	Ácidos graxos saturados e insaturados, Ga1 e Ga2
Fr. 20-24	0	0	+	+	◆
Fr. 25-30	0	0	0	0	◆
Extrato CHCl <sub>3</sub>	2	0	2	0	
Extrato CHCl <sub>3</sub> filtrado c/ CHCl <sub>3</sub>	2	0	2	0	
<b>Coluna 2</b>					
Fr. 0-3	1	0	+	+	★
Fr. 4	0	0	1	0	Ga1
Fr. 5	0	0	3	0	Ga0 e Ga2, mais mistura de ácidos aplanoxídicos
Fr. 6-12	0	0	2	0	Ácidos aplanoxídicos C, F e G
Fr. 13-23	0	0	2	0	Ácidos aplanoxídicos A e G

(continuação)

Extrato ou Fração	Sa	Ec	Bc	Pa	Componentes
Extrato CHCl <sub>3</sub> filtrado c/ CHCl <sub>3</sub> :MeOH (8:2)	2	0	3	0	
<b>Coluna 3</b>					
Fr. 0-2	0	0	+	+	◆
Fr. 3-5	1	0	1	0	✱
Fr. 6-21	2	0	2	1	Ácidos aplanoxídicos não determinados
Fr. 22-29	0	0	0	0	◆
Fr. 30-34	0	0	0	0	◆
Fr. 35-39	0	0	0	0	◆
Fr. 40-46	0	0	0	0	◆
Extrato EtOAc	3	0	2	2	
<b>Coluna 4</b>					
Fr. 0-1	0	0	+	+	◆
Fr. 2-3	1	1	+	+	★
Fr. 4-6	2	0	2	0	Substâncias indeterminadas
Fr. 7-10	2	0	2	0	Substâncias indeterminadas
Fr. 11-16	3	1	1	1	Substâncias indeterminadas
Fr. 17-27	2	0	1	1	Substâncias indeterminadas
Fr. 28-38	1	0	0	1	✱
Fr. 39-52	1	0	0	0	✱
Fr. 53-60	0	0	0	0	◆
<b>Controles</b>					
NH <sub>4</sub> OH 0,1N	0	0	0	0	-
NH <sub>4</sub> OH 1,0N	0	0	0	0	-
Eritromicina	3	0	3	0	-
Tetraciclina	3	3	3	2	-

<sup>a</sup> 5,0 mg de cada extrato e 3,0 mg de cada fração foram usados nos orifícios feitos no ágar;

<sup>b</sup> Sa = *Staphylococcus aureus*, Ec = *Escherichia coli*, Bc = *Bacillus cereus*, Pa = *Pseudomonas aeruginosa*;

<sup>c</sup> 0 = ausência de zona de inibição ou zona de inibição menor que 9,0 mm (inativa); 1 = zona de inibição entre 9,0 e 12,0 mm (parcialmente ativa); 2 = zona de inibição entre 13,0 e 18,0 mm (ativa); 3 = zona de inibição maior que 18,0 mm (muito ativa); + = fração não testada;

◆ = estudo químico não realizado porque a fração não apresentou atividade; ★ = estudo químico não realizado porque a quantidade obtida da fração foi insuficiente; ✱ = estudo químico não realizado porque a fração apresentou pouca atividade.



### 3.8 Extração de substâncias das culturas dicarióticas com solventes orgânicos

Os rendimentos médios em micélio (peso fresco) obtidos no cultivo dos isolados MIP-G98012, MIP-G99013 e MIP-G99015 estão apresentados na Tabela 4. Nas culturas do isolado MIP-G98012 restaram em média 63,35 ml de caldo de cultivo, do isolado MIP-G99013 81,65 ml de caldo e do isolado MIP-G99015 106,65 ml de caldo, todas as culturas continham, inicialmente, 150,0 ml de caldo de cultivo.

TABELA 4 – Rendimento médio em gramas do cultivo dos isolados MIP-G98012, MIP-G99013 e MIP-G9915

	MIP-G98012	MIP-G99013	MIP-G99015
Rendimento Médio*	76,85 (0,80)*	51,77 (1,55)	32,66 (0,49)

\* Média de 3 repetições \*(desvio padrão)

Pela análise de variância (teste F) constatou-se que as diferenças nos rendimentos dos cultivos dos diferentes isolados foram significantes ( $p < 0,0001$ ), portanto nas condições de crescimento utilizadas nesse experimento o isolado MIP-G98012 apresentou o melhor rendimento em micélio fresco.

Os caldos de cultivo restantes nas três garrafas de cada isolado e os micélios obtidos nas mesmas foram agrupados para o processo de extração de substâncias. Para o isolado MIP-G98012 foram agrupados 190,0 ml de caldo de cultivo e 230,56 g de micélio, para o isolado MIP-G99013 238,0 ml de caldo de cultivo e 155,33 ml de micélio e para o isolado MIP-G99015 320,0 ml de caldo de cultivo e 97,99 ml de micélio. Na Tabela 5 estão apresentados os rendimentos do processo de extração com  $\text{CHCl}_3$  e EtOAc dos caldos de cultivos e dos micélios das três culturas agrupadas de cada isolado.

TABELA 5 – Rendimentos do processo de extração de substâncias dos caldos de cultivo e micélios dos isolados MIP-G98012, MIP-G99013 e MIP-G9915

	MIP-G98012	MIP-G99013	MIP-G99015
<b>Extrato em CHCl<sub>3</sub></b>			
- Caldo (mg)	<10,00	<10,00	10,00
- Micélio (mg)	20,00	10,00	<10,00
<b>Extrato em EtOAc</b>			
- Caldo (mg)	10,00	15,00	<10,00
- Micélio (mg)	35,00	48,00	20,00

Foi feita a comparação entre as substâncias encontradas nos extratos obtidos em CHCl<sub>3</sub> e EtOAc para cada isolado através de CCD (Figura 12a e b). Por esse método não foram observadas diferenças qualitativas entre as substâncias produzidas pelos diferentes isolados. Considerou-se, então, que os três isolados apresentavam o mesmo perfil químico. Pela técnica de comparação utilizada sugere-se que existam diferenças quantitativas e não qualitativas com relação às substâncias produzidas pelos diferentes isolados da mesma espécie.

No cromatograma dos extratos dos caldos de cultivo (Figura 12a) pode-se observar a predominância de substâncias mais polares nos caldos restantes das culturas, que não aparecem nos extratos feitos a partir do caldo de batata que não foi inoculado. Nos extratos dos micélios (Figura 12b) observa-se manchas com R<sub>f</sub> similar ao dos esteróis identificados nos extratos e frações dos basidiomas, além de substâncias mais polares.

Como não foram observadas diferenças qualitativas nos cromatogramas

comparativos entre os três isolados, optou-se por utilizar os extratos do caldo de cultivo e do micélio do isolado MIP-G98012 para realização de CCDs comparativas com os extratos obtidos a partir dos basidiomas de *G. australe* e os padrões Ga0, Ga1, Ga2 e Ga3 (Figuras 13a e 13b).

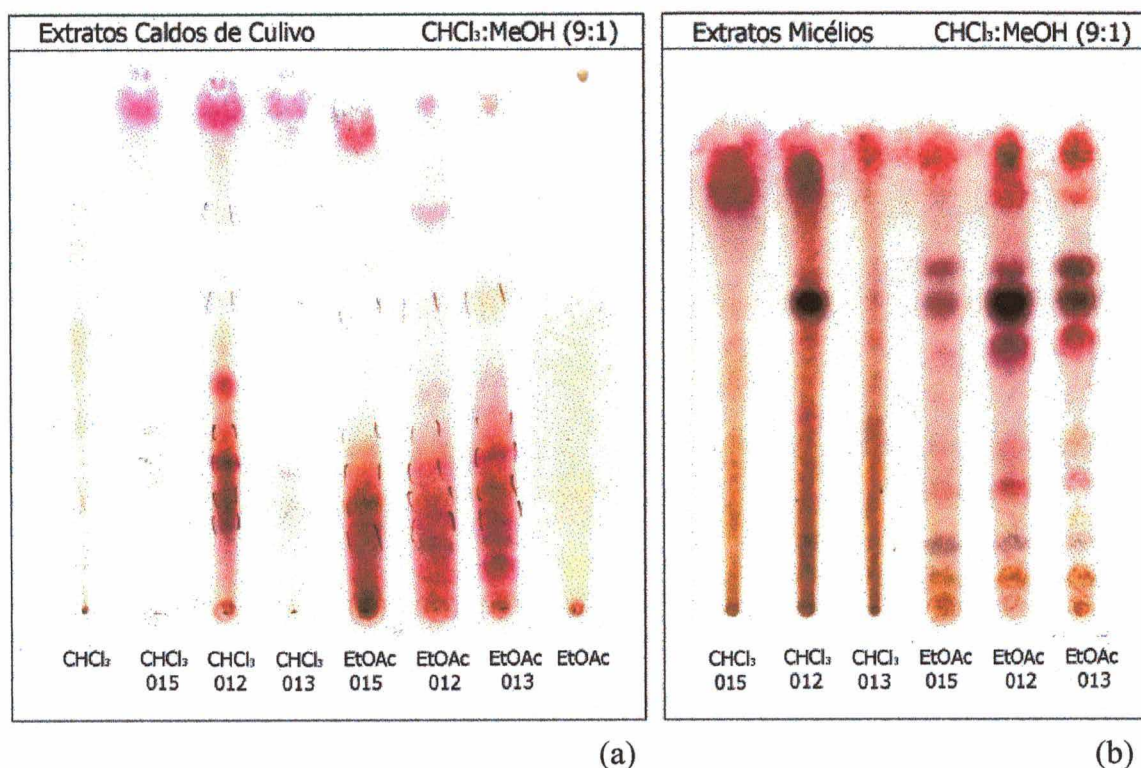


Figura 12 – Cromatogramas comparativos entre os extratos obtidos com  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{EtOAc}$  do caldo de cultivo (a) e do micélio (b) dos isolados MIP-G98012 (012), MIP-G99013 (013) e MIP-G99015 (015); sistema de solventes  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (9:1);  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  = Extratos dos caldos sem inóculo em  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{EtOAc}$ .

Com relação à presença de Ga0/Ga1 nos extratos da cultura, verifica-se no cromatograma (Figura 13a) a presença de manchas muito sutis com  $R_f$  similar ao dessas substâncias, tanto nos extratos obtidos do caldo de cultivo quanto nos extratos do micélio. A mancha mais evidente nos extratos do micélio tem  $R_f$  compatível com o padrão Ga2. Com finalidade ilustrativa, nessa mesma placa foi corrida uma amostra do extrato em hexano, já que a substância Ga2 foi detectada na fração 18-19 desse extrato.



Através de CCD (Figura 13b) não foi constatada a presença de Ga3 nos extratos provenientes das culturas.

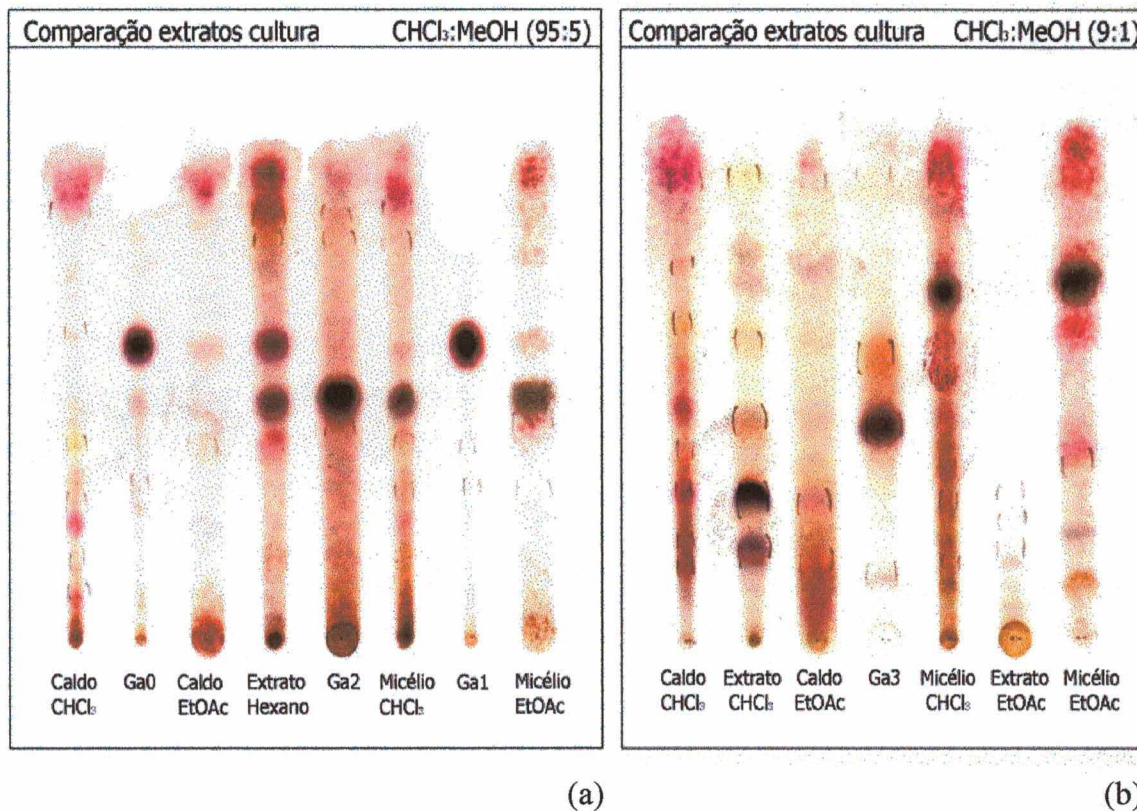


Figura 13 – (a) Cromatograma comparativo entre os extratos em CHCl<sub>3</sub> e EtOAc do caldo de cultivo e do micélio do isolado MIP-G98012, o extrato em hexano obtido dos basidiomas de *G. australe* e os padrões Ga0, Ga1 e Ga2; sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5); (b) Cromatograma comparativo entre os extratos em CHCl<sub>3</sub> e EtOAc do caldo de cultivo e do micélio do isolado MIP-G98012, os extratos em CHCl<sub>3</sub> e EtOAc obtidos dos basidiomas de *G. australe* e o padrão Ga3; sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1).

## 4 DISCUSSÃO

A maioria dos basidiomas coletados (12 deles) desenvolveu-se sobre árvores cortadas ou madeira em decomposição, e apenas três basidiomas foram coletados sobre árvores vivas (Tabela 1). Um dos basidiomas (FLOR 11741) foi coletado sobre um tronco de gimnosperma (*Pinus* sp.) em decomposição, todos os demais foram coletados sobre dicotiledôneas, coincidindo com ZHAO (1989), que afirma que o habitat de *G. australe* é sobre madeira em decomposição, e com RYVARDEN & GILBERTSON (1993), que afirmam que essa espécie desenvolve-se sobre dicotiledôneas vivas ou mortas. Entretanto, MELO (1986) refere que *G. australe* desenvolve-se quase que exclusivamente sobre árvores vivas, como parasita e raramente sobre madeira em decomposição, como saprófita. Contudo, os basidiomas coletados para realização deste trabalho desenvolveram-se principalmente sobre madeira em decomposição ou árvores cortadas, sendo que as árvores vivas nas quais os basidiomas foram coletados não pareciam afetadas pela presença do fungo. Assim, observando-se as coletas realizadas neste estudo é possível sugerir que *G. australe* é uma espécie saprófita e não parasita.

KOTLABA & POUZAR (1971) afirmam que *G. australe* raramente ocorre em comunidades florestais naturais, a maioria das coleções observadas por eles eram provenientes de parques, jardins, e margens de rodovias. De maneira geral, neste trabalho os basidiomas foram coletados em ambientes que sofreram ação humana, seja recente ou passada.

A identificação dos basidiomas baseou-se nos trabalhos de STEYAERT (1972, 1975), considerando também os trabalhos de LOGUERCIO-LEITE (1990b) e GERBER (1996) que estudaram materiais coletados na Ilha de Santa Catarina. Nossas medidas (item 3.1.1) estão de acordo com as obtidas para *G. australe* por esses autores.

STEYAERT (1975) considera o nome *G. australe* como sendo um sinônimo de *G. tornatum* (Pers.) Bres., entretanto RYVARDEN & JOHANSEN (1980) salientam que apesar de *Polyporus tornatus* Pers. (1826) ser um nome mais antigo que *P. australis* Fr., o qual foi publicado em *Elenchus Fungarium* (1828), esse último foi definido no artigo 13 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica como parte do *Systema Mycologicum* publicado em 1 de janeiro de 1821. Portanto *P. australis* torna-se um nome válido, sendo correta a utilização do nome *G. australe* ao invés de *G. tornatum*.

Foram feitos isolamentos de culturas dicarióticas de todos os basidiomas coletados. Inicialmente foram obtidas culturas dos basidiomas FLOR 11723, 11727, 11728 e 11729. Entretanto, após um período de armazenagem em geladeira ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) essas culturas perderam a viabilidade. Assim foram coletados novos basidiomas, alguns dos quais originaram as culturas dicarióticas indicadas na Tabela 2, utilizadas posteriormente neste trabalho. WANG, LIN, HUA (1990) avaliaram a preservação de 36 culturas de diferentes espécies de *Ganoderma* crescidas em ágar utilizando quatro técnicas de preservação: a temperatura ambiente cobertas por óleo mineral, no refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ , em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e em tanques de nitrogênio líquido a  $-180^{\circ}\text{C}$ . Após um ano de preservação, das culturas armazenadas em refrigerador, seis perderam a viabilidade e seis cresceram com muito pouca vitalidade. Com as outras três técnicas de estocagem todas as culturas se mantiveram viáveis. Deve-se considerar que a manutenção do fungo em um meio (ágar-batata) que possui uma composição totalmente

diferente do substrato natural do fungo (madeira) pode afetar também a viabilidade das culturas. Segundo SMITH & ONIONS (1994), além da temperatura e do meio de cultura, outros fatores que podem afetar a viabilidade das culturas são: luz, aeração, pH e atividade de água.

Com relação ao processo de extração de substâncias, foram utilizados 675,5 g de pedaços dos basidiomas secos para obtenção do extrato metanólico. O peso seco desse extrato foi de 35,8 g, que corresponde a 5,3% do peso dos basidiomas. Em seus trabalhos com *G. applanatum*, CHAIRUL *et al.* (1991, 1994) utilizaram 1,0 kg de basidiomas pulverizados para extração com metanol e obtiveram apenas 20,0 g de extrato bruto, ou seja, um processo com rendimento de 2,0%. ARISAWA *et al.* (1986) utilizaram 8,0 kg de basidiomas de *G. lucidum* e obtiveram 180,0 g de extrato metanólico, o rendimento do processo foi de 2,25%. Assim, pode-se considerar que o rendimento do processo de extração utilizado foi melhor do que aqueles obtidos pelos autores citados. Em todos os casos, foi necessária uma grande quantidade de material biológico para a obtenção de uma pequena quantidade de extrato bruto.

A técnica usada para a extração de substâncias dos basidiomas de *G. australe* foi a recomendada para análises fitoquímicas, nas quais não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado (FALKENBERG, SANTOS, SIMÕES, 1999). O material foi submetido a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente (item 2.6), conseguindo-se assim, uma extração fracionada, na qual os diferentes extratos continham compostos de polaridade também crescente, como pode-se verificar na Figura 5. As substâncias mais apolares do extrato bruto ficaram no extrato em hexano e foram identificadas posteriormente, como sendo, principalmente, ácidos graxos saturados, insaturados e seus derivados, e pequenas quantidades dos esteróis Ga1

e Ga2. O extrato em  $\text{CHCl}_3$  foi o de maior rendimento. Entre as substâncias que compunham esse extrato, é importante salientar a presença de triterpenos ácidos e de esteróis. KIM & KIM (1999) afirmam que a maioria dos triterpenos isolados de *G. lucidum* foram extraídos com  $\text{CHCl}_3$ . Conforme era esperado, no extrato em EtOAc foram obtidas substâncias mais polares que aquelas encontradas nos demais extratos, essas substâncias, nos sistemas de solventes e revelador utilizados no desenvolvimento da CCD não tiveram boa separação e resolução, e também não foram identificadas nos estudos químicos (item 3.7). Como já foi mencionado anteriormente as frações desse extrato serão alvo de futuras investigações.

A comparação das frações obtidas com os padrões (item 3.4) através de CCD, teve como objetivo verificar a presença dos triterpenóides isolados de outras espécies de *Ganoderma* em *G. australe*. Essa técnica revelou a possível ocorrência de Ga0/Ga1 e Ga2 nas frações 18-19 da coluna 1 e nas frações 4 e 5 da coluna 2 (Figuras 9 e 10a). A presença dessas substâncias em *G. australe* foi confirmada pelos estudos químicos realizados pelo Professor Delle Monache (item 3.7). A ocorrência de vários esteróis, além do ergosterol em fungos foi abordada na introdução deste trabalho. Segundo GRIFFIN (1994), é esperado que certos extratos obtidos de fungos contenham misturas complexas de esteróis com  $\text{C}_{27}$ ,  $\text{C}_{28}$  e  $\text{C}_{29}$ . A presença de Ga0 ( $5\alpha$ -ergost-7-en- $3\beta$ -ol ou fungisterol), Ga1 ( $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol) e Ga2 (5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ -ol ou peróxido de ergosterol) já foi verificada por diversos autores em outras espécies de *Ganoderma*, entretanto a presença desses esteróis em *G. australe* não havia sido descrita anteriormente. Esses esteróis também já foram encontrados em outras espécies de fungos não pertencentes a família Ganodermataceae.

O Ga0 já foi identificado em *G. applanatum*, *G. lucidum*, *Laetiporus sulphureus*



(Bull.: Fr.) Murr. (KAC *et al.* 1984; SMÂNIA *et al.*), *Perenniporia ochroleuca* (Berk.) Ryv. (HIROTANI *et al.*, 1984) e *Inonotus obliquus* Pers.: Fr. (KAHLOS *et al.* 1996)

O Ga1, segundo KELLER, MAILLARD, HOSTETTMAN (1996), é um esterol usualmente encontrado em fungos, já tendo sido isolado de *G. amboinense* (Lam.: Fr.) Pat. (LIN, KUO, WON, 1993), *G. applanatum* (KAC *et al.*, 1984; GAN, KUO, LIN, 1998; SMÂNIA *et al.*), *G. carnosum* Pat. (KELLER *et al.*, 1997), *G. lucidum* (KAC *et al.* 1984; LIN, TOME, WON, 1990), *G. neojaponicum* Imaz. (GAN *et al.*, 1998) e *G. tsugae* (LIN, FANN, CHUNG, 1997) e também de outras espécies de fungos: *P. ochroleuca* (HIROTANI *et al.*, 1984), *L. sulphureus* (KAC *et al.*, 1984), *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan (TAKAIASHI *et al.*, 1987), *Phellinus torulosus* (Pers.) Bourd. & Galz. (GONZÁLEZ *et al.*, 1994), *Fomitopsis pinicola* (Swartz.: Fr.) Karst. (KELLER *et al.*, 1996) e *I. obliquus* (KAHLOS *et al.*, 1996)

As espécies de *Ganoderma* das quais já foi isolado Ga2 foram: *G. applanatum* (SMÂNIA *et al.*), *G. carnosum* (KELLER *et al.*, 1997) e *G. lucidum* (ARISAWA *et al.*, 1986; LIN *et al.*, 1990; MIZUSHINA *et al.*, 1998). Ga2 também já foi encontrado em *P. torulosus* (GONZÁLEZ *et al.*, 1994), *I. obliquus* (KAHLOS *et al.*, 1996) e *Phellinus pini* (Fr.) Ames (LOURENÇO *et al.*, 1996). Além de fungos, essa substância já foi isolada de diversas espécies de esponjas marinhas (SHEIKH & DJERASSI, 1974).

Com relação ao triterpeno Ga3 isolado de *G. applanatum* por SMÂNIA *et al.*, os estudos químicos não revelaram sua presença em *G. australe*. Apesar disso, não se pode excluir completamente sua ausência nessa espécie, já que nas frações analisadas quimicamente, que pela CCD pareciam conter manchas com  $R_f$  similar ao de Ga3 (Figuras 10, 11a, 11b), existem diversas outras substâncias que podem mascarar os sinais de Ga3 nos espectros de RMN. A purificação dessas frações revelará a presença

ou não dessa substância em *G. australe*.

Foram identificados pela primeira vez em *G. australe* os ácidos aplanoxídicos A, C, F e G. Essas substâncias foram descritas para *G. applanatum* por CHAIRUL *et al.* (1991, 1994), que além dessas também encontraram e descreveram os ácidos aplanoxídicos B, D, H e I.

A presença dos ácidos aplanoxídicos em *G. australe* é um fato muito interessante, já que essa espécie é morfologicamente muito semelhante a *G. applanatum* e, ao que parece, também quimicamente. O gênero *Ganoderma* pode ser dividido em dois grupos reconhecíveis macroscopicamente: o complexo *G. lucidum*, que compreende as espécies com a superfície superior dos basidiomas lacada, e o complexo *G. applanatum*, que compreende as espécies com a superfície superior dos basidiomas não-lacada (GOTTLIEB, SAIDMAN, WRIGHT, 1998). *G. lucidum* é a espécie de *Ganoderma* mais estudada, mais de 119 triterpenóides já foram descritos para essa espécie (MAHATO *et al.*, 1992; CONNOLLY *et al.*, 1994; MAHATO & SEN, 1997; KIM & KIM, 1999). Em comum entre *G. applanatum* e *G. lucidum* até o momento foram encontrados apenas dois triterpenos: o ácido ganoderênico A e o composto B8 (NISHITOBA *et al.*, 1989), sendo que nenhum triterpeno do tipo ácido aplanoxídico foi isolado de *G. lucidum*. Dessa forma, nota-se que além das diferenças morfológicas, parecem haver diferenças na composição química entre os dois complexos de espécies de *Ganoderma*.

Diferenças na composição de triterpenos entre espécies lacadas foram encontradas por CHEN *et al.* (1999) ao analisarem o padrão de triterpenos de basidiomas obtidos a partir de três isolados de *G. lucidum* e três de *G. tsugae*. Assim, estudos quimiotaxonômicos baseados em padrões de triterpenos, aliados à taxonomia

tradicional, podem fornecer outras características para a identificação das espécies de *Ganoderma*. Associando as características morfológicas, químicas e genéticas, espécies até o presente consideradas diferentes poderão ser agrupadas, enquanto outras consideradas iguais poderão ser separadas.

Os esteróides e o triterpeno isolados de *G. australe* por JAIN & GUPTA (1984) não foram identificados em nossas frações, mas isso não significa que eles estejam ausentes, uma vez que o processo de separação das substâncias deverá ainda ser concluído e assim essas substâncias poderão ser detectadas.

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e das frações obtidas foi realizada utilizando-se o método de difusão. As técnicas de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) (SMÂNIA *et al.*, 1995) forneceriam uma avaliação mais acurada desse tipo de atividade, já que as substâncias ficam em contato direto com as bactérias, enquanto no teste de difusão a atividade depende de como as substâncias se difundem pelo meio de cultura. Os testes para determinação das CMI e CMB não foram realizados porque as frações obtidas foram preservadas para a purificação das substâncias ativas. Além disso, os resultados desses testes são melhor interpretados quando realizados com substâncias puras, já que nas frações podem existir interações sinérgicas e/ou antagônicas entre as substâncias presentes. Assim, quando as frações forem purificadas esses testes serão efetuados. Não foram efetuadas repetições dos testes de difusão também em virtude de escassez de material.

Os resultados dos testes de difusão (Tabela 3) mostram que as frações obtidas foram ativas principalmente contra as cepas Gram-positivas. A fração 6-21 da coluna 3 e algumas das frações do extrato em EtOAc apresentaram pouca atividade contra as

bactérias Gram-negativas. WASSER & WEIS (1999) mencionam que espécies de *Ganoderma* (*G. applanatum*, *G. lucidum* e *G. oregonense* Murr.) sintetizam substâncias ativas contra espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus pneumoniae*, todas bactérias Gram-positivas.

Relacionando as substâncias identificadas presentes nas frações ativas da coluna 1 obtiveram-se principalmente ácidos graxos saturados, insaturados e seus derivados. Não foram encontrados trabalhos que mencionassem a atividade antibacteriana dessa classe de compostos.

A fração ativa 18-19 (coluna 1) continha os esteróis Ga1 e Ga2, a fração 4 (coluna 2) continha Ga1 e a fração 5 (coluna 2) continha os esteróis Ga0 e Ga2. A atividade antibacteriana de frações de *G. applanatum* que continham essas substâncias foi avaliada por SMÂNIA *et al.* com resultados muito semelhantes aos nossos. Esses mesmos autores determinaram as CMI e CMB dessas substâncias purificadas e consideraram os resultados interessantes, principalmente levando em conta suas estruturas. Por fim, propõem que a obtenção de derivados dessas estruturas, por conversão química, poderá levar ao desenvolvimento de novos antibióticos.

Nas colunas 2 e 3 foram identificados, em frações ativas, ácidos aplanoxídicos. A atividade antibacteriana desse tipo de substância ainda não foi determinada. Entretanto, diversos outros terpenos derivados de fungos já tiveram sua atividade antibacteriana descrita. AYER & BROWNE (1981) mencionam esse tipo de atividade para diversos sesquiterpenos e diterpenos isolados de várias espécies de fungos. KELLER *et al.* (1996) isolaram cinco triterpenos ácidos de *Fomitopsis pinicola* que apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis* em testes biológicos desenvolvidos diretamente sobre as placas de sílica usadas em CCD.

As frações do extrato em EtOAc também apresentaram boa atividade antibacteriana, entretanto nessas frações nenhum componente foi identificado, sabe-se apenas que são substâncias mais polares do que as identificadas nos outros extratos. Foi possível observar por meio de CCD (Figura 11b) que houve alguma separação de substâncias até a fração 7-10 desse extrato. Com as demais frações, embora tenham sido utilizados diversos sistemas de solventes bastante polares para realização de CCD, nenhuma separação foi visualizada (resultados não apresentados). É importante ainda mencionar que foi usado apenas um sistema revelador, o qual é usualmente empregado na pesquisa de terpenóides (HOUGHTON & RAMAN, 1998). Dessa forma é possível que outros tipos de compostos possam estar presentes nessas frações. Outras técnicas de separação devem ser utilizadas com essas frações para o isolamento de possíveis novas substâncias. Com relação a outras classes de compostos que apresentam atividade antimicrobiana, ALI *et al.* (1996) citam que a hispidina, um composto fenólico isolado de um extrato em EtOAc de *Inonotus hispidus* (Bull.: Fr.) Karst. apresenta esse tipo de atividade.

Algumas das substâncias identificadas em *G. australe* já tiveram outras atividades biológicas descritas. Os ácidos aplanoxídicos apresentam atividade antitumoral (CHAIRUL *et al.*, 1991, 1994). Ga2 acentua o efeito inibitório do ácido linoleico sobre a DNA polimerase  $\beta$  (MIZUSHINA *et al.*, 1998). Além disso, algumas das frações obtidas de *G. australe* neste trabalho foram avaliadas contra *Trypanossoma cruzi* pelo Professor Mário Steindel (Laboratório de Protozoologia, MIP/UFSC) e apresentaram resultados promissores (dados não publicados).

Com relação aos estudos com as culturas dicarióticas, verificou-se que nas condições de cultivo usadas (item 2.12) o isolado MIP-G98012 apresentou o melhor

rendimento em peso fresco de micélio (Tabela 4). Entretanto, não é possível considerar esse resultado como definitivo já que não foram avaliadas outras condições de cultivo. A alteração de alguma(s) da(s) condição(ões) do cultivo (meio, pH, temperatura) pode levar a outros resultados.

Os estudos com as culturas dicarióticas devem ter continuidade, no sentido de verificar se o isolado MIP-G98012 apresenta realmente a maior produtividade de biomassa, para extração de substâncias bioativas.

Não foram realizados testes de atividade biológica ou estudos químicos com os extratos obtidos das culturas em virtude do baixo rendimento do processo de extração (Tabela 5).

Analisando os cromatogramas dos extratos dos caldos de cultivo e micélios (Figuras 12a e 12b), verificou-se a presença de substâncias polares disponíveis nos caldos de cultivo, as quais não estavam presentes nos extratos obtidos do caldo não-cultivado, ou seja, essas substâncias não foram extraídas dos ingredientes do meio de cultura. Entretanto, deve-se considerar que com a técnica de filtração usada para separar o micélio do caldo havia a possibilidade de passagem de pedaços de micélio para o caldo. Assim, as manchas presentes nesse cromatograma podem ser provenientes de substâncias presentes no micélio e não que tenham sido excretadas pelo fungo. As referências bibliográficas consultadas sobre extração e identificação de triterpenos em culturas de *Ganoderma* não mencionam que tenham sido feitas extrações dos caldos de cultivo, os trabalhos consultados registram a ocorrência de metabólitos no micélio cultivado (HIROTANI & FURUYA, 1986; HIROTANI *et al.*, 1987; CHYR & SHIAO, 1991; CHEN *et al.*, 1999).

Através de CCD não foram observadas diferenças qualitativas nos extratos

obtidos dos três diferentes isolados de *G. australe*, outras técnicas de análise qualitativa mais sofisticadas devem ser empregadas para comprovar as semelhanças ou diferenças entre os isolados. É interessante ressaltar que esses isolados foram obtidos de basidiomas coletados em três localidades distintas do Estado: Correia Pinto, Ilha de Santa Catarina e Ilha de Ratonés (Tabela 1), e provavelmente possuem origens genéticas distintas. Um estudo detalhado da composição de triterpenos desses isolados, poderá demonstrar se a produção dessas substâncias é uma característica específica ou individual. Estudos comparativos dessa natureza foram realizados com isolados de *G. lucidum* e *G. tsugae*. Existem diferenças no padrão de triterpenos entre diferentes isolados de *G. lucidum* (HIROTANI, INO, FURUYA, 1993; CHEN *et al.*, 1999), entretanto, entre os três diferentes isolados de *G. tsugae*, analisados por CHEN *et al.* (1999), não foram observadas diferenças.

Foram feitos cromatogramas comparativos entre os extratos do isolado MIP-G98012, os extratos obtidos dos basidiomas e os padrões (Figuras 13a e 13b). Constatou-se a presença de manchas com  $R_f$  similares aos de Ga0/Ga1 tanto nos extratos dos caldos quanto dos micélios, e de Ga2 nos extratos de micélio. A presença de esteróis no micélio cultivado era esperada, uma vez que esses metabólitos são constituintes da membrana citoplasmática dos fungos (WEETE, 1989). No cromatograma 13b, quando observam-se as manchas mais evidentes do extrato em  $\text{CHCl}_3$ , as quais correspondem aos ácidos aplanoxídicos, constata-se que nos extratos de cultura aparecem manchas com  $R_f$  similares aos desses compostos, mas que não apresentaram a mesma coloração quando reveladas. Não foram observadas manchas com  $R_f$  correspondente ao triterpeno Ga3. Apesar dessas observações, não foram realizados estudos químicos mais aprofundados para confirmar a presença ou ausência

dessas substâncias no micélio cultivado.

Existem diversos trabalhos sobre a identificação de triterpenos em culturas de espécies lacadas de *Ganoderma*, principalmente *G. lucidum*. Entretanto, não foram encontrados trabalhos com essa abordagem em espécies não-lacadas. HIROTANI & FURUYA (1986) e HIROTANI *et al.* (1987) verificaram que existem diferenças nos substituintes do C-3 entre os derivados de ácidos ganodéricos isolados do micélio cultivado daqueles isolados dos basidiomas de *G. lucidum*. Os derivados presentes no micélio possuem grupamentos 3 $\alpha$ -hidroxila, os derivados dos basidiomas 3 $\beta$ -hidroxila ou 3-ceto. Assim, parece haver relação entre o estágio do ciclo de vida em que o fungo se encontra e a produção de determinados triterpenos. HIROTANI & FURUYA (1990) estudaram as mudanças no padrão de triterpenos durante a formação do basidioma em *G. lucidum*. Nos diferentes estágios de crescimento do píleo analisados não foram observadas diferenças qualitativas entre eles, mas a quantidade de alguns triterpenos aumentou muito durante o desenvolvimento dessa estrutura. Além disso, esses autores verificaram que os ácidos ganodéricos característicos do micélio cultivado aparecem também nos extratos de basidiomas regenerados a partir das culturas, naqueles obtidos a partir da parte basal (micélio não-diferenciado) do basidioma e no estípite de grandes basidiomas. Essas observações levaram esses autores a sugerir que existe uma relação entre o metabolismo dos triterpenos com a diferenciação fúngica, ou seja, a formação dos basidiomas a partir do micélio. Assim, o isolamento de determinados triterpenos dos basidiomas e culturas pode estar relacionado com o estágio de desenvolvimento no qual o fungo se encontra.

Conforme mencionado acima, existem diferenças qualitativas e quantitativas entre os triterpenos isolados dos basidiomas e dos micélios cultivados de *G. lucidum*.



Com relação a *G. australe* verificou-se que a presença dos esteróis Ga0/Ga1 e Ga2 foi comum aos basidiomas e aos micélios cultivados já que são metabólitos intermediários na síntese do ergosterol (WEETE, 1989), sendo esse esterol constituinte da membrana citoplasmática de todas as espécies de fungos. No que se refere aos triterpenos, em virtude da técnica de comparação utilizada (CCD), não foram detectadas diferenças de composição. Diferenças ou semelhanças entre as substâncias encontradas nos basidiomas e nas culturas de *G. australe* poderão ser detectadas com a utilização de técnicas de análise mais adequadas para a análise de misturas, como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acopladas a espectrometria de massas.

## 5 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Apesar da diversidade morfológica dos basidiomas coletados, todos foram identificados como *G. australe*, sendo essa espécie facilmente encontrada na Ilha de Santa Catarina;

- Os componentes identificados nos extratos dos basidiomas de *G. australe* foram os esteróis Ga0, Ga1 e Ga2 e os triterpenos do tipo ácido aplanoxídico A, C, F e G. Essa é a primeira citação da ocorrência dessas substâncias nessa espécie de fungo.

- Algumas das frações obtidas a partir dos basidiomas apresentaram atividade antibacteriana. Esse efeito foi mais evidente contra as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas.

- Estudos preliminares com culturas dicarióticas sugerem que os esteróis Ga0, Ga1 e Ga2 também estejam presentes no micélio cultivado. A presença de ácidos aplanoxídicos no micélio cultivado não foi evidenciada, mas também não pode ser excluída.

- O presente estudo com *G. australe* abre diversas perspectivas de investigações, tais como a pesquisa de novas substâncias com propriedades antibacterianas produzidas por esta espécie de fungo, a possibilidade de determinação de outras atividades biológicas para as substâncias isoladas, além de estudos com as culturas dicarióticas que passaram a integrar a coleção de culturas do Laboratório de Antibióticos da UFSC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J.E. & GILBERTSON, R.L. - Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. In: SYMPOSIUM 59 A, B 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS. **Proceedings**. 1994. p. 79-93.
- ALI, N.A.A.; JANSEN, R.; PILGRIM, H.; LIBERRA, K.; LINDEQUIST, U. - Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus*. **Phytochemistry**, **41**(suppl.3):927-29, 1996.
- ARISAWA, M.; FUJITA, A.; SAGA, M.; FUKUMURA, H.; HAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; MORITA, N. - Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Natural Products**, **49**(suppl.4):621-25, 1986.
- AYER, W.A. & BROWNE, L.M. - Terpenoid metabolites of mushrooms and related Basidiomycetes. **Tetrahedron**, **37**:2199-248, 1981.
- CHAIRUL; TOKUYAMA, T.; HAYASHI, Y.; NISHIZAMA, M.; TOKUDA, H.; CHAIRUL, S.M.; HAYASHI, Y. - Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. **Phytochemistry**, **30** (suppl.12):4105-09, 1991.
- CHAIRUL; CHAIRUL, S.M.; HAYASHI, Y. - Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma applanatum*. **Phytochemistry**, **35**(suppl.5):1305-08, 1994.
- CHEN, D.H.; SHIOU, W.Y.; WANG, K.C.; HUANG, S.Y.; SHIE, Y.T.; TSAI, C.M.; SHIE, J.F.; CHEN, K.D. - Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, **46**:47-51, 1999.
- CHYR, R. & SHIAO, J.D. - Liquid chromatographic characterization of the triterpenoid patterns in *Ganoderma lucidum* and related species. **Journal of Chromatography**, **542**:327-36, 1991.
- CLEELAND, R. & GRUNBERG, E. - Laboratory evaluation of new antibiotics *in vitro* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V., ed.. - **Antibiotics in laboratory medicine**. 2. ed. London, Williams & Wilkins, 1986. p. 825-76.
- COLETTI, M.A.B. & MONDINO, P. - Basidiomiceti in relazione all'antibiosi Nota V: Attività antibiotica dei miceli e dei liquidi culturali. **Allionia**, **30**:61-4, 1990.

- COLETTI, M.A.B.; PIZZINAT, M.; ROSSI, M. - Basidiomiceti in relazione all'antibiosi Nota VII: Attività antibiotica dei miceli e dei liquidi colturali. *Allionia*, **32**:79-83, 1993.
- CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A.; NGADJUI, B.T. - Triterpenoids. *Natural Products Reports*, **11**(suppl.1):91-107, 1994.
- DAS, M.C. & MAHATO, S.B. Triterpenoids. *Phytochemistry*, **22**(suppl.5):1071-95, 1983.
- DELLE GRECA, M.; MANGONI, L.; MOLINARI, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. -  $5\alpha,8\beta$ -epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol from *Typha latifolia*. *Gazzetta Chimica Italiana*, **120**:391-92, 1990.
- DONK, M. - A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*, **3**:199-324, 1964.
- EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M.R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T. - Anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, **49**(suppl.6):1651-57, 1998.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M. O. - Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., org. - *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis/Porto Alegre, Editora da UFCS/Editora da Univesidade-UFRGS, 1999. p. 163-79.
- GAN, K.H.; KUO, S.H.; LIN, C.N. - Steroidal constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *Journal of Natural Products*, **61**:1421-22, 1998.
- GERBER, A.L. - Fungos xilófilos poróides no Morro da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. *Insula*, **25**:3-68, 1996.
- GILBERTSON, R.L. & RYVARDEN, L. - *North America polypores. Abortiporus-Lindtneria*. Oslo, Fungiflora, 1986. v. 1.
- GONZÁLEZ, A.G.; EXPÓSITO, T.S.; MARANTE, F.J.T.; PÉREZ, M.J.M.; TEJERA, E.B.; BARRERA, J.B. - Lanosterol derivatives from *Phellinus torulosus*. *Phytochemistry*, **35**(suppl.6):1523-26, 1994.
- GOTTLIEB, A.M.; SAIDMAN, B.O.; WRIGHT, J.E. - Isoenzymes of *Ganoderma* species from South America. *Mycological Research*, **10**(suppl.4):415-26, 1998.
- GRIFFIN, D.H. - *Fungal physiology*. 2 ed. New York, Wiley-Liss, 1994. 458p.
- HALMENSCHLAGER, M.A. & LOGUERCIO-LEITE, C. - Espécies de *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae) em Santa Catarina. In: SIMPOSIO DE BOTANICA, 4; SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE MICOLOGIA, 1, Havana, 1993. *Anales*. Havana, 1993. p.80.

- HIKINO, H. & MIZUNO, T. - Hypoglycemic actions of some heterglycans of *Ganoderma lucidum*. **Planta Medica**, **55**:385, 1989.
- HIKINO, H.; ISHIYAMA, M.; SUZUKI, Y.; KONNO, C. - Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Planta Medica**, **55**:423-28, 1989.
- HIROTANI, M. & FURUYA, T. - Changes of the triterpenoid patterns during formation of the fruit body in *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **29**(suppl.12):3767-71, 1990.
- HIROTANI, M.; INO, C.; FURUYA, T. - Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **32**(suppl.2):379-82, 1993.
- HIROTANI, M. & FURUYA, T. - Ganoderic acid derivatives, highly oxygenated lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **25**(suppl.5):1189-93, 1986.
- HIROTANI, M.; ASAKA, I.; INO, C.; FURUYA, T.; SHIRO, M. - Ganoderic acid derivatives and ergosta-4,7,22-triene-3,6-dione from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **26**(suppl.10):2797-803, 1987.
- HIROTANI, M.; INO, C.; FURUYA, T.; SHIRO, M. - Perenniporiol derivatives, six triterpenoids from the cultured mycelia of *Perenniporia ochroleuca*. **Phytochemistry**, **23**(suppl.5):1129-34, 1984.
- HOUGHTON, P.J. & RAMAN, A. - **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts**. 1 ed., London, Chapman & Hall, 1998. 199p.
- JAIN, A.C. & GUPTA, S.K. - The isolation of lanosta-7,9(11),24-trien-3 $\beta$ ,21-diol from the fungus *Ganoderma australe*. **Phytochemistry**, **23**(suppl.3):686-87, 1984.
- JONG, S.C. & BIRMINGHAM, J.M. - Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology**, **37**:101-34, 1992.
- KAC, D.; BARBIERI, G.; FALCO, M.R.; SELDES, A.M.; GROS, E. G. - The major sterols from three species of Polyporaceae. **Phytochemistry**, **23**(suppl.11):2686-87, 1984.
- KAHLOS, K.; LESNAU, A.; LANGE, W.; LINDEQUIST, U. - Preliminary tests of antiviral activity of two *Inonotus obliquus* strains. **Fitoterapia**, **68**(suppl.4):344-47, 1996.
- KELLER, A.C.; KELLER, J.; MAILLARD, M.P.; HOSTETTMANN, K. - A lanostane-type steroid from the fungus *Ganoderma carnosum*. **Phytochemistry**, **46**(suppl.5):963-65, 1997.

- KELLER, A.C.; MAILLARD, M.P.; HOSTETTMAN, K. - Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. **Phytochemistry**, **41**(suppl.4):1041-46, 1996.
- KIM, B.K.; KIM, H.W.; CHOI, E.C. - Anti-HIV activities of *Ganoderma lucidum*. In: SYMPOSIUM 59 A, B 5<sup>th</sup> INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS. **Proceedings**. 1994. p. 115.
- KIM, D.H.; BAE, E.A.; JANG, I.S.; HAN, M.J. - Anti-*Helicobacter pylori* activity of mushrooms. **Archives of Pharmacal Research**, **19**(suppl.6):447-49, 1996.
- KIM, H.W. & KIM, B.K. - Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, **1**:121-38, 1999.
- KIM, H.W.; SHIM, M.J.; CHOI, E.C.; KIM, B.K. - Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1 by water-soluble extract of *Ganoderma lucidum*. **Archives of Pharmacal Research**, **20**(suppl.5):425-31, 1997.
- KINO, K.; YAMASHITA, A.; YAMAOKA, K.; WATANABE, J.; TANAKA, S.; KO, K.; SHIMIZU, K.; TSUNOO, H. - Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Biological Chemistry**, **264**:472-78, 1989.
- KOHDA, H.; TOKUMOTO, W.; SAKAMOTO, K.; FUJII, M.; HIRAI, Y.; YAMASAKI, K.; KOMODA, Y.; NAKAMURA, H.; SHIGEMASA, Y.; UCHIDA, M. - The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. **Chemical and Pharmacology Bulletin**, **33**:1367-74, 1985.
- KOMODA, Y.; SHIMIZU, M.; SONODA, Y.; SATO, Y. - Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. **Chemical and Pharmacology Bulletin**, **37**(suppl.2): 531-33, 1989.
- KOYAMA, K.; IMAIZUMI, T.; AKIBA, M.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; SUZUKI, A.; YANO, S.; HORIE, S.; WATANABE, K.; NAOI, Y. - Antinociceptive components of *Ganoderma lucidum*. **Planta Medica**, **63**(suppl.3): 195-290, 1997.
- KOTLABA, F. & POUZAR, Z. - *Ganoderma adpersum* (Schulz.) Donk: a species resembling *Ganoderma applanatum* (Pers. ex. S. F. Gray) Pat. **Ceská Mykologie**, **25**(suppl.2):88-102, 1971.
- KUBOTA, T.; ASAKA, Y.; MIURA, I.; MORI, H. - 62: Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Helvetica Chimica Acta**, **65**(suppl.2):611-19, 1982.
- KUNIN, C.M. - Use of antimicrobial drugs in developing countries. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **5**:107-13, 1995.

- LEE, S.; PARK, S.; OH, J.W.; YANG, C.H. - Natural inhibitors for protein prenyltransferase. **Planta Medica**, **64**:303-8, 1998.
- LIN, C.H.; TOME, W.P.; WON, S.J. - A lanostanoid of formosan *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **29**(suppl.2):673-75, 1990.
- LIN, C.N.; TOME, W.P.; WON, S.J. - Novel cytotoxic principles of formosan *Ganoderma lucidum*. **Journal of Natural Products**, **54**(suppl.4):998-1002, 1991.
- LIN, C.N.; KUO, S.H.; WON, S.J. - Steroids of formosan *Ganoderma amboinense*. **Phytochemistry**, **32** (suppl.6):1549-51, 1993.
- LIN, C.N.; FANN, Y.F.; CHUNG, M.I. - Steroids of formosan *Ganoderma tsugae*. **Phytochemistry**, **48**(suppl.6):1143-46, 1997.
- LIN, L.J.; SHIAO, M.S.; LEE, K. R. - <sup>13</sup>C NMR correlation of stereochemistry in lanostanoid triterpenes **Journal of Natural Products**, **52**(suppl.3):595-605, 1989.
- LIN, L.J.; SHIAO, M.S.; YEH, S.F. - Triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, **27**(suppl.7):2269-71, 1988.
- LOGUERCIO-LEITE, C. - Revisão histórica sobre fungos poliporóides (Aphyllophorales) xilófilos de Santa Catarina, Brasil. **Insula**, **20**:3-10, 1990a.
- LOGUERCIO-LEITE, C. - **Políporos (Basidiomycotina) xilófilos de la Isla de Santa Catarina, Brasil**. Buenos Aires, 1990b. (Tese – Doutorado - FCNE, UBA).
- LOURENÇO, A.; LOBO, A.; RODRÍGUEZ, B.; JIMENO, M.L. - Ceramides from the fungus *Phellinus pini*. **Phytochemistry**, **43**(suppl.3):617-20, 1996.
- MAHATO, S.B. & SEN, S. - Advances in triterpenoid research, 1990-1994. **Phytochemistry**, **44**(suppl.7):1185-236, 1997.
- MAHATO, S.B. & KUNDU, A.P. - <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids: a compilation and some salient feats. **Phytochemistry**, **37**(suppl.6):1517-75, 1994.
- MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. - Triterpenoids. **Phytochemistry**, **31** (suppl.7):2199-249, 1992.
- MARTÍNEZ, A.T.; BARRASA, J.M.; PRIETO, A.; BLANCO, M.N. - Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. **Mycological Research**, **95**(suppl.7):782-4, 1991.
- MELO, I. - Studies on the Aphyllophorales of Portugal: the genus *Ganoderma* P. Karst. **International Journal of Mycology and Lichenology**, **2**(suppl.2-3):183-204, 1986.



- MIN, B.S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; BAE, K.W.; HATTORI, M. - Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. **Chemical and Pharmacology Bulletin**, 46(suppl.10): 1607-12, 1998.
- MIZUNO, T. - The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1:9-29, 1999.
- MIZUSHINA, Y.; WATANABE, I.; TOGASHI, H.; HANASHIMA, L.; TAKEMURA, M.; OHITA, K.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H.; ESUMI, Y.; UZAWA, J.; MATSUKAGE, A.; YOSHIDA, S.; SAKAGUCHI, K. - An ergosterol peroxide, a natural product that selectively enhances the inhibitory effect of linoleic acid on DNA polymerase  $\beta$ . **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 21(suppl.5):444-8, 1998.
- MONCALVO, J.M & RYVARDEN, L. - **A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk**. Oslo, Fungiflora, 1997. 114p.(Synopsis Fungorum 11)
- MORIGIWA, A.; KITABATAKE, K.; FUJIMOTO, Y.; IKEKAWA, N. - Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 34(suppl.7):3025-28, 1986.
- MUNSELL, L. - Munsell soil color charts. **U. S. Dep. Agric. Hand 18 - Soil Survey Manual**, 1975.
- NISHITOBA, T.; GOTO, S.; SATO, H.; SAKAMURA, S. - Bitter triterpenoids from the fungus *Ganoderma applanatum*. **Phytochemistry**, 28(suppl.1):193-7, 1989.
- RYVARDEN, L. - **Genera of polypores: nomenclature and taxonomy**. Oslo, Fungiflora, 1991. 363p. (Synopsis Fungorum 5)
- RYVARDEN, L. & GILBERTSON, R.L. - **European polypores : part 1**. Oslo, Fungiflora, 1993. 387p. (Synopsis Fungorum 6)
- RYVARDEN, L. & JOHANSEN, I. - **A preliminary polypore flora of East Africa**. Oslo, Fungiflora, 1980. 630p.
- SHEIKH, Y.M. & DJERASSI, C. - Steroids from sponges. **Tetrahedron**, 30:4095-103, 1974.
- SHIAO, M.S.; LEE, K.R.; LIN, L.J.; WANG, C.T. - Natural products and biological activities of the chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. In: HO, C.T., ed. - **Food phytochemicals for cancer prevention II: teas, spices and herbs**. Washington DC, American Chemical Society, 1994. p.342-54.

- SILVER, L.L. & BOSTIAN, K.A. - Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **37**(suppl.3):377-83, 1993.
- SINGER, R. - **The Agaricales in modern taxonomy**. 3 ed. Vaduz, J. Cramer, 1975. 912 p.
- SMÂNIA, A.JR.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.A.F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. - Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **45**:177-81, 1995.
- SMÂNIA, A.JR.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; CUNEO, R.S. - Antibacterial activity of *Ganoderma applanatum* extracts and components. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. (No prelo)
- SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. - **The preservation and maintenance of living fungi**. 2 ed. Oxon, CAB International, 1994. 122 pp. (IMI Technical Handbooks n° 2)
- STERNER, O. - Toxic terpenoids from higher fungi and their possible role in chemical defense systems. **Cryptogamie, Mycologie**, **16**(suppl.1):47-57, 1995.
- STEYAERT, R.L. - Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bagor and Leiden Herbaria. **Persoonia**, **7**(suppl.1):55-118, 1972.
- STEYAERT, R.L. - The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum* (Pers.) Bres. **Transactions British Mycological Society**, **65**(suppl.3):451-567, 1975.
- TAKAISHI, Y.; MURAKAMI, Y.; OHASHI, T.; NAKANO, K.; MURAKAMI, K.; TOMIMATSU, T. - Three triterpenes from *Astraeus hygrometricus*. **Phytochemistry**, **26**(suppl.8):2341-44, 1987.
- TOTH, J.O.; LUU, B.; OURISSON, G. - Les acides ganoderiques T à Z: triterpenes cytotoxiques de *Ganoderma lucidum* (Polyporacée). **Tetrahedron Letters**, **24**(suppl.10):1081-84, 1983.
- TRAUB, N.H. & LEONHARD, B. - Antibiotic susceptibility tests with fastidious and non fastidious bacterial reference strains: effects of aerobic ver hypercapnic incubation. **Chemotherapy**, **41**:18-33, 1995.
- UGAZ, O.L. - **Investigación fitoquímica : métodos en el estudio de productos naturales**. 2 ed. Lima, Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994. 300p.
- VAN DER HEM, L.G.; VAN DER VLIET, J.A.; BOCKEN, F.M.; KINO, K.; HOITSMA, A.J.; TAX, W.J.M. - Ling-Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. **Transplantation**, **60**: 438-43, 1995.

- WANG, B.C.; LIN, C.T.; HUA, J. - Long-term preservation of *Ganoderma* mycelia. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society** **28**, (1):86-93, 1990.
- WANG, C.N.; CHEN, J.C.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. - The aggregation of human platelet induced by ganodermic acid S. **Biochimica et Biophysica Acta**, **986**:151-60, 1989.
- WANG, C.N.; CHEN, J.C.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. - The inhibition of human platelet function by ganodermic acid S. **Biochemical Journal**, **277**:189-97, 1991.
- WANG, G.; ZHANG, J.; MIZUNO, T.; ZHUANG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, H.; LI, J. - Antitumor active polysaccharides from the chinese mushroom songshan lingzhi, the fruit body of *Ganoderma tsugae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, **57**:894-900, 1993.
- WASSER, S.P. & WEIS, A.L. - Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, **1**:31-62, 1999.
- WEETE, J.D. - Structure and function of sterols in Fungi. **Advances in Lipid Research**, **23**:115-67, 1989.
- WON, S.J.; LIN, M.T.; WU, W.L. - *Ganoderma tsugae* mycelium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, **59**:171-6, 1992.
- YEH, Z.Y. & CHEN, Z.C. - Preliminary investigations of *Ganoderma australe* (subgen. *Elfvigia*) in Taiwan. **Taiwania**, **35**(suppl.2):127-41, 1990.
- YEN, G.C. & WU, J.Y. - Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, **65**:375-79, 1999.
- ZHANG, J.; WANG, G.; LI, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H.; MAYUZUMI, H.; OKAMOTO, H.; LI, J. - Antitumor active protein-containing glycans from the chinese mushroom Songshan Lingzhi, *Ganoderma tsugae* mycelium. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, **58**(suppl.7):1202-5, 1994.
- ZHAO, J.D. - The Ganodermataceae in China. **Bibliotheca Mycologica**, **132**:1-175, 1989.