

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTERÓIS E TRITERPENOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DE *Ganoderma*  
Karsten E SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
ELZA DE FÁTIMA ALBINO SMÂNIA**

**Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em  
Química da Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito para  
a obtenção do título de Doutor em  
Química Orgânica.**

**Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes**

**Co-Orientador: Prof. Franco Delle Monache**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Junior**

**Florianópolis**

**2003**

**ESTERÓIS E TRITERPENOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DE  
*Ganoderma* Karsten E SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**Elza de Fatima Albino Smânia**

Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca examinadora.

-----  
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes  
Orientador – UFSC

-----  
Prof. Dr. Faruk Jose Nome Aguilera  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química  
UFSC

Banca examinadora:

-----  
Prof. Dr. Sonia Corina Hess  
UFMS

-----  
Prof. Dr. Vilma E. F. Heinzen  
UFSC

-----  
Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo  
FURB

-----  
Prof. Dr. Inês M. Costa Brighente  
UFSC

-----  
Prof. Dr. Artur Smania Junior  
Co-Orientador – UFSC

-----  
Prof. Dr. Margarida M. de Mendonça  
UFSC

-----  
Prof. Franco Delle Monache  
Co-Orientador – UCSC– Roma

-----  
Prof. Dr. Maria da Graça Nascimento  
Representante do Colegiado da Pós-  
Graduação

Florianópolis, 5 de dezembro de 2003

**Universidade Federal de Santa Catarina**

:

Ao meu marido e aos meus filhos pelo amor  
e sustentação na superação das angústias  
e dificuldades encontradas durante esses  
quatro anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Rosendo Augusto Yunes, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade que me concedeu para desenvolver meu potencial científico.

Ao Professor Franco Delle Monache, do Instituto de Química da Università Cattolica del Sacro Cuore de Roma, pela preciosa Co-Orientação possibilitando a conclusão desse doutorado.

Ao Professor e Co-Orientador Artur Smânia Junior, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo suporte científico concedido durante toda a minha formação acadêmica.

Ao Pesquisador Giuliano Delle Monache, do Instituto de Química da Università Cattolica del Sacro Cuore de Roma, pelo auxílio científico e convivência agradável durante o período de desenvolvimento da parte experimental em Roma.

Ao Pesquisador Franco Ferrari pela amizade demonstrada durante a minha permanência no Laboratório do Instituto de Química da Università Cattolica del Sacro Cuore de Roma.

À Professora Clarice Loguercio-Leite, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela identificação das espécies fúngicas e pelo suporte científico prestado.

Aos colegas pela amizade e auxílio na aprendizagem dos conhecimentos de Química durante a fase de realização dos créditos.

À secretária da Pós-Graduação, QMC-UFSC, Maria da Graça Hoeller e ao assistente administrativo Jadir Carminatti pelo auxílio prestado.

À Marcia Helene Barbosa dos Santos, QMC-UFSC, pela colaboração em todos os momentos em que foi solicitada.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela disponibilização do afastamento para a minha formação.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse doutorado.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Enquadramento taxonômico das espécies <i>Ganoderma annulare</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> e <i>Ganoderma australe</i> .....	7
2.2. Metabólitos fúngicos e atividades biológicas .....	7
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 Objetivo Geral .....	14
3.2. Objetivos Específicos .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1. Espécies fúngicas .....	15
4.2. Extração e isolamento dos metabólitos fúngicos .....	16
4.2.1. Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de <i>G. annulare</i> .....	17
4.2.2. Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de <i>G.</i> <i>applanatum</i> .....	18
4.2.3 Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de	

<i>G. australe</i> .....	19
4.3. Identificação dos compostos .....	22
4.4. Derivados dos triterpenóides .....	22
4.4.1. Acetil derivados .....	22
4.4.2. Metil derivados .....	23
4.4.3. Acetil-metil derivados .....	23
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias obtidas .....	24
4.5.1. Meios de cultura .....	24
4.5.2. Microrganismos .....	24
4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima .....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1. Isolamento e identificação das substâncias conhecidas .....	28
5.2. Isolamento e determinação da estrutura das substâncias <i>INÉDITAS</i> .....	44
5.2.1. Substância NEW49 [21] .....	45
5.2.2. Substância EFS31 [23] .....	66
5.3. Derivados dos esteróis e dos ácidos aplanoxídicos .....	79
5.4. Atividade antimicrobiana .....	95
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>117</b>

## Lista de abreviaturas

APT	Attached proton test
°C	graus Celcius
C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N	piridina deuterada
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
CIM	concentração inibitória mínima
δ	deslocamento químico
d	dublete
dd	duplodublete
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidade ótica
EtOAc	acetato de etila
fig.	figura
fr	frações
HETCOR	correlação heteronuclear a uma ligação
Hz	Hertz
INEPT	Intensive nuclei enhanced by polarization transfer
J	constante de acoplamento



m	multiplete
MeOH	metanol
MHz	mega Hertz
mL	mililitro
p.	página
q	quadruplete
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	singlete
t	triplete
tab.	Tabela
TMS	tetrametilsilano
UFC	unidades formadoras de colônias

## Lista de figuras

Figura 1. <i>Ganoderma applanatum</i> FLOR 11910.....	15
Figura 2. Cromatografia em camada delgada dos ácidos aplanoxídicos.....	20
Figura 3. Esquema de fracionamento, da fração em clorofórmio, do extrato metanólico de <i>G. australe</i> .....	21
Figura 4. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto [21] .....	46
Figura 5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto [21] .....	48
Figura 6. Espectro de HETCOR do composto [21] .....	50
Figura 7. Espectro de HETCOR a longa distância do composto [21] .....	54
Figura 8. Espectro de INEPT seletivo do composto [21] .....	58
Figura 9. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto [23] .....	67
Figura 10. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto [23] .....	68
Figura 11. Espectro de HETCOR do composto [23] .....	70
Figura 12. Espectro de INEPT seletivo do composto [23] .....	74
Figura 13. Esquema de síntese do derivado [24] .....	79
Figura 14. Esquema de síntese do derivado [25] .....	80
Figura 15. Esquema de síntese dos derivados [27] e [32] .....	81
Figura 16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto [12] .....	119
Figura 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto [12] .....	120
Figura 18. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto [13] .....	121
Figura 19. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto [13] .....	122

Figura 20. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [14] .....	126
Figura 21. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [14] .....	127
Figura 22. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [15] .....	129
Figura 23. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [15] .....	130
Figura 24. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [6] .....	133
Figura 25. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [6] .....	134
Figura 26. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [8] .....	136
Figura 27. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [8] .....	137
Figura 28. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [16] .....	139
Figura 29. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [16] .....	140
Figura 30. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [18] .....	142
Figura 31. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ do composto [18] .....	143
Figura 32. Espectro RMN $^1\text{H}$ do composto [19] .....	145
Figura 33. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [19] .....	146
Figura 34. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [20] .....	149
Figura 35. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [20] .....	150
Figura 36. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [24] .....	153
Figura 37. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [24] .....	154
Figura 38. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [25] .....	155
Figura 39. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [25] .....	156
Figura 40. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [26] .....	158
Figura 41. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [26] .....	159
Figura 42. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [27] .....	163
Figura 43. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [27] .....	164

Figura 44. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [28] .....	167
Figura 45. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [28] .....	168
Figura 46. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [29] .....	170
Figura 47. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [29] .....	171
Figura 48. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [30] .....	173
Figura 49. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [30] .....	174
Figura 50. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [31] .....	176
Figura 51. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [31] .....	177
Figura 52. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [32] .....	179
Figura 53. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [32] .....	180
Figura 54. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [33] .....	182
Figura 55. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [33] .....	183
Figura 56. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [34] .....	185
Figura 57. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [34] .....	186
Figura 58. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [35] .....	188
Figura 59. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [35] .....	189
Figura 60. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto [36] .....	191
Figura 61. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto [36] .....	192

## Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição de triterpenóides nas três espécies de <i>Ganoderma</i> .....	30
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos esteróis [12], [13], [14] e [15] .....	31
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos esteróis [12] e [13] .....	32
Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos esteróis [14] e [15] .....	33
Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H mais relevantes dos ácidos aplanoxídicos <b>A [6], B [7], E [17] e F [18]</b> .....	36
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H mais relevantes dos ácidos aplanoxídicos <b>C [8], D [9] e DMe [16]</b> .....	37
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H mais relevantes dos ácidos aplanoxídicos <b>G [19] e H [20]</b> .....	38
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos ácidos aplanoxídicos <b>A [6], B [7], E [17] e F [18]</b> .....	39
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos ácidos aplanoxídicos <b>C [8], D [9] e DMe [16]</b> .....	40
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos ácidos aplanoxídicos <b>G [19] e H [20]</b> .....	41
Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H do Ácido 15-O-acetil elfvínico <b>H [21]</b> .....	64
Tabela 12. Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup> C do ácido elfvínico <b>H [22]</b> com os do ácido 15-O-acetil elfvínico <b>H [21]</b> e do ácido 15-O-acetil,	

mono-3-metil éster elfvíntrico <b>H [23]</b> .....	<b>65</b>
Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos derivados esteróis acetilados <b>[24]</b> e <b>[25]</b> .....	<b>82</b>
Tabela 14. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos derivados esteróis acetilados <b>[24]</b> e <b>[25]</b> .....	<b>83</b>
Tabela 15. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>A</b> acetilado <b>[26]</b> , <b>A</b> Metilado <b>[29]</b> e <b>A</b> acetilado-metilado <b>[34]</b> .....	<b>84</b>
Tabela 16. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>A</b> acetilado <b>[26]</b> , <b>A</b> Metilado <b>[29]</b> e <b>A</b> acetilado-metilado <b>[34]</b> .....	<b>85</b>
Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H do derivado ácido aplanoxídico <b>C</b> metilado <b>[30]</b> em relação ao ácido aplanoxídico <b>C [8]</b> .....	<b>86</b>
Tabela 18. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C do derivado ácido aplanoxídico <b>C</b> metilado <b>30]</b> em relação ao ácido aplanoxídico <b>C [8]</b> .....	<b>87</b>
Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H do derivado ácido aplanoxídico <b>F</b> metilado <b>[31]</b> em relação ao ácido aplanoxídico <b>F[31]</b> .....	<b>88</b>
Tabela 20. . Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C do derivado ácido aplanoxídico <b>F</b> metilado <b>[31]</b> em relação ao ácido aplanoxídico <b>F[31]</b> .....	<b>87</b>

de RMN <sup>13</sup> C do derivado ácido aplanoxídico <b>F</b> metilado	
<b>[31]</b> .....	<b>89</b>
Tabela 21. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>G</b> acetilado <b>[27]</b> , <b>G</b> metilado <b>[32]</b> e <b>G</b> acetilado-metilado <b>[35]</b> .....	<b>91</b>
Tabela 22. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>G</b> acetilado <b>[27]</b> , <b>G</b> metilado <b>[32]</b> e <b>G</b> acetilado-metilado <b>[35]</b> .....	<b>92</b>
Tabela 23. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>H</b> diacetilado <b>[28]</b> , <b>H</b> metilado <b>[33]</b> e <b>H</b> diacetilado-metilado <b>[36]</b> .....	<b>93</b>
Tabela 24. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C dos derivados ácidos aplanoxídicos <b>H</b> diacetilado <b>[28]</b> , <b>H</b> metilado <b>[33]</b> e <b>H</b> diacetilado-metilado <b>[36]</b> .....	<b>94</b>
Tabela 25. Atividade antibacteriana das substâncias isoladas de <i>Ganoderma</i> spp. e de seus derivados .....	<b>96</b>
Tabela 26. Atividade antifúngica das substâncias isolados de <i>Ganoderma</i> spp. e de seus derivados .....	<b>99</b>

## Resumo

*Ganoderma* Karsten é um gênero de fungo pertencente a família Ganodermataceae (Aphyllophorales, Basidiomycetes) e várias espécies são usadas na medicina tradicional oriental chinesa no tratamento de bronquites, hepatopatias, artrites e também neurastenia, hipertensão e câncer. O estudo químico de *G. annulare* (Lloyd) Boedijn, *G. applanatum* (Pers.) Pat. e *G. australe* (Fr.) Pat. resultou no isolamento dos esteróis: 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol; 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi e o 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol e dos triterpenos: ácidos aplanoxídicos **A, C, D, F, G** e **H**. Do basidioma de *G. australe* foram isoladas duas substâncias inéditas o ácido 15-O-acetil elfvínico **H** (NEW49) e o ácido 15-O-acetil-3-mono-metil éster elfvínico **H** (EFS31). Todas as substâncias foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana. Os triterpenóides e seus derivados inibiram o crescimento das espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em concentrações de 1,0 a 2,0 mg/mL e das espécies fúngicas *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* em concentrações de 0,5 a 2,0 mg/mL. A substância NEW49 exibiu atividade antibacteriana somente para *S. aureus* (1,0 mg/mL) e atividade antifúngica contra *C. albicans* (2,0 mg/mL) e *T. mentagrophytes* (1,0 mg/mL). O composto EFS31 foi ativo tanto para as espécies bacterianas quanto para as fúngicas na concentração de 2,0 mg/mL.



## Abstract

*Ganoderma* Karsten is a genus of fungus belonging to the family Ganodermataceae (Aphyllophorales, Basidiomycetes) and many species have been used in traditional Chinese medicine to treat bronchitis, hepatopathy, arthritis and also hypertension, neurasthenia and cancer. The chemical study of *G. annulare* (Lloyd) Boedijn, *G. applanatum* (Pers.) Pat. and *G. australe* (Fr.) Pat. resulted in the isolation of the sterols:  $5\alpha$ -ergost-7-en- $3\beta$ -ol,  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol,  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxy and the 5,8-epidioxy- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ -ol and of the triterpenes aplanoxidic acids **A**, **C**, **D**, **F**, **G** and **H**. From the basidiocarp of *G. australe* were isolated two new substances: 15-O-acetyl-elfvingico acid **H** and the 15-O-acetyelfvingic acid **H** 3-mono-methyl ester. All the substances were submitted to antibacterial and antifungal activity. The triterpenoids and their derivatives inhibited the growth of bacterial species *Echerichia coli* and *Staphylococcus aureus* at the concentration of 1.0 to 2.0 mg/mL and of the fungi species *Candida albicans* and *Trichophytom mentagrophytes* at the concentration of 0.5 to 2.0 mg/mL respectively. The substance NEW49 exhibited antibacterial activity only to *S.aureus* (1.0 mg/mL) and antifungal activity against *C. albicans* (2.0 mg/mL) and *Trichophytom mentagrophytes* (1.0 mg/mL). The compound EFS31 was as effective against the bacterial species as it was against the fungi species at concentration of 2.0 mg/mL.

# 1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade fúngica pode ser avaliada quando constata-se que o número de espécies mundial é estimado em aproximadamente 1,5 milhão; entretanto somente 69.000 foram descritas. Dentre essas, 35.000 pertencem aos Macromycetes que incorporam mais de 250 espécies do gênero *Ganoderma* (ROSSMAN *et. al.*, 1998; MONCALVO & RIVARDEM, 1997; HAWKSWORTH, 1995). Dados mais recentes de Hawksworth (2001) e Kirk e colaboradores (2001) indicam um número de espécies fúngicas ainda superior, 9,9 milhões .

Certas espécies de Basidiomycetes representam um conjunto de organismos bastante explorado na medicina popular, e em especial as famílias formadoras de basidioma macroscópico. Uma das características dessa classe é a presença de um basídio que fornece sustentação aos basidiosporos. Os Basidiomycetes incluem aproximadamente 20.300 espécies, identificadas em 1.037 gêneros e distribuídos em 112 famílias. A maioria desses fungos é saprófita e algumas espécies são patógenos de plantas (KIRK *et al.*, 2001). Dentre as diversas famílias que compõe essa classe, destacam-se Agaricaceae [*Agaricus blazei* Murr., *Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach], Ganodermataceae, [*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. e *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. ], Pleurotaceae [*Lentinula edodes* (Berk.) Sing., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr) Kumm. e *Pleurotus pulmonarius* (Fr.:Fr) Qué] e Tricholomataceae [*Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) P. Karst.] que apresentam

importante valor medicinal e comercial (WASSER & WEIS, 1999; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; ADASKAVEG & GILBERTSON, 1994).

As propriedades terapêuticas dos Basidiomycetes vêm sendo reconhecidas por milênios na China, Coréia e Japão. Os primeiros livros chineses sobre produtos naturais medicinais datam de 2000 anos atrás e relatam os seus vários efeitos benéficos, além de listarem mais de 20 espécies de fungos medicinais (KIM & KIM, 1999; MIZUNO, 1999). Os conhecimentos sobre o uso popular dos fungos para tratar bronquites, hepatopatias, hipertensão, artrites, neurastenia, no combate ao câncer e como sedativo extrapolaram o continente asiático, foram difundidos também para a América do Norte e Europa (FURUSAWA *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1991; KOMODA *et al.*, 1989; ARISAWA *et al.*, 1986). Assim, muitos estudos científicos foram conduzidos com basidiomas destes fungos, com a finalidade de isolar e identificar quimicamente as diversas substâncias ativas e, também determinar suas potencialidades terapêuticas (CHANG & BUSWELL, 1999; CHEN & YU, 1999; KIM & KIM, 1999). Entre as substâncias que apresentam atividade biológica é interessante citar os polissacarídeos  $\beta$ -D-glucanos isolados de Basidiomycetes superiores, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune*, *Dendropolyporus umbellatus*, *Hericium erinaceus*, *Inotus obliquus*, *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum* e *Flammulina velutipes* os quais apresentam ação antitumoral (WASSER & WEIS, 1999 ; MIZUNO, 1996; 1995 ; JONG *et al.*, 1991 ; CHIARA *et al.*, 1982). Outras substâncias biologicamente ativas já foram isoladas de espécies descritas como Basidiomycetes e são efetivas contra vários tipos de infecções virais,

bacterianas e parasitárias. Entre essas, a campestrina, um antibiótico isolado de *Psalliota campestris* (BOSE, 1955) o armillane, um sesquiterpeno antibacteriano obtido de *Armillaria mellea* (DONNELLY & HUTCHINSON, 1990) e a cinabarina, um derivado fenoxazínico com atividade antibacteriana e antiviral encontrado em *Picnoporus sanguineus* (SMÂNIA *et al.*, 2003 ; SMÂNIA *et al.*, 1998).

Na ordem Aphyllophorales, além dos Basidiomycetes também são encontrados representantes de outros gêneros de macrofungos que vêm sendo alvo de estudos químicos, para a obtenção de novos fármacos. A partir de espécies de *Phellinus*, foram isoladas substâncias de diferentes classes químicas, como, triterpenos (GONZALEZ *et al.*, 1986), sesquiterpenos (CRUZ, 1997), ciclohexanos oxigenados (TATSUTA *et al.*, 1991) e compostos cloroaromáticos (TEUNISSEN *et al.*, 1997). Em alguns trabalhos, foi relatada a atividade biológica imunoestimulante de polissacarídeos extraídos de *P. linteus* (LEE *et al.*, 1996) e atividade antifúngica de compostos fenólicos obtidos de *P. pini* (LOURENCO *et al.*, 1996).

Além da ordem citada acima (Aphyllophorales), os anamorfos (fungos que apresentam esporos produzidos através de mitose, i.e., não produzem estruturas de origem sexual; também conhecidos como fungos mitospóricos, Fungi Imperfectii, Deuteromycetes), responsáveis pela síntese de cerca de 1000 antibióticos, incluem *Penicillium* Link, *Aspergillus* Link, *Acremonium* Link (anteriormente *Cephalosporium* Corda), *Tolyposcladium* W. Gams e *Cylindrocarpon* Wollenw. (*Fusidium* Link nom. rej.) que sintetizam penicilinas, griseofulvinas, cefalosporina, fumagilina, ácido fusídico, sicanina, variotina,

ciclosporina e a xantocilina (KIRK *et al.*, 2001; LANCINI & LORENZETTI, 1993; ELANDER & LOWE, 1992; HERRERA & ULLOA, 1990). É importante mencionar que essas substâncias não são específicas de cada gênero. A penicilina, por exemplo, é isolada de *Penicillium notatum* e também de cepas de *Penicillium chrysogenum* e de outras espécies de *Aspergillus* e *Acremonium* Link (*Cephalosporium* Corda), e em outros 6 gêneros (LANCINI & LORENZETTI, 1993; ELANDER & LOWE, 1992; KANZAKI & FUJISAWA, 1975).

O número de antibióticos conhecido é de aproximadamente 4.000, no entanto, somente em torno de 50 apresentam uso efetivo, uma vez que muitos deles são tóxicos (AZEVEDO, 1998). Dessa forma, é imprescindível que sejam incrementadas as pesquisas que visem a obtenção de novas substâncias com atividade antimicrobiana, principalmente com atividade dirigida contra patógenos fúngicos, uma vez que a disponibilidade de antifúngicos é inferior a de antibacterianos. Outras razões ainda são de grande relevância no incentivo a este tipo de pesquisa, como por exemplo o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tradicionais e a maior sensibilidade de pacientes tratados com drogas imunossupressoras às infecções fúngicas e bacterianas (SILVER & BOSTIAN, 1993). Na resistência aos antimicrobianos estão envolvidos três principais mecanismos de escape: destruição ou inativação da droga, prevenção da penetração do antimicrobiano no microrganismo e modificação do sítio-alvo da droga. Os genes que determinam essas funções podem ser codificados tanto em nível cromossômico quanto

plasmídeo (SCHLESSINGER & EISENSTEIN, 2002; TORTORA, FUNKE & CASE, 1997; PATRICK, 1995).

Alguns dos antibióticos citados anteriormente, são disponibilizados como preparações farmacêuticas e vêm sendo usados há décadas na medicina tradicional. Entretanto, esta não é a única modalidade de industrialização dos derivados dos macrofungos, uma vez que são comercializadas também preparações nutricêuticas (extratos parcialmente purificados com aplicação terapêutica) e nutracêuticas (alimentos funcionais para promoção de saúde). As preparações nutricêuticas apresentam baixa toxicidade mesmo em doses altas o que explica o grande consumo pela população oriental (WASSER *et al.*, 2001; CHANG & BUSWELL, 1999; STAMENTS & YAO, 1998; CHANG & BUSWELL, 1996). As principais espécies fúngicas cultivadas para fins alimentares são *Agaricus bisporus* (J. Lge) Sing. (Champignon ou cogumelo de Paris), *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm (cogumelo ostra ou caetetuba), *Volvariella volvacea* (Bell.: Fr.) Sing. (cogumelo palha) e *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. (flamulina), sendo que a produção mundial dessas espécies em 1994 foi de 4,9 milhões de toneladas. A classe dos compostos nutricêuticos, apresenta um potencial significativo na expansão da indústria biotecnológica, onde em 1994 a comercialização dessas substâncias foi de 5,0 bilhões de dólares e aumentou para 12,0 bilhões em 1998. O fungo *Ganoderma lucidum* conhecido na China como Ling Zhi e Reishi no Japão, é a espécie da qual mais preparações nutricêuticas são obtidas (CHANG & BUSWELL, 1999; ZEISEL, 1999; CHANG & BUSWELL 1996).

A família Ganodermataceae Donk é caracterizada pelos basidiósporos com a parede interna ornamentada, e a externa lisa e hialina. São integrantes dessa família os gêneros *Amauroderma* Murril, *Elfvigia* Karsten, *Ganoderma* Karsten, *Haddowia* Steyaert, *Humphreya* Steyaert e *Magoderma* Steyaert, os quais incluem aproximadamente, 77 espécies que apresentam basidiomas rígidos e em cores diversas como: vermelho, branco, amarelo e púrpura (LOGUERCIO-LEITE, GROPOSO, DRESCHLER-SANTOS, 2003; KIRK *et al.*, 2001; JONG & BIRMINGHAM, 1992).

Fungos do gênero *Ganoderma* Karsten, podem ser divididos em dois grupos, com base em suas características macromorfológicas. As espécies cujos basidiomas apresentam superfícies superiores lacadas são agrupadas no complexo *G. lucidum* e as não-lacadas no complexo *G. applanatum* (GOTTLIEB & WRIGHT, 1999; PHYLLIPS, 1991; ARORA, 1986). Os integrantes do primeiro complexo são *G. lucidum* (W. Curt. :Fr.) karts., *G. subamboinense* Henn., *G. oerstedii* (Fr.) Torr., *G. resinaceum* Bould enquanto que no segundo complexo, estão *G. tornatum* (Pers) Bres. [*G. australe* (Fr.) Pat], *G. applanatum* (Pers.)Pat. e *G. annulare* (Fr.) Gilbn. As sete espécies citadas são encontradas em Santa Catarina, sendo *G. tornatum* (*G. australe*) a mais freqüente na parte insular do Estado de Santa Catarina (LOGUERCIO-LEITE, GROPOSO & DRESCHLER-SANTOS, 2003; HALMENSCHLAGER & LOGUERCIO-LEITE, 1993).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

*Ganoderma* Karsten é um gênero de fungo pertencente a família Ganodermataceae Donk (Aphyllophorales, Basidiomycetes). Esses organismos se desenvolvem sobre madeiras, como sapróbios ou parasitas, e são importantes decompositores de celulose e lignina na natureza (ADASKAVEG & GILBERTSON, 1994).

### 2.1 Enquadramento taxonômico das espécies *Ganoderma annulare*, *Ganoderma applanatum* e *Ganoderma australe* (MONCALVO & RYVARDEN, 1997)

DIVISÃO: Basidiomycota

CLASSE: Basidiomycetes

ORDEM: Ganodermatales Jülich

FAMÍLIA: Ganodermataceae Donk

GÊNERO: *Ganoderma* Karsten

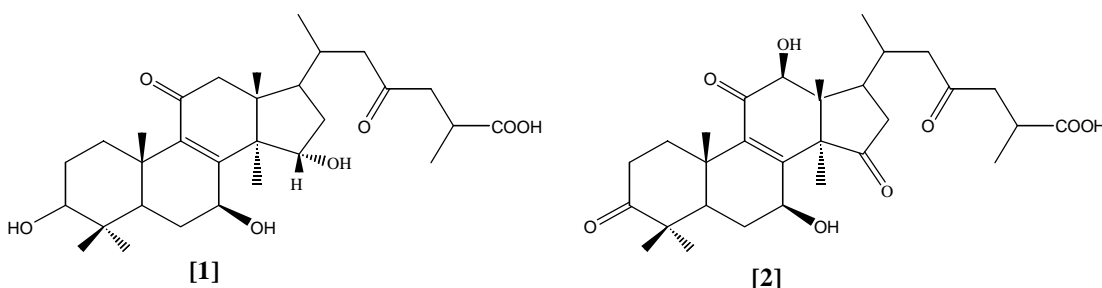
ESPÉCIES: *Ganoderma annulare* (Lloyd) Boedijn, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. e *Ganoderma australe* (Fr.) Pat.

### 2.2. Metabólitos fúngicos e atividades biológicas

Muitos estudos químicos foram desenvolvidos tanto com basidiomas quanto com micélio de *Ganoderma*. A partir de basidiomas de várias espécies

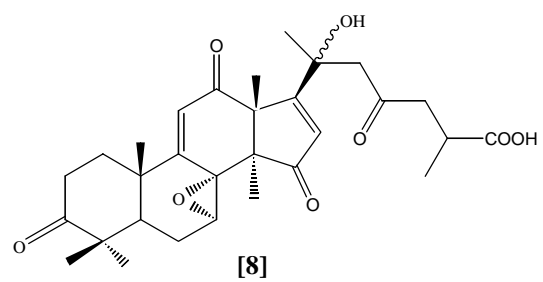
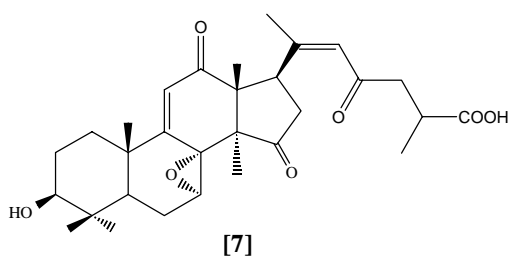
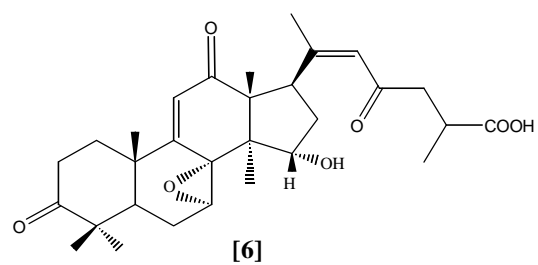
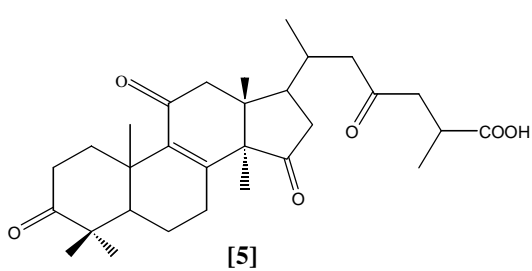
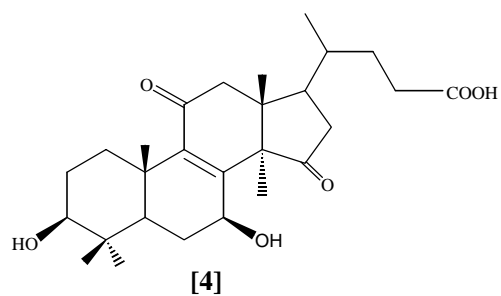
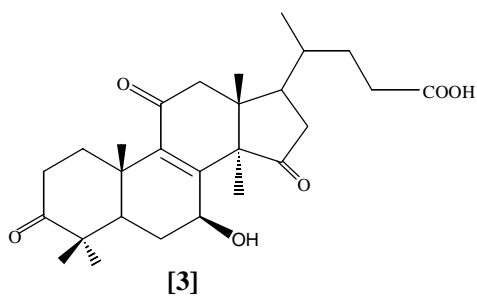


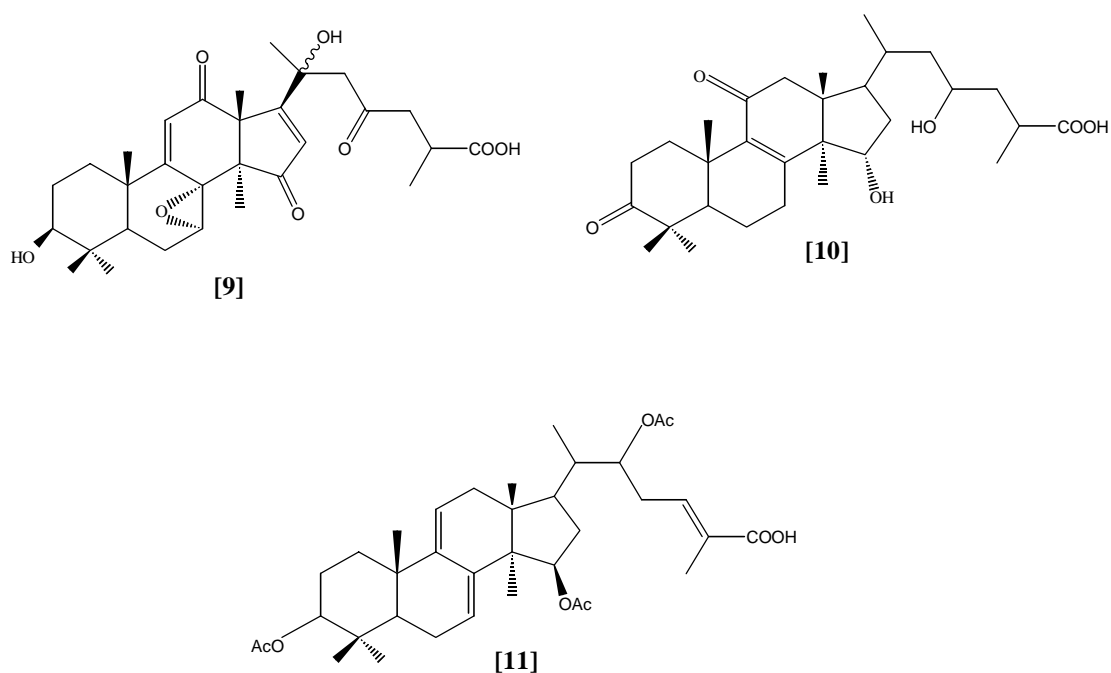
desse gênero foram isolados diversos compostos bioativos como, proteínas, polissacarídeos, como a quitina, triterpenos e esteróis. Entre as substâncias com atividades farmacológicas, podem ser citados os ácidos ganodéricos C [1] e D [2], isolados de *G. lucidum*, que apresentam atividade antiinflamatória (KOHDA *et al.*, 1985).



Em adição as substâncias citadas anteriormente, é importante ainda mencionar que os ácidos lucidênico A [3], lucidênico N [4], ganodérico E [5] presentes em *G. lucidum*, aplanoxídicos A [6], B [7], C [8] e D [9], obtidos de *G. applanatum*, além do ácido ganodérico  $\gamma$  [10] de *G. lucidum* e alguns polissacarídeos encontrados tanto em *G. lucidum* quanto *G. tsugae*, exibem atividade antitumoral contra diferentes sistemas biológicos (SHIUH-SHENG *et al.*, 2003; WU, SHI & KUO, 2001; WANG *et al.*, 1993; CHAIRUL *et al.*, 1991); as peptoglicanas e os ganoderanos B e C de *G. lucidum* apresentam propriedades hipoglicemiantes (TOMODA *et al.*, 1986); o ácido ganodérmico S [11] obtido de *G. lucidum* atua sobre o mecanismo de agregação de plaquetas humanas (WANG *et al.*, 1991); os derivados oxigenados do lanosterol obtidos

de *G. lucidum* inibem a biossíntese do colesterol em células hepáticas de rato (KOMODA *et al.*, 1989) .





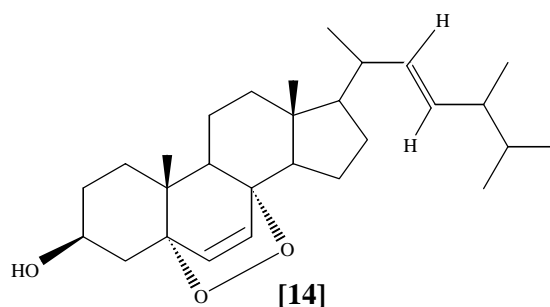
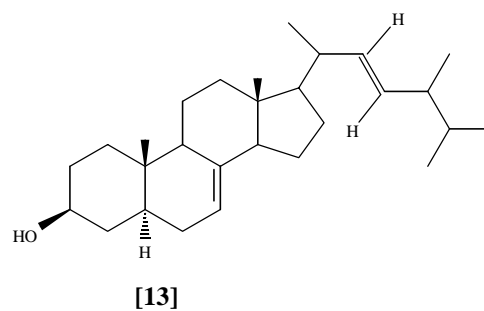
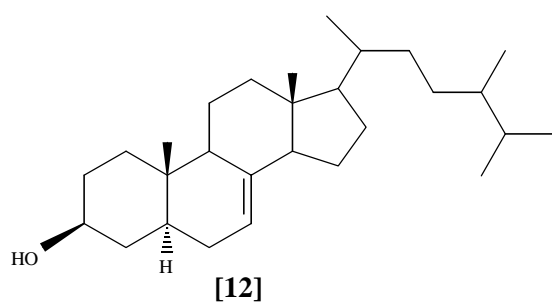
Extratos brutos, obtidos de micélios de *G. lucidum*, contendo triterpenos, apresentaram atividade preventiva contra câncer de cólon, atividades antiperoxidase, antiinflamatória e antimutagênica em ratos, indução de secreção de citocinas, e ainda atividade contra células de hepatoma (HUIMEI *et al.*, 2003; LAKSHMI *et al.*, 2003; SHWU-BIN *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2002). Dessa mesma espécie fúngica (*G. lucidum*) foram obtidos terpenóides, a partir de basidiosporos, com atividade anticomplemento e antitumoral (MIN *et al.*, 2001; MIN *et al.*, 2000). Além das substâncias descritas acima, na parede celular dos fungos é encontrada a quitina que dependendo da espécie fúngica, pode compor de 0,2 a 60% da estrutura citada. Estudos com a quitina têm demonstrado que esta substância acelera a recuperação de lesões bucais, previne o crescimento de células tumorais, atua como anticoagulante e na

redução do nível de colesterol sanguíneo. Essas propriedades tornam-se ainda mais atrativas aos laboratórios farmacêuticos devido ao fato da quitina não apresentar efeito tóxico, alérgico ou mutagênico (BURDYUKOVA & GOROVOJ, 2001; SU *et al.*, 1997).

Como foi relatado, muitos são os estudos que relacionam os constituintes de *Ganoderma* com atividade farmacológicas e antitumorais. No entanto, avaliações quanto a atividades antimicrobianas com espécies deste gênero são pouco exploradas. É citado que extratos aquosos e alcoólicos de *G. lucidum* apresentam uma potente atividade antiviral, incluindo ação contra HIV (KIM, KIM & CHOI, 1994), e que a fração em éter etílico, do extrato bruto dessa espécie, é ativa contra *Helicobacter pylori* (KIM *et al.*, 1996). Além disso, é relatado que lanostanóides isolados a partir de *G. pfeifferi* exibem atividade contra o vírus influenza tipo A e contra o vírus do herpes simples tipo 1 (MOTHANA, *et al.*, 2003) e que o extrato obtido de micélio de *G. lucidum* inibe o efeito da toxina colérica (HA, 2003).

Os relatos apresentados na literatura serviram de estímulo para que passássemos a estudar espécies de *Ganoderma* encontradas na Região Sul do Brasil. Assim, a partir de *G. applanatum* foram isolados os três esteróis  $5\alpha$ -ergost-7en- $3\beta$ -ol [12],  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol [13] e 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ -ol [14], os quais apresentaram atividade antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus pyogenes*. Dentre os microrganismos testados a espécie *Streptococcus pyogenes* foi a mais sensível e o esterol [14] a

substância de maior atividade (SMÂNIA *et. al.*; 1999). Os esteróis [13] e o [14]



também foram submetidos a testes quanto a atividade antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi*. O composto [13] reduziu a quantidade de formas epimastigotas do parasita de modo equipotente ao controle (benzonidazol) enquanto que o composto [14] apresentou uma atividade 4 vezes maior que o controle (MARQUES, 2001). Em um outro estudo realizado com basidioma de *G. australe*, frações obtidas dos extratos em hexano, em clorofórmio e em

acetato de etila foram testadas contra bactérias, por teste de difusão, e estas foram ativas contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (GERBER *et al.*, 2000).

Os testes biológicos realizados com metabólitos de *Ganoderma* têm demonstrado que essas moléculas podem atuar em diversos sistemas biológicos. Esse fato despertou o interesse no sentido de estudar a ação dessas substâncias não somente contra bactérias mas, também, contra fungos que são agentes etiológicos de uma série de doenças humanas e de animais.

A ação específica das substâncias mencionadas e de maneira geral, das substâncias biologicamente ativas, decorre essencialmente de suas estruturas químicas que devem adaptar-se às estruturas químicas tridimensionais dos receptores existentes no organismo-alvo, formando complexos. Os efeitos biológicos produzidos por esses metabólitos são, então, inerentes à sua reatividade química, à forma, ao tamanho, à disposição estereoquímica da molécula e à distribuição dos grupos funcionais, bem como efeitos de ressonância, efeitos indutivos e as possíveis ligações com o receptor, além de outros fatores. Assim, além de serem usados os produtos originalmente produzidos pelo fungo, é importante que sejam também testados aqueles derivados de tratamentos químicos, com o objetivo de melhorar a sua ação biológica, através da ampliação ou de sua interação com o alvo celular ou na sua penetração nos microrganismos (BARREIRO & FRAGA, 2001; PIRAINO & BRANDT, 1999; PATRICK, 1995; CECHINEL, 1991).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver estudo químico e de avaliação quanto a atividade antimicrobiana com espécies de *Ganoderma*

### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar as substâncias sintetizadas por três espécies de *Ganoderma*: *G. annulare*, *G. applanatum* e *G. australe*;
- Determinar a estrutura dos compostos isolados;
- Promover modificações estruturais nos compostos isolados;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos isolados e de seus derivados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Espécies fúngicas

As três espécimes de *Ganoderma* estudadas nesse trabalho pertencem a *Ganoderma annulare* (Lloyd) Boedijn (FLOR 11484), *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (FLOR 11910) e *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. (FLOR 11914).



Figura 1- *Ganoderma applanatum* FLOR 11910



O basidioma referente a primeira espécie foi coletado em Capanema (PR), e os correspondentes às outras duas espécies em Içara (SC). Todos os basidiomas foram identificados pela Profa. Clarice Loguercio-Leite, do Laboratório de Micologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e uma amostra de cada basidioma foi depositada no Herbário FLOR/BOT/CCB/UFSC.

#### **4.2. Extração e isolamento dos metabólitos fúngicos**

A extração foi feita através de maceração exaustiva com metanol, à temperatura ambiente, partindo-se de 427 g do basidioma, em pequenos pedaços, de *G. annulare*, 375 g de *G. applanatum* e 135 g de *G. australe*. Os metabólitos fúngicos, obtidos de cada uma das três espécies, foram particionados sucessivamente e exaustivamente com hexano (2,00 g, 0,60 g, 4,18 g), clorofórmio (2,06 g, 0,57 g, 6,71 g) e acetato de etila (1,24 g, 0,42 g, 2,00 g). Cada extrato resultante foi cromatografado em coluna de gel de sílica (0,040 – 0,063 mm Carlo Erba). O diâmetro e a altura das colunas variaram em função das quantidades de materiais utilizados. Os sistemas de solventes usados para a eluição cromatográfica seguiram o modo gradiente crescente de polaridade. Os eluatos foram coletados em volumes convenientes, os quais foram agrupados com base nas similaridades de  $R_f$  após cromatografia em camada delgada (CCD). Os cromatogramas, sobre as placas de sílica (Merck com 200 $\mu$ m de espessura), foram visualizadas sob radiação ultravioleta e revelados com o uso de reagentes anisaldeído sulfúrico e ácido

sulfúrico/metanol 10%. As frações foram purificadas por meio de repetidas cromatografias em coluna e por cristalização.

Com base nos resultados obtidos em trabalhos similares a este e citados nos diversos itens desta tese, os nossos estudos também foram centralizados no isolamento de esteróis e triterpenos. As etapas desenvolvidas para a purificação de tais substâncias, a partir dos basidiomas das três espécies fúngicas, foram semelhantes e estão descritas abaixo de forma simplificada. As substâncias obtidas dos extratos acima descritos estão apresentadas na Tabela 1(p. 30) do item 5.0 de Resultados e Discussão.

#### **4.2.1 Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de *G. annulare*:**

- Extrato em hexano – 1,80 g deste extrato foi fracionado em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição inicialmente o  $\text{CHCl}_3$  e então gradiente crescente de polaridade pela adição de metanol a este solvente ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH - 98:2 a 8:2). O eluato foi agrupado em cinco frações as quais foram novamente fracionadas em coluna resultando no isolamento de três diferentes esteróis (Tabela 1, p.30).
- Extrato em  $\text{CHCl}_3$  – 2,06 g deste extrato foram fracionados em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição inicialmente o  $\text{CHCl}_3$  e então gradiente crescente de polaridade pela adição de metanol a este solvente ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH - 97:3 a 8:2). O eluato foi agrupado em quatro frações que foram submetidas a um novo fracionamento que originaram um esterol e cinco diferentes triterpenos ácidos (Tabela 1, p.30).

- Extrato em EtOAc - 1,24 g deste extrato foi fracionado em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição o sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5 a 7:3) e por ultimo apenas o MeOH. Deste extrato não foram obtidos triterpenóides (Tabela 1, p.30).

#### **4.2.2 Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de *G. applanatum*:**

- Extrato em hexano – 0,60 g deste extrato foi fracionado em coluna de gel de sílica, usando-se na eluição os seguintes sistemas de solvente: Hexano: $\text{CHCl}_3$  (7:3 a 1:1),  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (97:3 a 9:1). O eluato foi agrupado em cinco frações que foram cromatografadas em coluna resultando no isolamento de dois esteróis (Tabela 1, p.30).
- Extrato em  $\text{CHCl}_3$  – 0,57 g deste extrato foi fracionado em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição o sistema de solvente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5 a 8:2). O eluato foi agrupado em quatro frações, que após nova cromatografia, proporcionou o isolamento de três triterpenos ácidos. (Tabela 1, p.30).
- Extrato em EtOAc – 0,42 g deste extrato foi fracionado em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição o sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5 a 8:2) e por ultimo apenas o MeOH. Deste extrato não foram obtidos triterpenóides (Tabela 1, p.30).

#### 4.2.3 Fracionamento dos extratos obtidos do particionamento de *G. australe*:

- Extrato em hexano – 4,18 g deste extrato foram fracionados em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição os seguintes sistemas de solvente: Hexano:CHCl<sub>3</sub> (9:1 a 8:2), CHCl<sub>3</sub> e CHCl<sub>3</sub>:MeOH (97:3 a 8:2). O eluato foi agrupado em quatro frações, que foram submetidas a um novo fracionamento o qual resultou no isolamento de cinco diferentes triterpenóides (Tabela 1, p.30).
- Extrato em CHCl<sub>3</sub> – 4,71 g deste extrato foram fracionados em coluna de gel de sílica, usando-se na eluição inicialmente o CHCl<sub>3</sub> e então gradiente crescente de polaridade pela adição de metanol a este solvente (CHCl<sub>3</sub>:MeOH - 97:3 a 8:2). O eluato foi agrupado em cinco frações e a partir destas foram obtidos 10 diferentes triterpenóides (Tabela 1, p.30).
- Extrato em EtOAc – 2,00 g deste extrato foram fracionados em coluna com gel de sílica, usando-se na eluição o sistema de solvente CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5 a 7:3) e por último apenas o MeOH. O eluato foi agrupado em quatro frações, os quais foram novamente cromatografados e originaram três diferentes triterpenos ácidos (Tabela 1, p.30).

Na tentativa de exemplificar com mais detalhes os procedimentos realizados nesta etapa, foi elaborado um diagrama (Figura 3, p.21), no qual está esquematizado o fracionamento e purificação do extrato em clorofórmio,

derivado do extrato bruto metanólico de *G. australe*. A opção por este extrato foi em virtude do seu bom rendimento, em termos de substâncias obtidas.

Através de experimentos em CCD, representado na figura 2, foi possível determinar quais são os melhores eluentes para a avaliação de amostras contendo ácidos aplanoxídicos isoladas a partir dos fungos. Os ácidos aplanoxídicos isolados das três espécies fúngicas, apresentaram em CCD,  $R_f$  muito próximos. O acetato de etila foi o melhor solvente para a separação dos ácidos aplanoxídicos **F**, **C** e **G**, mas, não para os ácidos aplanoxídicos **A** e **H**. Neste caso, o sistema de solvente mais efetivo foi  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ , 9:1. É importante notar que a eluição desses últimos compostos (ácidos aplanoxídicos **A** e **H**) ocorre em ordem inversa nos sistemas de solventes citados, no sentido que o ácido aplanoxídico **H** tem  $R_f$  maior em EtOAc, e  $R_f$  menor em  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  com relação ao ácido aplanoxídico **A**. No entanto, é intuitivo que o uso alternado dos dois solventes pode proporcionar uma separação mais efetiva.

Figura 2 - Cromatografia em camada delgada dos ácidos aplanoxídicos

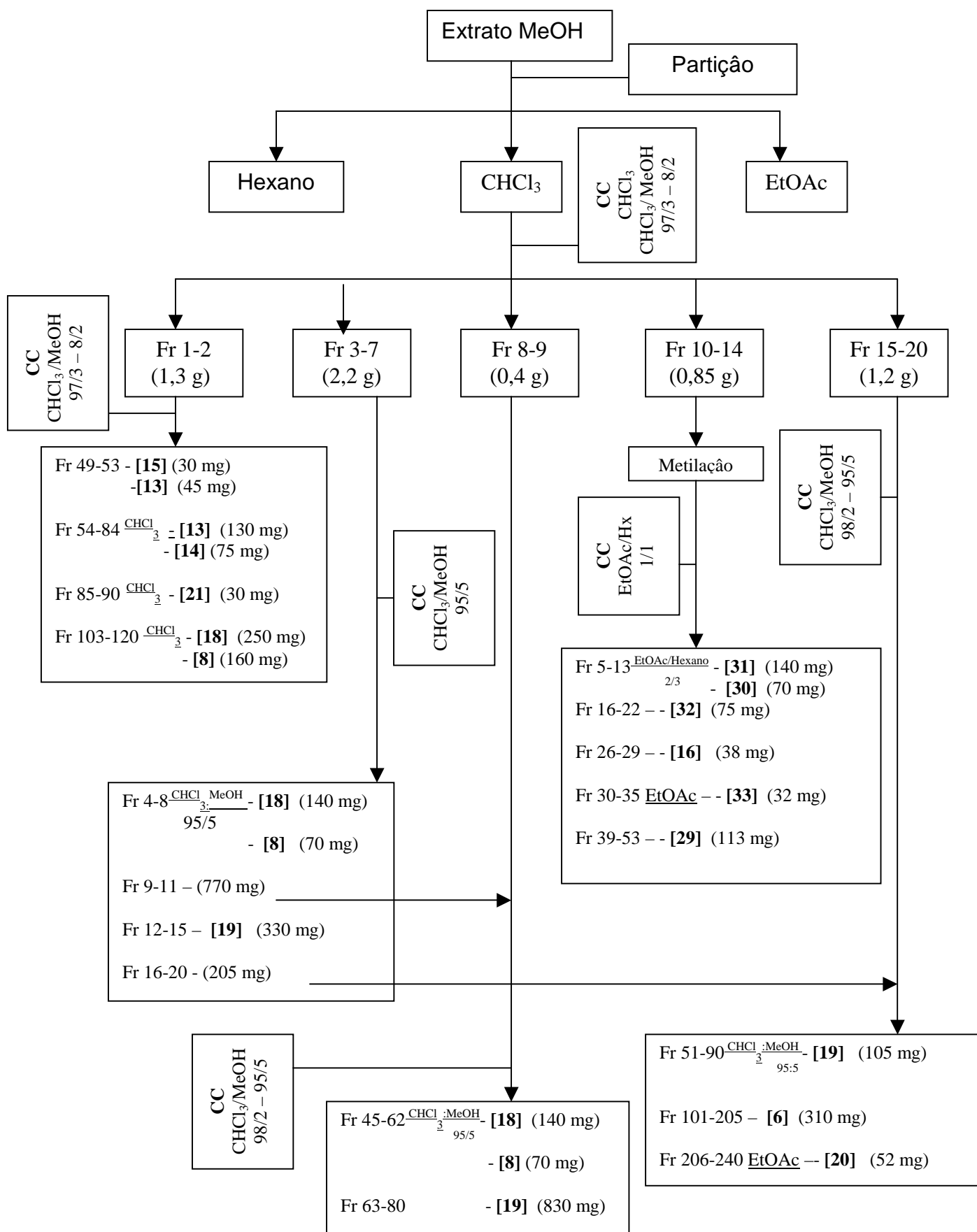


Figura 3 - Esquema de fracionamento, da fração em clorofórmio, do extrato metanólico de *G. australe*

### 4.3 Identificação dos compostos

As substâncias obtidas foram identificadas através de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) (Varian GEMINI 300), usando solventes deuterados e o tetrametilsilano como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais ( $\delta$  ppm). Para os compostos inéditos também foram feitos espectros bidimensionais (HETCOR, HETCOR longa-distância e INEPT seletivo) (DELLE MONACHE, 2001).

### 4.4 Derivados dos triterpenóides

Os esteróis  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ -ol [13] e 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22dien- $3\beta$ -ol [14] e os ácidos aplanoxídicos A [6], C [8], F [18], G [19] e H [20], foram submetidos a tratamentos químicos para a obtenção dos respectivos derivados.

#### 4.4.1. Acetil derivados

A reação de acetilação foi realizada com os esteróis [13] e [14] e com os ácidos aplanoxídicos A [6], G [19] e H [20]. À quantidade de 40 a 80mg de cada amostra, foi adicionado 1mL de uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1) e as mesmas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, cada mistura foi derramada sobre

gelo, onde permaneceu por 5 horas. Então, procedeu-se a filtração em funil sinterizado. Para eliminar resíduos de piridina e de anidrido acético a parte sólida de cada mistura foi lavada várias vezes com água destilada. Para garantir a completa eliminação dos reagentes mencionados, o sólido foi dissolvido em clorofórmio e lavado com água em funil de separação. A solução clorofórmica foi secada com sulfato sódico e, após a filtração, o solvente foi evaporado. Do sólido resultante de cada amostra, foram realizados experimentos de CCD e RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) para confirmar a ocorrência da reação. Quando necessário os resíduos foram purificados através de fracionamento em coluna cromatográfica.

#### **4.4.2. Metil derivados**

A metilação foi realizada com 50 a 70mg dos ácidos aplanoxídicos A [6], C [8], F [18], G [19] e H [20]. A estes foram acrescentados 5mL de clorofórmio e 10mL de uma solução etérea de diazometano, previamente preparada. As misturas permaneceram à temperatura ambiente por 2 horas, os solventes foram evaporados e os sólidos resultantes foram submetidos a experimentos de CCD e RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) para demonstrar a ocorrência da reação. Os produtos foram purificados por meio de fracionamento cromatográfico.

#### **4.4.3. Acetil-metil derivados**

Para essa reação foram tratados de 40 a 60mg dos ésteres metílicos



dos ácidos aplanoxídicos A [29], G [32] e H [33] empregando-se a metodologia descrita no item 4.4.1.

#### **4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias obtidas**

A atividade antimicrobiana das substâncias obtidas foi avaliada através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), conforme procedimentos descritos a seguir.

##### **4.5.1. Meios de cultura**

Os meios de cultura empregados para o teste de atividade antibacteriana foram o ágar sangue, ágar de Mueller–Hinton e o caldo de Mueller–Hinton. Para os testes antifúngicos foram utilizados o ágar extrato de malte e o caldo nutritivo. Todos os meios foram adquiridos dos Laboratórios Difco.

##### **4.5.2. Microrganismos**

**Bactérias:** Para a determinação das CIMs, foram empregadas as espécies *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (“American Type Culture Collection”, Rockville, MD).

**Preparo do inóculo bacteriano:** O inóculo foi preparado transferindo-se 300 µL de cada cultura bacteriana para 3 mL de caldo Mueller–Hinton, com subsequente incubação por 20 horas a 36<sup>o</sup>C. A pureza da cultura ativada foi testada após 8 horas da incubação inicial, com a repicagem desta para uma placa contendo meio de ágar sangue, onde foram observadas as características das colônias após incubação (20 horas). Após foi preparado uma suspensão dessas bactérias, diluídas em caldo Mueller-Hinton, correspondendo a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL.

**Fungos:** Para os experimentos visando a análise da atividade antifúngica foram empregados fungos de uma espécie filamentosa, *Trichophyton mentagrophytis* (Blanchard) e uma não filamentosa, *Candida albicans*. Esses organismos foram obtidos, respectivamente, junto ao Laboratório Santa Luzia e ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN), ambos de Florianópolis/SC.

**Preparo do inóculo fúngico:** O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas incubadas por sete dias a 30<sup>o</sup>C em tubos contendo ágar extrato de malte inclinado. Às culturas foram adicionadas de 5mL de solução fisiológica e deslocadas com auxílio de uma alça de Henle, formando uma suspensão de esporos e hifas. As suspensões foram transferidas para tubo estéril contendo 3 pérolas de vidro, agitadas em aparelho vórtex por aproximadamente 50 segundos e ajustadas com solução fisiológica estéril para turvação

correspondente a  $10^5$  UFC/mL. Para isso, foi usado um espectrofotômetro 6100 Jenway e a D.O. foi medida a 530 nm.

#### **4.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima**

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo. As substâncias-teste foram dissolvidas em 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), previamente esterilizado por autoclavação, e as soluções foram adicionadas de 1.800  $\mu$ L de caldo Muller-Hinton para bactérias e caldo nutritivo para os fungos. Posteriormente foram preparadas diluições seriadas com concentrações variando de 2,0 a 0,0156 mg/mL, as quais foram distribuídas, em volumes de 200  $\mu$ L em placa de microdiluição (contendo 96 orifícios). Como controle de crescimento e de esterilidade foram usadas apenas as misturas de meio de cultura e DMSO, sem a adição de agentes antimicrobianos. Em cada orifício teste e de controle de crescimento foram adicionados 5  $\mu$ L de inóculo bacteriano ou fúngico. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 36<sup>0</sup>C para bactérias e 72 horas a 30-35<sup>0</sup>C para os fungos. A leitura dos experimentos foi realizada primeiramente através de densidade ótica (com o uso de uma máquina leitora de Elisa modelo CLX800 Bio-Tek Instruments, Inc) e posteriormente com o uso de um revelador de crescimento microbiano, o p-iodo nitrotetrazolium (Sigma).

A CIM foi considerada a menor concentração da substância que inibiu o crescimento bacteriano ou fúngico, após a incubação. Os resultados foram

expressos em mg/mL (INGROFF-ESPINEL *et al.*, 1997; WOODS & WASHINGTON, 1995).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento e identificação das substâncias conhecidas

O estudo químico de *Ganoderma annulare*, *G. applanatum* e *G. australe* permitiu o isolamento e a identificação dos esteróis: 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol [12]; 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol [13], 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol [14]; e o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi [15] e também os triterpenos: ácido aplanoxídico **A [6]**, **C [8]**, **D metilado [16]**, **F [18]**, **G [19]** e **H [20]**. Na Tabela 1(p.29) são apresentados os esteróis e os ácidos aplanoxídicos encontrados em cada espécie fúngica.

Além desses, também foram isolados dois compostos inéditos denominados NEW49 [21] e EFS31 [23], a partir do basidioma de *G. australe*, que serão discutidos no item 5.2.

Como pode ser observado na Tabela 1, *G. australe* foi a espécie que apresentou o maior número de esteróis e ácidos aplanoxídicos. Os esteróis são substâncias sintetizadas por vários gêneros de basidiomicetos, enquanto que os triterpenos são específicos de *Ganoderma* (CHEN *et al.*, 1999; KELLER *et al.*, 1997; CHYR & SHIAO, 1991). Os esteróis 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol [12], 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol [13], 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol [14] e o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi [15] e os ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **C [8]**, **D metilado [16]**, **F [18]**, **G [19]** e **H [20]**, tiveram suas estruturas identificadas através de espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As fórmulas estruturais dos quatro esteróis são apresentadas abaixo e nas tabelas de 2 a 4 estão disponíveis os

seus dados de RMN. Os espectros dessas substâncias são mostrados no anexo (fig. de 15 a 18). Em particular, para o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi **[15]** (dados de RMN nunca reportados na literatura) a localização da carbonila na posição 3 ( $\delta_c$  212,1) está confirmada pelos deslocamentos dos metilenos em 2 e 4 em relação ao composto **[13]**, de +7,4 e +6,4 ppm, respectivamente devido ao efeito anisotrópico.

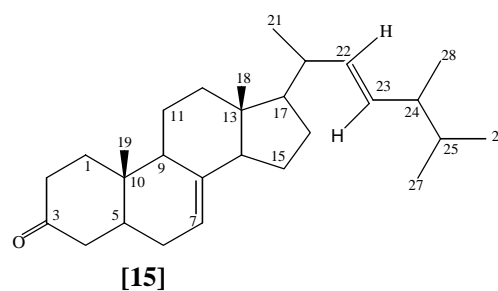
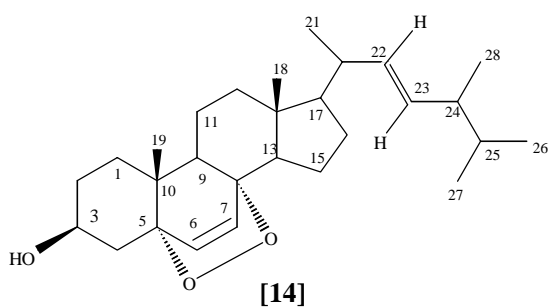
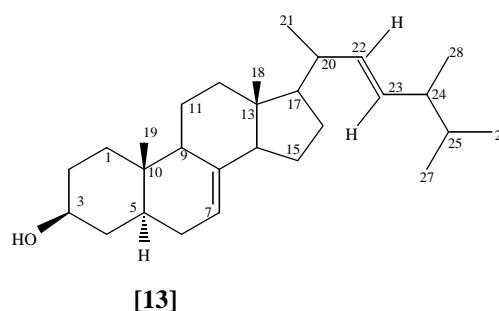
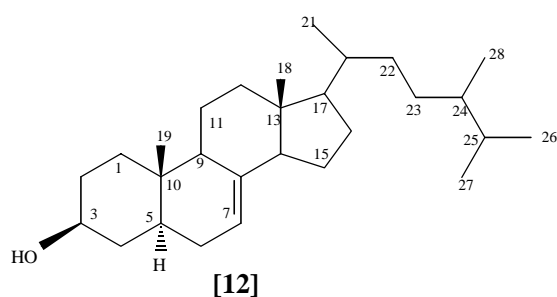


Tabela 1. Distribuição de triterpenóides nas três espécies de *Ganoderma*

Espécie fúngica/Extrato/Fração	Substâncias <sup>a</sup>											
	12	23	15	13	14	21	18	8	19	16	20	6
<b><i>G. annulare</i></b>												
<b>Extrato em hexano (1,8 g)</b>												
- Fr1 01-04 (450 mg)												
- Fr2 05-19 (770 mg)												
- Fr3 20-24 (190 mg)												
- Fr4 25-38 (160 mg)												
<b>Extrato em clorofórmio (2,0 g)</b>												
- Fr1 01-03 (040 mg)												
- Fr2 04 (180 mg)												
- Fr3 05-32 (1,58 g)												
- Fr4 33-49 (140 mg)												
<b>Extrato acetato de etila (1,2 g)</b>												
- Fr1 01-59 (1,17 g)												
<b><i>G. applanatum</i></b>												
<b>Extrato em hexano (0,6 g)</b>												
- Fr1 01-08 (070 mg)												
- Fr2 09 (010 mg)												
- Fr3 10-13 (010 mg)												
- Fr4 14-18 (250 mg)												
- Fr5 19-27 (080 mg)												
<b>Extrato em clorofórmio (0,57 g)</b>												
- Fr1 01-07 (120 mg)												
- Fr2 08-11 (150 mg)												
- Fr3 12-22 (180 mg)												
- Fr4 23-44 (050 mg)												
<b>Extrato acetato de etila (0,42 g)</b>												
- Fr1 01-15 (360 mg)												
<b><i>G. australe</i><sup>b</sup></b>												
<b>Extrato em hexano (4,1 g)</b>												
- Fr1 01-18 (470 mg)												
- Fr2 19-21 (050 mg)												
- Fr3 22-27 (210 mg)												
- Fr4 28-57 (2,7 g)												
<b>Extrato em clorofórmio (4,7 g)</b>												
- Fr1 01-02 (1,10 g)												
- Fr2 03-07 (1,40 g)												
- Fr3 08-09 (400 mg)												
- Fr4 10-14 (750 mg) <sup>c</sup>												
- Fr5 15-20 (990 mg)												
<b>Extrato acetato de etila (2,0 g)</b>												
- Fr1 01-04 (110 mg)												
- Fr2 05-08 (340 mg)												
- Fr3 09-11 (330 mg)												
- Fr4 12-22 (230 mg)												

<sup>a</sup>[12] 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol; [13] 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol; [14] 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol; [15] 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi; [6] ác. aplanoxídico A; [8] ác. aplanoxídico C; [16] ác. aplanoxídico D metilado; [18] ác. aplanoxídico F; [19] ác. aplanoxídico G; [20] ác. aplanoxídico H.

<sup>b</sup>Duas substâncias inéditas (NEW 49 [21] e EFS31 [23]) foram isoladas desta espécie.

<sup>c</sup>Fração metilada – substâncias isoladas como metil éster.

Tabela 2. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos esteróis [12], [13], [14] e [15]

Hidrogênio	H-3	H-6	H-7	H-22/23
Esteróis				
[12] Experiência	3,61m	-	5,35m	-
[12] Literatura <sup>a</sup>	3,61m	-	5,35m	-
[13] Experiência	3,61m	-	5,35m	5,19dd
[13] Literatura <sup>a</sup>	3,61m	-	5,35m	5,19dd
[14] Experiência	3,96m	6,50d (8,5Hz)	6,24d (8,5Hz)	5,18dq
[14] Literatura <sup>a</sup>	3,97m	6,50d (8,5Hz)	6,26d (8,5Hz)	5,17dq
[15] Experiência	-	-	5,19m	5,19dd

<sup>a</sup>DELLA GRECA *et. al.*, 1990



Tabela 3. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos esteróis [12] e [13]

Esteróis	[12]	[12]	[13]	[13]
Carbono	Experiência	Literatura <sup>a</sup>	Experiência	Literatura <sup>a</sup>
1	37,1	37,1	37,1	37,1
2	31,3	31,3	31,3	31,3
3	71,0	71,0	71,0	71,0
4	37,8	37,8	37,8	37,8
5	40,2	40,2	40,2	40,2
6	29,7	29,7	29,7	29,7
7	117,4	117,4	117,4	117,4
8	139,5	138,5	139,5	139,5
9	49,4	49,4	49,4	49,4
10	34,2	34,2	34,2	34,2
11	21,5	21,5	21,5	21,5
12	39,4	39,4	39,4	39,4
13	43,3	43,3	43,3	43,3
14	55,1	55,1	55,1	55,1
15	22,9	22,9	22,9	22,9
16	28,0	28,0	28,1	28,1
17	56,0	56,0	55,9	55,8
18	13,0	13,0	13,0	13,0
19	12,0	12,0	12,0	12,0
20	42,8	42,8	40,5	40,5
21	21,1	21,1	21,1	21,1
22	33,9	33,9	135,6	135,6
23	31,9	31,9	131,8	131,8
24	40,4	40,4	42,8	42,8
25	33,1	33,1	33,0	33,0
26	17,6	17,6	17,6	17,6
27	19,6	19,6	19,6	19,6
28	19,9	19,8	19,9	19,9

<sup>a</sup>DELLA GRECA *et. al.*, 1990

Tabela 4 Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos esteróis [14] e [15]

Esteróis	[14] Experiência	[14] Literatura <sup>a</sup>	[15] Experiência
Carbono			
1	36,8	36,9	38,1
2	30,1	30,0	38,7
3	66,4	66,4	212,1
4	36,9	36,9	44,2
5	82,1	82,1	42,8
6	130,7	130,7	29,7
7	135,4	135,4	116,9
8	79,4	79,4	139,5
9	51,6	51,7	48,8
10	36,9	36,9	34,3
11	20,6	20,6	21,6
12	39,2	39,2	39,3
13	44,5	44,5	43,2
14	51,1	51,1	54,9
15	23,4	23,4	22,9
16	28,6	28,6	28,1
17	56,2	56,1	55,8
18	12,8	12,8	12,4
19	18,2	18,2	12,1
20	39,7	39,7	40,5
21	20,7	20,8	21,1
22	132,3	132,3	135,5
23	132,2	132,2	131,9
24	42,7	42,8	42,8
25	33,0	33,0	33,0
26	17,5	17,5	17,6
27	19,6	19,6	19,6
28	19,9	19,9	19,9

<sup>a</sup>DELLA GRECA *et. al.*, 1990

Quanto aos triterpenos, foram isolados os ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **C [8]**, **F [18]** **G [19]** e **H [20]** em *G. annulare*; os ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **C [8]**, **F [18]** e **G [19]** em *G. applanatum*; e, a partir do basidioma de *G. australe*, os cinco ácidos citados anteriormente, além do ácido aplanoxídico **D** metilado **[16]**. Chairul e colaboradores, estudando basidiomas de *G. applanatum* de origem asiática, isolaram todos os ácidos aplanoxídicos mencionados, além dos ácidos aplanoxídicos **B [7]** e **E [17]** (CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994; CHAIRUL *et al.*, 1991). Entretanto, em outras duas pesquisas com esta última espécie fúngica, sendo uma procedente da República Checa e outra do Brasil nenhum desses triterpenos foram encontrados (BOH *et al.*, 2000; SMÂNIA *et al.*, 1999). Os resultados contrastantes obtidos nos estudos de uma mesma espécie fúngica, ratifica a necessidade de se considerar as características genéticas de cada indivíduo, na obtenção dos seus constituintes químicos celulares. É importante mencionar que, na literatura consultada, o isolamento de ácidos aplanoxídicos manteve-se restrito a apenas um dos complexos de *Ganoderma*, ou seja, *G. applanatum*. Por outro lado, do complexo de *G. lucidum* foram também obtidos inúmeros triterpenóides, porém diferentes dos aqui discutidos (WU *et al.*, 2001; MIN *et al.*, 2000; CHEN & YU, 1999; CHYR & SHIAO, 1991).

As fórmulas estruturais de todos os ácidos aplanoxídicos estão apresentadas abaixo. As tabelas de 5 a 10 (p. 36 a 41) referem-se aos dados de RMN dos ácidos aplanoxídicos isolados no presente estudo, ou seja, todos os citados anteriormente com exceção dos ácidos aplanoxídicos **B [7]** e **E [17]**

(CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994; CHAIRUL *et al.*, 1991). Os espectros dessas substâncias são apresentados no anexo (fig. de 24 a 34).

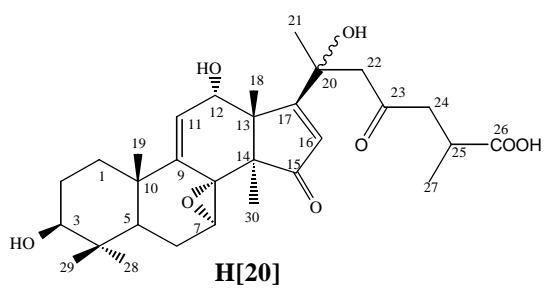
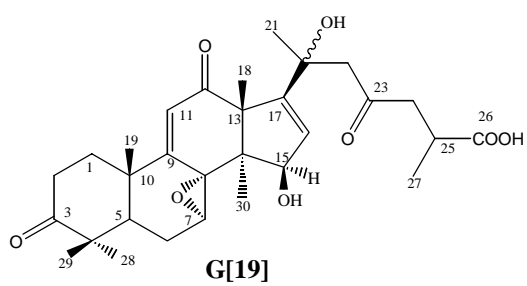
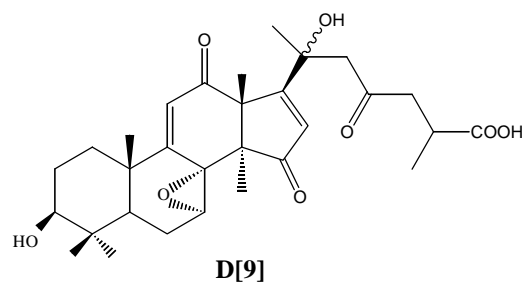
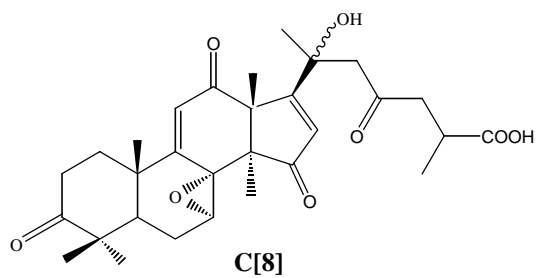
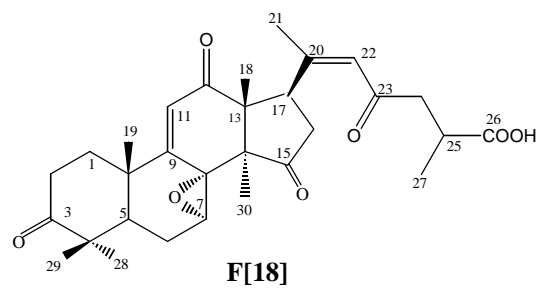
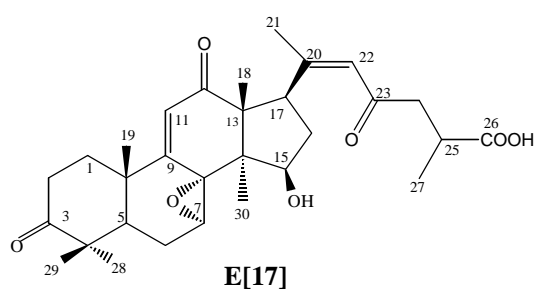
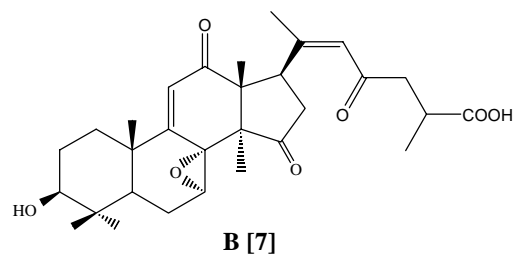
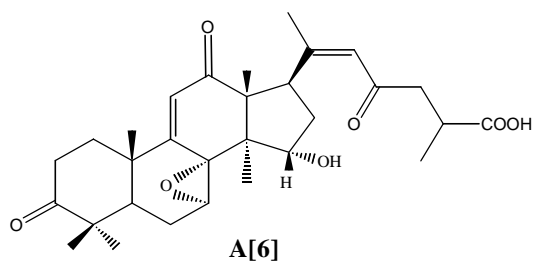


Tabela 5. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  mais relevantes dos triterpenos ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **B [7]**, **E [17]** e **F [18]**

Triterpenos	A[6]	A[6]	B[7]	E[17]	F[18]	F[18]
Hidrogênio	Experiência	Literatura <sup>a</sup>	Literatura <sup>a</sup>	Literatura <sup>b</sup>	Experiência	Literatura <sup>b</sup>
H-3	-	-	3,53dd	-	-	-
H-7	4,15d	4,11	4,07d	4,75d	4,68d	4,67d
H-11	6,05s	6,03s	6,04s	6,04s	-	-
H-12	-	-	-	-	6,35s	6,06s
H-15	4,46t	4,44t	-	4,03d	-	-
H-16	-	-	-	-	-	-
H-17	3,36t	3,37t	3,30t	NR <sup>c</sup>	3,32t	3,32t
Me-18	1,15	1,15	1,13	1,12	1,13	1,13
Me-21	2,19	2,19	2,40	2,25	2,27	2,27
H-22	6,39s	6,35s	6,35s	6,48s	6,36s	6,36s
H <sub>2</sub> -22	-	-	-	-	-	-
Me-27	1,21d	1,21d	1,22d	1,21d	1,21d	1,21d

<sup>a</sup> CHAIRUL *et al.*, 1991

<sup>b</sup> CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994

<sup>c</sup> NR Dado não relatado na literatura

Tabela 6. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  mais relevantes dos triterpenos ácidos aplanoxídicos **C[8]**, **D[9]** e **DMe[16]**

Triterpenos	C[8]	C[8]	DMe[16]	D[9]
Hidrogênio	Experiência	Literatura <sup>a</sup>	Experiência	Literatura <sup>a</sup>
H-3	-	-	3,29dd	3,23dd
H-7	4,66d	4,65d	4,57d	4,57d
H-11	6,15s	6,12s	6,10	6,02
H-12	-	-	-	-
H-16	5,69s	5,74s	5,66s	5,58s
H-17	-	-	-	-
Me-18	1,67	1,61	1,60s	1,53s
Me-21	1,53	1,52	1,33s	1,32s
H-22	-	-	-	-
H <sub>2</sub> -22	2,90	NR <sup>b</sup>	2,93s	NR <sup>b</sup>
Me-27	1,19d	1,18d	1,15d	0,95d
OMe	-	-	3,65	-

<sup>a</sup> CHAIRUL *et al.*, 1991

<sup>b</sup>NR Dado não relatado na literatura

Tabela 7. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  mais relevantes dos triterpenos ácidos aplanoxídicos **G[19]** e **H[20]**

Triterpenos	G[19]	G[19]	H[20]	H[20]
Hidrogênio	Experiência	Literatura <sup>a</sup>	Experiência	Literatura <sup>a</sup>
H-3	-	-	3,29dd	3,26dd
H-7	4,19d	4,19d	4,75d	4,82d
H-11	6,06s	6,06s	5,66d	5,66d
H-12	-	-	4,12d	4,13d
H-15	4,57d	4,57d	-	-
H-16	5,66d	5,64d	5,77	5,74
Me-18	1,40	1,42	1,45	1,42
Me-21	1,45	1,45	1,44	1,43
H <sub>2</sub> -22	2,91s	2,91s	2,93s	2,91s
Me-27	1,20d	1,20d	1,17d	1,19d

<sup>a</sup>CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994

Tabela 8. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **B [7]**, **E [17]** e **F [18]**

Triterpenos	A[6] Experiência	A[6] Literatura <sup>a</sup>	B[7] Literatura <sup>a</sup>	E[17] Literatura <sup>b</sup>	F[18] Experiência	F[18] Literatura <sup>b</sup>
Carbono						
1	36,0	36,0	35,7	36,2	36,0	36,1
2	33,6	33,6	27,7	33,7	33,6	33,6
3	216,2	216,2	78,0	216,5	216,0	216,0
4	45,9	45,9	41,5	46,0	45,9	45,9
5	40,8	40,8	39,3	39,4	40,8	40,7
6	23,2	23,2	21,8	23,2	22,7	22,7
7	60,5	60,5	58,7	62,9	62,6	62,6
8	66,0	66,0	71,4	64,3	57,6	57,6
9	163,4	163,4	165,6	164,8	164,8	164,8
10	40,2	40,2	37,9	40,3	40,7	40,7
11	130,8	130,8	128,7	130,1	129,7	129,7
12	201,2	201,2	200,9	202,8	200,5	200,5
13	50,3	50,3	54,9	53,3	55,0	55,0
14	59,3	59,3	62,0	60,2	58,8	58,8
15	71,7	71,7	209,6	76,6	209,5	209,5
16	33,6	33,6	38,5	39,5	38,3	38,3
17	45,8	45,8	43,0	48,7	45,8	42,8
18	18,1	18,1	18,1	19,6	18,1	18,1
19	21,6	21,6	18,3	21,3	21,6	21,6
20	157,3	157,3	154,9	158,6	158,6	158,6
21	20,6	20,6	20,4	20,9	20,4	20,4
22	126,0	126,0	126,7	126,3	126,7	126,8
23	198,8	198,8	198,7	199,2	198,7	198,5
24	47,6	47,6	47,7	47,6	47,7	47,6
25	34,8	34,8	34,9	33,7	34,9	34,9
26	179,6	179,6	179,7	180,1	180,2	180,2
27	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0
28	14,6	14,6	17,1	21,7	24,8	24,8
29	24,6	24,6	25,8	24,8	21,7	21,7
30	28,7	28,7	28,7	28,6	28,4	28,6

<sup>a</sup>CHAIRUL *et al.*, 1991

<sup>b</sup>CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994



Tabela 9. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos ácidos aplanoxídicos **C [8]**, **D [9]** e **DMe [16]**

Triterpenos	C[8] Experiência	C[8] Literatura <sup>a</sup>	DMe[16] Experiência	D[9] Literatura <sup>a</sup>
Carbono				
1	35,7	35,7	35,2	35,2
2	33,4	35,4	27,5	27,5
3	215,7	215,7	77,9	77,9
4	46,0	46,0	41,8	41,8
5	40,7	40,7	39,4	39,4
6	22,9	22,9	21,8	21,8
7	59,1	59,1	59,0	59,0
8	62,1	62,1	62,9	62,9
9	167,6	167,6	168,7	168,9
10	40,8	40,8	38,0	38,0
11	129,8	129,8	128,3	128,3
12	199,8	199,8	200,2	200,2
13	54,5	54,5	54,2	54,2
14	62,8	62,8	61,5	61,5
15	202,8	202,8	203,2	203,2
16	125,2	125,2	125,2	125,2
17	181,6	181,6	181,9	181,9
18	30,3	30,3	29,8	29,8
19	24,9	24,9	25,9	25,9
20	73,0	73,0	72,9	72,9
21	29,5	29,5	29,4	29,4
22	52,9	52,9	52,9	52,9
23	206,2	206,2	206,3	206,3
24	47,8	47,8	47,8	47,8
25	34,4	34,5	33,1	33,1
26	179,9	179,9	179,9	179,9
27	16,9	16,9	16,9	16,9
28	24,5	24,8	17,1	17,1
29	21,6	21,6	25,7	25,7
30	28,7	28,7	28,7	28,7
OMe	-	-	51,9	-

<sup>a</sup>CHAIRUL *et al.*, 1991

Tabela 10. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos ácidos aplanoxídicos **G [19]** e **H [20]**

Triterpenos	G[19]	G[19]	H[20]	H[20]
Carbono	Experiência	Literatura <sup>a</sup>	Experiência	Literatura <sup>a</sup>
1	35,7	35,9	35,4	35,6
2	33,4	33,6	27,5	27,6
3	215,7	216,4	77,9	78,2
4	46,0	46,0	41,8	41,6
5	40,7	40,5	39,4	39,1
6	22,9	23,1	21,8	22,2
7	59,1	62,4	59,0	62,6
8	62,1	63,6	62,9	62,8
9	167,6	167,7	158,2	158,2
10	40,8	40,5	38,0	37,9
11	129,8	130,0	128,5	128,7
12	203,6	203,6	78,1	78,1
13	50,2	50,2	50,2	50,2
14	64,8	64,8	64,4	64,4
15	78,4	78,4	204,0	204,0
16	127,2	127,2	127,2	127,2
17	167,7	167,7	168,9	168,9
18	30,9	30,9	31,0	31,0
19	24,7	24,7	25,7	25,7
20	72,2	72,2	72,2	72,2
21	28,6	28,6	28,7	28,7
22	53,9	53,9	53,9	53,9
23	208,0	208,0	208,7	208,7
24	48,0	48,0	48,2	48,2
25	34,1	34,1	34,5	34,5
26	180,1	180,1	179,6	179,6
27	16,8	16,8	16,9	16,9
28	24,0	24,0	24,6	24,6
29	21,7	21,7	22,2	22,2
30	26,9	26,9	27,0	27,0

<sup>a</sup>CHAIRUL, CHAIRUL & HAYASHI, 1994

A classe dos compostos “ácidos aplanoxídicos” encontrada nas espécies de *Ganoderma* estudadas no presente trabalho, foi descrita para esse gênero por Chairul e colaboradores (1994,1991). Assim, é importante mencionar que as tabelas de 5 a 10 foram extremamente usadas para a identificação rotineira desses compostos. Em particular, o exame dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (tab. de 8 a 10) resultou nas seguintes constatações:

- Todos os compostos do tipo “ácidos aplanoxídicos” têm sinais de carbonos quaternários no intervalo 57,6 – 66,0 e de carbonos protonados no intervalo 59,0 - 62,6, devido à presença de função epóxido nas posições 8-7. Essa característica é exclusiva dos “ácidos aplanoxídicos” e permite distingui-los dos demais ácidos triterpênicos isolados de *Ganoderma* spp.;
- Os ácidos aplanoxídicos com a mesma cadeia lateral (**A [6], B [7], E [17] e F [18]**) ou (**C [8], D [9], G [19], e H [20]**); apresentam os mesmos sinais para os carbonos 20-27;
- Dentro da série dos ácidos aplanoxídicos **A [6], B [7], E [17] e F [18]** a distinção pode ser feita com base nos outros sinais. Assim, o sinal do carbono 3 aparece aproximadamente em  $\delta 216$  (**A [6], E [17], F [18]**) e  $\delta 78,0$  (**B [7]**); o sinal do carbono 15 se encontra aproximadamente em  $\delta 209$  (**F [18], B [7]**), em  $\delta 76,6$  (**E [17]**) e em  $\delta 71,4$  (**A [6]**). A diferença de deslocamento do C-15 para **E [17]** e **A [6]** é explicada pelo fato de ambos serem epímeros nessa posição;
- Na série dos ácidos aplanoxídicos **C [8], D [9], G [19] e H [20]** a diferenciação baseou-se nos sinais dos carbonos 16 e 17 ( $\delta 125,2$  e

aproximadamente 181 para **C [8]**, **D [9]**;  $\delta$ 127,2 e aproximadamente 168 para **G [19]** e **H [20]** respectivamente). Também nos sinais do carbono 3 aproximadamente em  $\delta$ 216 para **C [8]** e **G [19]** ; aproximadamente  $\delta$ 78 para **D [9]** e **H [20]** ); e nos sinais do carbono 12 aproximadamente  $\delta$ 200 - 203 para **C [8]**, **D [9]**, **G [19]**;  $\delta$ 78,1 para **H [20]**). Além da presença de um oximetino a mais (C-12 e  $\delta$ 78,1) o ácido aplanoxídico **H [20]** se destacou dos demais pelo sinal do carbono 9 ( $\delta$ 158,2 *versus* aproximadamente 168 para **C [8]**, **D [9]**, **G [19]**), em decorrência da falta de conjugação com o carbono 12.

Para a identificação dos ácidos aplanoxídicos, os dados de RMN  $^1\text{H}$  (tab.5, p.36) foram um pouco menos úteis porém, deve-se destacar as seguintes diferenças:

- Na série dos ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **B [7]**, **E [17]** e **F [18]** o sinal do Me-18 observado em  $\delta$ 1,12-1,15 é deslocado para aproximadamente  $\delta$ 1,60 na série **C [8]**, **D [9]**, **G [19]** e **H [20]** devido a presença da dupla ligação entre os carbonos 17-16;
- Igualmente pode ser distinguido o sinal do Me-21 da série dos ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **B [7]**, **E [17]** e **F [18]** em relação a série **C [8]**, **D [9]**, **G [19]** e **H [20]** ( $\delta$ 1,44 - 1,53) devido a ausência de uma dupla ligação nessa última série;
- A série dos ácidos aplanoxídicos **A [6]**, **B [7]**, **E [17]** e **F [18]** apresenta um sinal de **próton** como singlete em  $\delta$ 6,35 - 6,48 (H-22). Ao contrário, a

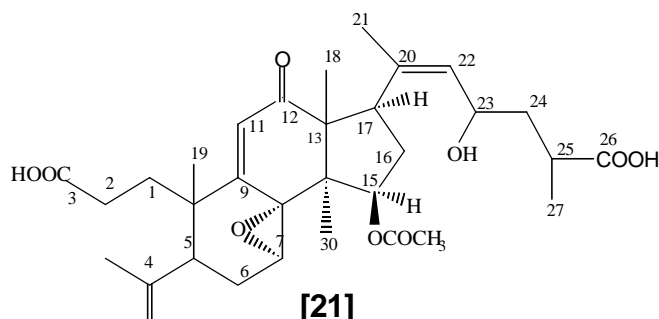
série dos ácidos aplanoxídicos **C [8]**, **D [9]**, **G [19]** e **H [20]** apresenta um sinal de próton como singlete com integração para **dois** hidrogênios (H<sub>2</sub>-22) no intervalo  $\delta$ 2,90 - 2,93, característico de prótons  $\alpha$  à carbonila;

- O ácido aplanoxídico **H [20]** é o único que apresenta um OH na posição 12, e se observa um acoplamento entre o H-12 e o H-11 resultando em um dublete (J= 2,7Hz) a  $\delta$ 4,13, conseqüentemente o sinal devido a H-11 aparece como outro **dublete** a  $\delta$ 5,66 (J= 2,7Hz). Ao contrário, nos demais ácidos aplanoxídicos o sinal de H-11 se apresenta como **singlete** no intervalo  $\delta$ 6,04-6,15.

## 5.2. Isolamento e determinação da estrutura das substâncias **INÉDITAS**

Durante o fracionamento dos extratos de *G.australe* foram isolados dois lanostanóides denominados EFS31 e NEW49, cujas estruturas são inéditas. A substância EFS31 foi isolada a partir do extrato em hexano (FR3 22-27; tab. 1, p.30) e a NEW49 do extrato em clorofórmio (FR1 01-02) e correspondem, respectivamente, as estruturas **[23]** e **[21]**.

### 5.2.1. Substância NEW49



O espectro de  $^1\text{H}$  RMN (fig. 4 na p.46 e tab.11 na p.64) do composto **[21]** apresenta sinais para **sete** metilas, seis das quais ( $\delta$  2,05; 1,91; 1,73; 1,22; 1,03 e 0,99) são singletes e um ( $\delta$  1,30) como dublete ( $J=7,3$  Hz). Além desses, são observados sinais para **um** metileno ( $\delta$  4,94 e 4,72), para **cinco** prótons entre olefínicos ( $\delta$  5,99s;  $\delta$  5,54d,  $J=8$  Hz) e oximetínicos ( $\delta$  5,39,t, $J=9,6$  Hz;  $\delta$  5,30, quarteto largo;  $\delta$  4,04d, $J=4,1$  Hz) e também sinais para **três** prováveis metinos ( $\delta$  3,24t,  $J=9,5$ ;  $\delta$  2,87dd,  $J=12,7$  e  $9,6$  Hz;  $\delta$  2,74dd,  $J=15,4$  e  $8,0$  Hz). Os demais sinais de prótons da molécula se encontram no intervalo  $\delta$  2,40 - 1,60 sobrepostos entre si ou sobre os sinais das metilas.



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 5 na p.48 e tab.11 na p.64) apresenta sinais para **trinta e dois** carbonos, os quais com experimentos de APT e HETCOR (fig. 6) foram estabelecidos como **sete** metilas, **seis** metilenos, **oito** metinos e **onze** carbonos quaternários. De acordo com os espectros de RMN é possível propor a presença dos seguintes fragmentos ou substituintes:

- um grupo O-CO-CH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  170,6/21,1;  $\delta_{\text{H}}$  2,05s);
- um substituinte isopropenílico, CH<sub>2</sub>=C(Me)- ( $\delta_{\text{C}}$  115,7/144,0/23,2;  $\delta_{\text{H}}$  4,94s/4,72s/1,73s);
- um epóxido ( $\delta_{\text{C}}$  66,3/61,1;  $\delta_{\text{H}}$  4,04d);
- dois -COOH ( $\delta_{\text{C}}$  180,0/178,8);
- um -C=CH-CO- ( $\delta_{\text{C}}$  163,0/129,8/201,3;  $\delta_{\text{H}}$  5,98s) e
- um Me-C=CH-CHOH- ( $\delta_{\text{C}}$  19,1/140,3/126,2/75,2;  $\delta_{\text{H}}$  1,92s/5,54d/5,30m).

O composto **[21]** apresenta um grupo epóxido, como ocorre nos “ácidos aplanoxídicos”, porém quando se compara seus outros dados de RMN com os dos “ácidos aplanoxídicos” (tab. de 5 a 10) não se encontra indícios de que o composto **[21]** seja desse tipo, nem em relação ao esqueleto, nem a cadeia lateral.

Nos espectros de RMN do composto **[21]** as diferenças que mais ressaltam em relação aos “ácidos aplanoxídicos” são a presença de **duas** funções carboxilas e do fragmento **isopropenílico**. Devido a presença desses dois grupos, foi proposta a inclusão do composto **[21]** na série “seco”, isto é, com o anel A aberto, sendo que esta classe de compostos não havia sido anteriormente observado no gênero *Ganoderma*. No entanto foi feita uma pesquisa bibliográfica relativa à série de compostos “seco” encontrados em





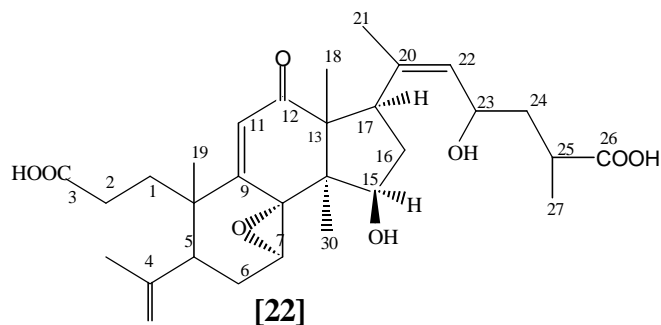








outros fungos, e foi encontrado um composto, o **ácido elfvínico H** [22] (YOSHIKAWA *et al.*, 2002),



isolado do fungo *Elfvíngia applanata* (Ganodermatacea), que apresenta dados de  $^{13}\text{C}$  RMN comparáveis com os dados do composto [21] (tab. 12, p.64). A diferença principal entre esses dois compostos, consiste no deslocamento do carbono 15 e na presença de sinais para um grupo acetila nos espectros do composto [21]. As outras pequenas diferenças dos demais sinais podem ser atribuídas aos diferentes solventes usados na obtenção dos espectros. Portanto ao composto [21] foi designada a estrutura do **ácido 15-O-acetil elfvínico H**. A confirmação da estrutura foi obtida através das conectividades a duas ou três ligações encontradas no espectro HETCOR a longa distância (fig. 7) e nos experimentos de INEPT seletivo (fig. 8 e tab.11 na p.63).

As principais conectividades encontradas no espectro de HETCOR a longa distância foram as seguintes: carboxila em 3 com H-2; carbono quaternário (C-8) do epóxido com H-11; carbonos quaternários C-9, C-13 e C-14 com os sinais do Me19, Me18/Me30 e Me30/Me18, respectivamente e do oximetino em 15 com o Me30.









Por outro lado, nos experimentos de INEPT seletivo (fig. 8), a irradiação a  $\delta$  4,04 (H-7) deu conectividade com C-5 e C-6; a irradiação a  $\delta$  5,98 (H-11) com C-8, C-10 e C-13; a irradiação a 3,24 (H-17) com C-13 e C-20; a irradiação a  $\delta$  5,54 (H-22) com o Me-21; e a irradiação a  $\delta$  2,74 (H-25) com a carbonila em 26 e o Me 27. Analogamente, a irradiação seletiva de cada grupo metila deu resposta positiva com os respectivos carbonos vizinhos (tab. 11, p. 64).

Assim, esses experimentos confirmaram a estrutura e a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos do **ácido 15-O-acetil elfvínico H [21]**.















Tabela 11. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do Ácido 15-O-acetil elfvínico H [21]

<b>Ácido 15-O-acetil elfvínico H [21]</b>				
	<b>C</b>	<b>H<sup>a</sup></b>	<b>Conetividades a longa distância</b>	
			<b>C-H<sup>b</sup></b>	<b>H-C<sup>c</sup></b>
1	31,8	2,38/1,83	-	-
2	34,0	2,36m	-	-
3	178,8	-	H-2	-
4	144,0	-	Me29	-
5	43,9	2,87dd(12,7;9,6)	-	C-4
6	27,1	2,12/1,78	-	-
7	61,1	4,04d(4,1)	-	C-5, C-6
8	66,3	-	H-11	-
9	163,0	-	Me19	-
10	43,6	-	-	-
11	129,8	5,98s	-	C-8;C-10;C-13
12	201,3	-	Me18	-
13	58,8	-	Me18/30	-
14	51,5	-	Me30/18	-
15	71,5	5,39dd(9,6; 7,2)	Me30	CO(Ac)
16	36,2	2,10m	-	-
17	44,2	3,24t(9,5)	-	C-13; C-20
Me18	17,9	1,03s	-	C-12;C-13;C-14
Me19	23,3	0,99s	-	C-9;C-10
20	140,3	-	Me21	-
Me21	19,1	1,92s	-	C-17;C-20;C-22
22	126,2	5,54d(8,0)	-	Me21
23	75,2	5,30m	-	C-22
24	37,0	2,13m	-	-
25	34,3	2,74dd(15;7,3)	-	C-26;Me27
26	180,0	-	-	-
Me27	15,7	1,30d(7,3)	-	C-24;C-25;C-26
<b>28</b>	<b>115,7</b>	<b>4,94/4,72</b>	-	<b>C-5; Me-29</b>
<b>Me 29</b>	<b>23,2</b>	<b>1,73s</b>	-	<b>C-4; C28</b>
Me30	15,1	1,22s	-	C-8;C-13;C-16
<b>OAc</b>	<b>170,6</b>	-	<b>Me(Ac)</b>	-
<b>Me(Ac)</b>	<b>21,1</b>	2,05s	-	<b>CO(Ac)</b>

<sup>a</sup>J em Hertz, entre parênteses

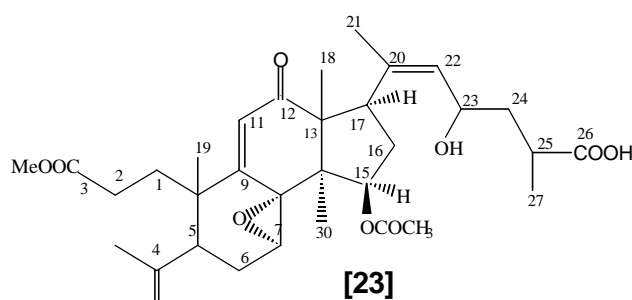
<sup>b</sup>Experimento de HETCOR a longa distância

<sup>c</sup>Experimento de INEPT seletivo

Tabela 12. Comparação dos dados de carbono do ácido elfvínico H [22] (YOSHIKAWA *et al.*, 2002) com os do ácido 15-O-acetil elfvínico H [21] e do ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvínico H [23].

Carbono	[21]	[22]	[23]	
	(CDCl <sub>3</sub> ) <sup>13</sup> C	(C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) <sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1	31,8	30,1	31,8	2,35/1,82
2	34,0	37,9	29,4	2,38
3	178,8	176,1	<b>173,9</b>	-
4	144,0	145,6	144,3	-
5	43,9	44,3	43,9	2,87
6	27,1	27,9	27,1	2,13/1,80
7	61,1	63,7	61,1	4,04
8	66,3	67,0	66,2	-
9	163,0	164,1	163,1	-
10	43,6	44,4	43,7	-
11	129,8	130,3	129,8	5,97s
12	201,3	203,6	201,3	-
13	58,8	60,3	58,8	-
14	51,7	53,9	51,5	-
15	71,5(15-OAc)	76,9(15-OH)	71,5(15-OAc)	5,39
16	36,2	40,3	36,4	2,12m
17	44,2	47,1	44,2	3,24
Me18	17,9	19,8	17,9	1,03
Me19	23,3	24,1	23,4	0,98
20	140,3	141,8	140,2	-
Me21	19,1	19,8	19,1	1,92s
22	126,2	127,0	126,2	5,54
23	75,2	75,9	75,1	5,30
24	37,0	37,4	37,1	2,13
25	34,3	35,0	34,3	2,74
26	180,0	179,9	180,0	-
Me27	15,7	16,1	15,7	1,30d
28	115,7	115,5	115,7	4,94/4,72
Me 29	23,2	23,0	23,3	1,73
Me30	15,1	21,4	15,1	1,21
<b>OAc</b>	<b>170,6</b>	-	<b>170,5</b>	-
<b>Me(Ac)</b>	<b>21,1</b>	-	<b>21,1</b>	2,05
<b>COOMe</b>	-	-	<b>51,7</b>	3,66

### 5.2.2. Substância EFS31



Os dados completos de RMN do composto **[23]** são apresentados na Tabela 12 (p.65) e os espectros nas figuras de 9 a 12. Este composto dispõe de dados espectrais de RMN quase idênticos aos do composto **[21]**. A única diferença observada é que no composto **[23]** aparece absorção adicional para um éster metílico (OMe  $\delta_C$  51,7;  $\delta_H$  3,66s). Assim, o composto **[23]** seria o **mono metil éster** do composto **[21]** na posição 3 ou 26. A localização do OMe no carbono em 3 (e não no carbono em 26) foi deduzida pelo deslocamento do C-2, que passou de  $\delta_C$  34,0 no espectro do composto **[21]** para  $\delta_C$  29,4 no espectro do composto **[23]**, enquanto que o C-25 apresentou o mesmo deslocamento químico no espectro de RMN  $^{13}C$  de ambos compostos. Dessa forma, o composto **[23]** foi identificado como sendo **ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvínico H**.

Biogeneticamente, os ácidos do tipo “elfvínico H” (**[21]** e **[23]**) podem derivar do ácido aplanoxídico E**[17]** por abertura do anel A e redução do grupo carbonila presente no carbono 23.





















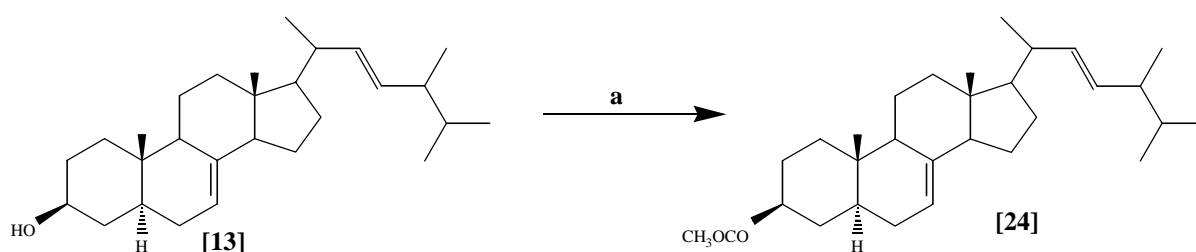






### 5.3. Derivados dos esteróis e dos ácidos aplanoxídicos

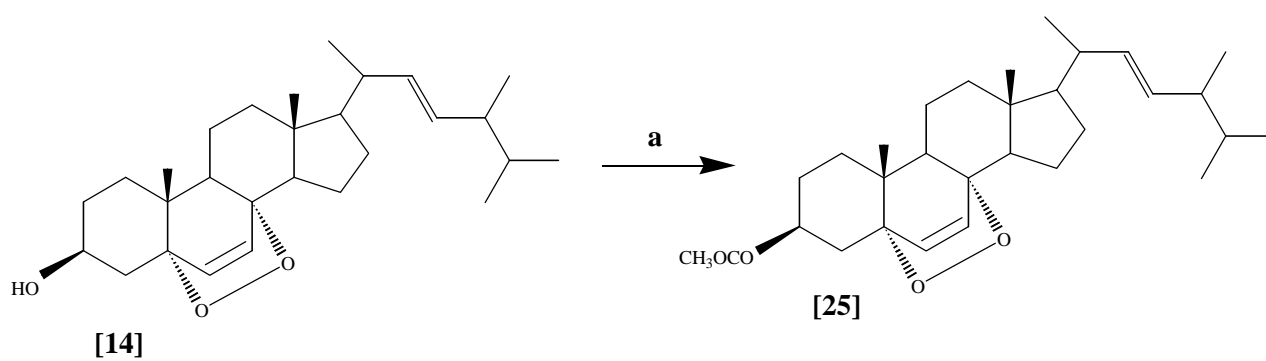
A seguir são apresentados nas figuras de 13 a 15 os esquemas de síntese dos derivados esteróis acetilados e dos derivados ácidos aplanoxídicos acetilado e metilado. Nas tabelas de 13 a 24 são fornecidos os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos derivados esteróis acetilados [24] e [25] e dos derivados dos ácidos aplanoxídicos acetilados [26], [27], [28] dos derivados dos ácidos aplanoxídicos metilados [29], [30], [31], [32], [33] e derivados dos ácidos aplanoxídicos acetilados-metilados [34], [35] e [36]. Os espectros desses compostos estão disponíveis no anexo.



(a) Piridina/ Ac<sub>2</sub>O, temperatura ambiente, 24 horas

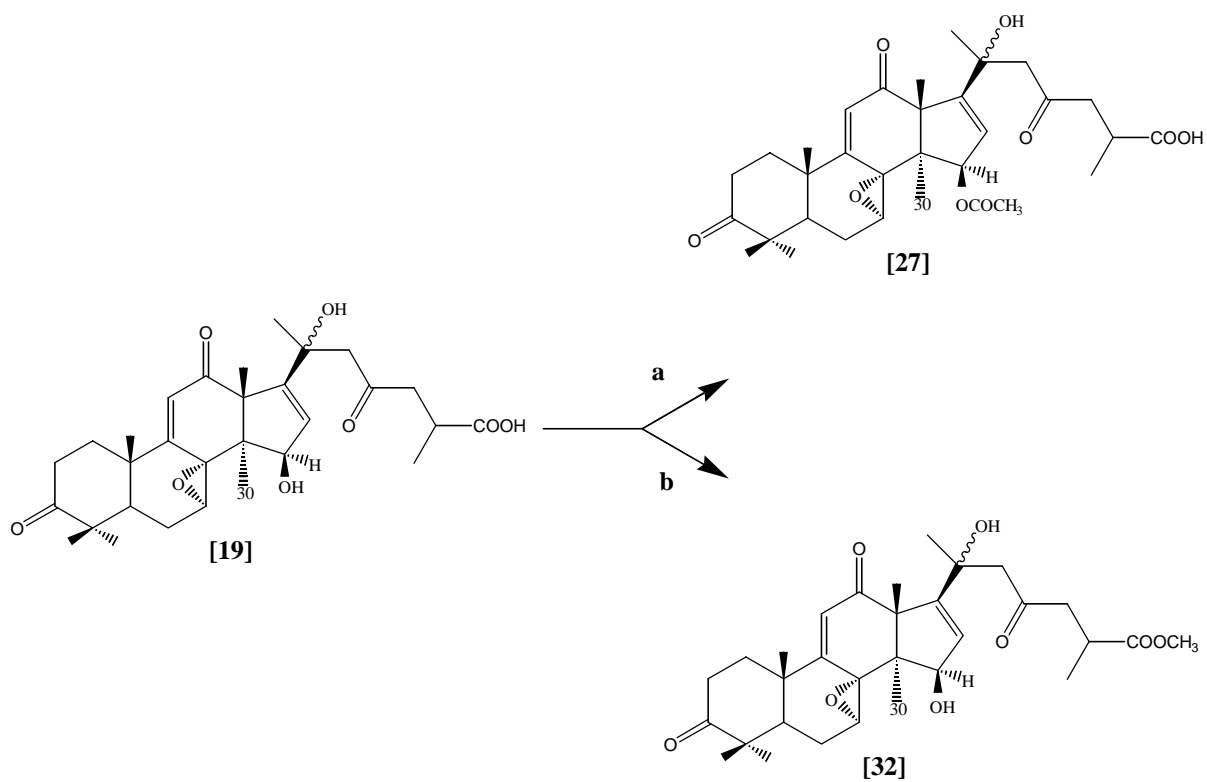
Figura 13 - Esquema de síntese do derivado acetilado [24]





(a) Piridina/ Ac<sub>2</sub>O, temperatura ambiente, 24 horas

Figura 15 - Esquema de síntese do derivado acetilado [25]



(a) Piridina/  $\text{Ac}_2\text{O}$ , temperatura ambiente, 24 horas

(b)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ , temperatura ambiente, 2 horas

Figura 16 - Esquema de síntese dos derivados G acetilado [27] e G metilado [32]

Tabela 13. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  mais relevantes dos derivados esteróis acetilados [24], [25] em relação ao esterol [13] e [14], respectivamente

Esteróis	[13]	[24]	[14]	[25]
Hidrogênio				
H-3	3,61m	4,69m	3,96m	4,98m
H-6	-	-	6,50d (8,5 Hz)	6,50d (8,5 Hz)
H-7	5,35m	5,14m	6,24d (8,5 Hz)	6,24d (8,5 Hz)
H-22/23	5,19dd	5,19dd	5,18dq	5,18dq
O-CO-Me	-	2,03s	-	2,02s

Tabela 14. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados esteróis acetilados [24], [25] em relação ao esteroi [13] e [14], respectivamente

Esteróis	[13]	[24]	[14]	[25]
Carbono				
1	37,1	36,9	36,9	34,3
2	31,3	27,5	31,3	28,6
3	71,0	73,5	71,1	69,5
4	37,8	33,8	36,9	33,2
5	40,2	40,2	82,1	86,7
6	29,7	29,7	29,7	29,7
7	117,4	117,4	139,5	130,4
8	139,5	139,5	79,4	79,4
9	49,4	49,4	49,4	51,5
10	34,2	34,2	34,2	36,7
11	21,5	21,5	21,5	20,9
12	39,4	39,4	39,4	39,4
13	43,3	43,3	43,3	44,2
14	55,1	55,1	55,1	56,2
15	22,9	22,9	22,9	23,4
16	28,1	28,0	28,1	26,3
17	55,9	56,0	55,9	55,9
18	13,0	13,0	13,0	13,0
19	12,0	12,0	12,0	12,0
20	40,5	42,8	40,5	39,8
21	21,1	21,1	21,1	20,9
22	135,6	133,9	135,6	134,2
23	131,8	131,7	131,8	132,1
24	40,8	40,4	42,8	42,7
25	33,0	33,1	33,0	33,2
26	17,6	17,6	17,6	17,7
27	19,6	19,6	19,6	19,5
28	19,9	19,9	19,9	19,9
O-CO-Me	-	170,7	-	170,1
O-CO-Me	-	21,5	-	21,3

Tabela 15. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos **A acetilado [26]**, **A Metilado [29]** e **A acetilado-metilado [34]** em relação ao ácido aplanoxídico **A [6]**

Triterpenos	[6]	[26]	[29]	[34]
Hidrogênio				
H-7	4,15d	4,08d	4,14d	4,08d
H-11	6,05s	6,06s	6,37s	6,37s
H-15	4,46t	5,44t	4,68t	4,39t
H-17	3,36t	3,41t	3,36t	3,41t
H-22	6,39s	6,39s	6,02s	6,04s
O-CO-Me	-	2,08s	-	2,08s
COOMe	-	-	3,68s	3,68s

Tabela 16. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos **A acetilado [26]**, **A Metilado [29]** e **A acetilado-metilado [34]** em relação ao ácido aplanoxídico **A [6]**

Triterpenos	[6]	[26]	[29]	[34]
Carbono				
1	36,0	36,7	35,9	35,9
2	33,6	33,3	33,4	33,4
3	216,2	216,5	216,2	216,3
4	45,9	45,8	45,8	45,6
5	40,8	40,5	40,5	40,6
6	23,2	22,8	22,8	22,9
7	60,5	60,3	60,5	60,4
8	66,0	65,2	66,5	66,5
9	163,4	164,0	163,0	163,9
10	40,2	40,1	40,1	40,1
11	130,8	130,1	130,8	130,2
12	201,2	201,1	201,2	201,1
13	50,3	50,7	50,3	50,3
14	59,3	59,1	59,2	59,0
15	71,7	72,3	71,7	72,2
16	33,6	31,7	31,6	31,
17	45,8	45,5	45,7	45,8
18	18,1	18,1	18,1	18,1
19	21,6	21,4	21,6	21,5
20	157,3	156,8	156,9	156,1
21	20,6	20,8	20,6	20,5
22	126,0	126,0	125,9	126,0
23	198,8	198,6	198,6	198,5
24	47,6	47,5	47,7	47,7
25	34,8	34,6	34,8	34,7
26	179,6	180,3	176,6	176,4
27	17,0	16,9	17,2	17,1
28	14,6	15,1	14,6	15,2
29	24,6	24,4	24,5	24,5
30	28,7	28,6	28,7	28,7
O-CO-Me	-	170,7	-	170,5
O-CO-Me	-	21,5	-	21,1
COOMe	-	-	176,6	176,4
COOMe	-	-	51,9	51,8

Tabela 17. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do derivado ácido aplanoxídico **C metilado [30]** em relação ao ácido aplanoxídico **C [8]**

Triterpenos	[8]	[30]
Hidrogênio		
H-7	4,66d	4,66d
H-11	6,15s	6,14s
H-16	5,69s	5,69s
Me-18	1,67	1,63
Me-21	1,53	1,54
H <sub>2</sub> -22	2,90s	2,96s
Me-27	1,19d	1,15d
COOMe	-	3,67s

Tabela 18. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do derivado ácido aplanoxídico **C metilado [30]** em relação ao ácido aplanoxídico **C [8]**

Triterpenos	[8]	[30]
Carbono		
1	35,7	35,4
2	33,4	33,3
3	215,7	215,0
4	46,0	46,8
5	40,7	40,5
6	22,9	22,6
7	59,1	58,8
8	62,1	61,9
9	167,6	167,3
10	40,8	40,5
11	129,8	129,6
12	199,8	199,7
13	54,5	54,3
14	62,8	62,6
15	202,8	202,7
16	125,2	125,0
17	181,6	181,4
18	30,3	29,9
19	24,9	24,8
20	73,0	72,8
21	29,5	29,3
22	52,9	52,7
23	206,2	206,2
24	47,8	47,8
25	34,4	34,4
26	179,9	176,1
27	16,9	16,9
28	24,3	24,3
29	21,6	21,5
30	28,7	28,6
COOMe	-	176,1
COOMe	-	51,9



Tabela 19. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300MHz) em  $\text{CDCl}_3$  mais relevantes do derivado ácido aplanoxídico **F metilado [31]** em relação ao ácido aplanoxídico **F [18]**

Triterpenos Hidrogênio	[18]	[31]
H-7	4,67d	4,68d
H-11	6,35s	6,35s
Me-18	1,13	1,13
Me-21	2,27	2,27
H22	6,36s	6,06s
Me-27	1,21d	1,21d
COOMe	-	3,69s

Tabela 20. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  do derivado ácido aplanoxídico **F metilado [31]** em relação ao ácido aplanoxídico **F [18]**

Triterpenos	[18]	[31]
Carbono		
1	36,1	35,9
2	33,6	33,5
3	216,0	216,2
4	45,9	45,8
5	40,7	40,5
6	22,7	22,6
7	62,6	62,5
8	57,6	57,5
9	164,8	164,1
10	40,7	40,2
11	129,7	129,7
12	200,5	200,5
13	55,0	54,9
14	58,8	58,9
15	209,5	209,6
16	38,3	38,2
17	42,5	42,7
18	18,1	18,2
19	21,6	21,5
20	158,6	154,1
21	20,4	20,4
22	126,7	126,7
23	198,7	198,5
24	47,7	47,7
25	34,9	34,7
26	180,2	176,4
27	17,0	17,1
28	24,8	24,8
29	21,7	21,5
30	28,4	28,6
COOMe	-	176,4
COOMe	-	51,8

As modificações estruturais promovidas nos triterpenóides isolados dos fungos, foram restritas a metilação e ou acetilação. Como consequência, os sinais para esses grupos funcionais, que foram introduzidos nessas substâncias, são muito similares entre si. Assim, foram selecionados para discussão os derivados **G acetilado [27]**, **G metilado [32]** e **G acetilado-metilado [35]**, cujo resultado dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  estão reunidos na tabelas 22 e sua análise resultou nas seguintes constatações:

1. sinais adicionais para o **OMe**(51,8-51,7) nos compostos metilados, e para o **OAc**(169,7-169,5/21,4) nos derivados acetilados;
2. transformação do **COOH**(180,1-180,7) para **COOMe**(176,5-176,2);
3. deslocamento(+1,8 ppm) do C-15 na troca 15-**OH**(78,2-78,1) para 15-**OAc**(80,0-79,9);
4. na mesma transformação, 15-**OH**/15-**OAc**, foram manifestados os efeitos  $\alpha$ (-3 ppm aproximadamente) e  $\beta$ (+2 ppm aproximadamente) sobre os sinais dos C-16 e C-17, respectivamente;
5. a presença do sinal do grupo acetil na posição 15 altera também o sinal do C-23(208,6-208,0 para 206,9).

Os deslocamentos mencionados acima nos itens de 1 a 4, ocorreram conforme ao esperado para as transformações efetuadas; porém, o deslocamento comentado no item 5 provavelmente ocorreu pela influência no espaço do 15-**OAc**.

Tabela 21 Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos **G acetilado** [27], **G metilado** [32] e **G metilado-acetilado** [35] em relação ao ácido aplanoxídico **G** [19]

Triterpenos	[19]	[27]	[32]	[35]
Hidrogênio				
H-7	4,19d	4,39d	4,17d	4,99d
H-11	6,06s	6,15s	6,11s	6,13s
H-15	4,57d	4,98d	4,81d	4,38d
H-16	5,66d	5,77d	5,66d	5,78d
Me-18	1,40	1,39	1,40	1,40
Me-21	1,45	1,44	1,45	1,44
H <sub>2</sub> -22	2,91s	2,91s	2,92s	2,91s
Me-27	1,20d	1,21d	1,20d	1,21d
O-CO-Me	-	2,10s	-	210s
COOMe	-	-	3,66s	3,66s

Tabela 22. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos **G acetilado** [27], **G metilado** [32] e **G acetilado-metilado** [35] em relação ao ácido aplanoxídico **G** [19]

Triterpenos	[19]	[27]	[32]	[35]
Carbono				
1	35,7	35,7	35,6	35,8
2	33,5	33,4	33,5	33,4
3	216,7	216,3	216,5	216,1
4	45,9	45,8	45,8	45,7
5	40,3	40,1	40,3	40,1
6	22,9	23,1	22,9	23,2
7	62,3	62,1	62,2	62,1
8	63,5	63,0	63,4	63,0
9	167,6	166,7	167,4	166,6
10	40,4	40,4	40,3	40,4
11	129,9	130,2	129,9	130,2
12	203,7	202,9	203,4	202,9
13	50,1	49,6	50,1	49,6
14	64,6	64,9	64,5	64,9
15	78,2	80,0	78,1	79,9
16	127,1	123,1	126,9	123,9
17	157,4	159,5	157,7	159,7
18	31,0	30,0	30,8	29,9
19	24,8	24,7	24,7	24,7
20	72,1	71,7	72,0	71,8
21	28,6	28,5	28,5	28,5
22	53,6	53,6	53,6	53,9
23	208,6	208,5	208,4	206,9
24	48,0	47,6	48,1	47,9
25	34,4	34,4	34,3	34,5
26	180,1	180,7	176,5	176,2
27	16,8	16,8	16,8	16,9
28	23,8	24,1	23,7	24,2
29	21,6	21,6	21,5	21,6
30	26,8	26,5	26,6	26,5
O-CO-Me	-	169,7	-	169,4
O-CO-Me	-	21,2	-	21,4
COOMe	-	-	176,5	176,2
COOMe	-	-	51,8	51,7

Tabela 23. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos **H diacetilado [28]**, **H metilado [33]** e **H diacetilado-metilado [36]** em relação ao ácido aplanoxídico **H [20]**

Triterpenos	[20]	[28]	[33]	[36]
Hidrogênio				
H-3	3,29dd	4,55dd	3,10dd	4,55dd
H-7	4,75d	4,95d	4,78d	4,97d
H-11	5,66d	6,12d	6,09s	6,12s
H-12	4,12d	4,27d	4,14d	4,26d
H-16	5,77	5,76	5,67d	5,76d
Me-18	1,45	1,58	1,57	1,58
Me-21	1,44	1,44	1,45	1,44
H <sub>2</sub> -22	2,93s	2,93s	2,92s	2,92s
Me-27	1,17d	1,21d	1,17d	1,21d
O-CO-Me	-	2,08s	-	2,09s
O-CO-Me	-	2,06s	-	2,06s
COOMe	-	-	3,66s	3,66s

Tabela 24. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  dos derivados ácidos aplanoxídicos aplanoxídicos **H diacetilado [28]**, **H metilado [33]** e **H diacetilado-metilado [36]** em relação ao ácido aplanoxídico **H [20]**

Triterpenos	[20]	[28]	[33]	[36]
Carbono				
1	35,4	35,2	35,4	35,2
2	27,5	26,9	27,5	26,5
3	77,9	79,8	77,9	79,8
4	41,8	41,3	41,4	41,3
5	39,4	39,0	38,9	39,0
6	21,8	21,4	21,5	21,5
7	59,0	54,0	53,7	55,9
8	62,9	62,2	62,4	62,2
9	158,2	168,8	168,7	167,5
10	38,0	36,8	37,8	36,8
11	128,5	128,9	128,6	128,9
12	78,1	79,5	78,1	79,5
13	50,2	49,5	50,1	49,6
14	64,4	65,1	64,7	65,1
15	204,0	203,5	203,8	203,2
16	127,2	128,8	126,9	128,6
17	168,9	167,5	158,3	160,1
18	31,0	30,0	30,9	29,9
19	25,7	25,7	25,7	25,7
20	72,2	71,9	72,1	71,2
21	28,7	28,6	28,7	28,7
22	53,9	49,5	53,7	48,0
23	208,7	207,0	208,2	206,9
24	48,2	47,7	48,3	47,9
25	34,5	34,5	34,4	34,5
26	179,6	180,4	176,6	176,1
27	16,9	16,9	16,9	17,0
28	24,6	24,8	24,5	24,9
29	22,2	22,2	22,1	22,2
30	27,0	29,6	26,7	26,5
O-CO-Me	-	170,7	-	170,7
O-CO-Me	-	21,4	-	21,2
O-CO-Me	-	169,8	-	169,6
O-CO-Me	-	21,2	-	21,2
COOMe	-		176,6	176,1
COOMe	-		51,9	51,8

#### 5.4. Atividade antimicrobiana

As substâncias isoladas de *Ganoderma*, bem como os derivados tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada através do método de microdiluição. As espécies bacterianas testadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e as espécies fúngicas foram *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os resultados estão apresentados nas tabelas 25 e 26.

Os esteróis 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol [12], 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol [13], 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol [14] e o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi [15] foram ativos para as duas espécies bacterianas testadas. Entretanto, o composto [14] apresentou uma sensibilidade duas vezes maior tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* em relação aos outros três esteróis. Os compostos acetilados [24] e [25] apresentaram diminuição da atividade antibacteriana, e como conseqüência, foram inativos na maior concentração testada (tab.25).

A atividade antimicrobiana dos triterpenos foi semelhante àquela encontrada para os esteróis. Os ácidos aplanoxídicos **A** [6], **C** [8] e **G** [19] foram ativos contra *E. coli* na concentração de 2,0 mg/mL e somente o ácido aplanoxídico **F** [18] não inibiu esta espécie. Entretanto, o **D metilado** [16] foi o composto mais ativo em relação as duas espécies bacterianas avaliadas. Ao mesmo tempo que certos triterpenóides compõe a parede celular fúngica, podem ainda interagir com diferentes espécies desses organismos, atuando como desorganizadores de membranas celulares, pela combinação com compostos lipofílicos presentes nas mesmas (COWAN, 1999).



Tabela 25. Atividade antibacteriana das substâncias isoladas de *Ganoderma* spp. e de seus derivados

Bactérias	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Substâncias (origem)	CIM <sup>a</sup>	CIM
A[6] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
C[8] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	2,0	1,0
[12] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[13] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[14] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	1,0	1,0
[15] <i>G. australe</i>	2,0	2,0
D Metil[16] <i>G. australe</i>	1,0	1,0
F[18] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	>2,0	>2,0
G[19] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
H[20] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	>2,0	1,0
NEW49[21] <i>G. australe</i>	>2,0	1,0
EFS31[23] <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[24]	>2,0	>2,0
[25]	>2,0	>2,0
[26] A Acetil	2,0	2,0
27] G Acetil	2,0	2,0
[28] H Diacetil	2,0	2,0
[29] A Metil	2,0	2,0
[30] C Metil	2,0	2,0
[31] F Metil	2,0	2,0
[32] G Metil	2,0	1,0
[33] H Metil	2,0	2,0
[34] A Acetil-Metil	2,0	1,0
[35] G Acetil -Metil	2,0	>2,0
[36] H Diacetil-Metil	2,0	2,0
Tetraciclina	0,002	0,001

<sup>a</sup>Concentração Inibitória Mínima em mg/mL

A atividade antimicrobiana de terpenóides e derivados, também tem sido alvo de investigação em outros trabalhos científicos. Mendonza e colaboradores (1997), descreveram que quando essas moléculas têm a sua hidrofobicidade aumentada pela inclusão do grupo metil, ocorre diminuição da atividade antimicrobiana. No presente estudo, não foi observada uma correlação uniforme entre as modificações estruturais promovidas e variação da atividade biológica, tanto para os ensaios com bactérias quanto com os fungos. Em alguns casos, as modificações não interferiram na atividade. Para o derivado **A metilado [29]** houve manutenção da atividade antibacteriana em relação ao original **A [6]**, Em outros, ocorreu incremento da atividade antibacteriana do derivado **G metilado [32]** ou diminuição da atividade do **H metilado [33]** ou perda da atividade dos acetilados **[24]** e **[25]**, tabelas 25 e 26 (p. 96 e 99). É importante salientar que as variações que ocorreram na atividade dos compostos, na grande maioria dos casos, corresponderam a apenas uma diluição. Em estudos microbiológicos, diferenças de uma diluição para a determinação da concentração mínima inibitória e mínima bactericida são consideradas normais, mesmo em repetições de experimentos, ou seja, uso de uma mesma substância com um único microrganismo (WOODS & WASHINGTON, 1995).

A atividade antibacteriana das substâncias inéditas, seguiu o mesmo padrão que a descrita para as substâncias conhecidas. A espécie *S. aureus* foi sensível tanto ao **ácido 15-O-acetil elfvínico H [21]** (1,0 mg/mL) quanto para o **ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvínico H [23]** (2,0 mg/mL), enquanto que *E. coli* foi inibida apenas pelo **[23]** (tab.25).

Com relação a atividade antifúngica, os compostos mais ativos foram o **F [18]** e o **H diacetilado [28]** contra *C. albicans* e *T. mentagrophytes*. Para os esteróis os compostos 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **[14]** e o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi **[15]** foram ativos contra as duas espécies fúngicas (tab. 26). Quanto as substâncias inéditas, ambas apresentaram atividade contra as duas espécies testadas. Entretanto, quando o ácido 15-O-acetil elfvínico H **[21]**, foi avaliado contra o *T. mentagrophytes* foi observado uma sensibilidade duas vezes maior deste fungo com relação ao o ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvínico H **[23]** (tab.26).

Tabela 26. Atividade antifúngica das substâncias isolados de *Ganoderma* spp. e de seus derivados

Fungos	C. albicans	T. mentagrophytes
Substâncias (origem)	CIM <sup>a</sup>	CIM
A [6] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	>2,0	0,5
C [8] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[12] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	>2,0	>2,0
[13] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	>2,0	>2,0
[14] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[15] <i>G. australe</i>	2,0	2,0
D Metil[16] <i>G. australe</i>	1,0	1,25
F [18] <i>G. annulare</i> e <i>G. australe</i>	1,0	1,0
G [19] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	1,0	>2,0
H [20] <i>G. annulare</i> , <i>G. applanatum</i> e <i>G. australe</i>	2,0	1,0
NEW49 [21] <i>G. australe</i>	2,0	1,0
EFS31 [23] <i>G. australe</i>	2,0	2,0
[24]	>2,0	>2,0
[25]	>2,0	>2,0
[26] A Acetil	2,0	2,0
27] G Acetil	2,0	2,0
[28] H Diacetil	1,0	1,0
[29] A Metil	2,0	>2,0
[30] C Metil	2,0	2,0
[31] F Metil	1,0	1,25
[32] G Metil	2,0	2,0
[33] H Metil	>2,0	1,25
[34] A Acetil-Metil	1,0	1,5
[35] G Acetil -Metil	>2,0	1,25
[36] H Diacetil-Metil	>2,0	1,0
Fluconazol	NT <sup>b</sup>	0,0006

<sup>a</sup> Concentração Inibitória Mínima em mg/mL.

<sup>b</sup> Não testado

## 6. CONCLUSÕES

1. Das três espécies de fungo estudadas: *Ganoderma annulare*, *G. applanatum* e *G. australe*, foram isolados dez triterpenóides já conhecidos. Entre esses, quatro esteróis: 5 $\alpha$ -ergost-7-en-3 $\beta$ -ol [12]; 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ -ol [13]; 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ -ol [14] e o 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3-oxi [15] e seis triterpenos: ácidos aplanoxídicos A [6], C [8], D metilado [16], F [18], G [19] e H [20].
2. Do basidioma de *G. australe* foram isoladas duas substâncias inéditas: ácido 15-O-acetil elfvínico H [21] e o ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvínico H [23], caracterizados pela presença do anel A aberto. Essa classe de compostos (seco) é descrita pela primeira vez no gênero *Ganoderma*.
3. Todos os triterpenóides isolados são do tipo lanostano. Os esteróis obtidos são comuns a outros gêneros de Basidiomycetes, porém, os triterpenos são exclusivos do gênero *Ganoderma*.
4. Os esteróis e os triterpenos inibiram o crescimento bacteriano em concentração semelhante. Entretanto, os triterpenos apresentaram atividade contra as estirpes fúngicas em concentração inferior a dos esteróis.

5. A atividade do ácido 15-O-acetil elfvíntrico H **[21]** foi restrita a estirpe bacteriana Gram-positiva, porém, foi ativa contra as duas espécies fúngicas.
  
6. O composto ácido 15-O-acetil-3-mono metil éster elfvíntrico H **[23]** exibiu atividade tanto para espécies fúngicas quanto para as bacterianas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J. E. & GILBERTSON, R. L. Wood decay caused by *Ganoderma* species in the *G. lucidum* complex. Proceedings of Contributed Symposium 59 A, B 5<sup>th</sup> **International Mycological Congress** (ed. P. K. Buchanan, R. S. Hseu & J. M. Moncalvo), 1994.

ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W. & BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996, 868p.

ARISAWA, M., FUJITA, A., SAGA, M., FUKUMURA, H., HAYASHI, T., SHIMIZU, M. & MORITA, N. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. **J. Nat. Prod.**, v.49 p.621-625, 1986.

ARORA, D. **Mushrooms demystified**. Tem Speed Press, 2 ed., 1986, 956p.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: Editora da UFG, 1998, 490p.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos**. São Paulo: Artmed, 2001, 243p.

BOH, B., HODZAR, D., DOLNICAR, D., BEROVIC, M. & POHLEVEN, F. Isolation and qualification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. **Food technol. Biotechnol.**, v.38 n.1 p.11-18, 2000.

BOSE, S. R. Campestrin, the antibiotic of *Psalliota campestris*. **Nature**, v.175 p. 468, 1955.

BURDYUKOVA, L. I. & GOROVOJ, L. F. Fungal chitin in medicine: Prospects for its application. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.3 p. 126-127, 2001.

CECHINEL-FILHO, V. **Modificação da estrutura molecular da xantoxilina e estudo da atividade farmacológica dos derivados**. 1991. 84f. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1991.

CHAIRUL, S. M., CHAIRUL, T. & HAYASHI, Y. Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma applanatum*. **Phytochemistry**, v.35 n.5 p.1305-1308, 1994.

CHAIRUL, T., TOKUYAMA, Y., HAYASHI, M., NISHIZAWA, H. T., CHAIRUL, S. M. & HAYASHY, Y. Applanoxidic acids A, B, C and D, biologically active tetracyclic triterpenes from *Ganoderma applanatum*. **Phytochemistry**, v.30 n.12 p. 4105-4109, 1991.



CHANG, S. T. & BUSWELL, J. A. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1p.139-146, 1999.

CHANG, S. T. & BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.473-476, 1996.

CHEN, R-Y. & YU, D-Q. Studies on the triterpenoid constituents of the spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). **Internatinal journal of Medicinal Mushrooms**, v.1 p.147-152, 1999.

CHIARA, G.; MAEDA, Y.Y.; HAMURO, J. current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin. **Int. J. Tissue React.**, v.4 p. 207-225, 1982.

CHYR, R. & SHIAO, J. D. Liquid chromatographic characterization of the triterpenoids patterns in *Ganoderma lucidum* and related species. **J. Chromatogr.** v.542 p.327-336, 1991.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Rewiew**, v.12 p.564-582, 1999.

CRUZ, E.L. The biosynthesis of the new tremulane sesquiterpenes isolated from *Phellinus tremulae*. **Can. J. Chem.**, V .75 P.834-839, 1997.

DELLA GRECA, M., MANGONI, L., OLINARO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. 5 $\beta$ ,8 $\beta$ -epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol from *Typha latifolia* **Gazz. Chim. Ital.**, v.120 p.391-392, 1990.

DELLE MONACHE, F. Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.101-146.

DONNELLY, D.M.X.; HUTCHINSON, R.M. Armillane, a saturated sesquiterpene ester from *Armillaria mellea*. **Phytochemistry**, v.29 p.179-182, 1990.

ELANDER, R. P. & LOWE, D. A. Fungal biotechnology: an overview. In: ARORA, D. K., ELANDER, R. R. & MUKERJI, K. G. **Handbook of applied mycology**. Marcel Dekker, inc., New York: 1992, v. 4, 1114p. p. 1-34.

FURUSAWA, E., CHOU, C. S., FURUSAWA, S. HIRAZUMI, A. & DANG, Y. Antitumor activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in synergenic mice. **Phytotherapy Research**, v.6 p.300-304, 1992.

GERBER, A. L., SMÂNIA, A. Jr., DELLE MONACHE, F., BIACHI, N.Jr. & SMANIA, E.F.A. Triterpenes and sterols from *Ganoderma australe* (Fr.) Pat.

(Aphyllorphomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.2 p.303-311, 2000.

GONZALEZ, A.G.; BARRERA, J.B.; PEREZ, M.J.M.; MARANTE, F.J.T. Two new triterpene acids from *Phellinus pomaceus*. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v.1 p.551-554, 1986.

GOTTLIEB & WRIGHT. Taxonomy of *Ganoderma* from Southern South America: Subgenus *Eufvingia*. **Mycol. Res.**, v.103 n.10 p.1289-1298, 1999.

HA, C-L. The inhibitory effect of the Chinese herb *Ganoderma lucidum* mycelium on gut immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **Nutrition Research**, v.23 n.5 p.691-701, 2003.

HALMENSCHLAGER, M. A. and LOUGUERCIO-LEITE, C. Espécies de *Ganoderma* Karst. (Ganodermataceae) em Santa Catarina. **Simpósio de Botânica 4: Simposio Latinoamericano de Micologia**. L. Abstracts, Havana, p.80, 1993.

HAWKSWORTH, D.L. Mushrooms: The extent of the unexplored potential. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.3 p.82, 2001.

HAWKSWORTH, D.L. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi**. 8 ed., Cambridge: Cab International, University Press, 1995, 616p.

HERRERA, T. & ULLOA, M. **El reino de los hongos**. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990, 520 p.

HUIMEI, L.; EIKAI, K.; TOSHIHIRO, U OSAMU, K.; HIROMITSU, W. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxymethane-induction of colon cancers in male F344 rats. **Oncology reports**, v.10 n.2 p.375-379, 2003.

INGROFF-ESPINEL, A.; DAWSON, K.; PFALLER, M.; ANAISSIE, E., BRESLIN, B.; DIXSON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETTER, J.; RINALDI, M.; WALSH, T. Comparative and collaborative evolution of standardization of antifungal susceptibility for filamentous fungi. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**, v.39 p.314-319, 1997.

JONG, S. C., & BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Appl. Microbiol.**, v.37 .p.101-134, 1992.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M.; PAI, S.H. Immunomodulatory substances of fungal origin. **J. Immunol. Immunopharmacol.**, v.9 n.3 p.115-122, 1991.

KANZAKI, T. & FUJISAWA, Y. Recent progress in cephalosporin fermentation. **J. Takeda Res. Lab.**, v.34 .p.324-349, 1975.

KELLER, A-C., KELLER, J., MAILLARD, P. M. & HOSTETTMANN. A lanostane-type steroid from the fungus *Ganoderma carnosum*. **Phytochemistry**, v.44 n.5 p.963-965, 1997.

KIM, H. W. & KIM, B. K. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphylophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1 n.2 p.121-138, 1999.

KIM, D. H., BAE, E. A., JANG, I. S. & HAN, M. J. Anti-*Helicobacter pylori* activity of mushrooms. **Arch. Pharm. Res.**, v.19 n.6 p.447-449, 1996.

KIM, B. K., KIM, H. W. & CHOI, E. C. Anti-HIV activities of *Ganoderma lucidum*. In: BUCHANAN, P. K., HSEU, R. S. & MONCALVO, J. M. (ed.) **Proceedings of Contributed Symposium 59 A, B 5<sup>th</sup> International Mycological Congress**. 1994.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., DAVID, J. C. & SALPERS, J. A. **Dictionary of the fungi**. 9 ed. Surrey: Cabi International, 2001, 655p.

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* Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. **Chem. Pharm. Bull.**, v.33 p.1367-1374, 1985.

KOMODA, Y., SHIMIZU, M., SONODA, Y. & SATO, Y. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. **Chem. Pharm. Bull.**, v.37 p.531-533, 1989.

LAKSHMI, B., AJITH, T. A., SHEENA, N., GUNAPALAN, N., JANARDHANAN, K. K. Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, (Suppl.) p.85-97, 2003.

LANCINI, G. and LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and others bioactive microbial metabolites**. London: Plenum Press, 1993, 236p.

LEE, J.H.; CHO, S.M.; KIM, H.M.; HONG, N.D.; YOO, I.D. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.6 p.52-55, 1996.

LOGUERCIO-LEITE, C., GROPOSO, C., DRESCHER-SANTOS, E. R. Ganodermataceae (Basidiomycetes) em Santa Catarina. **54 Congresso Nacional de Botânica**. Resumo, Belém do Pará, RO268-2, 2003.

LOURENCO, A.; LOBO, A.M.; RODRIGUEZ, B.; JIMENO, M.L. Ceramides from the fungus *Phellinus*. **Phytochemistry**, v.43 p.617-620, 1996.

MA, J., YE, Q., HUA, Y., ZHANG, D., COOPER, R., CHANG, M. N., CHANG, J. Y., & SUN, H. H. New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*. **J. Nat. Prod.**, v.65 p.72-75, 2002.

MARQUES, C. J. S. **Atividade antiparasitária e antiviral de *Pycnoporus sanguineus***. 2001. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MENDONZA, L., WILKENS, M. & URZÚA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.58 p.85-88, 1997.

MIN, B-S., GAO,J-J., HATTORI, M., LEE, H.K., KIM, Y. H. Anticomplement Activity of terpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. **Planta Medica**, v.67 p.811-814, 2001.

MIN, B-S., GAO,J-J., NAKAMURA, N., & HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v.48 n.7 p.1026-11033, 2000.

MIZUNO, T. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr.(Mitosporic Fungi) chinese caterpillar fungi,

"Tochukaso" (Review). **Internatinal journal of Medicinal Mushrooms**, v.1 p.251-261, 1999.

MIZUNO, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Food Ingred. J.** Japan, v.167 p.69-85, 1996.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev. Intern.*, v.11 n.1 p.7-21, 1995.

MONCALVO, J. M. & RYVARDEN, L. **A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk.** Oslo: Fungiflora, 1997, 114p.

MOTHANA, R. A. A.; AWADH ALI, N. A.; JANSEN, R.; WEGNER, U.; MENDEL, R.; LINDEQUIST, U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. **Fitoterapia**, v.74 p.1-2, 2003.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry.** New York: Oxford University Press, 1995, 336p.

PHYLLIPS, R. **Mushrooms.** Boston: Little, Brown and Company, 1991, 319p.

PIRAINO, F. & BRANDT, C. R. Isolation and partial characterization of an antiviral RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*, **Antiviral Reserch**, v.43 p.67-68,1999.



ROSSMAN, A. Y., TULLOSS, R. E., O'DELL, T. E., THORN, R. G. **Protocols for an all taxa biodiversity inventory of fungi in Costa Rican conservation area.** North Carolina: Parkway Publishers Inc., 1998, 195p.

SCHLESSINGER, D. & EISENSTEIN, B. I. Bases biológicas da ação antibacteriana In: SCHAECHTER, M., ENGLEBERG, N. C., EISENSTEIN, B. I., MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.46-54.

SHWU-BIN, L.; CHYI-HANN, L.; SHIUH-SHENG, L.; LOU-SING, K. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. **Life Sciences**, v.72 n.21 p.2381-2390, 2003.

SHIUH-SHENG, L.; PO-LEI, L.; CHIEH-FU, C.; SHENG-YUAN, W.; KUANG-YAO, C. Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.5 n.1 p. 1-16, 2003.

SILVER, L. L. & BOSTIAN, K. A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37 (Suppl. 3) p.377-383, 1993.

SMÂNIA, A. JR., MARQUES, C. J. S., SMÂNIA, E. F. A., ZANETTI, C. R., CAROBREZ, S. G., TRAMONTE, R. & LOGUERCIO-LEITE, C. Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytother. Res.** v.17 p.1069-1072, 2003.

SMÂNIA, A. JR., DELLE MONACHE, F., SMÂNIA, E. F. A., & CUNEO, R. S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllophoromycetidae) fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1 p.325-330, 1999.

SMÂNIA, E. F. A., SMÂNIA, A. JR., LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Rev. Microbiol.**, v.29 p.317- 320, 1998.

STAMENTS, P. & YAO, C.D.W. **MycoMedicinals**: Informational booklet on medicinal mushrooms. Usa: MycoMedia, 1998, 46p.

SU, C-H., SUN, C-S., JUAN, S-W., HU, C-H., KE, W-T., & SHEU, M-T. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. **Biomaterials**, v.18 p.1169-1174, 1997.

TATSUTA, K.; NIWATA, Y.; UMEZANA, K.; TOSHIMA, K.; NAKATA, M.

Enantiospecific synthesis and biological evaluation of 1.6-epi-cyclophellitol. **J. Antibiotics**, v.44 p.456-458, 1991.

TEUNISSEN, P.J.M.; SWARTS, H.J.; FIELD, J.A. The production of drosophilin a (tetrachloro-4-methoxyphenol) and drosophilin a methyl ether (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by ligninolytic Basidiomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.47 p.695-700, 1997.

TOMODA, M. GONDA, R. KASAHARA, Y. and HIKINO, H. Antidiabetes drugs. Glican structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies **Phytochemistry**, v.25 p.2817-2820, 1986.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE C. L. **Microbiology**. 6 ed. California: Addison wesley Lngman, 1997. 832p.

WANG, G., ZHANG, J., MIZUNO, T., ZHUANG, C., ITO, H., MAYUZUMI, H., & LI, J. Antitumor active polysaccharides from the chinese mushroom songshan lingzhi, yhe fruit body of *Ganoderma tsugae*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v 57 p.894-900, 1993.

WANG, C. N., CHEN, J. C., SHIAO, M. S. & WANG, C. T. The inhibition of human platelet function by ganodermic acid S. **Biochem. J.**, v.277 p.189-197, 1991.

WASSER, S. P., SOKOLOV, D., NEVO, E., RESHETNIKOV, S., & TIMOR-TISMENETSKY, M. Dietary supplements from medicinal mushrooms: How we are going to ensure their quality and safety. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.3 p.94, 2001.

WASSER, S. P. & WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1 p.31-62, 1999.

WOODS, G. L. & WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. & YOLKEN, R. H. (ed.). **Manual of clinical microbiology**. 6 ed. Washington: American society for microbiology, 1995. p. 1327-1341.

WU, T-S., SHI, L-SHIAN & KUO, S-C. Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes. **J. Nat. Prod.**, v.64 p.1121-1122, 2001.

YOSHIKAWA, K., NISHIMURA, N., BANDO, S., ARIHARA, MATSUMURA, E.,  
KATAYAMA, S. New lanostanoids, Elfvingic acids A-H, from the body of  
*Elfvingia applanata*. **J. Nat. Prod.**, v.65 p.548-552, 2002.

ZEISEL, S. H. Regulation of nutraceuticals. **Science** v.285 p.1853-1855, 1999.

## 9. ANEXOS

## **ESTERÓIS**

## TRITERPENOS



## **DERIVADOS DOS ESTERÓIS**

## **DERIVADOS DOS TRITERPENOS**