

MARISA APARECIDA DE LIMA



**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BASIDIOMICETOS
ISOLADOS NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre do Programa de
Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos.
Área de Concentração: Saúde Animal e
Humana. Setor de Tecnologia da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, por estar sempre comigo e por continuar colocando em meu caminho, pessoas boas e pacientes.

A toda minha família pela torcida e apoio incondicional mesmo na distância.

Ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá pela orientação, pelo entusiasmo a cada nova descoberta e pela dedicação de sempre.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação, por todas as oportunidades e votos de confiança ao longo desses dois anos.

Aos professores Dr^a Maria Eugênia Duarte Nosedá e Dr. Alan Guilherme Gonçalves por gentilmente aceitarem participar desta banca e fazer as devidas correções.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos pelos momentos de alegria, pelo companheirismo e toda ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Sascha Habu e Marcelo Fernandes pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos, análise de resultados, discussões e idéias. Por tornarem o trabalho mais prazeroso, com momentos de brincadeira e descontração.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Carboidratos por toda a ajuda, em especial ao Luciano Henrique pela ajuda na etapa de caracterização.

A todos os professores do Laboratório de Bioprocessos que colaboraram para realização deste trabalho, pela orientação, pelas sugestões, críticas, idéias, ensinamentos, correções, e principalmente, pelo respeito e amizade.

Ao professor Luis Cláudio Fernandes pela contribuição e disposição do Laboratório de Fisiologia para execução dos experimentos *in vitro*.

A professora Dr^a. Líbera Maria Dalla Costa, que gentilmente, cedeu as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

Aos estagiários de Iniciação Científica do Laboratório de Cultivo Celular (LCC) e Ricardo Alves (Bob) por toda a ajuda na etapa final do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná pela estrutura e suporte financeiro.

Ao SENAI-PR e Rede Paranaense de Metrologia e Ensaio pelo apoio financeiro.

A CAPES pela bolsa de Mestrado.

A minha irmã, Maina, por todo carinho e companheirismo nas horas de estresse, de carência e saudade de casa.

Aos amigos “ventanienses”, Diego, Carlos Eduardo, Marco Aurélio e Sr. Luís, pela imensa ajuda durante os primeiros meses em Curitiba, pela amizade e convivência.

Pelas confraternizações na tentativa de matar as saudades da nossa querida “Ventania”.

Ao meu namorado, Jefferson, pelo companheirismo e ajuda dentro e fora do laboratório.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

O meu mais sincero “Obrigada”!

*“A todas as pessoas
que colaboraram para
realização deste trabalho, DEDICO!”*

*“Sou um otimista.
Não parece adiantar muito
ser outra coisa qualquer.”
(Sir Winston Churchill)*

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1: Relação filogenética entre os fungos verdadeiros..... | 6 |
| Figura 2: Estruturas apresentadas pelos basidiomicetos durante o seu ciclo de vida..... | 7 |
| Figura 3: Representação das etapas do ciclo de vida de um Basidiomiceto..... | 8 |
| Figura 4: Representação da placa visualizada por Fleming em 1928, quando descobriu a penicilina. | 14 |
| Figura 5: Estrutura do antibiótico Pleuromutilina, obtido do basidiomiceto <i>P. sanguineos</i> , e seus derivados. | 14 |
| Figura 6: Antibióticos isolados do basidiomiceto <i>Ganoderma pfeifferi</i> eficazes contra MRSA..... | 15 |
| Figura 7: Estrutura molecular do polissacarídeo lentinana isolado do fungo <i>Lentinus edodes</i> | 17 |
| Figura 8: Estruturas do B-caroteno e de alguns tocoferóis, importantes agentes antioxidantes..... | 20 |
| Figura 9: Cultivo submerso dos fungos <i>Psilocibe cubensis</i> , <i>Lepista sordida</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> , <i>Picnoporus sanguineos</i> , <i>Perenniporia martiusii</i> , <i>Ganoderma stiptatum</i> , <i>Agaricus silvaticus</i> , <i>Oudemansiella canarii</i> e Soccol 3, respectivamente. ... | 32 |
| Figura 10: Porcentagem de inibição das células tumorais de Ehrlich frente a diferentes concentrações dos EPS das 12 espécies de basidiomicetos..... | 37 |
| Figura 11: Porcentagem de inibição das células tumorais de Sarcoma 180 frente a diferentes concentrações de EPS das 12 espécies de basidiomicetos..... | 39 |
| Figura 12: Percetagem de citotoxicidade dos EPS das 12 cepas de basidiomicetos sobre macrófagos peritoneais de camundongos..... | 43 |
| Figura 13: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método do conjugado B-caroteno - Ácido linoléico. | 51 |
| Figura 14: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método do poder redutor. | 53 |
| Figura 15: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólcos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método de inibição de radicais livres - DPPH..... | 55 |
| Figura 16: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pela capacidade de inativação de ânions superóxido, expressa em relação à atividade do controle positivo BHA (0,1 mg/mL)..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 17: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pela capacidade de inibição da peroxidação lipídica. | 58 |
| Figura 18: Basidiomiceto <i>Perenniporia martiusii</i> (Berk) Ryvardeen..... | 61 |
| Figura 19: Antibiótico Pereniporin A, terpeno produzido pelo fungo <i>Perenniporia medullaepanis</i> | 62 |
| Figura 20: Fracionamento do extrato DCM por cromatografia em coluna, guida pela coloração e iluminação com UV. | 69 |
| Figura 21: Atividade antimicrobiana da cepa de <i>P. martiusii</i> evidenciada pelos testes de difusão em ágar, contra MRSA e <i>S. aureus</i> 65..... | 73 |
| Figura 22: Teste de macrodiluição em placa. | 76 |
| Figura 23: Parâmetros cinéticos avaliados durante o cultivo de <i>P. martiusii</i> em biorreator. | 78 |
| Figura 24: Cultivo de <i>P. martiusii</i> com 96 horas (micélio marrom claro) e 120 horas (micélio preto) de fermentação..... | 78 |
| Figura 25: Avaliação da eficiência das extrações sucessivas com diclorometano, com relação a atividade antimicrobiana contra a cepa MRSA mecIII. | 81 |
| Figura 26: Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas na CC, pelo método de difusão em ágar..... | 82 |
| Figura 27: Perfil cromatográfico do extrato DCM, Fr 2 e Fr 10, revelados por UV 360 nm. | 82 |
| Figura 28: Avaliação da atividade antimicrobiana das sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II, contra a cepa de MRSA mecIII. | 83 |
| Figura 29: Espectros de ¹³ C-RMN do extrato DCM; da Fr 2 e Fr 10, respectivamente. | 85 |
| Figura 30: Espectros de ¹³ C-RMN do extrato DCM e Fr 2 e DEPT-Fr 2. | 87 |
| Figura 31: Espectros de ¹³ C-RMN da Fr 2, Fr 10.I e Fr 10.II, respectivamente. | 88 |
| Figura 32: Espectros de ¹ H-RMN das sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II..... | 89 |
| Figura 33: Integração do espectro ¹ H-RMN da sub-fração Fr 10.I..... | 90 |
| Figura 34: Integração do espectro ¹ H-RMN da sub-fração Fr 10.II..... | 90 |
| Figura 35: Comparação entre o espectro de RMN de ¹³ C da Fr2 e um espectro de RMN ¹³ C típico de ácidos graxos. | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 1: Compostos bioativos isolados de Basidiomicetos..... | 11 |
| Tabela 2: Polissacarídeos com propriedades antitumorais isolados de cogumelos..... | 19 |
| Tabela 3: Basidiomicetos utilizados neste trabalho, classificação, origem e substrato do qual foram isolados..... | 25 |
| Tabela 4: Composição do meio básico utilizado na fermentação..... | 26 |
| Tabela 5: Concentração final de exopolissacarídeos obtida em cada um dos cultivos das 12 cepas de basidiomicetos..... | 34 |
| Tabela 6: Composição monossacarídica dos exopolissacarídeos produzidos pelas 12 espécies de basidiomicetos utilizados neste trabalho..... | 35 |
| Tabela 7: Atividade antitumoral <i>in vitro</i> dos EPS das 12 espécies de basidiomicetos contra células tumorais de Sarcoma 180 e Ehrlich..... | 39 |
| Tabela 8: Determinação dos constituintes fenólicos totais presentes nos extratos aquosos e hidroalcoólicos..... | 59 |
| Tabela 9: Relação de microrganismos utilizados durante a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de basidiomicetos..... | 65 |
| Tabela 10: Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências utilizadas para avaliação do perfil fitoquímico do extrato bruto e das frações obtidos do fungo <i>P. martiusii</i> (Berk)..... | 70 |
| Tabela 11: Avaliação da atividade antimicrobiana do filtrado da fermentação das 12 cepas de basidiomicetos e dos extratos hidroalcoólicos obtidos do micélio, por meio do testes de difusão em ágar (antibiograma)..... | 74 |
| Tabela 12: Resultados dos teste de macrodiluição para determinação da concentração inibitória mínima do filtrado e do extrato hidroalcoólico..... | 77 |
| Tabela 13: Resultados de eficiência das extrações consecutivas da biomassa de <i>P. martiusii</i> com diclorometano..... | 80 |
| Tabela 14: Perfil fitoquímico do extrato DCM, Fr 2 e Fr 10, analisado por CCD..... | 84 |

LISTA DE ABREVIações

Ara – Arabinose

BDA - Ágar Batata Dextrose

BHI - Infusão de Cérebro e Coração

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado

CG-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH - α,α -diphenyl- β -picrylhydrazil

EPS - Exopolissacarídeos

Fuc – Fucose

Gal - Galactose

Glc - Glucose

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Man - Manose

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MRSA – *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NaBH₄ – Borohidreto de Sódio

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NBT - Nitroblue Tetrazolium

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

PBS – Tampão Fosfato

PPS - Endopolissacarídeos

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TFA – Ácido Trifluoroacético

TSA - Trypticase Soy Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UV – Ultra Violeta

Xil – Xilose

RESUMO

Há anos, os cogumelos têm sido considerados devido ao seu valor medicinal. Desde cedo, os cientistas têm dado maior importância às suas propriedades farmacológicas que ao seu papel como alimento básico. Sabe-se que das 14 a 15 mil espécies de cogumelos no mundo, 700 apresentam propriedades medicinais, entretanto, estima-se que esse número chegue a 1800 espécies. O que faz com que os cogumelos representem uma vasta fonte para obtenção de novos medicamentos. Muitos compostos bioativos, apresentando as mais diversas atividades, como por exemplo, antibióticos, antitumorais, antioxidantes, entre outras, têm sido isolados dos cogumelos. No presente trabalho, doze espécies de basidiomicetos isolados em diferentes regiões do Paraná foram cultivadas por fermentação submersa e avaliadas quanto às suas propriedades antitumorais, antioxidantes e antimicrobianas. Exopolissacarídeos obtidos das 12 cepas por precipitação com etanol foram parcialmente caracterizados e avaliados quanto à sua atividade antitumoral *in vitro* contra células de tumor de Ehrlich e Sarcoma 180, e sua citotoxicidade, também *in vitro*, contra macrófagos peritoniais. Foram observados elevados valores de inibição das células tumorais e baixa citotoxicidade contra macrófagos, indicando uma alta seletividade entre as células aderidas e suspensas. O filtrado e o extrato hidroalcoólico, obtido a partir do micélio cultivado, também foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante por diferentes metodologias. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram maior atividade antioxidante em todas as metodologias utilizadas, o que pode ser explicado por uma maior concentração de compostos fenólicos encontrados nesses extratos, quando comparados ao filtrado do mesmo cultivo. Os extratos hidroalcoólicos e filtrados foram testados, também, frente a diferentes microrganismos patogênicos por meio do teste de difusão em ágar. Por ter apresentado uma importante atividade antimicrobiana, com um amplo espectro de ação, agindo inclusive contra cepas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes, a espécie *Perenniporia martiusii* foi selecionada e teve o seu extrato hidroalcoólico fracionado por cromatografia líquida em coluna e em camada delgada de sílica. O extrato bruto e as frações foram parcialmente caracterizados por meio de análise fitoquímica e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a fim de identificar os compostos bioativos responsáveis pela sua atividade, e que apresentam um vasto potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Mushrooms have for many years been used due to their high medicinal value. Early, the scientists have granted major importance to their pharmacologic properties than as basic food. It is known that there are 14 to 15 thousands of mushrooms species in the world, with 700 of them presenting medicinal properties, but this number could arrive to 1800 species. Therefore, mushrooms are a wide source to obtainment of new medicines. Several bioactive compounds presenting different biological activities such as antibiotics, anticancer and antioxidant in between others have been isolated from mushrooms. In the present study, 12 species of basidiomycetes from Parana state were cultivated using submerged fermentation and evaluated for their anticancer, antioxidant and antimicrobial activities. Exopolysaccharides obtained from the 12 strains by ethanol precipitation were partially characterized and their anticancer activity *in vitro* were evaluated against Ehrlich and Sarcoma 180 tumor cells, and their cytotoxicity against peritoneal macrophages. The results showed high values of tumor cells inhibition and low values of cytotoxicity, indicating a high selectivity among adhered and suspended cells. The filtrates and hydroalcoholic extracts from cultivated mycelium were evaluated as for their antioxidant activities by different methods. The hydroalcoholic extracts showed higher antioxidant activity in all methodologies used; this can be explained by the major concentration of phenolic compounds found in this extracts when compared to filtrates. The hydroalcoholic extracts and filtrates were evaluated for their antimicrobial activity against several pathogens by the agar diffusion test. The mushroom *Perenniporia martiusii* was selected due to its strong antimicrobial activity, presenting a wide action spectrum, including methicillin-resistant *Staphyococcus aureus*. *P. martiusii* hydroalcoholic extract and its fractions obtained by column and thin layer liquid chromatography using silica were partially characterized by phytochemical analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. This kind of study warrants major knowledge about Brazilian mushrooms biodiversity and encourages new researches about this rich source of bioactive metabolites presenting a wide biotechnological potential.

SUMÁRIO

| | PÁG. |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| LISTA DE TABELAS..... | iii |
| LISTA DE ABREVIACÕES..... | iv |
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 4 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 5 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 5 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 3.1 BASIDIOMICETOS..... | 5 |
| 3.1.1 Características Gerais..... | 5 |
| 3.1.2 Ciclo Reprodutivo..... | 6 |
| 3.1.3 Cultivo de Basidiomicetos por Fermentação Submersa..... | 9 |
| 3.1.4 Potencial Biotecnológico..... | 10 |
| 3.1.4.1 Produção de Compostos Antimicrobianos..... | 12 |
| 3.1.4.2 Produção de Compostos Antitumorais e Imunoestimulantes..... | 16 |
| 3.1.4.3 Produção de Compostos Antioxidantes..... | 19 |
| CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BASIDIOMICETOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 24 |
| 2.1 MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO DAS CEPAS..... | 24 |
| 2.2 PREPARO DO INÓCULO..... | 25 |
| 2.3 CULTIVO..... | 26 |
| 2.4 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS | 27 |
| 2.5.1 Determinação de Açúcares Totais | 27 |
| 2.5.2 Determinação de Açúcares Redutores | 27 |
| 2.5.3 Determinação de Proteínas | 28 |
| 2.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA..... | 28 |
| 2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DOS EPS..... | 29 |
| 2.7.1 Obtenção das Células de Sarcoma 180 e Erlich | 29 |
| 2.7.2 Obtenção dos Macrófagos | 29 |
| 2.7.3 Ensaio de Citotoxicidade | 30 |
| 2.7.4 Análise Estatística | 30 |
| 2.8. FLUXOGRAMA..... | 31 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS..... | 32 |
| 3.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA | 34 |
| 3.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DOS EPS | 36 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 44 |

CAPÍTULO II: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS
E HIDROALCOÓLICOS DE BSIOMICIETOS CULTIVADOS EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 45 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS..... | 47 |
| 2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 47 |
| 2.2.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno – Ácido Linoléico) | 47 |
| 2.2.2 Poder Redutor..... | 48 |
| 2.2.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres..... | 48 |
| 2.2.4 Inativação do Ânion Superóxido | 49 |
| 2.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS | 49 |
| 2.4 FLUXOGRAMA..... | 50 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |

| | |
|---|----|
| 3.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES | 51 |
| 3.1.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno – Ácido linoléico) | 51 |
| 3.1.2 Poder Redutor..... | 52 |
| 3.1.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres..... | 54 |
| 3.1.4 Inativação de Ânions Superóxido..... | 56 |
| 3.1.5 Inibição da Peroxidação Lipídica | 57 |
| 3.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS | 58 |
| 4. CONCLUSÕES | 59 |

CAPÍTULO III: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Perenniporia
martiusii* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

| | |
|---|----|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 60 |
| 2.MATERIAL E MÉTODOS..... | 64 |
| 2.1 PRÉ-SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 64 |
| 2.1.1 Obtenção do Filtrado e Extratos Hidroalcoólicos | 64 |
| 2.1.2 Microrganismos Utilizados | 64 |
| 2.1.3 Preparo do Inóculo | 66 |
| 2.1.4 Teste de Difusão em Ágar | 66 |
| 2.1.5 Concentração Inibitória Mínima..... | 66 |
| 2.2 CULTIVO DO FUNGO <i>Perenniporia martiusii</i> (BERK) EM BIORREATOR | 67 |
| 2.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO | 67 |
| 2.3.1 Partição Líquido-Líquido | 67 |
| 2.3.2 Extração com Diclorometano | 68 |
| 2.3.3 Fracionamento do Extrato Diclorometano por Cromatografia em Coluna | 68 |
| 2.3.4 Fracionamento da Fração Fr10 por Cromatografia em Camada Delgada..... | 69 |
| 2.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO DCM, FR 2 E FR 10. | 70 |
| 2.4.1 Perfil Fitoquímico..... | 70 |
| 2.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear(RMN)..... | 71 |
| 2.5 FLUXOGRAMA..... | 72 |
| 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 73 |
| 3.1 PRÉ SELEÇÃO DA CEPA DE <i>P. martiusii</i> | 73 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2 Teste de difusão em ágar | 73 |
| 3.1.2 Determinação da CIM | 75 |
| 3.2 CULTIVO DE <i>P. martiusii</i> EM BIORREATOR | 77 |
| 3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO | 79 |
| 3.3.1 Partição Líquido-Líquido | 79 |
| 3.3.2 Extração com Diclorometano | 80 |
| 3.3.3 Fracionamento do Extrato DCM por Cromatografia em Coluna | 81 |
| 3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA..... | 83 |
| 3.4.1 Perfil Fitoquímico..... | 83 |
| 3.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear | 84 |
| 4. CONCLUSÕES | 91 |
| 5.REFERÊNCIAS | 93 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, os cogumelos têm sido considerados devido ao seu valor medicinal. Desde cedo, os cientistas têm dado maior importância às suas propriedades farmacológicas que ao seu papel como alimento básico. Constantemente, a humanidade tem buscado novas substâncias capazes de melhorar as funções biológicas, e assim, tornar as pessoas mais saudáveis. Aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas, cerca de metade da população mundial, utilizam suplementos alimentares como uma forma de cuidado com a saúde. Estes produtos têm sido comumente chamados de vitaminas, suplementos alimentares ou nutracêuticos. Neste contexto, por apresentarem um alto valor nutricional, os cogumelos têm sido amplamente empregados como nutracêuticos.

Os cogumelos são considerados alimentos quase completos, ricos em proteínas, sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, fibras e outros elementos essenciais, além de apresentarem baixos teores de gordura e carboidratos. Assim, um nutracêutico de cogumelos é um extrato refinado e parcialmente definido obtido tanto do micélio quanto do corpo de frutificação, que quando consumido regularmente, apresenta propriedades terapêuticas, constituindo uma forma saudável de se prevenir o desenvolvimento de desordens metabólicas e garantir o bom funcionamento do organismo.

Sabe-se que das 14 a 15 mil espécies de cogumelos no mundo, 700 apresentam propriedades medicinais, entretanto, estima-se que esse número chegue a 1800 espécies. O que faz com que os cogumelos representem uma vasta fonte para obtenção de novos medicamentos. Nas últimas décadas, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para verificar as propriedades bioativas dos cogumelos. Muitos compostos bioativos têm sido isolados recentemente dos cogumelos. Entre os compostos com propriedades medicinais produzidos por cogumelos, estão incluídos polissacarídeos, polissacarídeo-peptídeos, ácidos graxos, glicoproteínas, terpenóides, esteróides, compostos poliacetilênicos, entre outros. Muitos compostos de origem fúngica têm sido explorados pelos humanos para usos farmacêuticos, como antibióticos, agentes hipocolesterolêmicos, antitumorais, antiparasitários, imunoestimulantes, antioxidantes, imunossuppressores pós-operatórios.

Nos últimos anos, um dos principais problemas de saúde pública mundial é o crescente aumento no número de microrganismos patogênicos resistentes às classes de

antibióticos comercializados, devido ao uso indiscriminado das drogas antimicrobianas. A emergência de microrganismos resistentes, como MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes) e *Pseudomonas sp.*, leva a muitos problemas clínicos durante o tratamento de doenças infecciosas, como hipersensibilidade, reações alérgicas e imunossupressão. Os MRSA são conhecidos por serem um dos mais prevalentes patógenos nosocomiais em todo mundo, sendo os principais responsáveis pelos casos de infecção hospitalar e morte de indivíduos imunodeprimidos. Algumas cepas de MRSA têm sido consideradas epidêmicas e apresentam uma alta prevalência, espalhando-se por hospitais em diversos países. Consequentemente, a busca por novos agentes antibióticos tornou-se uma necessidade urgente.

Além dos problemas enfrentados devido à crescente resistência dos microrganismos patogênicos, outro problema de saúde pública de ordem mundial é o câncer, com maior número de pacientes nos países desenvolvidos. Em 2005, das 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representa 13 % do total. No Brasil, segundo dados do INCA, foram 472.050 casos no ano de 2006 e a previsão para 2009 é de que haverá 466.730 novos casos.

Muitos basidiomicetos têm sido estudados por apresentar propriedades antitumorais e imunoestimulantes. Quase todas as famílias taxonômicas de fungos superiores apresentam espécies de cogumelos que produzem polissacarídeos com propriedades medicinais. Segundo Chang e Milles (1996), cerca de 660 espécies de cogumelos, em 37 diferentes táxons, apresentam polissacarídeos com atividade antitumoral e imunoestimulante, que podem ser obtidos do corpo de frutificação, do micélio cultivado por fermentação submersa, ou do próprio caldo da fermentação. Vários polissacarídeos e polissacarídeos conjugados têm sido comercializados para tratamento de pacientes em terapias convencionais contra o câncer. Eles são esquisofilana, lentinana, grifolana, krestin (polissacarídeo-peptídeo) e PSK (polissacarídeo-proteína). Muitos desses polissacarídeos têm sido classificados como agentes não-específicos, uma vez que o modo de ação e a estrutura química dos componentes bioativos também não são bem definidos. Apesar de estes compostos serem amplamente encontrados entre os cogumelos, cada espécie produz diferentes tipos de polissacarídeos, com diferentes propriedades biológicas. Além disso, polissacarídeos produzidos por uma mesma espécie, obtidos de diferentes fontes (micélio, corpo de frutificação e caldo fermentado) podem apresentar diferentes

estruturas e funções. Desta forma, os cogumelos representam uma vasta fonte de substâncias que podem vir a ser utilizadas no combate a diferentes tipos de câncer.

Outra preocupação crescente diz respeito à busca por novos agentes antioxidantes de origem natural, uma vez que os principais antioxidantes sintéticos utilizados (BHA e BHT) foram identificados como compostos cancerígenos. Os antioxidantes são compostos essenciais para garantir a inibição dos radicais livres, formas reativas de oxigênio, responsáveis por uma série de doenças degenerativas e ligadas ao próprio envelhecimento. Entre as doenças associadas ao excesso de radicais livres estão incluídos diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, arterioscleroses, diabetes, asma, hepatites, cirroses, deficiências imunológicas e o próprio envelhecimento. A oxidação é também um dos mais importantes processos de deterioração dos alimentos, uma vez que isso pode afetar a cor, sabor, textura e segurança alimentar dos consumidores. Assim, existe a necessidade permanente de inativar estes radicais livres, através de suplementos antioxidantes ou alimentos contendo antioxidantes. Os cogumelos, reconhecidos pelo seu alto valor nutricional e importância na prevenção de doenças, são ricas fontes desses compostos com potencial para aplicação como antioxidantes naturais.

De fato, vários compostos com atividades antioxidantes, antitumoral e antimicrobiana têm sido isolados de basidiomicetos. Porém, apesar do enorme potencial e diversidade presente nas regiões tropicais, poucos estudos objetivando a descoberta de novos compostos produzidos por basidiomicetos foram realizados no Brasil. A grande maioria das pesquisas foi voltada para os cogumelos comestíveis ou mais comuns, cujas espécies são facilmente reconhecidas.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial biotecnológico de basidiomicetos, isolados em diferentes regiões do estado do Paraná, quanto à produção de compostos com atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, visando à descoberta de novos compostos bioativos.

A fim de clarificar e facilitar o entendimento das diferentes metodologias e resultados obtidos, no que se refere às três distintas atividades biológicas avaliadas, o presente trabalho foi organizado na forma de três capítulos principais, onde cada atividade foi abordada em separado. Os capítulos foram preparados na forma de artigos breves e a fim de fornecer um embasamento com relação ao conteúdo apresentado em cada um deles, estes foram precedidos por uma revisão da literatura apresentada logo após os objetivos do trabalho.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de basidiomicetos, isolados em diferentes regiões do estado do Paraná, quanto à produção de compostos com atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, visando à descoberta de novos compostos bioativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar, em fermentação submersa, doze espécies selvagens de basidiomicetos isoladas em diferentes regiões do estado do Paraná.
- Avaliar a atividade antioxidante de diferentes extratos, obtidos a partir do micélio e do caldo da fermentação, através de cinco metodologias distintas.
- Quantificar os compostos fenólicos presentes nos diferentes extratos e filtrados.
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos exopolissacarídeos obtidos do caldo da fermentação, frente a diferentes linhagens de células tumorais e macrófagos.
- Caracterizar os exopolissacarídeos obtidos, quanto à porcentagem de proteínas e açúcares totais, e determinação da composição monossacarídica.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos frente a diversos microrganismos patogênicos e selecionar o basidiomiceto mais promissor.
- Realizar, em biorreator, o cultivo da cepa selecionada, analisando diferentes parâmetros cinéticos.
- Submeter o extrato hidroalcoólico bruto obtido a partir do micélio da cepa selecionada a extrações sequenciais com diferentes solventes orgânicos e métodos cromatográficos.
- Realizar a caracterização fitoquímica do extrato bruto e das frações obtidas.
- Caracterizar o extrato bruto e das frações por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BASIDIOMICETOS

3.1.1 *Características Gerais*

Os fungos constituem um grupo de organismos cosmopolita extremamente diverso, com uma ampla variedade de morfologias, metabolismos e habitats. Levantamentos da década de 90 propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos eram conhecidos, com aproximadamente 69.900 espécies descritas na literatura. Representam, assim, um dos maiores grupos taxonômicos com o maior número de espécies na natureza, aproximando-se da casa dos 1,5 milhões de espécies (MANFIO et al., 2005; HAWKSWORTH et al., 2001).

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados e heterotróficos, que se alimentam através da absorção de nutrientes, previamente degradados por um rico complexo enzimático. A variedade de enzimas hidrolíticas excretadas pelos fungos permite que esse grupo de organismos degrade e utilize quase todas as fontes de materiais orgânicos disponíveis na natureza, sendo essencialmente importantes para manutenção do equilíbrio ecológico.

Os fungos verdadeiros são classificados em Ascomicetos, Basidiomicetos, Zigomicetos e Quitridiomicetos. Eles diferem entre si, principalmente, pela ontogênese, filogenia, reprodução sexuada e assexuada, produção de esporos e constituição de parede celular (Figura 1) (BERBEE e TAYLOR, 1992). Dentre os fungos verdadeiros, o grupo monofilético Basidiomicota representa cerca de um terço das espécies de fungos descritas e é um componente ecológico vital, principalmente de ecossistemas terrestres.

Os basidiomicetos são assim denominados por apresentarem uma estrutura característica denominada de basídio, estrutura protuberante onde são produzidos e armazenados os esporos (MYCOKEY et al., 2006; ALEXOPOULOS et al., 1996). Os basidiomicetos juntamente com alguns ascomicotas constituem o grupo dos Macromicetos, e são comumente chamados de cogumelos (MORADALI et al., 2007; WALDE et al., 2006).

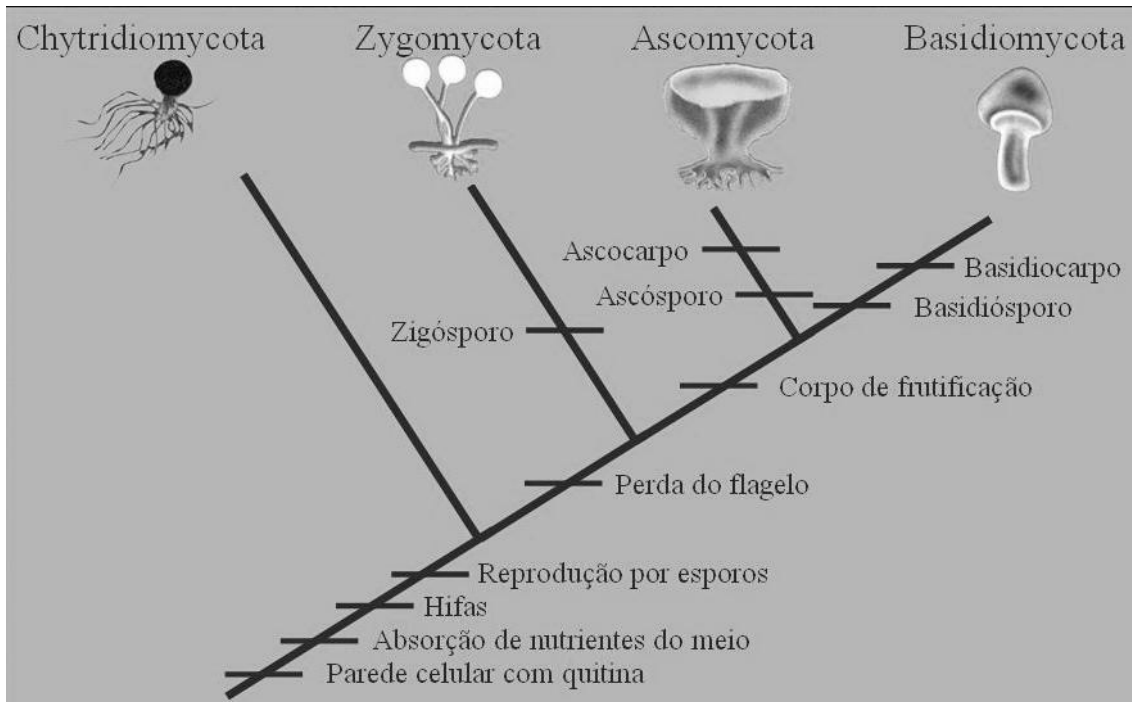


Figura 1: Relação filogenética entre os fungos verdadeiros.

Estima-se que existam no planeta, aproximadamente, cerca de 140.000 diferentes espécies de cogumelos, porém, somente cerca de 10% são conhecidas. Metade destas apresenta propriedades alimentícias, sendo que 2.000 espécies são seguras e perto de 70 são conhecidas por apresentar alguma propriedade farmacológica (WASSER, 2002). Desta forma, esse grupo de organismos representa uma importante área a ser pesquisada, com um vasto potencial biotecnológico a ser descoberto.

3.1.2 Ciclo Reprodutivo

O ciclo reprodutivo dos basidiomicetos tem sido profundamente estudado, e por isso, de maneira geral, as suas etapas são bem conhecidas. Os basidiomicetos são caracterizados por apresentar as maiores e mais complexas estruturas encontradas nos fungos. Apesar de a maioria das espécies deste grupo estar capacitada para a reprodução assexuada e sexuada, eles raramente produzem esporos assexuados, ou seja, formados a partir da fragmentação do micélio. Eles passam a maior parte do seu ciclo de vida como micélio vegetativo, degradando substratos complexos (Figura 2).

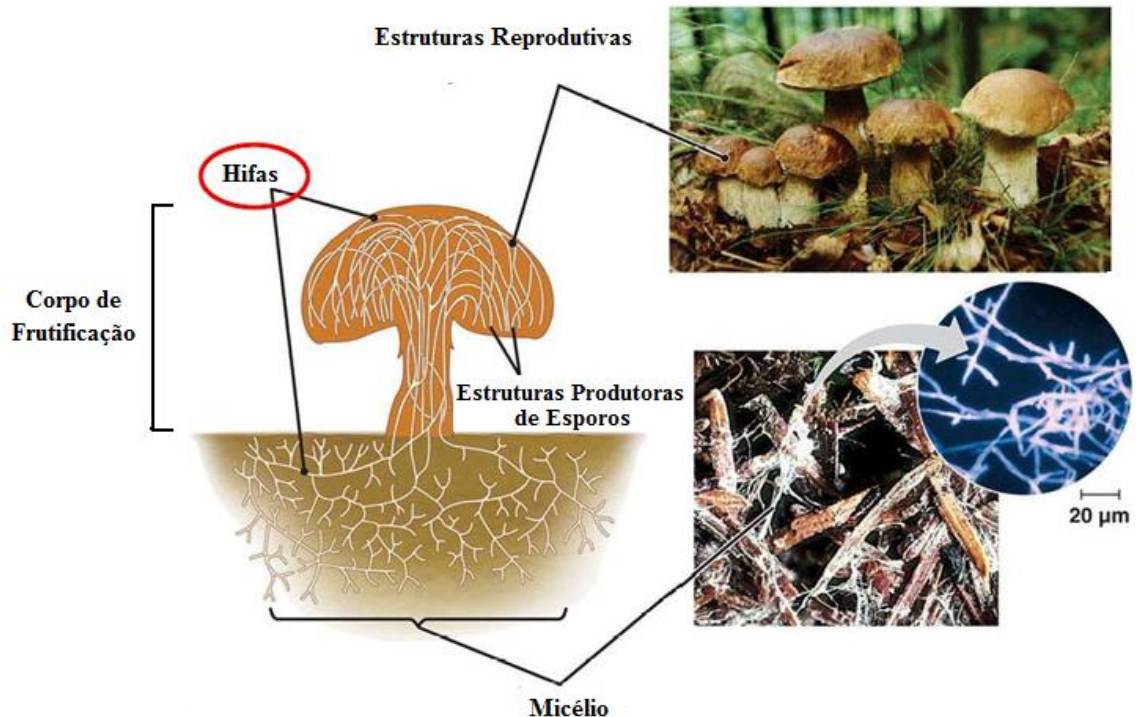


Figura 2: Estruturas apresentadas pelos basidiomicetos durante o seu ciclo de vida.

Adaptado de http://www.cientic.com/imagens/img_fungo2.jpg

A reprodução sexuada nos basidiomicetos inicia-se com a fusão entre células haplóides de "mating types" compatíveis. Este processo é conhecido como somatogamia, ou plasmogamia, uma vez que o talo haplóide fúngico desenvolve o papel que células gaméticas especializadas desenvolveriam em planta e animais (Figura 3).

Os dois núcleos da fase dicariótica permanecem separados, formando um núcleo diplóide apenas em células que se desenvolvem dentro dos basídios. A fusão do núcleo haplóide para formar um diplóide é denominada cariogamia, e ocorre apenas no interior do basídio. Essas células com um único núcleo diplóide vão originar, por meiose, quatro esporos haplóides. O tempo entre a cariogamia e a meiose é altamente variável, e depende largamente da história de vida do organismo (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Cada esporo produzido, quando em condições nutricionais e ambientais favoráveis, vai germinar, originando uma estrutura filamentosa, formada por células haplóides uninucleares, chamada micélio primário. Quando micélios primários compatíveis se encontram, pode acontecer a fusão nuclear, originando uma estrutura filamentosa binucleada, denominada micélio secundário. Este pode permanecer e se desenvolver enquanto as condições forem favoráveis. Quando as fontes nutritivas se

tornam escassas ou as condições ambientais deixam de ser favoráveis (umidade e frio), o micélio secundário pode se reorganizar para formar tecidos, que vão originar os corpos de frutificação, capazes de garantir a produção e dispersão de novos esporos, começando novamente o seu ciclo de vida.

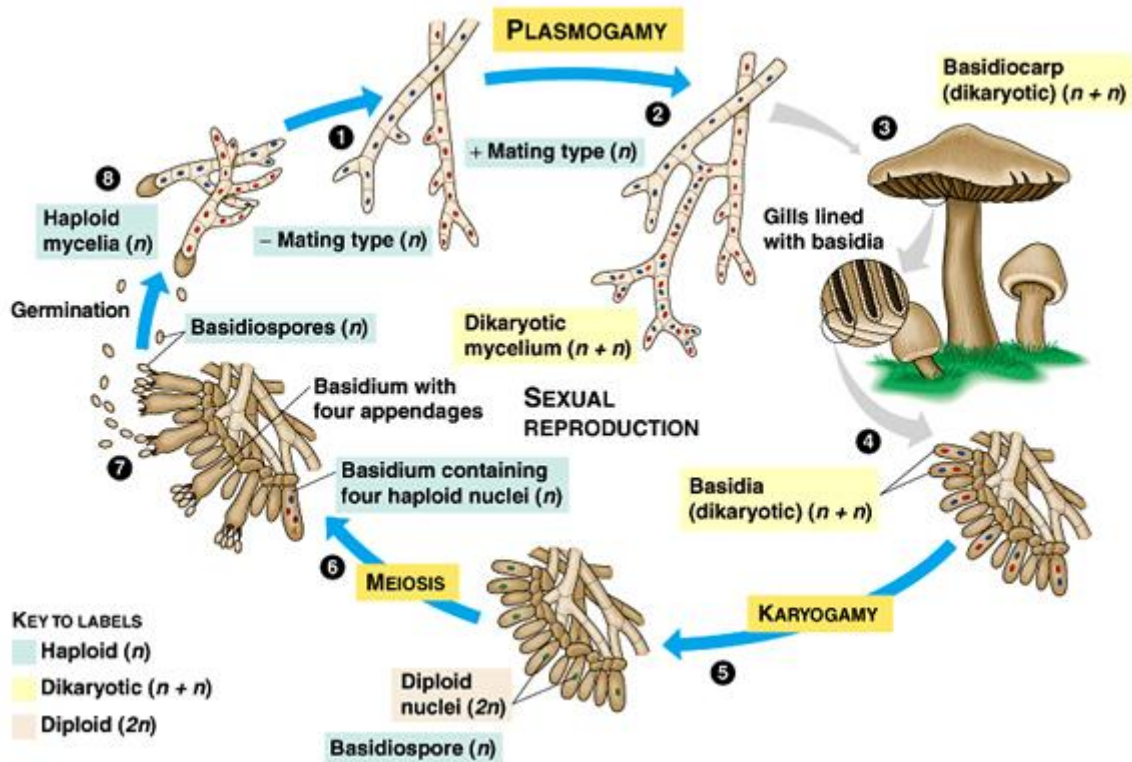


Figura 3: Representação das etapas do ciclo de vida de um Basidiomiceto.

Fonte: http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/16002_19.html

Os esporos são estruturas relativamente resistentes e podem permanecer viáveis por longos períodos, até que encontrem condições adequadas para germinação. Os esporos podem ser liberados do corpo de frutificação por uma série de mecanismos, ativos ou passivos, como por exemplo, pela ação do vento, água e animais. De maneira geral, os basidiomicetos têm desenvolvido muitas habilidades para tornar a dispersão de esporos mais eficiente, entre as quais, a sua estrutura aparece como a principal. Outra característica marcante é a produção da explosiva descarga de esporos denominados balistosporos. Além disso, a sua coloração, aroma e sabor funcionam como atrativos para animais dispersores. Assim, os corpos de frutificação são responsáveis, essencialmente pela função reprodutiva, garantindo a manutenção das espécies de basidiomicetos.

3.1.3 Cultivo de Basidiomicetos por Fermentação Submersa

Há uma longa história da aplicação de cogumelos com propósitos medicinais. Nós sabemos que a mais de dois mil anos as pessoas têm utilizado compostos derivados de cogumelos devido às suas propriedades tônicas e medicinais. Atualmente, existe um grande interesse em novas classes de compostos extraídos tanto do micélio quanto do corpo de frutificação. Porém, tradicionalmente, as pesquisas sobre atividades biológicas de cogumelos focavam-se nos compostos obtidos do corpo de frutificação (KURBANOGLU, 2003; EL-KATTAN et al., 1991; LITCHFIELD, 1967). De todos os medicamentos comercializados derivados de cogumelos, cerca de 80 a 85% são obtidos a partir dos corpos de frutificação, cultivados ou coletados do próprio ambiente. Apenas 15% dos produtos comercializados são obtidos a partir do micélio ou do pulverizado obtido do micélio juntamente com o meio de cultivo. Entretanto, com os avanços tecnológicos que permitiram um maior controle de qualidade e rendimento, os processos de fermentação submersa têm levado a um maior interesse nos compostos obtidos a partir do micélio ou do próprio caldo da fermentação, uma vez que podem apresentar as mesmas propriedades farmacológicas daqueles obtidos a partir do corpo de frutificação (HERIGE, 1996).

O desenvolvimento do corpo de frutificação é um processo lento e complexo, que envolve uma série de etapas, como seleção da cepa, desenvolvimento da “semente”, preparo de uma compostagem adequada, ou resíduos lignocelulósicos, como palha, seguido por um longo período de cultivo, o que pode levar pelo menos três meses (KURBANOGLU, 2003). Isto faz com que o cultivo por meio da fermentação submersa se torne uma alternativa mais eficiente e atrativa.

A principal vantagem da fermentação submersa em relação ao cultivo tradicional, por fermentação sólida, é a redução do tempo gasto para produção dos compostos de interesse (TANG e ZHONG, 2003). Segundo Wagner et al. (2003), a produção de corpos de frutificação de *Ganoderma lucidum* leva pelo menos três meses, enquanto uma quantidade satisfatória de seus metabólitos bioativos, como ácido ganodérico e polissacarídeos, pode ser obtida em fermentação submersa e apenas duas ou três semanas. O cultivo submerso, similar ao cultivo convencional de bactérias, também apresenta como vantagem a possibilidade de controlar o tipo de produto e as condições do processo, como temperatura, taxa de agitação, taxa de inoculação, fontes de carbono e nitrogênio, e pH (GETHA et al., 2009; GHORASHI et al., 2003). A

possibilidade de manipular as condições de cultivo na fermentação submersa pode fazer com que os basidiomicetos produzam uma maior gama de compostos bioativos de importância terapêutica, num curto período de tempo (ZHONG e TANG, 2004).

3.1.4 Potencial Biotecnológico

Os fungos filamentosos sintetizam uma grande variedade de produtos naturais, genericamente chamados de metabólitos secundários. Estes compostos, geralmente, apresentam baixo peso molecular e não são necessários para o crescimento e desenvolvimento do organismo em condições laboratoriais, mas são importantes fatores de proteção no seu habitat natural, conferindo vantagens ao microrganismo produtor frente a outros competidores. Conseqüentemente, muitos metabólitos secundários tendem a ser compostos que apresentam algum efeito tóxico ou inibitório sobre outros microrganismos. Assim, devido a essas propriedades biológicas, muitos compostos de origem fúngica têm sido explorados pelos humanos para usos farmacêuticos, como antibióticos, agentes hipocolesterolêmicos, antitumorais, antiparasitários, imunostimulantes, antioxidantes, imunossuppressores pós-operatórios (SHWAB e KELLER, 2008).

Muitos são os fatores que determinam a produção destes compostos. Acredita-se que a regulação do metabolismo secundário fúngico seja dependente, até certo ponto, da organização cromossomal de genes biosintéticos. Além da organização genética, a regulação das rotas secundárias é determinada por fatores ambientais, como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura, luminosidade e pH. Como o metabolismo secundário demanda uma grande quantidade de energia, é provável que os fungos sejam capazes de ativar a produção de alguns metabólitos de interesse, apenas quando isso se torna uma vantagem e apenas sob certas condições ambientais. A produção de metabólitos secundários também é coordenada, em geral, pelo desenvolvimento do fungo. Tal qual em certas condições ambientais, é vantajoso para o fungo produzir certos metabólitos secundários apenas em estágios apropriados do seu desenvolvimento (SHWAB e KELLER, 2008; BRODHAGEN e KELLER, 2006; YU e KELLER, 2005; KELLER e HOHN, 1997).

Entre as substâncias bioativas produzidas por fungos, já em escala industrial, têm-se ácidos orgânicos, polissacarídeos, hormônios reguladores de crescimento em plantas, alcalóides, micotoxinas, e antibióticos (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos bioativos isolados de Basidiomicetos.

| Tipo de Composto | Moléculas bioativas | Potencial Biológico |
|----------------------------|--|------------------------------------|
| Polissacarídeos | Grifolana | Imunomodulador |
| | Lentinana | Antitumoral |
| | Esquizofilana | Antiviral |
| Polissacarídeo-peptídeo | PSP | Antitumoral |
| | PSK | Antiviral |
| | | Antimicrobiano Citotóxico |
| Proteínas | Fips | Imunomodulador |
| Terpenóides | Ácido Ganodérico | Antimicrobiano |
| | Ganoderiol | Anti-HIV |
| | Ácido Ganoderênico | Antitumoral |
| | Ácido Lucidênico | Citotóxico |
| | Ganolúcido | Liberação/inibição de |
| | Lucidomols | histaminas |
| | Ganoderols | Antihipertensivo |
| Ácido aplanoxidico | Antiinflamatório | |
| Esteróides | Polioxigenado derivados de ergosterol | Citotóxico |
| | | Antitumoral |
| | | Antimicrobiano |
| Ácidos graxos | Ácido linoléico | Antimutagênico |
| | Ácido Palmítico | Antibacteriano |
| Germânio orgânico | Bis- β -carboxietilgermanium Sesquioxide | Antitumor imunomodulatório |
| Nucleotídeos | Adenosina | Inibição de agregados de plaquetas |
| Compostos Poliacetilênicos | Biformina, agrocibina, marasmina, quadrifidina | Antibióticos |

Fonte: Tabela adaptada de Moradali et al. (2007).

Esta ampla diversidade metabólica é uma característica que torna os fungos uma rica fonte de compostos bioativos (EL-ENSHASYA, 2007). Além disso, numerosas pesquisas têm comprovado o alto valor nutricional desses organismos. Os basidiomicetos são alimentos quase completos, sendo ricos em proteínas, sais minerais, ferro, vitaminas B1, B2, cálcio, fibras e outros elementos essenciais, além de apresentarem baixos teores de gorduras e carboidratos (MIZUNO, 1999; WASSER e WEIS, 1999). Dessa forma, o consumo regular destes alimentos constitui uma forma saudável de se prevenir o desenvolvimento de desordens metabólicas e garantir o bom funcionamento do organismo, agindo assim, como os denominados alimentos funcionais. Estes, além de propiciarem uma dieta adequada em vitaminas, minerais, fibras, carboidratos e outros nutrientes, contribuem também para o tratamento e prevenção de doenças crônico-degenerativas.

Os cogumelos são importantes alimentos funcionais já que além de possuírem um alto valor nutritivo, com quantidade de proteínas quase equivalente a da carne e acima de alguns vegetais e frutas, estimulam o sistema imunológico e têm se mostrado importantes aliados no tratamento de doenças que afligem a população mundial, como o câncer, lupus, hepatite, HPV (Vírus do Papiloma Humano) e AIDS, entre outras doenças.

3.1.4.1 Produção de Compostos Antimicrobianos

Apesar do número crescente de profissionais atentos aos benefícios causados pelas propriedades imunológicas de certos cogumelos e outros fungos, poucos vêem os cogumelos como uma rica fonte de antibióticos naturais. Apesar de bem conhecidas as propriedades imunomodulatórias da glucanas constituintes da parede celular fúngica, poucos pesquisadores estão cientes de que muitos metabólitos secundários, secretados extracelularmente pelo micélio, podem combater bactérias (STAMETS, 2002; KUPRA et al., 1979; BENEDICT e BRADY, 1972) e vírus (BRANDT e PIRAINO, 2000; SUZUKI et al., 1990). Além disso, esses metabólitos extracelulares são ativos contra protozoários como *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária (ISAKA et al., 2001; KITTAKOOP et al., 1999; LOVY et al., 1999), e outros microrganismos (ORDÓNEZ et al., 2006; WANG e NG, 2006; ZIEGENBEIN et al., 2006; ROSA et al., 2003).

Como humanos (animais) e fungos apresentam microrganismos antagonistas em comum, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, nós podemos nos beneficiar das estratégias naturais de defesa dos fungos, que podem produzir os antibióticos para combater infecções por esses microrganismos. Assim, não é surpresa que os antibióticos antibacterianos mais utilizados pelos seres humanos sejam de origem fúngica (HARDMAN et al., 2001).

Alguns cogumelos e seus metabólitos podem apresentar propriedades antibióticas altamente específica, enquanto outros têm efeitos mais amplos. Com o aumento do número de bactérias desenvolvendo resistência aos antibióticos comerciais, como as MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina-resistentes) e *Pseudomonas*, extratos e derivados de cogumelos representam uma grande promessa para elaboração de novos medicamentos (STAMETS, 2002).

Quase dois mil anos já se passaram desde que o médico grego Dioscorides incluiu o fungo basidiomiceto *Fomitopsis officinalis* em seu livro “De Materia Medica”, publicado aproximadamente no ano 65 d.c.. Conhecido naquela época como “agaricum” ou “agarikon”, e posteriormente como quinina, ele foi usado no tratamento da doença conhecida agora como tuberculose. A indústria farmacêutica tem sido lenta para explorar as propriedades antibióticas dos cogumelos, em parte devido ao crescimento lento dos basidiomicetos e menor rendimento comparado aos mofo (ANKE, 1989), como o *Penicillium notatum*, fungo a partir do qual Fleming descobriu a penicilina em 1928 (Figura 4) (STAMETS, 2002). Porém, com o desenvolvimento de novos modelos de fermentação e novas tecnologias de purificação, os basidiomicetos passaram novamente a ser vistos como uma fonte potencial para descoberta de novas classes de antibióticos (SUAY et al., 2001).

A primeira investigação a respeito do potencial antimicrobiano de basidiomicetos foi realizada por Anchel, Hervey e Wilkins em 1941 (SANDVEN, 2000), quando eles examinaram extratos obtidos do corpo de frutificação e do micélio de mais de duas mil espécies. Eles isolaram e identificaram a pleuromutilina (KAVANAGH et al., 1950), um diterpeno amplamente utilizado no tratamento contra infecções por micoplasmas em animais (BRIZUELA et al., 1998), que levou ao desenvolvimento do primeiro antibiótico comercializado obtido a partir de basidiomicetos (ROSA et al., 2003). Em 1946, foi isolado o antibiótico poliporina a partir do fungo *Pycnoporus sanguineos*. Esse composto mostrou-se eficaz contra

microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sem causar nenhuma toxicidade em experimentos animais.

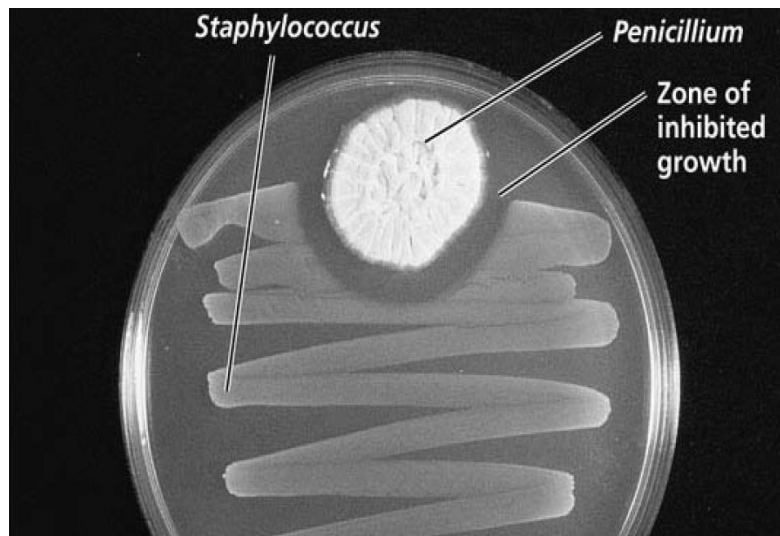


Figura 4: Representação da placa visualizada por Fleming em 1928, quando descobriu a penicilina.

Fonte: <http://stringthebean.wordpress.com/2007/04/15/top-10-greatest-discovery/>

Mais recentemente, estudos realizados por Smânia et al. (1995a e 1997) mostraram que o fungo *Pycnoporus sanguineus* também produz cinabarina, um pigmento alaranjado ativo contra *B. cereus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *S. typhi*, *S. aureus* e vários *Streptococcus spp.*, sendo mais efetivo contra os Gram-positivos.

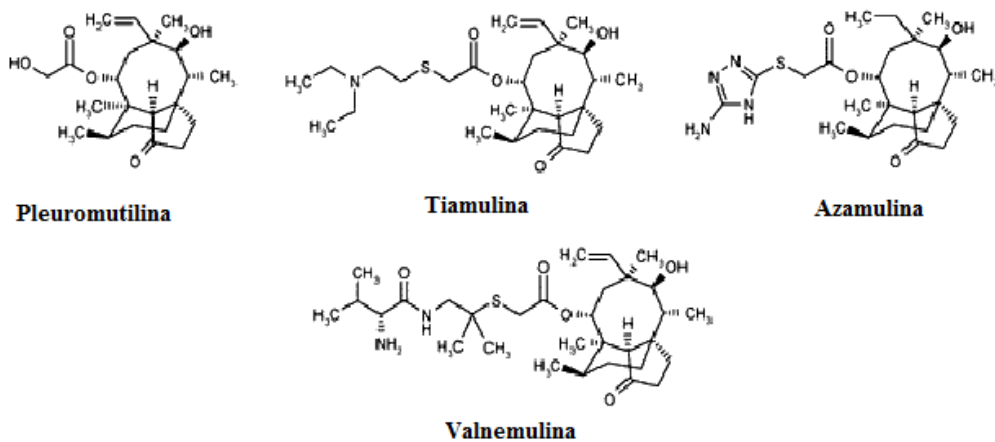


Figura 5: Estrutura do antibiótico Pleuromutilina, obtido do basidiomiceto *P. sanguineus*, e seus derivados.

Estudos recentes realizados por Rosa et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de 103 basidiomicetos isolados em Minas Gerais. Foram testados extratos orgânicos obtidos do corpo de frutificação e do caldo de cultivo, extraídos com etanol e acetato de etila, respectivamente. Dos extratos testados, 14% apresentaram uma significativa atividade antimicrobiana contra um ou mais microrganismos, gerando halos de inibição maiores que 12 mm de diâmetro. Destes, dois apresentaram um amplo espectro de ação, e foram efetivos contra fungos e bactérias, oito foram efetivos contra bactérias e três contra fungos, apenas.

Muitos metabólitos secundários isolados de basidiomicetos têm sido reportados como potenciais agentes antimicrobianos. Existe um especial interesse em um novo grupo de hidroquinonas sesquiterpenos conhecidos como ganomicinas (Ganomycin A e B) (Figura 6), produzido por espécies europeias do gênero *Ganoderma*, *G. pfeifferi*, que inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA) e de outras bactérias (GETHA et al., 2009; MOTHANA et al., 2000). Smânia et al. (2003) isolaram três esteróides e cinco triterpenos do fungo *Ganoderma annulare* que foram fortemente efetivos contra os fungos *Microsporium cannis* e *Trychophyton mentagrophytes*.

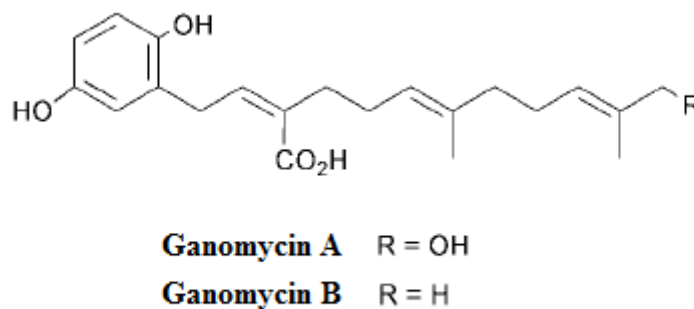


Figura 6: Antibióticos isolados do basidiomiceto *Ganoderma pfeifferi* eficazes contra MRSA.

Além dos metabólitos excretados extracelularmente, outras moléculas produzidos por basidiomicetos, como os polissacarídeos constituintes da parede celular, também apresentam atividade antimicrobiana, aumentando a eficiência dos cogumelos para os propósitos medicinais. Os polissacarídeos lentinana, isolado do fungo *Lentinus edodes*, e esquizofilana, isolado do cogumelo *Schizophyllum commune*, são eficientes

contra *Candida albicans* e *S. aureus* (WASSER e WEIS, 1999). A lentinana também se mostrou efetiva contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* (CHIHARA, 1992), enquanto o extrato do micélio foi efetivo contra o vírus HSV-1, causador do herpes labial (SHARKAR et al., 1993). Os polissacarídeos de cogumelos, como a lentinana, podem melhorar o sistema imune, potencializando repostas mediadas, e indiretamente, mas de forma efetiva, agir como antibióticos (STAMETS, 2002).

O fato de que os basidiomicetos têm sido insuficientemente estudados, juntamente com a vasta gama de tipos estruturais de antibióticos que têm sido obtidos a partir deles, sugerem que os basidiomicetos podem ser uma fonte de novos compostos bioativos com diferentes espectros antimicrobianos (Getha et al., 2009; Anke, 1989).

3.1.4.2 Produção de Compostos Antitumorais e Imunoestimulantes

É bem estabelecido que os basidiomicetos apresentam um amplo espectro de propriedades terapêuticas e profiláticas (SHAMTSYAN et al., 2004; MAU et al., 2002; MIZUNO et al., 1999). Entre as mais importantes estão as atividades imunomoduladoras e antitumorais de muitas espécies de basidiomicetos (KIM et al., 2006; LAM et al., 2001; MIZUNO et al., 1995b).

Vários estudos a respeito da atividade antitumoral de compostos naturais, incluindo compostos originados de cogumelos, têm sido desenvolvidos a fim de solucionar esse problema que acomete populações em todo mundo (SHAMTSYAN et al., 2004; WASSER et al., 2002; OOI e LIU, 2000). Há quase meio século, micologistas causaram grande impacto ao divulgar os primeiros artigos relando as propriedades antitumorais de extratos obtidos dos corpos de frutificação de várias espécies de macromicetos (GREGORY et al., 1966; ESPENSHADE e GRIFFITH, 1966; KANATSU et al., 1963), criando seus primeiros “medicamentos” a partir de cogumelo e introduzindo-os no mundo da indústria farmacêutica (SHAMTSYAN et al., 2004; MIZUNO et al., 1999 a,b; WASSER e WEIS, 1999). Na década de 60, uma mucoproteína, denominada calvacina, foi o composto natural mais citado e utilizado em diversos laboratórios para tratamento contra o câncer. Esse composto foi isolado do cogumelo *Calvatia gigantea* por Lucas et al. em 1959. Sua atividade foi testada contra diversos tipos de câncer, entre eles Sarcoma 180, adenocarcinoma mamário 755 e células tumorais HeLa (WASSER e WEIS, 1999). Em 1969, Chihara e colaboradores isolaram do fungo *Lentinus edodes* um polissacarídeo solúvel em água, genericamente

chamado lentinana (Figura 7). A sua atividade antitumoral foi originalmente comprovada por estudos *in vivo* contra Sarcoma 180. Segundo Chihara et al. (1969), o polissacarídeo lentinana inibiu quase completamente o desenvolvimento de vários tipos de tumores sólidos.

Desde o isolamento do lentinana, numerosas pesquisas têm sido realizadas a fim de isolar novos compostos com propriedades antitumorais produzidos por basidiomicetos. Entre os compostos isolados estão vários polissacarídeos como as beta-glucanas, heteroglucanas, proteoglucanas, peptido-glucanas, lectinas, além de vários compostos de baixo peso molecular, como os esteróides, terpenos, compostos fenólicos, entre outros (WASSER e WEIS, 1999). Nas duas últimas décadas, muitas substâncias bioativas, produzidas por basidiomicetos, têm sido isoladas e identificadas. Mas entre elas, os polissacarídeos são as mais amplamente estudadas, e têm se mostrado particularmente efetivas contra vários tipos de câncer e outras doenças, através da estimulação do sistema imune ou por efeito citotóxico direto, além de aliviar os efeitos causados pela quimioterapia e radioterapia (CHANG e MILLES, 1996).

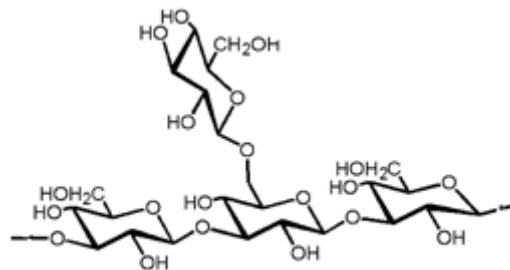


Figura 7: Estrutura molecular do polissacarídeo lentinana isolado do fungo *Lentinus edodes*.

Os primeiros medicamentos antitumorais desenvolvidos a partir de cogumelos tiveram todos como princípio ativo polissacarídeos do tipo beta-glucanas. Esses medicamentos são Krestin (PSK), isolado do micélio do cogumelo *C. versicolor* contendo (1-4),(1-3) ou (1-4),(1-6)- β -D-glucana; Schizophyllan, uma (1-3),(1-6)- β -D-glucana de alto massa molecular obtida do filtrado do cultivo de *Schizophyllum commune*; e Lentinan, (1-3),(1-6)- β -D-glucana. Estes polissacarídeos apresentam diferentes composições químicas e seus mecanismos bioquímicos responsáveis por suas

propriedades antitumorais ainda não são bem definidos (CHANG e MILLES, 1996). Em geral, glucanas de alto peso molecular parecem ser mais efetivas contra o câncer que os compostos de baixo peso molecular.

A maior parte da parede celular dos fungos é constituída por polissacarídeos. Cerca de 80% da sua parede celular é formada por microfibrilas cristalinas organizadas em uma matriz amorfa. Os outros 20% são compostos por lipídeos e proteínas, em proporção equivalente. A composição e o tipo de polissacarídeo formador da parede dependem do tipo de fungo. Alguns podem apresentar quitina como principal componente fibrilar e polímeros de glucose (glucanas) formando a matriz, enquanto outros podem apresentar polímeros de manose, conhecidos como mananas (HERITAGE, 1996). Da mesma forma, as propriedades antitumorais podem ser alteradas, dependendo da origem (corpo de frutificação, micélio ou caldo fermentado), condições de cultivo, entre outros fatores.

Nas últimas décadas, as principais pesquisas envolvendo as propriedades antitumorais e imunomodulatórias de basidiomicetos logicamente, conduziram a uma série de pesquisas terapêuticas, profiláticas, nutricionais e outros benefícios dos macromicetos. Porém, essas pesquisas têm se focado nos gêneros mais comuns de cogumelos já comercializados, como *Agaricus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Grifola*, *Flammulina*, *Volvariella*, *Auricularia* e *Tremella* (Tabela 2) (CHANG et al., 1999). No Brasil, o maior destaque é para o cogumelo *Agaricus brasiliensis*, comumente chamado “cogumelo do sol”. De acordo com a cultura popular, esse cogumelo pode ser utilizado contra uma variedade de doenças como diabetes, arteriosclerose, hepatite, hipercolesteremia, doenças cardíacas, entre outras. Algumas pesquisas demonstraram, experimentalmente, os efeitos imunoestimulantes e anticancerígenos dos seus polissacarídeos (FIRENZUOLI, 2007; SOCCOL et al., 2006).

Entretanto, apesar da imensa diversidade fúngica do Brasil, o cultivo de cogumelos é relativamente escasso em comparação a outros países. Poucas espécies nativas têm sido utilizadas na alimentação ou com propósitos medicinais. Desta forma, existe toda uma biodiversidade, que representa uma potencial fonte de compostos bioativos, ainda por ser estudada, o que justifica novas pesquisas (SOCOOL et al., 2006).

Tabela 2: Polissacarídeos com propriedades antitumorais isolados de cogumelos.

| Espécie | Tipo de câncer | Origem polissacarídeo | Estrutura polissacarídeo |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>Coriolus versicolor</i> | Câncer de pulmão, estômago e mama | Micélio | (1-4),(1-3) ou (1-4),(1-6)- β -D-glucana |
| <i>Lentinula edodes</i> | Câncer estomacal | Corpo de frutificação | (1-3)- β -D-glucana |
| <i>Shizophyllum commune</i> | Câncer cervical | Caldo do cultivo | (1-3),(1-6)- β -D-glucana |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | Antitumoral | Corpo de Frutificação e micélio | (1-6)- β -D-glucana |
| <i>Agaricus blazei</i> | Antitumoral | Corpo de Frutificação e micélio | (1-6)- β -D-glucana |
| <i>Grifola frondosa</i> | Antitumoral | Corpo de frutificação | (1-6),(1-3)- β -D-glucana |
| | Antitumoral | Micélio | (1-3),(1-6)- β -D-glucana |

Fonte: Tabela adaptada de Chang e Milles (1996).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo. Ainda hoje, no início do terceiro milênio, não foram desenvolvidos medicamentos preventivos ou específicos (como as vacinas ou antibióticos) contra os diversos tipos de câncer. Como as células cancerosas originam-se a partir de células normais, que passam a proliferar de forma descontrolada, os medicamentos utilizados na terapia acabam atingindo as células normais, gerando severos prejuízos ao paciente. Desta forma, torna-se necessário investigar novas substâncias com propriedades antitumorais que melhorem as repostas imunológicas sem causar prejuízos ao paciente.

3.1.4.3 Produção de Compostos Antioxidantes

Quase todos os organismos estão naturalmente protegidos contra os danos causados pelos radicais livres, porém os nossos mecanismos de defesa são insuficientes

para prevenir todos os prejuízos causados pelo estresse oxidativo. Compostos antioxidantes de origem natural estão sendo extensivamente estudados por sua capacidade de proteger o organismo e as células contra danos causados por pelo estresse oxidativo, considerado causa do envelhecimento e de doenças degenerativas. Os antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos desempenham um importante papel como agentes protetores benéficos para saúde humana.

Os cogumelos são uma rica fonte desses compostos (BARROS et al., 2007). Alguns cogumelos comestíveis, amplamente consumidos na cultura asiática, têm sido relatados como portadores de importantes propriedades antioxidantes, e estas, parecem estar relacionadas ao seu conteúdo de compostos fenólicos, como ácido variegático e diboviquinona (CHEUNG et al., 2003). Além dessa classe de compostos, as vitaminas, carotenóides, flavonóides, ácidos orgânicos, β -caroteno, tocoferóis, entre outros isolados de basidiomicetos, apresentam potencial atividade antioxidante (Figura 8). Os compostos antioxidantes podem ser isolados de diferentes partes do cogumelo (haste, corpo de frutificação), do micélio e do próprio caldo da fermentação.

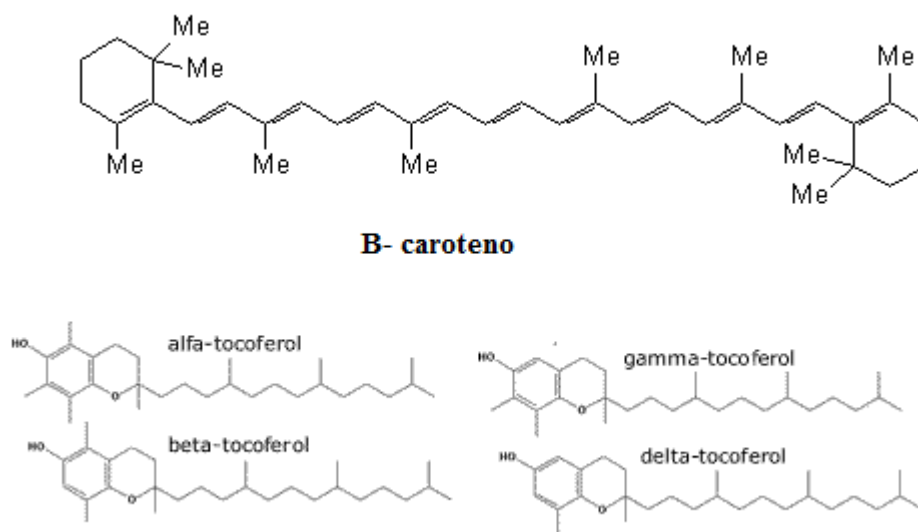


Figura 8: Estruturas do B-caroteno e de alguns tocoferóis, importantes agentes antioxidantes.

Vários estudos têm avaliado a atividade antioxidante de compostos produzidos por basidiomicetos, obtidos por diferentes formas de extração. Tsai et al. (2007) avaliaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos e etanólicos dos fungos

Agaricus blasei, *Agrocybe cylindracea* e *Boletus edulis* e relataram que ambos os extratos mostraram-se efetivos de acordo com as metodologias empregadas. Entre os componentes dos extratos, foram detectados tocoferóis e outros compostos fenólicos, que justificaram as atividades encontradas. Mau et al. (2005) analisaram a atividade antioxidante de extratos aquosos obtidos do corpo de frutificação, micélio e caldo de cultivo de *Ganoderma tsugae* e confirmaram a presença de ácido ascórbico, α e δ -tocoferol, além de outros compostos fenólicos nos três diferentes extratos. Porém, os extratos obtidos do micélio e do caldo mostraram maior atividade antioxidante. β -caroteno e γ -tocoferol não foram observados, uma vez que estes compostos não são solúveis em água.

Ribeiro et al. (2008) compararam a atividade antioxidante e o perfil fitoquímico de extratos obtidos do chapéu e estipe de basidiomicetos selvagens. Entre os compostos encontrados, foram identificados vários ácidos orgânicos, como oxálico, cítrico, málico e fumárico, que se apresentavam em maior concentração nos extratos obtidos do chapéu. Os alcalóides encontrados também mostraram uma maior tendência a se concentrar no chapéu.

De uma forma geral, os cogumelos são vistos, atualmente, como uma imensa e praticamente inexplorada fonte para descoberta de novos compostos antioxidantes, que merece ser cuidadosamente estudada.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BASIDIOMICETOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são uma classe de biopolímeros com um alto valor e uma ampla variedade de aplicações industriais e farmacêuticas (CHO, 2006). Podem ser classificados em endopolissacarídeos (PPS) ou exopolissacarídeos (EPS) (LEE et al., 2006). Estes compostos são produzidos por fungos, bactérias e microalgas. Entre todos estes, os polissacarídeos produzidos por cogumelos têm emergido como uma importante classe de compostos bioativos. Extratos de vários cogumelos, especialmente medicinais, têm sido utilizados na tradicional terapia Oriental por suas propriedades antitumorais e imunomodulatórias (POKHREL et al., 2007; LIU, OOI e FUG, 1999).

Os polissacarídeos podem ser obtidos diretamente do corpo de frutificação ou do micélio obtido por fermentação. Tradicionalmente, as pesquisas têm se focado nos polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação (LITCHFIELD, 1967; EL-KATTAN et al., 1991; KURBANOGLU, 2003). Entretanto, devido ao longo período de cultivo necessário para o desenvolvimento do corpo de frutificação, o cultivo do micélio por meio da fermentação submersa, utilizando meios definidos, torna-se uma alternativa mais eficiente e atrativa (WU et al., 2002; LITCHFIELD, 1967). Além disso, exopolissacarídeos (EPS), que também exibem efeitos biológicos similares aos polissacarídeos do micélio (PPS), podem ser produzidos e liberados simultaneamente no meio de fermentação (LI et al., 2005; KIM et al., 2002).

Durante as últimas décadas, tem crescido o interesse nos polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos por diversos cogumelos cultivados em fermentação submersa devido a suas benéficas atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral, imunoestimulante, hipoglicêmica, entre outras (LIM et al., 2006). Os polissacarídeos fúngicos podem ser administrados juntamente com as terapias convencionais contra diversos tipos de câncer e outras doenças, sem causar efeitos tóxicos em longo prazo, além de trazer outros benefícios à saúde. Esses polissacarídeos podem gerar diferentes respostas celulares, agindo em diferentes receptores na superfície da célula, desencadeando distintos processos imunológicos de defesa. Uma combinação dessas respostas envolvendo diferentes tipos celulares pode levar a uma grande inibição das células tumorais, o que pode ser induzido por um único polissacarídeo (FIRENZUOLI, GORI e LOMBARDO, 2007). Em muitos países orientais, vários imunocêuticos compostos de polissacarídeos fúngicos têm sido aceitos, como a lentinana produzida

pelo fungo *Lentinula edodes*, krestin produzido por *Coriolus versicolor* e esquizofilana produzida por *Schizophyllum commune* (LIU, OOI e FUNG, 1999; BORCHERS et al., 1999).

No Brasil, apesar da imensa diversidade fúngica, o cultivo de cogumelos é relativamente escasso em comparação a alguns países da Europa e da Ásia, e até mesmo o México ou Estados Unidos, e se restringe a espécies conhecidas, que apresentam características comestíveis e de fácil identificação. Poucas espécies nativas têm sido utilizadas na alimentação ou com propósitos medicinais. Desta forma, existe toda uma biodiversidade, que representa uma potencial fonte de compostos bioativos, ainda por ser estudada (SOCOOL et al., 2006).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo, apesar das recentes ferramentas desenvolvidas no seu combate, como drogas milagrosas, diferentes formas de tratamento e diagnósticos modernos. A maior causa das mortes é devido aos danos causados ao sistema imune durante o tratamento do tumor. Desta forma, torna-se necessário investigar novas substâncias com propriedades antitumorais que melhorem as repostas imunológicas sem causar prejuízos ao paciente. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos exopolissacarídeos produzidos por doze espécies de basidiomicetos isolados em diferentes regiões do estado do Paraná, cultivados em fermentação submersa, bem como a caracterização parcial desses compostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A caracterização bioquímica parcial dos exopolissacarídeos foi realizada no Setor de Ciências Biológicas no Laboratório de Bioquímica de Carboidratos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR. Os testes de atividade biológica foram realizados, também no Setor de Ciências Biológicas, no Laboratório de Fisiologia, UFPR.

2.1 MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Foram utilizadas neste trabalho doze cepas de basideomicetos (Tabela 3) depositadas no banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. As cepas foram coletadas e isoladas pelos pós-graduandos Francisco Vítola e Marcelo Fernandes. Todas as cepas foram isoladas diretamente dos corpos de frutificação, coletados em diferentes regiões do estado do Paraná.

A identificação foi realizada pelo pesquisador André de Meijer, que gentilmente colaborou com este trabalho. Estas cepas representam apenas uma pequena parcela da enorme biodiversidade fúngica brasileira (DE MEIJER, 2006), ainda pouco explorada, e que constitui uma potencial fonte de compostos bioativos. A identificação foi feita com base em características morfológicas macro e microscópicas. Em alguns casos foram realizados testes bioquímicos.

As linhagens isoladas foram mantidas em placas de petri e tubos de ensaio contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) a 4°C, com repiques trimestrais.

Tabela 3: Basidiomicetos utilizados neste trabalho, classificação, origem e substrato do qual foram isolados.

| Espécie | Ordem | Família | Origem | Substrato |
|---------------------------------|--------------|------------------|----------------|-------------------------|
| 1. <i>Agaricus silvaticus</i> | Agaricales | Agaricaceae | Mata Atlântica | Madeira em decomposição |
| 2. <i>Pycnoporus sanguineus</i> | Polyporales | Polyporaceae | Curitiba | Madeira em decomposição |
| 3. <i>Ganoderma australe</i> | Polyporales | Ganodermataceae | Curitiba | Madeira em decomposição |
| 4. <i>Lepista sordida</i> | Agaricales | Tricholomataceae | Mata Atlântica | Solo |
| 5. <i>Oudemansiella canarii</i> | Agaricales | Marasmiaceae | Curitiba | Árvore |
| 6. <i>Pereniporia martiusii</i> | Polyporales | Polyporaceae | Mata Atlântica | Madeira em decomposição |
| 7. <i>Pleurotus djamor</i> | Agaricales | Pleurotaceae | Mata Atlântica | Madeira em decomposição |
| 8. <i>Ganoderma stiptatum</i> | Polyporales | Ganodermataceae | Mata Atlântica | Madeira em decomposição |
| 9. Soccol 3 | - | - | Maringá | Solo |
| 10. <i>Phallus sp.</i> | Phallales | Phallaceae | Mata Atlântica | Solo |
| 11. <i>Psilocibe cubensis</i> | Agaricales | Strophariaceae | Maringá | Solo |
| 12. <i>Ganoderma applanatum</i> | Polyporale | Ganodermataceae | Curitiba | Madeira em decomposição |

2.2 PREPARO DO INÓCULO

As linhagens fúngicas foram repicadas em placas de petri (90x15 mm) contendo BDA, e em seguida, incubadas em estufa a temperatura de 28°C até que o micélio recobrisse toda a superfície do meio. Após o crescimento, o micélio foi delicadamente raspado e transferido para frascos Erlenmeyers contendo o meio da fermentação.

2.3 CULTIVO

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyers de 1L, contendo 500 mL de meio de cultivo básico (Tabela 4). O meio utilizado foi modificado a partir do meio descrito por FAN (2000). A cultura foi acondicionada a 28°C ($\pm 0,2$), 120 rpm em agitador rotatório de bancada, por 15 dias. O tempo de cultivo foi determinado com base nas características visuais do cultivo, principalmente, acúmulo de biomassa.

Tabela 4: Composição do meio básico utilizado na fermentação.

| Composição | g/L |
|--------------------------------------|------|
| Glucose | 20,0 |
| Extrato de Levedura | 3,0 |
| Extrato de Malte | 1,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,06 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,06 |

2.4 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Transcorridos os 15 dias de fermentação, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração com papel de filtro Whatman nº1, em bomba a vácuo. Os sobrenadantes dos cultivos foram concentrados até pelo menos 1/3 do volume inicial, utilizando estufa a vácuo por aproximadamente 6-12 h a 45°C, e neutralizados.

A precipitação dos exopolissacarídeos foi realizada pela adição de etanol. Para cada volume do sobrenadante, foram adicionados três volumes de álcool etílico (96° GL, -18° C). A mistura foi mantida *over night* a temperatura de 4°C (DALLA'SANTA, 2006; RUBEL, 2006). O precipitado foi então recuperado por centrifugação (10.000 rpm, 30 min), seguida por duas lavagens com etanol. Os EPS foram secos em estufa a 45°C para remoção do etanol e liofilizados. Foi calculado o rendimento para cada uma das cepas.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Determinação de Açúcares Totais

A quantificação de açúcares totais foi realizada pelo método de fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), modificado por Cuesta *et al.* (2002). Este método permite a dosagem de açúcares simples ou complexos numa faixa de sensibilidade de 10 a 70 $\mu\text{g/mL}$, e fundamenta-se no fato de que estes compostos e seus derivados, incluindo metil ésteres com grupos redutores livres ou potencialmente livres, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado dão uma coloração amarelo-alaranjado, com uma reação sensível e coloração estável possível de ser lida a 490 nm, diretamente proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. Sendo considerado, portanto, um método simples, rápido, sensível e com resultados reprodutíveis.

Para as análises, os polissacarídeos foram solubilizados em água (1 mg/mL) e homogeneizados. A uma alíquota de 50 μL dessa solução, foram adicionados mais 450 μL de água destilada. Na sequência foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após o resfriamento da amostra, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (490 nm). As análises foram realizadas em triplicata. Para confecção da curva padrão, foi utilizada glicose.

2.5.2 Determinação de Açúcares Redutores

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada segundo o método descrito por Somogyi-Nelson (1944), onde o açúcar aquecido juntamente com uma solução alcalina de tartarato de cobre leva à formação de óxido cuproso, que reagindo com molibdato de arsênio, possibilita a formação de um composto de coloração azul passível de ser quantificada por colorimetria. Quanto mais intensa a cor azul, maior a quantidade de óxido cuproso formado, e este por sua vez, é diretamente proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes na amostra.

Para as análises, alíquotas de 0,5 mL da amostra (1 mg/mL) foram adicionados a tubos de ensaio, seguida da adição de 0,5 mL do reativo de Nelson. Os tubos foram agitados por dois minutos e incubados em banho-maria a 93°C, onde foram mantidos por 20 minutos. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL de

solução arsenomolibdica a cada tubo, seguido de agitação ocasional durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 3,5 ml de água destilada a cada tubo. E procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos com base na curva padrão de gliocse.

2.5.3 Determinação de Proteínas

Para a determinação do conteúdo protéico, foi utilizado o método descrito por Lowry *et al.* (1951) por ser altamente sensível a baixas concentrações de proteínas. Para a curva de calibração, foi utilizada a albumina bovina.

2.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

A determinação da composição monossacarídica foi realizada segundo as etapas descritas por Lima *et al.* (2007). Os polissacarídeos (aproximadamente 2 mg de EPS de cada uma das 12 cepas) foram submetidos à hidrólise ácida total com 0,5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2M, por 2 horas a 120°C (YANG, GRAY e MONTGOMERY, 1999). Após a hidrólise, o ácido foi completamente removido por evaporação utilizando rotaevaporador acoplado a bomba de vácuo. Os monossacarídeos foram reduzidos pela adição de borohidreto de sódio (NaBH₄) e mantidos por 12 horas a temperatura ambiente. O excesso de NaBH₄ foi transformado em ácido bórico abaixando o pH até 5 com adição de ácido acético diluído. O ácido bórico formado foi eliminado por sucessivas destilações com metanol (3-5 vezes). Os alditóis foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético a 120°C, por 1 hora e 30 minutos, e posteriormente, lavados com clorofórmio e bicarbonato de sódio aquoso (WOLFROM e THOMPSON, 1963). Os monossacarídeos na forma de acetatos de alditóis foram extraídos na fase clorofórmica e então analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3.300, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 d.i.) modelo DB-225, acoplado a um espectrômetro de massa da marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800. As injeções foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C e seguida de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C/min, até 230°C, mantendo-se constante. O gás hélio foi usado como gás de arraste.

Os acetatos de alditóis foram identificados pelos tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons, comparados com padrões.

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS EPS

2.7.1 Obtenção das Células de Sarcoma 180 e Erlich

As células tumorais de Sarcoma 180 e Erlich foram obtidas do estoque do Laboratório Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. Estas linhagens são muito utilizadas para experimentos que envolvem atividade antitumoral devido à facilidade de manutenção e manipulação (ZUCKERBERG, 1972; SHIRAI *et al.*, 1991).

Para reativação e proliferação inicial, as células tumorais foram inoculadas via intraperitoneal em camundongos wistar, para formação de ascite. Todo o procedimento de manipulação para o repique *in vivo* foi realizado em condições estéreis. Após a verificação visual de formação de ascite, as células foram retiradas da região intraperitoneal das cobaias e lavadas com 12 mL de PBS (Phosphate-Buffered Saline – tampão fosfato salina) pH 7,4. A suspensão foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos. Este passo foi repetido por até três vezes para eliminar fluido biológico. Em seguida as células foram diluídas em meio RPMI (Himedia, Laboratories Pvt. Ltda. Mumbai – Índia), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas – SP), e mantidas em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO₂ e 95% de ar. Penicilina e estreptomicina (Amresco) foram utilizados como antibiótico. A viabilidade celular foi avaliada por coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer.

2.7.2 Obtenção dos Macrófagos

Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de fêmeas de camundongos Wistar com 20 a 24 dias de idade, por injeção intraperitoneal de 10 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) gelado. Os macrófagos residentes foram recuperados pela lavagem peritoneal, e em seguida a suspensão de células foi transferida para garrafas de cultivo contendo RPMI suplementado. As garrafas foram incubadas por 1 hora em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO₂ e 95% de ar para a adesão dos macrófagos. Em seguida, o meio foi trocado para garantir a pureza das células. A viabilidade celular foi avaliada por coloração com azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer.

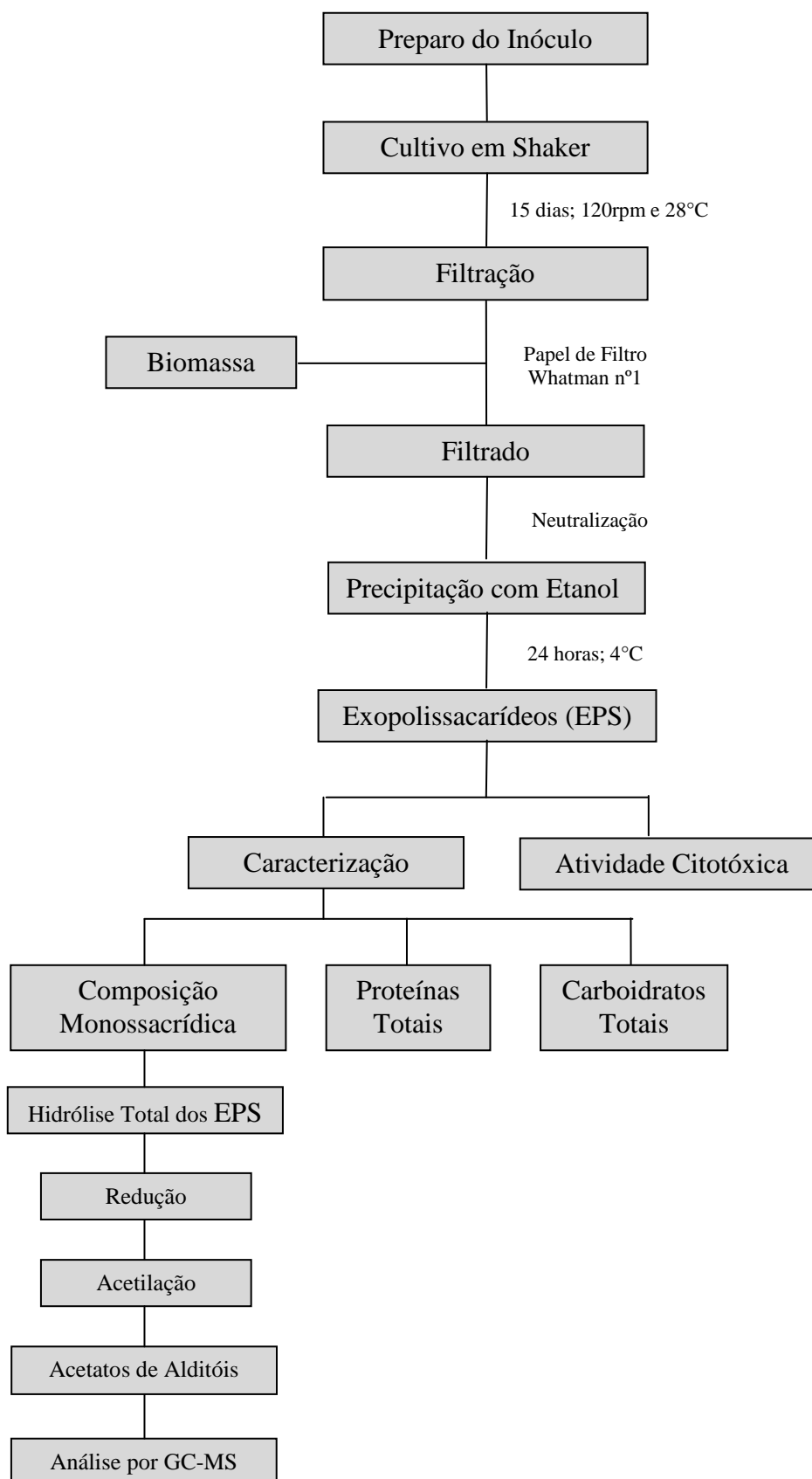
2.7.3 Ensaios de Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, as células tumorais das linhagens Sarcoma 180 e Erlich e as células de macrófagos foram suspensas em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e distribuídas em placas de 96 poços na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço e incubadas a 37°C sob as mesmas condições descritas anteriormente. Ao atingirem 60-70% da confluência (aproximadamente 24 horas), as células foram expostas aos EPS obtidos da fermentação das 12 cepas de basidiomicetos. Os EPS foram diluído em dimetilsulfóxido 10%, veículo utilizado como controle. Foram testadas três diferentes concentrações de EPS: 2 µg/mL; 20 µg/mL e 200 µg/mL, por um período de 48 horas de incubação. Após o tempo de exposição, foram adicionados aos “wells” 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS), e as células incubadas por mais 3 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido, os “wells” lavados 2 vezes com PBS e foram adicionados 200 µL da solução de isopropanol acidificado (0,04 N de HCl). A viabilidade celular foi determinada por absorbância a 560 nm com referência a 655 nm (Mosmann, 1983). Como controle positivo foi utilizado ácido gálico 1%. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, com duplicata dos experimentos.

2.7.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e avaliados pelo teste de Tukey, sendo reportados na forma de média e desvio padrão, considerando o nível de significância de $p \leq 0,01$.

2.8. FLUXOGRAMA



Fluxograma da metodologia desenvolvida no Capítulo I.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Ao final dos 15 dias de cultivo das 12 cepas de basidiomicetos por fermentação submersa, foi observada uma aparente estabilização da biomassa. A fonte de carbono (glucose) de fácil assimilação permitiu uma rápida produção de biomassa, apesar das condições de cultivo não terem sido otimizadas (Figura 9). Em geral, fermentações utilizando meios basais não ultrapassam 15-20 dias, para evitar a lise das células fúngicas (POKHREL et al., 2007; WU et al., 2003). Com exceção da cepa Soccol 3, todas apresentaram um crescimento satisfatório nas condições de cultivo utilizadas. Apesar de não produzir uma quantidade de biomassa comparável às demais espécies, a cepa Soccol 3 causou uma grande modificação na coloração do meio de cultivo, que no final da fermentação apresentava uma coloração de marrom a preta, bastante escura. Quanto aos EPS obtidos das 12 cepas, foram observadas características bastante distintas em relação à coloração e textura.



Figura 9: Cultivo submerso dos fungos *Psilocibe cubensis*, *Lepista sordida*, *Ganoderma applanatum*, *Picnoporus sanguineos*, *Perenniporia martiusii*, *Ganoderma stiptatum*, *Agaricus silvaticus*, *Oudemansiella canarii* e Soccol 3, respectivamente.

Na tabela 5 são apresentados os rendimentos obtidos para produção de EPS. Como pode ser observado, a cepa de *Agaricus silvaticus*, espécie nativa, ainda pouco estudada no que se refere às propriedades biológicas de seus polissacarídeos, apresentou a maior produção de EPS (0,430 g/L). As espécies do gênero *Ganoderma*, quando comparadas com as demais, confirmaram-se como grandes produtoras de EPS. *G. australe*, *G. stiptatum* e *G. applanatum* produziram 0,382, 0,412 e 0,398 g/L, respectivamente. A menor produção concentração de EPS foi obtida no cultivo do fungo *Phallus sp.* (0,142 g/L).

Quando comparado a outros dados da literatura (KIM et al., 2002; MAZIERO et al., 2002), as concentrações de EPS encontradas no presente trabalho são relativamente baixas, o que pode ser explicado pela utilização de um meio de cultivo básico e condições não otimizadas. Apenas procurou-se utilizar uma fonte de carbono que garantisse a produção de biomassa e polissacarídeos. Vários pesquisadores têm demonstrado que glucose é claramente uma boa fonte para produção de exopolissacarídeos por cultivo submerso de cogumelos (POKHREL et al., 2007; NOUR EL-DEIN et al., 2004; XU et al., 2003). Porém vários outros fatores, como por exemplo o tempo de fermentação, influenciam diretamente na produção de metabólitos primários e secundários. Em geral, os picos de produção de polissacarídeos são encontrados em torno do décimo dia de fermentação, podendo decrescer torno do 15º dia, o que pode ser explicado pelo esgotamento da fonte de carbono, e conseqüente consumo de EPS (XIAO et al., 2004).

Não foram encontrados na literatura, trabalhos que descrevessem condições ótimas para produção de EPS para a maioria das cepas testadas, ao contrário de cogumelos como *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e *Pleurotus ostreatus*, entre outros comumente utilizados e difundidos entre os pesquisadores (SHU e CHU, 2007; CUI et al., 2006; SARANGI et al., 2006; KIM et al., 2005; ZHENG et al., 2005; GONZAGA et al., 2005; FAN et al., 2002). Assim, as concentrações encontradas no presente trabalho podem ser aumentadas com a otimização das condições de cultivo, pH inicial, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio adequadas, concentração de nutrientes, assim como o período de duração da fermentação.

Tabela 5: Concentração final de EPS obtida em cada um dos cultivos das 12 cepas de basidiomicetos.

| Espécie | EPS (g/L) | Carb.T (%) | Proteínas (%) |
|-------------------------------|---------------|-------------|---------------|
| <i>Agaricus silvaticus</i> | 0,430 ± 0,023 | 56,7 ± 4,23 | 18,1 ± 1,12 |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 0,219 ± 0,045 | 63,6 ± 0,98 | 12,3 ± 1,54 |
| <i>Ganoderma australe</i> | 0,382 ± 0,031 | 68,0 ± 3,12 | 17,6 ± 2,35 |
| <i>Lepista sordida</i> | 0,345 ± 0,043 | 67,5 ± 2,34 | 10,4 ± 1,79 |
| <i>Oudemansiella canarii</i> | 0,220 ± 0,037 | 34,6 ± 7,32 | 15,3 ± 1,34 |
| <i>Perenniporia martiusii</i> | 0,266 ± 0,028 | 46,2 ± 4,56 | 21,8 ± 2,47 |
| <i>Pleurotus djamor</i> | 0,280 ± 0,049 | 71,3 ± 2,78 | 14,9 ± 1,38 |
| <i>Ganoderma stipitatum</i> | 0,412 ± 0,009 | 58,2 ± 1,24 | 18,7 ± 1,56 |
| Soccol 3 | 0,160 ± 0,014 | 42,3 ± 3,97 | 27,3 ± 2,13 |
| <i>Phallus sp.</i> | 0,142 ± 0,025 | 58,1 ± 2,99 | 22,1 ± 2,27 |
| <i>Psilocibe cubensis</i> | 0,210 ± 0,016 | 60,1 ± 4,55 | 24,3 ± 0,78 |
| <i>Ganoderma applanatum</i> | 0,398 ± 0,011 | 72,3 ± 3,36 | 14,8 ± 1,07 |

Como pode ser observado na tabela 5, os resultados dos testes de determinação da concentração de carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956) e de proteínas totais (Lowry et al., 1951) mostraram uma alta relação de proteínas nos EPS obtidos pela precipitação com etanol. Lima (2008) avaliou dois diferentes métodos de extração para obtenção de EPS de *Agaricus blazei* e observou relações semelhantes de carboidratos:proteínas ao realizar a precipitação com etanol, cerca de 77,5% de carboidratos para 22,5% de proteínas. Os dados encontrados também foram semelhantes aos resultados obtidos por Dong et al. (2002), que obtiveram uma concentração de 21,6% de proteínas e 57,5% de carboidrato no EPS de *A. brasiliensis*. Segundo Lima (2008), realizar uma precipitação prévia com ácido tricloroacético (TCA) favorece a purificação dos EPS, visto que reduziu a quantidade de proteínas precipitantes do meio de cultivo, portanto seria uma alternativa para purificação dos EPS obtidos no presente trabalho.

3.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Como pode ser observado na tabela 6, a determinação da composição monossacarídica dos EPS das 12 cepas mostrou que o açúcar predominante, frente às condições de cultivo utilizadas, foi a manose. Duas exceções foram os EPS dos fungos *G. applanatum* e *L. sordida* que apresentaram uma maior concentração de glucose com

73,7% e 51,9%, seguida por manose, 18,5% e 26,6%, respectivamente, o que indica que seus EPS fazem parte do grupo das glucanas.

Tabela 6: Composição monossacarídica dos EPS produzidos pelas 12 espécies de basidiomicetos utilizados neste trabalho.

| Espécie | Composição Monossacarídica (mol %)* | | | | | | | Tipo de Polissacarídeo |
|-------------------------------|-------------------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|------------------------|
| | Glc | Gal | Man | Xil | Ara | Rib | Fuc | |
| <i>Agaricus silvaticus</i> | 28,8 | 10,0 | 49,2 | 1,1 | 3,8 | 3,1 | 5,1 | Glucomanana |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 25,6 | 7,1 | 47,1 | 10,0 | 0,1 | 1,9 | 7,3 | Glucomanana |
| <i>Ganoderma australe</i> | 12,5 | 11,6 | 73,9 | 0,1 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | Galactoglucomanana |
| <i>Lepista sordida</i> | 51,9 | 7,6 | 26,6 | 0,9 | 4,5 | 4,5 | 8,4 | Manoglucana |
| <i>Oudemansiella canarii</i> | 19,9 | 14,9 | 56,1 | 2,1 | 0,8 | 0,7 | 6,1 | Glucomanana |
| <i>Perenniporia martiusii</i> | 4,7 | 24,3 | 68,3 | 0,3 | 0,1 | 2,3 | - | Galactomanana |
| <i>Pleurotus djamor</i> | 12,1 | 4,2 | 79,0 | 0,5 | 0,4 | 3,7 | - | Glucomanana |
| <i>Ganoderma stiptatum</i> | 8,1 | 16,2 | 64,5 | 1,8 | 2,3 | 2,3 | 6,9 | Galactomanana |
| Soccol 3 | 3,5 | 24,7 | 70,6 | 0,6 | - | - | - | Galactomanana |
| <i>Phallus sp.</i> | 5,1 | 36,7 | 56,9 | - | - | - | - | Galactomanana |
| <i>Psilocibe cubensis</i> | 11,9 | 6, | 75,3 | 0,3 | 3,3 | 3,3 | 0,3 | Glucomanana |
| <i>Ganoderma applanatum</i> | 73,7 | 1,5 | 18,5 | 2,3 | - | - | 1,3 | Manoglucana |

* Monossacarídeos quantificados em GC-MS em moles % na forma de acetatos de alditóis após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Os EPS dos fungos *A. silvaticus*, *P. sanguineos*, *G. australe*, *O. canarii*, *P. djamor*, e *P. cubensis* apresentaram composição típica das glucomananas com maiores concentrações de manose, seguido por glucose. Enquanto, *P. martiusii*, *G. stiptatum*, Soccol 3 e *Phallus sp.* apresentaram EPS com maiores concentrações de manose, seguido por galactose, tipicamente galactomananas. Na maioria das espécies também foram identificados outros monossacarídeos (xilose, arabinose, ribose e fucose) sempre em percentagens menores a 10%.

3.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS EPS

A atividade antitumoral dos polissacarídeos era comumente atribuída ao mecanismo de estimulação de resposta imune mediada (OOI e LIU, 2000). Por exemplo, polissacarídeos produzidos por *Panax ginseng*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, entre outros, apresentaram atividade imunoestimulatória, o que sugeria que este fosse o principal mecanismo da atividade antitumoral dos polissacarídeos (CAO et al., 2006; CAO e LIN, 2004). Porém alguns polissacarídeos, como polissacarídeos isolados de *Phellinus linteus* (LI et al., 2004) e *Cordyceps sinensis* (CHEN et al., 1997), inibiram diretamente a proliferação de células cancerosas *in vitro*. Também tem sido reportado que polissacarídeos de diferentes cepas têm diferentes atividades antitumorais *in vitro*, dependendo da sua composição monossacarídica, conteúdo de proteínas, massa molecular e conformação estrutural (CUI et al., 2006; JIN et al., 2003).

No presente trabalho foi avaliada a atividade antitumoral *in vitro* dos EPS produzidos pelas 12 espécies de basidiomicetos contra células tumorais de Sarcoma 180 e Ehrlich. De acordo com a porcentagem de inibição *in vitro* das células de Ehrlich, frente aos diferentes EPS em diferentes concentrações (2, 20 e 200 µg/mL), todos, com exceção dos EPS de *A. silvaticus* e *G. australe*, apresentaram forte atividade inibitória em todas as concentrações testadas. Não foi observada uma relação dose-resposta, entre a concentração dos EPS e a citotoxicidade contra as células de tumor de Ehrlich (Figura 10), o que foi confirmado através das análises estatísticas, utilizando o teste de Tukey com limite de probabilidade de 5% (Tabela 7). Em especial, os EPS obtidos de seis espécies de basidiomicetos apresentaram forte atividade antitumoral, inibindo em mais de 70% o crescimento das células tumorais na maior concentração testada (200 µg/mL), o que sugere que eles apresentam potencial para investigação de novos agentes quimioterápicos contra este tipo de tumor. Nenhum efeito antiproliferativo foi observado diante da exposição das células tumorais aos EPS de *A. silvaticus* e *G. australe*, significando que eles não apresentaram citotoxicidade direta sobre as células de Ehrlich. Foi utilizado como controle positivo, o ácido gálico 1%, que inibiu em 92,87% o crescimento das células tumorais.

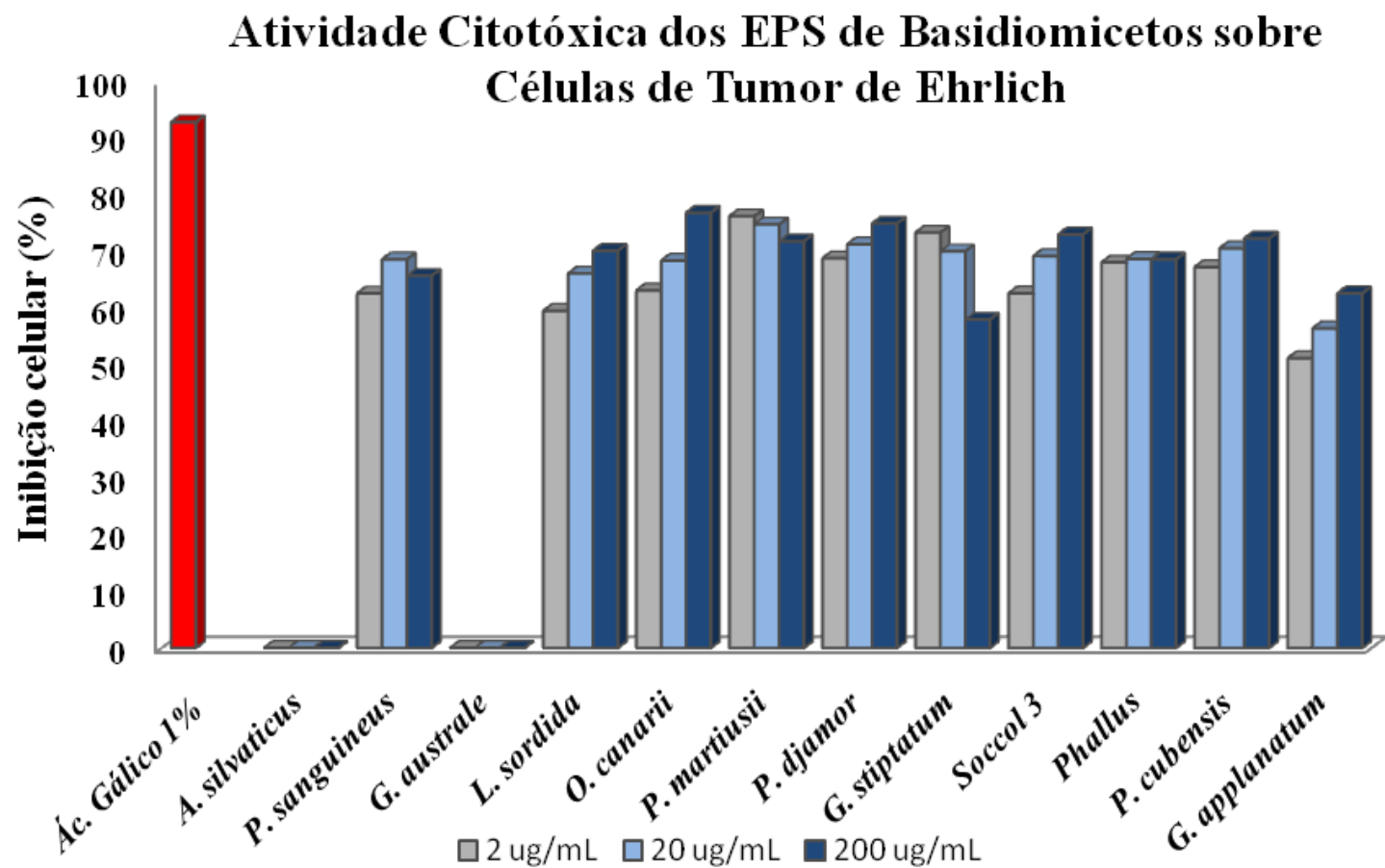


Figura 10: Porcentagem de inibição das células tumorais de Ehrlich frente a diferentes concentrações dos EPS das 12 espécies de basidiomicetos.

Na figura 11 são apresentados os dados de citotoxicidade dos EPS, utilizando as concentrações já descritas (2, 20 e 200 $\mu\text{g/mL}$), sobre células de Sarcoma 180. Vários trabalhos têm comprovado a atividade antitumoral de polissacarídeos de cogumelos utilizando essa linhagem de células tumorais (HUNG et al, 2007). Como pode ser visualizado na figura 11, ao contrário do que se viu com as células de Ehrlich, foi detectado um efeito dose-resposta entre a concentração da maioria dos EPS e a porcentagem de inibição das células tumorais. Em especial, esse efeito foi observado com os EPS de *Agaricus silvaticus*, *Perenniporia martiusii* e *Ganoderma applanatum* que tiveram suas atividades aumentadas de 31,54-80,84%, 13,08-72,90% e 9,34-69,94%, respectivamente, quando a concentração passou de 2 $\mu\text{g/mL}$ para a concentração máxima testada, 200 $\mu\text{g/mL}$.

Na tabela 7 são apresentados os dados referentes às análises estatísticas dos resultados de atividade antitumoral do EPS sobre as células de Sarcoma 180 e Ehrlich. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão das triplicatas, com $n=3$. Através do teste de Tukey ($P < 0,05$), foram comparadas as atividades das diferentes concentrações de um mesmo EPS e as atividades dos 12 diferentes EPS numa mesma concentração (2, 20 ou 200 $\mu\text{g/mL}$).

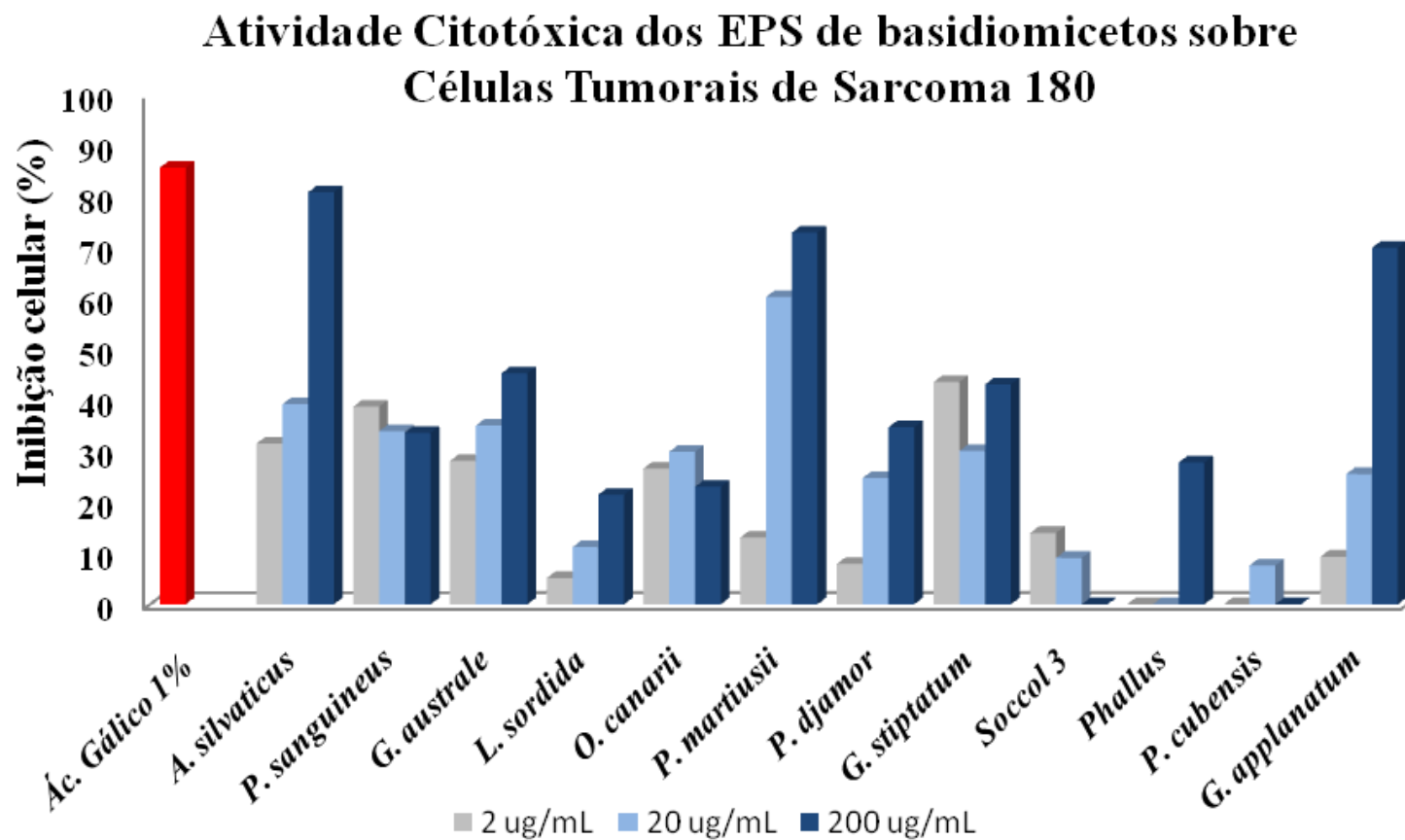


Figura 11: Porcentagem de inibição das células tumorais de Sarcoma 180 frente a diferentes concentrações de EPS das 12 espécies de basidiomicetos.

Tabela 7: Atividade antitumoral *in vitro* dos EPS das 12 espécies de basidiomicetos contra células tumorais de Sarcoma 180 e Ehrlich.

| Espécie | Conc. EPS (µg/mL) | INIBIÇÃO (%) | |
|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | Sarcoma 180 | Ehrlich |
| <i>A. silvaticus</i> | 2 | *B 31,54±4,295 abc** | - |
| | 20 | B 39,25±4,703 b*** | - |
| | 200 | A 80,84±0,539 a**** | - |
| <i>P. sanguineus</i> | 2 | A 38,78±6,128 ab | A 62,57±4,003 bc |
| | 20 | A 33,96±12,645 b | A 68,56±2,517 ab |
| | 200 | A 33,64±3,304 bc | A 65,67±12,443 abcd |
| <i>G. australe</i> | 2 | A 28,13±12,152 bc | - |
| | 20 | A 35,05±4,602 b | - |
| | 200 | A 45,33±1,321 b | - |
| <i>L. sordida</i> | 2 | B 5,15±0,971 c | B 59,48±7,947 cd |
| | 20 | AB 11,21±0,660 cd | AB 66,08±2,328 ab |
| | 200 | A 21,49±12,61 c | A 70,10±4,243 abc |
| <i>O. canarii</i> | 2 | A 26,63±9,712 bc | B 63,09±10,632 bc |
| | 20 | A 29,91±3,992 bc | AB 68,35±9,665 ab |
| | 200 | A 23,05±8,389 bc | A 76,80±1,601 a |
| <i>P. martiusii</i> | 2 | B 13,08±4,602 c | A 76,19±2,998 a |
| | 20 | A 60,28±5,203 a | A 74,74±2,157 a |
| | 200 | A 72,90±5,607 a | A 71,75±5,678 ab |
| <i>P. djamor</i> | 2 | B 7,94±5,286 c | B 68,76±4,507 abc |
| | 20 | AB 24,77±6,608 bcd | AB 71,24±2,674 ab |
| | 200 | A 34,73±5,842 bc | A 74,89±2,572 a |
| <i>G. stiptatum</i> | 2 | A 43,61±2,573 ab | A 73,30±4,092 ab |
| | 20 | B 30,06±4,240 bc | A 70,00±3,336 ab |
| | 200 | A 43,15±0,972 b | B 57,94±9,920 cde |
| Soccol 3 | 2 | A 14,01±12,556 c | B 62,58±6,244 bc |
| | 20 | A 9,11±6,278 cd | AB 69,17±3,329 ab |
| | 200 | - | A 72,99±3,683 a |
| <i>Phallus sp.</i> | 2 | - | A 68,04±2,400 abc |
| | 20 | - | A 68,66±1,957 ab |
| | 200 | 27,80±8,260 bc | A 68,56±8,421 abcd |
| <i>P. cubensis</i> | 2 | - | A 67,21±2,314 ab |
| | 20 | 7,63±5,456 d | A 70,51±2,057 ab |
| | 200 | - | A 72,27±3,699 bcd |
| <i>G. applanatum</i> | 2 | C 9,34±2,643 c | A 51,13±9,487 d |
| | 20 | B 25,54±7,091 bcd | A 56,39±2,920 c |
| | 200 | A 69,94±1,888 a | A 62,58±6,305 bcd |

* Concentrações diferentes de um mesmo EPS, seguidas por diferentes letras em maiúsculo (ABC) são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com um limite de probabilidade de 5%.

** Atividades de diferentes EPS na concentração de 2 µg/mL, seguidas por diferentes letras vermelhas em minúsculo (abcd) são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com um limite de probabilidade de 5%.

*** Atividades de diferentes EPS na concentração de 20 µg/mL, seguidas por diferentes letras verdes em minúsculo (abcde) são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com um limite de probabilidade de 5%.

**** Atividades de diferentes EPS na concentração de 200 µg/mL, seguidas por diferentes letras em minúsculo (abcd) são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com um limite de probabilidade de 5%.

Como pode ser observado na tabela 7, as atividades encontradas nos ensaios com tumor de Ehrlich não se mostraram muito diferentes ao nível de 5% de significância (Teste Tukey), tanto quando comparadas diferentes concentrações de um mesmo EPS, como quando comparados os 12 diferentes EPS numa mesma concentração. Ao contrário, quando utilizadas as células de Sarcoma 180, foi possível confirmar o efeito dose-resposta dos EPS das espécies que inicialmente mostraram esse perfil, comparando-se as atividades geradas por diferentes concentrações de um mesmo EPS através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). As atividades dos EPS também se mostraram bastante diferentes quando comparados os 12 EPS em uma mesma concentração, perfil observado nas três diferentes concentrações.

No presente trabalho, também foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* dos EPS sobre células de macrófagos peritoniais de camundongos. Os macrófagos, que fazem parte da resposta imune inata, desempenham um papel extremamente importante e essencial na proteção do corpo humano frente a qualquer tipo de células invasoras, inclusive células tumorais (SARANGI et al., 2006; KURASHIGE et al., 1997). Devido ao fato das células cancerosas originarem-se a partir de células normais, que passam a se reproduzir de forma descontrolada, torna-se necessária a seleção de um novo agente antitumoral capaz de selecionar e destruir apenas as células defeituosas sem afetar as células normais. Na figura 12, são apresentados os resultados obtidos dos ensaios com macrófagos. Como pode ser visto, foi observada uma citotoxicidade de até 55% quando as células foram incubadas junto ao EPS obtido do cogumelo *Picnoporus sanguineus*, na concentração de 200 µg/mL. As espécies *A. silvaticus*, *P. martiusii* e *G. applanatum*, que se mostraram promissoras nos resultados com as células de Sarcoma 180, apresentaram 25,52%, 27,10% e 23,84%, respectivamente, de citotoxicidade direta sobre os macrófagos na concentração de 200µg/mL. Estes polissacarídeos mostraram-se potentes antitumorais, apresentando uma alta seletividade entre as células suspensas (tumorais) e as células aderidas (macrófagos). Resultados semelhantes foram

observados por Huang et al. (2007), que ao avaliar a atividade antitumoral de polissacarídeos do micélio de *Poria cocos* chegou a 81% de inibição das células de Sarcoma 180, obtendo uma baixa citotoxicidade sobre células de macrófagos humanos (MCF-7).

Está bem documentado que polissacarídeos podem se ligar a receptores presentes na membrana dos macrófagos e iniciar o processo de ativação dessas células (TAYLOR et al., 2002). A maioria dos polissacarídeos isolados de cogumelos que apresentam atividades antitumorais e imunomodulatórias apresentam grandes concentrações de glucose (KWEON et al., 1999) e manose (YANG et al., 2007; CHO et al., 1994; YAMADA et al., 1985), em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho. Estes polissacarídeos têm sido reportados por apresentar atividades imunoestimulantes, incluindo ativação de macrófagos, células natural *killer*, e neutrófilos, *in vitro* e aumentar a resistência contra infecções e tumores, *in vivo* (WASSER, 2002; SONG et al., 1998).

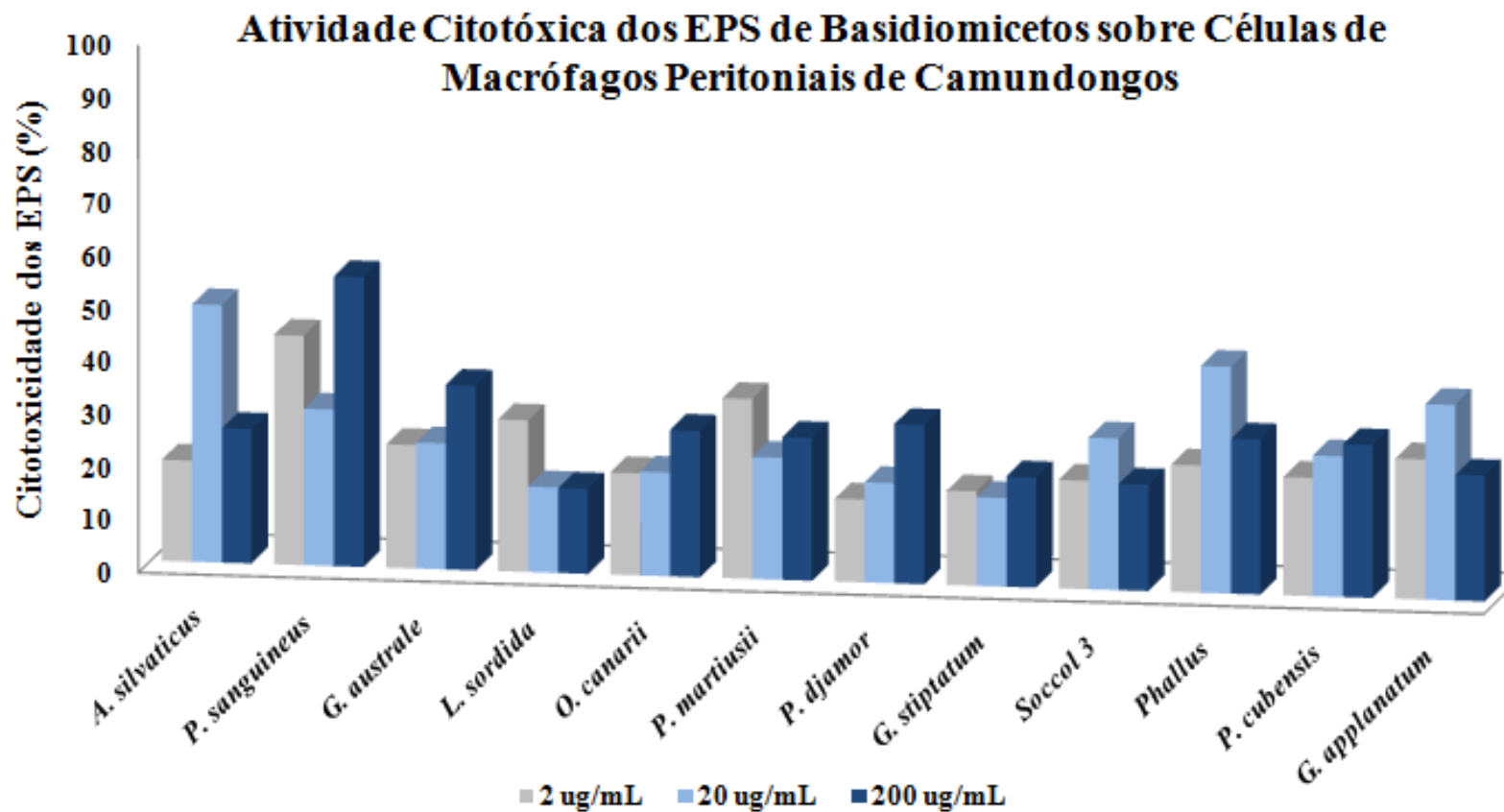


Figura 12: Percentagem de citotoxicidade dos EPS das 12 cepas de basidiomicetos sobre macrófagos peritoniais de camundongos.

4. CONCLUSÕES

- Dentre as 12 cepas de basidiomicetos cultivadas por fermentação submersa, as espécies pertencentes ao gênero *Ganoderma* e *Lepista Sordida* produziram maior quantidade de exopolissacarídeos.
- Os exopolissacarídeos isolados do cultivo de *A. silvaticus*, *P. martiusii* e *Ganoderma applanatum* apresentaram maior atividade inibitória sobre o crescimento das células tumorais de Sarcoma 180, concomitante à reduzida atividade citotóxica sobre as células de macrófagos peritoniais.
- Estes resultados demonstram o potencial destas espécies de basidiomicetos como fonte de novas moléculas com atividade antitumoral.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS E HIDROALCOÓLICOS DE BASIOMICIETOS CULTIVADOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

1. INTRODUÇÃO

Os processos oxidativos são essenciais para a grande maioria dos organismos, como forma de produzir a energia necessária para a manutenção dos diversos processos biológicos envolvidos na manutenção da vida. No entanto, durante os processos de oxidação, são formados os chamados radicais livres e a sua acumulação excessiva pode estar associada a muitas doenças e processos degenerativos relacionados ao envelhecimento (ASSUNÇÃO et al., 2009). Os radicais livres são moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. Eles podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997). Além das fontes endógenas, como a própria respiração celular, os radicais livres podem ser resultado de fontes exógenas como a exposição a poluentes, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Entre as principais formas reativas de oxigênio têm-se o radical superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, que apesar de não ser um radical livre verdadeiro, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996). Quase todos os organismos estão naturalmente protegidos contra os danos causados por esses radicais graças à ação de algumas enzimas oxidativas, como a superóxido desmutase e a catalase, além de compostos químicos como ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides, polifenóis e glutathione (MAU, LIN e SONG, 2002; NIKI, SHIMASKI e MINO, 1994). Porém, a presença destes compostos de defesa e outros mecanismos de reparo são insuficientes para prevenir todos os prejuízos causados por esses radicais (SIMIC, 1988). O nosso sistema antioxidante não é perfeito, então, com a idade, as células são danificadas pelo acúmulo de oxidação.

Os danos induzidos pelos radicais livres podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e ácidos nucleicos. Entre as doenças associadas ao excesso de radicais livres estão incluídos diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, arterioscleroses, diabetes, asma, hepatites, cirroses, deficiências imunológicas e o próprio envelhecimento (LEE, MITCHELL e SHIBAMOTO, 2000; MIDDLETON, KANDASWAMY e THEOHARIDES, 2000; PIETRA, SIMONETTI e MAURI, 1998). A oxidação é

também um dos mais importantes processos de deterioração dos alimentos, uma vez que isso pode afetar a cor, sabor, textura e segurança alimentar dos consumidores. Assim, existe a necessidade permanente de inativar estes radicais livres, através de suplementos antioxidantes ou alimentos contendo antioxidantes.

Para garantir a estabilização dos alimentos, alguns antioxidantes sintéticos têm sido utilizados, entre os quais se destacam BHA, BHT e TBHQ, que são aplicados em óleo e gorduras para prevenir sua oxidação (LOLIGER, 1991). Entretanto, BHA e BHT têm sido considerados como agentes carcinogênicos após experimentos com animais (BOTTERWECK et al., 2000). A conseqüente restrição ao uso desses antioxidantes sintéticos tem causado um aumento no interesse pela busca de substâncias naturais com capacidade antioxidante (BARROS et al., 2007).

Entre os antioxidantes naturais encontrados nos alimentos, especialmente nos vegetais, estão os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), carotenóides, tocoferol e ácido ascórbico (ELMASTASA et al., 2007; CAZZI et al., 1997). Os cogumelos, reconhecidos pelo seu alto valor nutricional e importância na prevenção de doenças, são ricas fontes desses compostos (BARROS et al., 2007; VALENTÃO et al., 2005). Recentemente, vários pesquisadores têm reportado que os cogumelos apresentam forte atividade antioxidante e capacidade de inativação de radicais livres (LEE et al., 2003; MAU, et al., 2002; YANG et al., 2002; YEN e WU, 1999). Componentes como polissacarídeos, triterpenóides e esteróides com efeitos antioxidantes têm sido isolados de cogumelos medicinais (LEE et al., 2002; LIU et al., 1997). Compostos fenólicos isolados de cogumelos apresentaram atividade antioxidante, inibindo a oxidação do LDL (TEISSENDRE e LANDRAULT, 2000). Alguns cogumelos, amplamente consumidos na Ásia, têm sido relatados potenciais antioxidantes, devido ao seu conteúdo total de compostos fenólicos (CHEUNG et al., 2003). Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de compostos não-essenciais na dieta humana que têm sido associados com a inibição de arteriosclerose e câncer (WILLIAMS e IATROPOULOS, 1997). A bioatividade desses compostos pode ser devida à sua habilidade quelante de metais, inibição da lipoxigenase e inativação de radicais livres (DECKER, 1997).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, por diferentes métodos, a atividade antioxidante dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de doze espécies de basidiomets isolados no estado do Paraná e cultivados por fermentação submersa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram utilizadas neste trabalho as doze cepas de basideomicetos apresentadas na Tabela 3 (Capítulo I, item 2.1). A fermentação ocorreu nas mesmas condições descritas no item 2.3 (Capítulo I), utilizando o mesmo meio de cultivo, pelo mesmo período de incubação.

Ao final do cultivo, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração com papel Whatman n° 1, em bomba à vácuo. Os sobrenadantes dos cultivos foram concentrados até pelo menos 1/3 do volume inicial, utilizando estufa a vácuo por aproximadamente 6-12 h a 45°C, e posteriormente liofilizados (Filtrados). A biomassa úmida foi pesada e submetida à extração com álcool etílico (1:3 p/v), a 30°C, 120 rpm por 24 horas. A biomassa foi novamente separada por filtração e passou por uma segunda extração com etanol. O filtrado hidroalcoólico obtido das duas extrações foi concentrado em evaporador rotativo a temperatura de 50°C para remoção do solvente, e em seguida liofilizado (Extratos Hidroalcoólicos).

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.2.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno – Ácido Linoléico)

A atividade antioxidante dos extratos e filtrados foi determinada pelo método do conjugado β -caroteno – ácido linoléico (MILLER, 1971), com algumas modificações descritas por Shon (2003). Primeiramente, 0,2 mg de β -caroteno foram dissolvidos em 1,0 mL de clorofórmio. Na sequência, 0,02 mL de ácido linoléico e 0,2 mL de Tween-80 foram adicionados, a mistura foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente por 15 min. Após esse período, o clorofórmio foi evaporado totalmente e 50 mL de água destilada saturada com oxigênio foram adicionados e misturados vigorosamente para a formação da emulsão β -caroteno – ácido linoléico. Alíquotas de 1,0 mL desta emulsão foram transferidos para tubos contendo 50 μ L dos diferentes extratos e filtrados, numa concentração de 2 mg/mL. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 50°C por 2 horas. A absorbância foi lida em 490 nm. Como padrões, foram utilizados

BHA (sintético) e α -tocoferol (natural) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Um branco com água destilada também foi preparado. Todos os testes foram realizados em triplicata. A capacidade antioxidante foi calculada através da seguinte equação:

$$I (\%) = A_0/A_1 \times 100$$

Onde,

I: Inibição da peroxidação lipídica

A_0 : Absorbância do controle sem amostra (Branco)

A_1 : Absorbância na presença das amostras

2.2.2 Poder Redutor

O poder redutor dos extratos e filtrados foi determinado pelo método de Oyaizu (1986) como descrito por Shu (2008). Alíquotas de 500 μL dos extratos e filtrados (2 mg/mL) foram misturadas em 500 μL de tampão fosfato de sódio (200 mM , pH 6,6) e 500 μL de ferrocianeto de potássio 1%. A mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos, e posteriormente, foram adicionados 500 μL de ácido trifluoroacético (10% w/v), seguido de centrifugação a 650 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (1,0 mL) foi recuperado e misturado com 1,0 mL de água deionizada e 0,2 mL de cloreto férrico (0,1%). A absorbância foi medida em 700 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Maiores valores de absorbância indicaram maior poder redutor.

2.2.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres

A atividade antioxidante dos extratos e filtrados foi avaliada quanto à capacidade de doação de hidrogênios, ou seja, inativação de radicais livres, através do método do radical estável DPPH (*α, α -diphenyl- β -picrylhydrazil*) de Cheung e Ooi (2003), com algumas modificações descritas por Choi et al. (2006). Alíquotas de 0,8 mL de uma solução de DPPH 0,004% em metanol foram misturadas com 0,2 mL de extrato ou filtrado (2 mg/mL). A mistura foi vigorosamente agitada e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. A Absorbância foi lida em 517 nm. Como controle foi utilizado BHA e água destilada (branco). A capacidade de inativação do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$I (\%) = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

Onde,

I : Inativação do radical DPPH

A₀: Absorbância do controle sem amostra (Branco)

A₁: Absorbância na presença das amostras

2.2.4 Inativação do Ânion Superóxido

A capacidade de inativação de ânions superóxido foi determinada pelo método de Nishikimi et al. (1972), como descrita por Shu e Lung (2008). A reação ocorreu com a mistura de 1,0 mL de extrato ou filtrado (2mg/mL), 60 µM de PMS (*phenazine methosulfate*), 468 µM de NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*), e 150 µM de NBT (*nitroblue tetrazolium*) em um volume de 3,0 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). A reação ocorreu a temperatura ambiente, por 5 minutos. A absorbância foi medida em 560 nm, contra um branco (água destilada). Foram utilizados como controle BHA, BHT e α-tocoferol (100 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicadas.

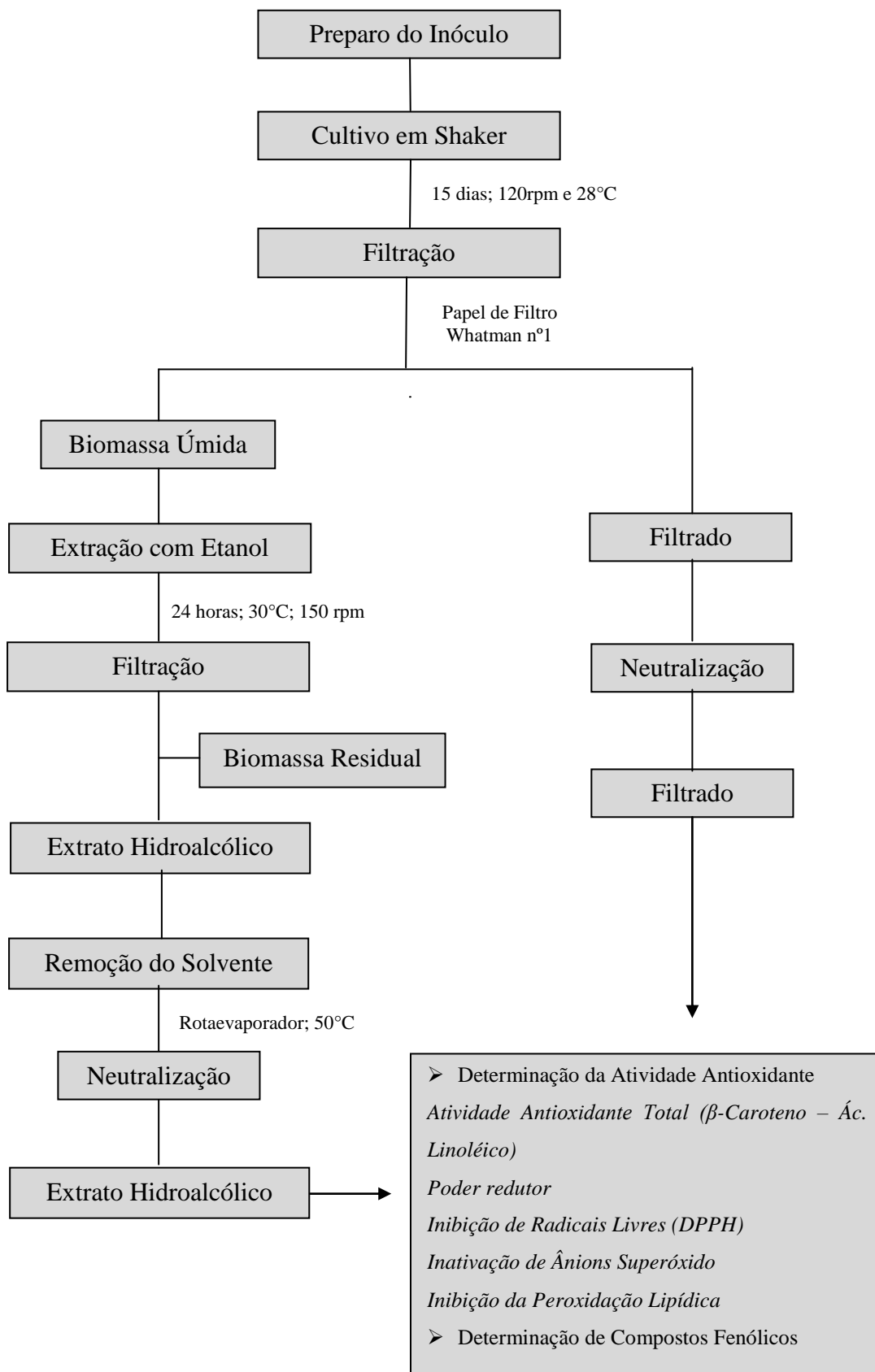
2.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O total de compostos fenólicos solúveis presentes nos diferentes extratos e filtrados foi determinado de acordo com o método descrito por Singleton e Rossi (1965), usando ácido gálico como padrão. Para tal, uma amostra de extrato ou filtrado (2 mg) foi adicionada de água destilada para um volume final de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi mantida por uma hora à temperatura ambiente, no escuro. A absorbância foi medida em 725 nm contra um branco (água destilada). A concentração de compostos fenólicos totais presentes nas amostras, determinada em microgramas equivalentes de ácido gálico, foi obtida pela equação da curva padrão de ácido gálico, como descrita a seguir:

$$\text{Abs.} = 0,0003 \mu\text{g de ácido gálico} + 0,0514$$

$$(R^2 = 0,9922)$$

2.4 FLUXOGRAMA



Fluxograma da metodologia desenvolvida no Capítulo II.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

3.1.1 Atividade Antioxidante Total (β -caroteno – Ácido linoléico)

A figura 13 mostra a atividade antioxidante do filtrado e dos extratos hidroalcoólicos, obtidos dos micélios das doze cepas de basidiomicetos, pelo método do conjugado β -caroteno – ácido linoléico. Os radicais livres formados pelo ácido linoléico atacam a estrutura altamente insaturada do β -caroteno, e a presença de diferentes agentes antioxidantes podem impedir a até certo ponto a oxidação do β -caroteno, neutralizando os radicais do linoleato e outros radicais livres presentes no sistema. A absorbância decresce rapidamente nas amostras sem antioxidantes, enquanto naquelas onde os agentes antioxidantes estão presentes a cor permanece por um longo tempo. Os controles positivos BHA e α -tocoferol utilizados neste teste apresentaram, respectivamente, 93% e 97% de atividade antioxidante na concentração de 100 μ g/mL.

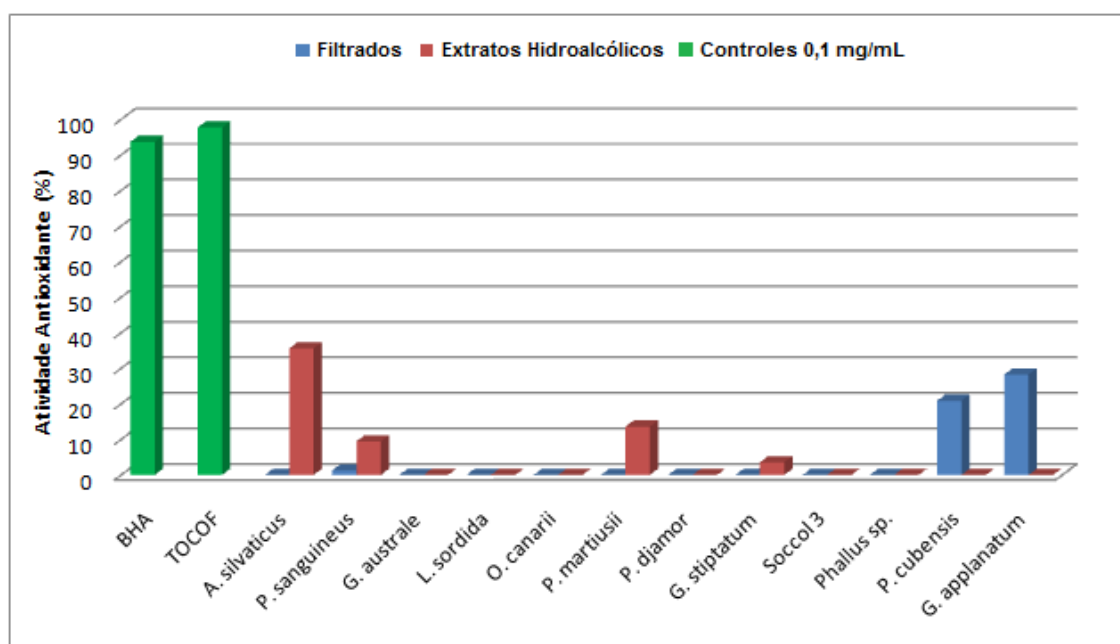


Figura 13: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método do conjugado B-caroteno - Ácido linoléico.

Os filtrados obtidos do cultivo dos fungos *Ganoderma applanatum*, *Psilocibe cubensis* e *Picnoporus sanguineos*, na concentração de 200 µg/mL, inibiram em 29%, 21% e 2% a oxidação do β-caroteno pelos radicais livres presentes no sistema, respectivamente (Figura 13). Os extratos hidroalcoólicos do micélio de *Agaricus silvaticus*, *Picnoporus sanguineos*, *Perenniporia martiusii* e *Ganoderma stiptatum* apresentaram, respectivamente, 36%, 10%, 14% e 4% de atividade antioxidante na concentração de 200 µg/mL (Figura 13).

Trabalhos anteriores mostram, que utilizando o método do conjugado β-caroteno-ácido linoléico, a atividade antioxidante de vários extratos de cogumelos aumenta com o aumento da concentração (LEE et al., 2007; MAU et al., 2006; MAU et al., 2005; HUANG, 2003). Lee et al. (2007) avaliou a atividade antioxidante de diferentes extratos (etanólico e aquosos) do fungo *Hypsizigus marmoreus* numa concentração de 5mg/mL e encontrou valores moderados de atividade (56% extrato etanólico e 38% extrato aquoso obtido por extração a quente), aumentando a concentração dos extratos para 10-20 mg/mL conseguiu valores de atividade considerados elevados (85 % a 95%). Extratos etanólicos de *P. citrinopileatus* exibiram moderada atividade (69%) a 5 mg/mL, e moderada a alta atividade antioxidante (71% a 87%) nas concentrações de 10-20 mg/mL (HUANG, 2003). *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ferulae* e *Pleurotus ostreatus* mostraram atividades moderadas (60%, 64%, 54% e 58%) na concentração de 5 mg/mL e moderadas a altas atividades (74-84%, 73-84%, 64-79% e 68-75%, respectivamente) nas concentrações de 10-20 mg/mL (LO, 2005). Quando comparadas às atividades encontradas na literatura, as atividades obtidas no presente trabalho tornam-se promissoras, uma vez que a concentração testada (0,2 mg/mL) foi muito inferior às concentrações citadas (de 5 a 20 mg/mL).

3.1.2 Poder Redutor

Como pode ser observado na figura 15, o filtrado dos cogumelos testados apresentaram um poder redutor apreciável e comparável aos controles utilizados neste teste. Neste ensaio, a cor amarela da solução teste muda para vários tons de verde a azul, dependendo do poder redutor dos compostos presentes. A presença de agentes redutores causa a conversão do complexo Fe^{3+} /ferrocianide a forma ferrosa (Fe^{2+}), o que gera a coloração azulada. Desta forma, ao medir a intensidade da cor azul a 700 nm, é

possível determinar a concentração de Fe^{2+} , ou seja, quanto maior a absorbância maior o poder redutor da amostra. BHA e α -tocoferol apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de poder redutor, 1,167 e 1,160. O filtrado dos fungos *P. martiusii*, *Phallus sp.*, *G. applanatum* e *L. sordida* apresentaram as seguintes valores de poder redutor, respectivamente: 1,116; 1,017; 1,019 e 1,016. O que mostra um poder redutor muito próximo ao dos agentes sintéticos comumente utilizados. O filtrado de *Agaricus silvaticus* apresentou o menor valor de absorbância, 0,734, portanto, menor poder redutor (Figura 14).

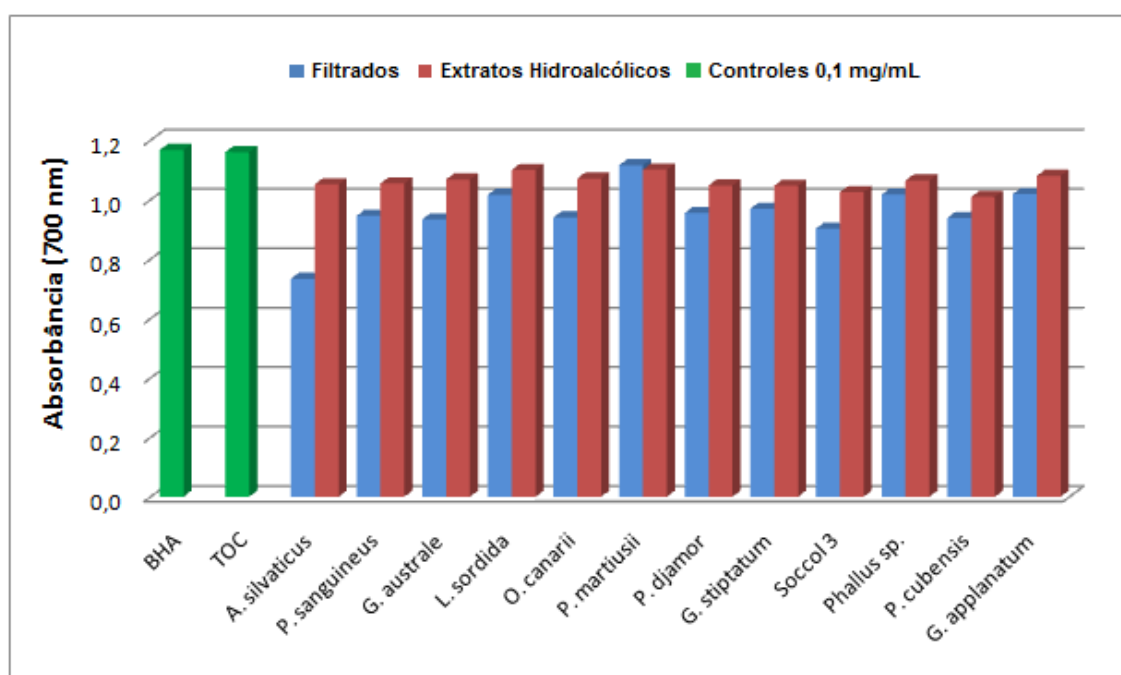


Figura 14: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método do poder redutor.

Os extratos hidroalcoólicos mostraram um maior poder redutor quando comparados aos filtrados, o que pode ser evidenciado, também, na figura 14. Entre os valores de absorbância observados, os maiores foram na presença dos extratos hidroalcoólicos obtidos dos fungos *P. martiusii* (1,101), *Lepista sordida* (1,100) e *G. applanatum* (1,080). O extrato hidroalcoólico do fungo *P. cubensis* apresentou o menor poder redutor (1,009). Mas ainda assim, considerado promissor quando comparado aos dados encontrados na literatura. Huang (2003), ao avaliar o capacidade redutora de extratos etanólicos do fungo *P. citrinopileatus*, encontrou um valor de poder redutor de

1,03 na concentração de 5 mg/mL. Enquanto *A. bisporus*, *P. eryngii*, *P. ferulae* e *P. ostreatus* mostraram um poder redutor de 0,76, 0,75, 0,70 e 0,61 na concentração de 20 mg/mL, respectivamente (LO, 2005).

3.1.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres

Entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas *in vivo*, estão incluídos os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. O peróxido de hidrogênio e radicais superóxido podem interagir com alguns íons de metais de transição para formar uma espécie de oxigênio altamente reativa, o radical hidroxila (SOARES, et al., 2009; HALLIWELL, 1991). Os agentes antioxidantes presentes nos extratos reagem com o radical livre estável DPPH (cor violeta intensa) e convertem esse radical a *1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine*, levando a uma perda da coloração violeta. BHA e α -tocoferol, ambos na concentração de 100 μ g/mL, apresentaram uma atividade inibitória de radicais livres de 83% e 24%, respectivamente. O α -tocoferol, vitamina E, é um antioxidante natural, e sua principal forma de ação no organismo é inibindo a peroxidação lipídica, o que justifica a sua baixa atividade inibitória de radicais livres, quando comparado ao padrão sintético BHA.

Como pode ser visto na figura 15, que mostra a porcentagem de atividade dos filtrados quanto à capacidade de inibição de radicais livres, a cepa ainda não identificada taxonomicamente, genericamente nomeada Soccol 3, isolada na região de Maringá, destacou-se com uma atividade inibitória de 63%, seguida pelos fungos *P. matiusii* e *G. australe*, com atividades de 31% e 19%, respectivamente. Como pode ser observado na mesma figura (15), os extratos hidroalcoólicos, obtidos a partir da micélio, novamente apresentaram melhores resultados, quando comparados com aos filtrados. Entre os extratos testados, destacaram-se *P. cubensis*, *G. applanatum* e *A. silvaticus*, com 66%, 52% e 43% de atividade, respectivamente. O fungo *P. sanguineus* foi a única espécie a não apresentar atividade alguma.

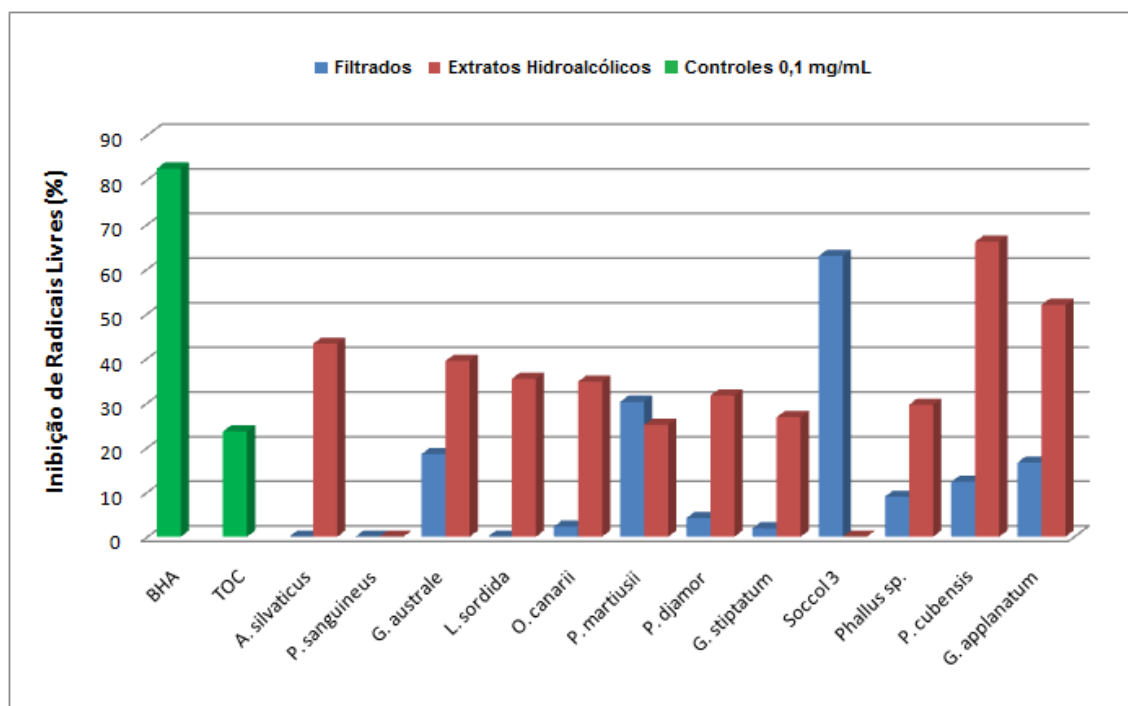


Figura 15: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pelo método de inibição de radicais livres - DPPH.

Obviamente, os extratos que mostraram as mais eficientes atividades inibidoras apresentam compostos antioxidantes, capazes de reagir rapidamente com os radicais DPPH, reduzindo o maior número possível dessas moléculas (TSAI et al., 2007; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Ribeiro et al. (2008) avaliou os potenciais antioxidantes de diferentes fontes (micélio, filtrado e corpo de frutificação) de vários cogumelos pelo método do radical estável DPPH e concluiu que os efeitos estão diretamente relacionados à concentração utilizada, dose-dependentes. Tsai et al. (2007) mostrou que a capacidade de inativação de radicais livres DPPH de três extratos etanólicos aumentava nitidamente de 15,7%, 9,74% e 21% para 94,9%, 89,2% e 88,8% aumentando-se as concentrações de 0,5 mg/mL para 5,0 mg/mL para os cogumelos *A. blazei*, *A. cylindracea*, e *B. edulis*, respectivamente. Turkoglu et al. (2007) testou diferentes concentrações do extrato alcoólico do cogumelo *Laetiporus sulphureus* e também observou um aumento na capacidade de inibição de radicais livres DPPH. Os valores de inibição nas concentrações de 100, 200, 400 e 800 µg/mL foram, respectivamente, 14%, 26%, 55% e 86%. Assim, possivelmente, as atividades observadas no presente trabalho podem ainda ser otimizadas, testando novas concentrações dos extratos.

3.1.4 Inativação de Ânions Superóxido

Ânions superóxido são formas reduzidas de oxigênio, geradas pelo recebimento de um elétron. Ânions superóxido são radicais livres produzidos a partir da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. A mitocôndria geralmente produz energia por uma série de reações em cadeia, que vão reduzir o oxigênio para formar água. Alguns elétrons escapam dessa cadeia de reações mitocondriais e diretamente reagem com oxigênio para formar os ânions superóxido. Isto pode levar a formação de uma série de outras espécies reativas de oxigênio *in vivo*, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (SIDDHURAJU e BECKER, 2007; LEE et al., 2004).

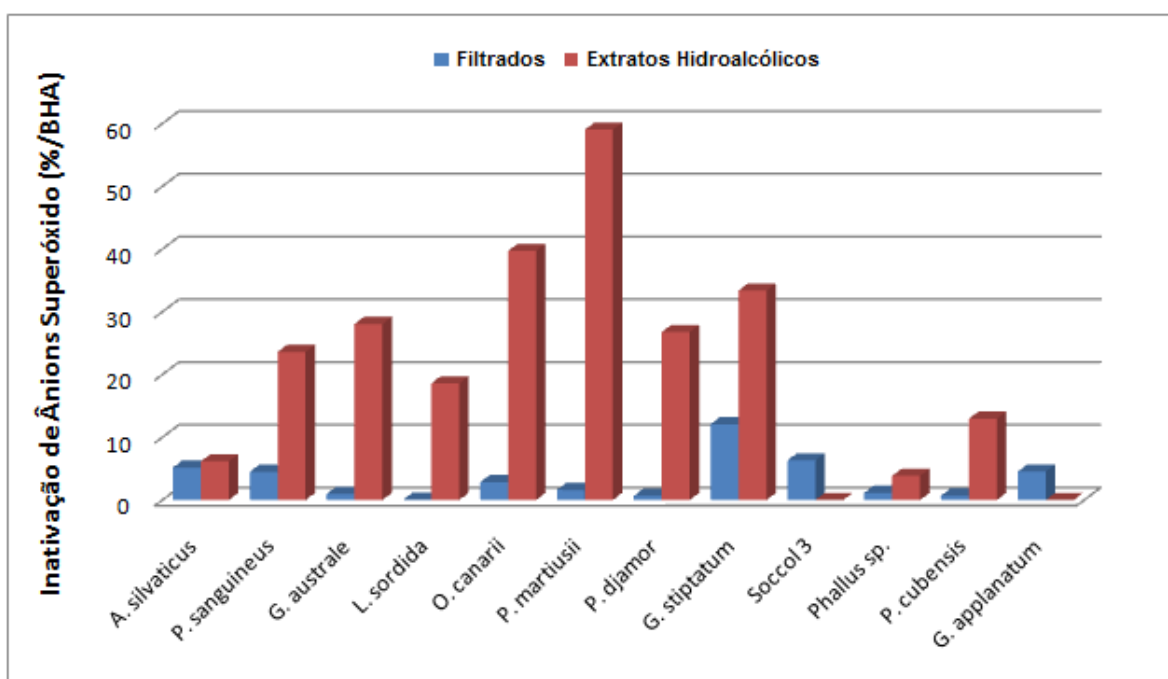


Figura 16: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pela capacidade de inativação de ânions superóxido, expressa em relação à atividade do controle positivo BHA (0,1 mg/mL).

Os resultados de atividade de inativação de ânions superóxido do filtrado e extratos hidroalcoólicos dos cogumelos testados foram expressos em relação a atividade do controle positivo utilizado, BHA (0,1 mg/mL). Como pode ser observado na figura 16, os extratos hidroalcoólicos obtidos do micélio apresentaram uma maior atividade antioxidante quando comparados aos filtrados. Os filtrados de *G. stiptatum*, *P. sanguineus*, *G. australe*, *L. sordida*, *O. canarii*, *P. martiusii* e *P. djamor* apresentaram 13%, 5%, 1%, 0%, 3%, 2% e 1% de atividade antioxidante em relação ao controle positivo, enquanto os extratos hidroalcoólicos apresentaram 34%, 23%, 28%, 19%, 40%, 59% e 26% na concentração de 0,2 mg/mL, respectivamente.

3.1.5 Inibição da Peroxidação Lipídica

O processo de peroxidação lipídica é mediado pela ação de radicais livres e pode ocorrer em membranas biológicas constituídas de ácidos graxos poliinsaturados reagentes ao oxigênio molecular, levando a formação de hidroperóxidos lipídicos e seus derivados. A acumulação desses compostos na membrana pode levar a inativação de receptores e enzimas, prejudcando suas funções, levando a uma desestabilização, tornando a membrana permeável a íons.

No presente trabalho, a capacidade dos extratos e filtrados de basidiomicetos de inibir a peroxidação lipídica foi avaliada pela formação do intermediário MDA-TBA, de coloração rosa, quantificada por espectrofotometria a 532 nm (LIU, 1997). Entre os filtrados analisados, apenas aquele obtido do fungo *Phallus sp.* apresentou alguma atividade antioxidante (13,6%) (Figura 17). Os controles BHA e α -tocoferol apresentaram 85% e 96% de atividade na concentração de 100 μ g/mL, respectivamente.

Os extratos hidroalcoólicos dos fungos *Phallus sp.*, *P. martiusii*, *P. cubensis*, *L. sordida*, Soccol 3 e *G. australe* inibiram a peroxidação lipídica em 51%, 30%, 28,5%, 19,5%, 19% e 5%, respectivamente, na concentração de 0,2 mg/mL (Figura 17). Dore (2006) avaliou a atividade antioxidante de vários extratos, que se mostraram eficientes para inibição da peroxidação lipídica, variando de 18,6% a 36,6% de inibição para os extratos de *G. saccatum* e de 24,2% a 42,9% para *P. dermatopus*.

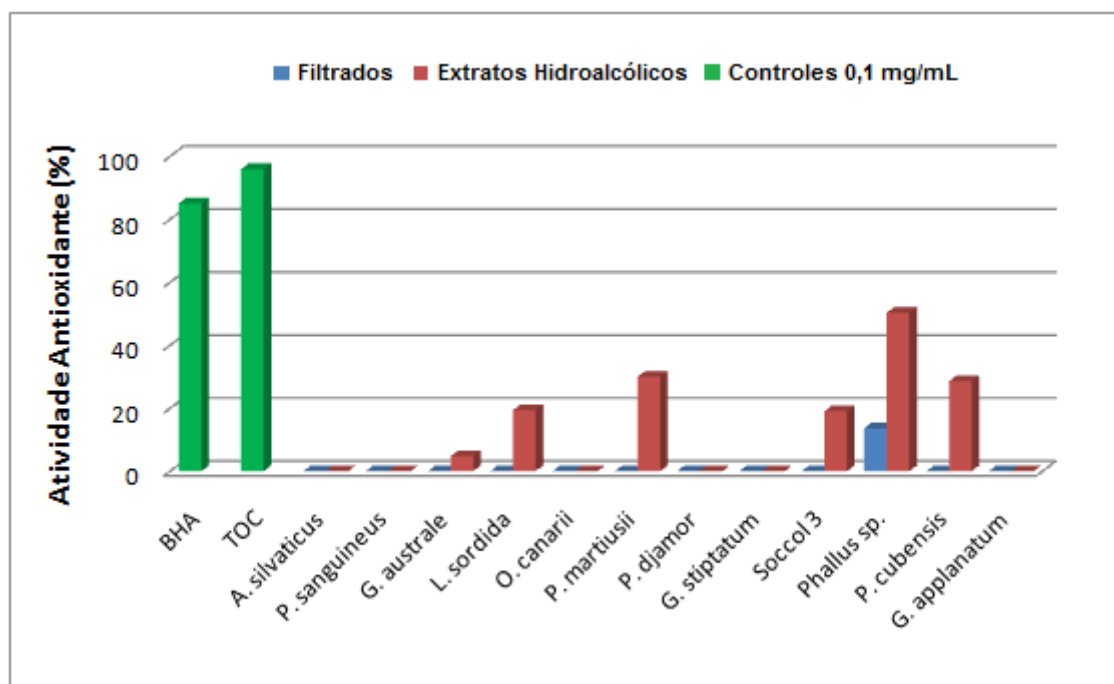


Figura 17: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos e filtrados (0,2 mg/mL) avaliada pela capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

3.2 Determinação de Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos, comumente encontrados em extratos de cogumelos, têm sido apontados como os principais responsáveis pelas eficientes atividades antioxidantes desses extratos (SHU et al., 2008; SONG e YEN, 2002; AKDEMIR et al., 2001; LIU et al., 1997). O conteúdo de compostos fenólicos presentes no filtrado e extratos hidroalcoólicos são apresentados na tabela 8. Como pode ser visto, as amostras apresentaram um alto teor de fenólicos totais, porém os extratos hidroalcoólicos apresentaram maiores concentrações desses compostos. O teor de fenólicos totais pode ser um dos fatores que explica as maiores atividades antioxidantes dos extratos hidroalcoólicos em todas as metodologias utilizadas, quando comparados ao filtrado.

Tabela 8: Determinação dos constituintes fenólicos totais presentes nos extratos aquosos e hidroalcoólicos.

| CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS (µg/mg) | | |
|---|------------------|------------------------|
| Macromicetos | Filtrado | Extrato Hidroalcoólico |
| 1. <i>Agaricus silvaticus</i> | 40,08 ± 0,220 a* | 38,49 ± 0,313 a |
| 2. <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 48,42 ± 0,350 a | 49,00 ± 0,165 a |
| 3. <i>Ganoderma australe</i> | 50,92 ± 0,489 a | 47,98 ± 0,451 b* |
| 4. <i>Lepista sordida</i> | 30,92 ± 0,247 a | 30,13 ± 0,234 a |
| 5. <i>Oudemansiella canarii</i> | 40,92 ± 0,312 a | 57,99 ± 0,459 b |
| 6. <i>Pereniporia martiusii</i> | 58,42 ± 0,583 a | 71,35 ± 0,543 b |
| 7. <i>Pleurotus djamor</i> | 29,25 ± 0,511 a | 33,44 ± 0,152 b |
| 8. <i>Ganoderma stiptatum</i> | 35,92 ± 0,875 a | 52,64 ± 0,241 b |
| 9. Soccol 3 | 85,92 ± 0,115 a | 104,25 ± 0,229 b |
| 10. <i>Phallus</i> | 40,92 ± 0,421 a | 52,38 ± 0,317 b |
| 11. <i>Psilocibe cubensis</i> | 26,75 ± 0,265 a | 71,52 ± 0,291 b |
| 12. <i>Ganoderma applanatum</i> | 50,92 ± 0,257 a | 68,42 ± 0,227 b |

*Diferentes letras mostram resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

- Os extratos hidroalcoólicos apresentaram maior atividade antioxidante em todas as metodologias utilizadas.
- Os extratos hidroalcoólicos apresentaram um maior conteúdo de compostos fenólicos.
- Estudos mais aprofundados sobre a constituição destes extratos e avaliação da atividade antioxidante empregando diferentes concentrações dos mesmos tornam-se necessários, uma vez que representam uma importante fonte de compostos antioxidantes, possíveis de ser biotecnologicamente explorados.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Perenniporia martiusii* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

1.INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos são amplamente utilizados como um alimento altamente selecionado devido ao sabor agradável, e especialmente, devido a suas propriedades nutricionais e medicinais. Eles apresentam um importante conteúdo protéico, glicídico e de sais minerais, além de ser uma rica fonte de fibras. Eles são capazes de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários que apresentam atividade antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, antitrombótica, citostática, hipoglicêmica, antiviral e antibiótica, entre outras (CARVALHO et al., 2007; KÜES & LIU, 2000; SUAY et al., 2000; WASSER & WEIS, 1999; BRIZUELA et al., 1998; CHANG & BUSWELL, 1996; BREENE, 1990).

Cogumelos medicinais têm sido ingeridos há centenas de anos, em alguns casos, milênios, sem apresentar efeitos tóxicos, o que faz deles grandes candidatos para pesquisa de novos agentes antivirais e antimicrobianos. As células superficiais do micélio secretam antibióticos conhecidos como exsudados ou metabólitos secundários. Estes antibióticos apresentam diferentes mecanismos de ação sobre os diferentes microrganismos. Entre os antibióticos comercializados, isolados de cogumelos, estão calvacin produzido pelo fungo *Calvatia gigantea*; ácido armilárico do fungo *Armillaria mellea*; campestrin do cogumelo *Agaricus campestris*; coprinol isolado de fungos do gênero *Coprinus sp.*; corolin produzido pelo fungo *Trametes versicolor* ou *Coriolus versicolor*; cortinellin do fungo *Lentinula edodes*; ganomycin de *Ganoderma lucidum*; e sparassol produzido pelo fungo *Sparassis crispa* (STAMETS, 2005). Além de apresentar efeitos antimicrobianos diretos, agindo sobre os microrganismos antagonistas, os compostos derivados de cogumelos podem também ativar o sistema imune, potencializando as respostas de defesa, agindo de forma indireta, mas com uma atividade antimicrobiana eficiente (STAMETS, 2003).

O fato de que os basidiomicetos têm sido relativamente pouco estudados, juntamente com a vasta gama de tipos estruturais de antibióticos que têm sido obtidos a partir alguns deles, sugerem que os basidiomicetos podem ser uma fonte de novos compostos bioativos com diferentes espectros antimicrobianos (GETHA et al., 2009; ANKE, 1989).

Assim, no presente trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana de doze diferentes espécies de basidiomicetos depositados na coleção do Laboratório de

Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. As espécies de cogumelos foram coletadas em diferentes regiões do estado do Paraná e cultivadas em fermentação submersa. Foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir do micélio e o caldo da fermentação, frente a diferentes microrganismos patogênicos. Por apresentar um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, foi selecionado o fungo *Perenniporia martiusii* (Berkley) (Figura 23) (RYVARDEN, 1972). Essa espécie foi coletada, no ano de 2008, em um fragmento de Mata Atlântica da cidade de Guaraqueçaba, no litoral do estado do Paraná, e identificada pelo pesquisador André De Meijer, através de suas características morfológicas macro e microscópicas, e por meio de reações bioquímicas.

Esta é uma espécie rara, que apresenta uma ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, já foi identificada em estados como São Paulo, Amazonas, Bahia, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, e mais recentemente, na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Sua primeira descrição no estado do Paraná foi realizada por Gerber et al. (1999). *Perenniporia martiusii* diferencia-se macroscopicamente das demais espécies pileadas de *Perenniporia* devido ao seu basidioma espesso e lenhoso (GIBERTONI, 2004).



Figura 18: Basidiomiceto *Perenniporia martiusii* (Berk) Ryvarden.

Fonte: <http://www.ccb.ufsc.br/bot/micologia/fotos.html>

Perenniporia é um grande e cosmopolita gênero pertencente à família Polyporaceae da ordem Polyporales. O gênero foi tipificado pelo fungo *Perenniporia medulla-panis* (DONK, 1960) e até a última revisão publicada, apresentava 77 espécies (DAÍ et al., 2002). Entre as principais características do gênero estão: basidioma perene, ressupinado ou pileado, píleo liso, ocraceus ou pretos com a idade, duros e lenhosos, com uma grossa parede (RYVARDEN e GILBERTSON, 1994). O seu crescimento está intimamente ligado a materiais lignocelulósicos em decomposição, causando podridão em troncos de árvores.

Os fungos do gênero *Perenniporia* têm sido ignorados pelos micologistas pelo fato de não serem comestíveis, o que se deve à dureza do seu basídio. Essa característica também dificulta o isolamento de exemplares desta espécie. Porém, cultivar o seu micélio por fermentação submersa é relativamente fácil e rápido. Não existem relatos na literatura que mostrem alguma atividade biológica de compostos isolados ou de extratos obtidos de *Perenniporia martiusii* (Berk). Santos et al. (2005) realizaram uma seleção de lípases e proteases produzidas por 41 macrofungos de 21 gêneros diferentes e identificaram a produção de proteases por *P. martiusii*. Kida et al. (1986) isolaram dois compostos denominados pereniporinas A e B do fungo *P. medullaepanis*. Pereniporin A (Figura 24) apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, com um MIC de 6,25 µg/mL, mas se mostrou inativo contra bactérias Gram-negativas. Ambos os compostos apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais. Outra espécie do gênero, *P. fraxinophila*, tem sido cultivada e estudada para produção de metaloproteases, utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares (KIM et al.; 2008).

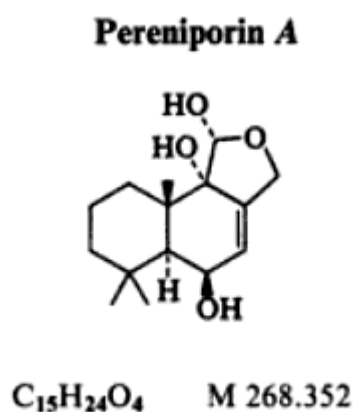


Figura 19: Antibiótico Pereniporin A, terpeno produzido pelo fungo *Perenniporia medullaepanis*.

Em outro estudo, Suay et al. (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de 204 cogumelos poliporóides e mostraram que mais de 75% das espécies examinadas apresentaram atividade antimicrobiana e 45% delas inibiram o crescimento de uma grande variedade de microrganismos (SUAY et al., 2000). A vasta gama de agentes antibacterianos efetivos isolados de fungos poliporóides sugerem que este grupo, insuficientemente explorado, pode ser uma valiosa fonte de novos compostos bioativos com diferentes espectros antimicrobianos, que deve ser cuidadosamente estudado.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos obtidos do micélio e do caldo de cultivo do basidiomiceto poliporóide, *P. martiusii*, e sua caracterização parcial, visando identificar os compostos responsáveis pela atividade encontrada.

2.MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Laboratório de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. A caracterização parcial dos extratos foi realizada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas.

2.1 PRÉ-SELEÇÃO DAS CEPAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.1.1 Obtenção do Filtrado e Extratos Hidroalcoólicos

A fim de verificar a produção de compostos com atividade antimicrobiana, os extratos obtidos do micélio e filtrado obtido do caldo do cultivo das doze cepas de basidiomicetos apresentadas na tabela 3 (CAPÍTULO I, item 2.1) foram testados através do método de ágar difusão, contra um ampla variedade de microrganismos patogênicos.

Os cogumelos foram cultivados nas mesmas condições descritas no item 2.3 (CAPÍTULO I), utilizando o mesmo meio de cultivo, pelo mesmo período de incubação. Ao final da fermentação, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração em papel de filtro Whatman nº 1 usando bomba de vácuo. O sobrenadante de cada um dos cultivos foi neutralizado e reservado. A biomassa úmida foi pesada e submetida à extração com álcool etílico (1:3 p/v), a 30°C, 120 rpm por 24 horas. A biomassa foi novamente separada por filtração e passou por uma segunda extração com etanol. O filtrado hidroalcoólico obtido das duas extrações foi concentrado em evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo a temperatura de 50°C para remoção do solvente, e em seguida neutralizado. Assim foram obtidos um filtrado e um extrato hidroalcoólico de cada uma das doze cepas.

2.1.2 Microrganismos Utilizados

A atividade antimicrobiana do filtrado e extratos hidroalcoólicos foi verificada contra 21 diferentes microrganismos patogênicos de diferentes origens, como apresentado na tabela 9.

Tabela 9: Relação de microrganismos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e filtrados das doze cepas de basidiomicetos.

| Microrganismo | Origem | Coleção |
|---------------------------------|----------------|-------------------------------|
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>E. coli</i> ATCC 35218 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>E. faecalis</i> LPB 088 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>K. pneumoneae</i> ATCC 70063 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| Levedura LPB 015 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. agalactiae</i> LPB 157 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> LPB 034 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> LPB 039 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> LPB 044 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> LPB 056 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| <i>S. aureus</i> LPB 065 | Mastite Bovina | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| MRSA LPB 123 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |
| MRSA mecIII | Humana | Hospital de Clínicas-UFPR |
| MRSA (MBM-9393)-UFRJ | Humana | Hospital de Clínicas-UFPR |
| MRSA 16 | Humana | Hospital de Clínicas-UFPR |
| MRSA 19 | Humana | Hospital de Clínicas-UFPR |
| MRSA 77 | Humana | Hospital de Clínicas-UFPR |
| <i>S. saprophyticus</i> LPB 135 | Humana | Laboratório Bioprocessos-UFPR |

As cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA) fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e foram, gentilmente, cedidas pela Prof^a. Dr^a. Líbera Maria Dalla Costa.

As cepas foram mantidas em freezer -80°C, em caldo BHI (infusão de cérebro-coração) mais 15% de glicerol. Antes dos testes, as cepas foram reativadas em Ágar Sangue.

2.1.3 Preparo do Inóculo

Os testes para verificação da atividade antimicrobiana foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) (2007). Para tal, os inóculos foram repicados em meio TSA (Trypticase Soy Agar), 24 horas antes, e incubados em estufa a 37°C. As células de colônias isoladas foram suspensas em solução salina (0,9%), e a turbidez foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland (10^8 UFC/mL).

2.1.4 Teste de Difusão em Ágar

Após o preparo do inóculo, placas de Petri (150x15mm) contendo 50 mL de Ágar Muller Hinton foram inoculadas em três sentidos, com o auxílio de um swab. Foram feitos poços de 6,0 mm de diâmetro, onde foram adicionados 50 µL dos extratos hidroalcoólicos ou filtrado. Como controle negativo, foi utilizado o meio da fermentação. Como controle positivo, foram utilizados diferentes discos de antibióticos, entre eles: penicilina 10 µg, gentamicina 10 µg, oxacilina 1 µg, cloranfenicol 30 µg e vancomicina 30 µg. As placas foram, então, incubadas em estufa a 35°C por 18 a 24 horas. O diâmetro dos halos foi lido com auxílio de um halômetro.

Por apresentar um maior espectro de ação contra os microrganismos testados, com uma maior atividade evidenciada contra as cepas de MRSA, o fungo *Perenniporia martiusii* (Berk) foi selecionado para os testes posteriores.

2.1.5 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento do microrganismo. A CIM do filtrado e do extrato bruto hidroalcoólico obtido a partir do micélio do fungo *P. martiusii* (Berk) foi determinada pelo método de macrodiluição, contra os microrganismos cuja atividade inibitória foi evidenciada no teste de difusão em ágar. Para tal, placas de Petri contendo 50 mL de Ágar Muller Hinton, impregnado com concentrações crescentes do extrato ou filtrado de *P. martiusii*, foram inoculadas com o auxílio de um multinoculador. A concentração final do inóculo foi de 10^4

UFC/mL (1 a 2 μ L da diluição de 1:10 da suspensão inicial equivalente à escala 0,5 de MacFarland, preparada como descrito no ítem 2.1.3). Placas controles sem o extrato foram inoculadas no início e ao final para verificar a viabilidade do inóculo, e alguma eventual contaminação ou acúmulo do extrato nos pinos do inoculador. Os mesmos antibióticos utilizados como controle positivo no teste de difusão em ágar foram utilizados como controle da CIM. As placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24 horas.

2.2 CULTIVO DO FUNGO *Perenniporia martiusii* (BERK) EM BIORREATOR

A linhagem de *P. martiusii* (Berk) foi repicada em placas de Petri (90x15mm), contendo PDA (Ágar Batata Dextrose), e incubada a 28 °C. Após o preenchimento de toda a placa pelo fungo, o micélio foi delicadamente raspado e transferido para frascos Erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultivo básico, descrito no Capítulo I. A cultura foi mantida a 28°C ($\pm 0,2$), 120 rpm em agitador rotatório de bancada, por um período de cinco dias. A fermentação ocorreu em um biorreator de 14 litros, modelo BioFlo 110 (NEW BRUNSWICH SCIENTIFIC COMPANY, USA). Foram utilizados 10 litros de meio básico, inoculados com 500 mL do inóculo (5% v/v), pH inicial 6,0. A temperatura foi controlada a 28°C, agitação de 150 rpm, aeração de 1vvm (volume de ar/volume de meio/min), por um período de 6 dias, sem controle de pH. Amostras foram retiradas no início da fermentação e em intervalos de 12 horas. Foi analisada a biomassa (peso seco), variação do pH, consumo de glucose e proteína.

2.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

2.3.1 Partição Líquido-Líquido

O extrato hidroalcoólico do fungo *P. martiusii* (Berk), obtido como descrito no ítem 2.1.1 deste capítulo, foi pré-fracionado por partição líquido-líquido utilizando diferentes solventes num gradiente crescente de polaridade. Para tal, 3,0 g de extrato foram solubilizados em 100 mL de água destilada e deixados homogeneizando por 24 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada e concentrada em rotaevaporador a 50°C, até um volume final de 50 mL. Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio e etanol. A partição foi realizada em funil de separação com 50 mL de extrato para 150 mL de solvente. A partição foi repetida por três vezes

com cada um dos solventes. Ao final, as frações orgânicas foram concentradas em rotaevaporador até a secura e a fração hidroalcoólica remanescente, liofilizada. Assim foram obtidas as frações: hexânica, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio e aquosa.

A fim de identificar a fração que concentrou as moléculas responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato, as cinco frações foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, como descrito no item 2.1.3 deste capítulo, numa concentração de 10 mg/mL. Como microrganismos-teste foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e MRSA mecIII. A fração diclorometano foi confirmada como a que concentrou a maior parte da atividade presente no extrato bruto.

2.3.2 Extração com Diclorometano

A partir da identificação da fração diclorometano como aquela que continha os compostos antimicrobianos, realizou-se a extração da biomassa (micélio) diretamente com este solvente. Para tal, a biomassa obtida na fermentação foi recuperada por filtração e liofilizada. Foram realizadas cinco extrações consecutivas com diclorometano (10 g de biomassa seca/100 mL de diclorometano), sendo que em cada uma delas, a biomassa permanecia extraído por 24 horas, sob agitação constante. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo 40°C. Foi calculado o rendimento de cada uma das extrações, e verificada também, a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (item 2.1.3 deste capítulo), contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA mecIII.

2.3.3 Fracionamento do Extrato Diclorometano por Cromatografia em Coluna

Para execução do fracionamento, utilizou-se cerca de 200 mg do extrato diclorometano e 50 g de sílica gel 60. A sílica foi suspensa em benzeno:acetato de etila (9:1) e a suspensão foi transferida para uma coluna cromatográfica de vidro (3 cm d.i. x 30 cm). Após a compactação do adsorvente, a amostra dissolvida em diclorometano foi adsorvida a uma pequena quantidade de sílica, e esta pasta foi então, adicionada na parte superior da coluna e recoberta com um chumaço de algodão. Como eluente foram utilizadas as seguintes soluções: 300 mL de benzeno:acetato de etila (9:1); 150 mL de benzeno:acetato de etila (4:1); 150 mL de benzeno:acetato de etila (1:1); 150 mL

benzeno:acetato de etila (1:4); 150 mL de etanol; 150 mL de etanol:água (1:1); e 150 mL de água. A vazão foi controlada para aproximadamente 2,5 mL/min. O fracionamento foi acompanhado pela coloração e irradiação da coluna com lâmpada de UV 360 nm (Figura 25). Foram coletadas 75 frações com volume de 15 mL cada uma. Os resultados da separação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando primeiramente detecção por UV, seguida de revelação com vanilina sulfúrica. As frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas e avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, contra *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA mecIII.

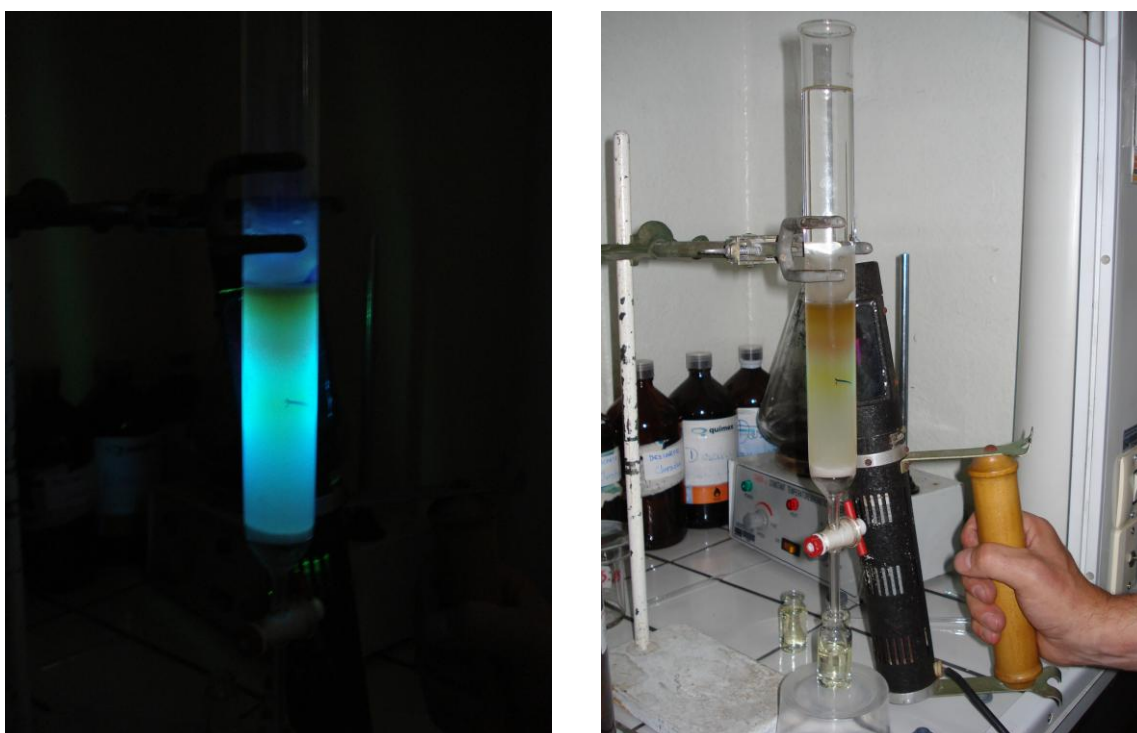


Figura 20: Fracionamento do extrato DCM por cromatografia em coluna, guida pela coloração e irradiação com UV.

2.3.4 Fracionamento da Fração Fr10 por Cromatografia em Camada Delgada

A fração 10 (21 mg), obtida através da cromatografia em coluna, foi recromatografada em sílica, desta vez em camada delgada, utilizando como fase móvel benzeno:acetato de etila (9:1). As cromatoplasmas foram analisadas com UV 360nm e os R_fs dos compostos isolados foram calculados. Os *spots* foram raspados para recuperar os compostos presentes na fração. Foram obtidas duas sub-frações com dois compostos

suspostamente isolados, Fr10.I e Fr10.II. A atividade antimicrobiana dos compostos foi verificada pelo método de difusão em ágar, contra *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA mecIII.

2.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO DCM, FR 2 E FR 10.

2.4.1 Perfil Fitoquímico

O extrato bruto diclorometano e as frações Fr2 e Fr10, obtidas pela CC, foram avaliados quanto à presença de diferentes metabólitos secundários por CCD, empregando-se diversos sistemas de eluição e reveladores apropriados para detecção de alcalóides, compostos fenólicos, terpenos, iridóides, cumarinas e quinonas (Tabela 10).

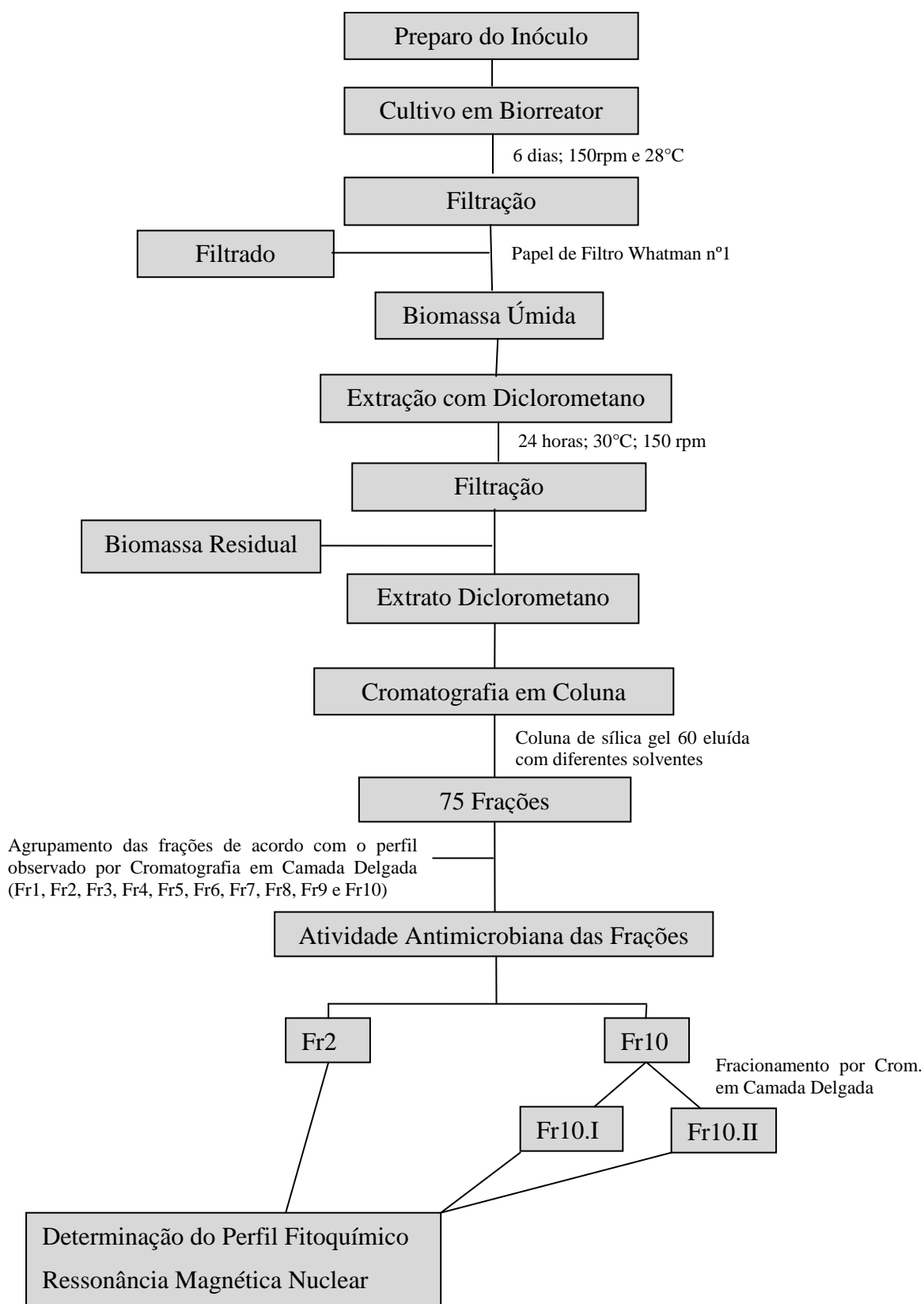
Tabela 10: Sistemas de eluição e reveladores para detecção de diferentes metabólitos no extrato bruto e nas frações obtidos do fungo *P. martiusii* (Berk).

| Sistema de Eluição | Revelador | Metabólito | Referência |
|--|------------------------|---|-------------------|
| AcOEt – HCOOH – AcOH – Água (100:11:11:27 v/v) | Dragendorff | Alcalóides | WAGNER, 1996 |
| AcOEt – HCOOH – AcOH – Água (100:11:11:27 v/v) | DPPH 0,04% | Compostos Fenólicos | ASSUNÇÃO, 2008 |
| Benzeno – AcOEt (97:3 v/v) | Vanilina Sulfúrica | Monoterpenos, Sesquiterpenos e Diterpenos | WAGNER, 1996 |
| AcOEt – HCOOH – AcOH – Água (100:0,5:0,5:0,5 v/v) | Lieberman/ Burchard | Triterpenos e Esteróides | HARBONE, 1982 |
| AcOEt – HCOOH – AcOH – Água (100:11:11:27 v/v) | Vanilina Sulfúrica | Iridóides | WAGNER, 1996 |
| Éter – Tolueno – AcOH 10% (50:50:50 v/v) | UV | Cumarinas | WAGNER, 1996 |
| AcOEt – HCOOH – AcOH – Água (100:0,5:0,5:0,5 v/v) | KOH 10% | Quinonas | HARNONE, 1998 |

2.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear(RMN)

Para as análises por espectroscopia de RMN, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ou dimitilsulfóxido deuterado, de acordo com a solubilidade da amostra, e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperatura de 30°C. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C -RMN, ^{13}C -RMN-DEPT e ^1H -RMN foram obtidos em espectrômetro BRUKER, modelo Avance-DRX-400. Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram calibrados com base no pico central dos solvente utilizado, com relação ao TMS (clorofórmio 77,23 ppm e DMSO 39,51 ppm).

2.5 FLUXOGRAMA



Fluxograma da metodologia desenvolvida no Capítulo III.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRÉ SELEÇÃO DA CEPA DE *P. MARTIUSII*

3.1.2 *Teste de difusão em ágar*

Um total de 24 amostras (filtrado e extratos hidroalcoólicos) de 12 basidiomicetos foram testados quanto à presença de compostos antimicrobianos, através do método de difusão em ágar, realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo NCCLS (2007). Como pode ser observado na tabela 11, a espécie *Perenniporia martiusii* apresentou um amplo espectro de ação, com diferentes atividades contra 17 dos 20 microrganismos testados. Os extratos obtidos de *P. martiusii* foram efetivos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, porém uma maior atividade foi observada contra os primeiros. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores que mostraram muitas espécies incomuns de basidiomicetos como grandes produtoras de uma ampla variedade de atividades antimicrobianas (GETHA et al., 2009; ANKE et al., 1989).

Tanto o filtrado obtido da fermentação submersa, como o extrato hidroalcoólico obtido a partir do micélio cultivado de *P. martiusii* apresentaram atividade antimicrobiana, porém o extrato hidroalcoólico mostrou-se efetivo contra um maior número de microrganismos, além de apresentar maiores halos de inibição. Entre os microrganismos testados, as cepas de *S. aureus* mostraram-se mais sensíveis à presença dos extratos de *P. martiusii*, com halos de inibição de até 25 mm (Figura 21).

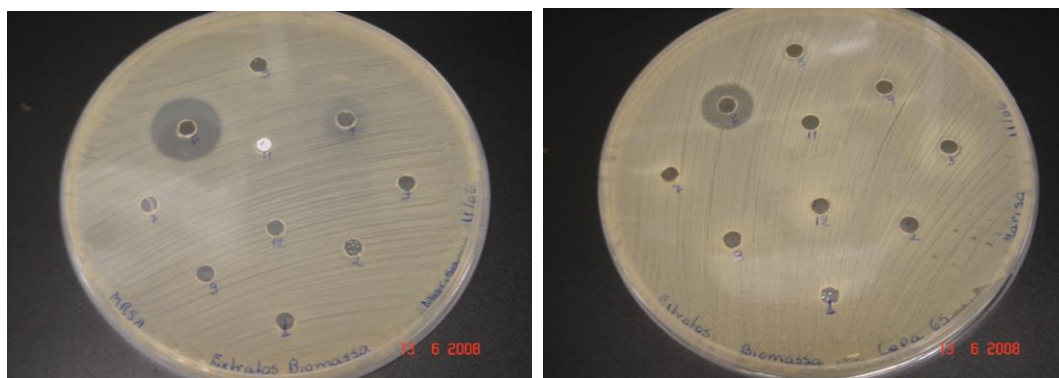


Figura 21: Atividade antimicrobiana da cepa de *P. martiusii* evidenciada pelos testes de difusão em ágar, contra MRSA e *S. aureus* 65.

Tabela 11: Avaliação da atividade antimicrobiana do filtrado da fermentação (F) das 12 cepas de basidiomicetos e dos extratos hidroalcoólicos (H) obtidos do micélio, por meio dos testes de difusão em ágar (antibiograma).

| Atividade Antimicrobiana Obtida no Antibiograma (Halos de Inibição em mm) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|-------------------------|----|-----------|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|----|-----------|
| Espécies | Ext. | Microrganismos Testados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | Ec | Ef | Kp | Le | M ¹ | M ² | M ³ | M ⁴ | M ⁵ | M ⁶ | Sa ¹ | Sa ² | Sa ³ | Sa ⁴ | Sa ⁵ | Sa ⁶ | Sa ⁷ | Sag | Ss | Pa |
| <i>A. silvaticus</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. sanguineus</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>G. australe</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>L. sordida</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>O. canarii</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. martiusii</i> | F | - | - | 12 | - | 17 | 18 | 12 | 15 | 12 | 13 | 15 | 10 | 13 | 12 | 12 | 10 | 8 | - | - | - |
| | H | 12 | - | 17 | - | 25 | 16 | 14 | 17 | 13 | 17 | 18 | 13 | 21 | 18 | 20 | 17 | 20 | 10 | - | 12 |
| <i>P. djamor</i> | F | - | - | - | - | 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>G. stiptatum</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 35 |
| Soccol 3 | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Phallus sp.</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. cubensis</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>G. applanatum</i> | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Legenda: Ec-*E. coli* ATCC 25922; Ef- *E. faecalis*; Kp-*K. pneumoniae* ATCC 70063; Le-Levedura; M¹-MRSA LPB 123; M²- MRSA mecIII; M³-MRSA MBM-9393; M⁴-MRSA 16; M⁵-MRSA 19; M⁶-MRSA 77; Sa¹-*S. aureus* ATCC 25923; Sa²-*S. aureus* ATCC 29213; Sa³-*S. aureus* 34; Sa⁴-*S. aureus* 39; Sa⁵-*S. aureus* 44; Sa⁶-*S. aureus* 56; Sa⁶-*S. aureus* 65; Sag-*S. agalactae*; Ss- *S. saprophyticus*; Pa-*P. aeruginosa* ATCC 27853.

Entre as cepas de *S. aureus* utilizadas, foram incluídas 2 cepas controles sensíveis (ATCC 25923 e ATCC 29213); 6 cepas resistentes à meticilina, entre elas 2 controles (MRSA-mecIII e MRSA-MBM 9393) e 4 isolados de pacientes humanos do Hospital de Clínicas-UFPR, com diferentes padrões de resistência; e 5 cepas, também com diferentes padrões de resistência, isoladas de mastite bovina. Tanto o filtrado como o extrato hidroalcoólico foram efetivos contra todas as cepas de *S. aureus*, tanto isolados de humanos, como de animais. Porém, diferentes halos de inibição foram observados, o que pode ser observado pelos diferentes padrões de resistência das cepas utilizadas. A maior atividade antimicrobiana de *P. martiusii* foi evidenciada contra as cepas MRSA.

Com relação às demais espécies de basidiomicetos testadas, o filtrado obtido da fermentação de *Pleurotus djamor* também apresentou alguma atividade contra MRSA (12 mm). Foi observada, também, uma forte atividade inibitória do filtrado e do extrato hidroalcoólico do fungo *Ganoderma stiptatum* sobre *Pseudomonas aeruginosa* (20 e 35 mm, respectivamente). As espécies dos gêneros *Pleurotus* e *Ganoderma* têm sido amplamente estudadas quanto à produção de compostos bioativos, inclusive vários compostos com atividade antimicrobiana foram isolados de fungos pertencentes a estes dois gêneros (PATERSON et al., 2006; ROSADO et al., 2003; SEKIZAWA et al., 2002; MOTHANA et al., 2000).

Diante dos resultados obtidos, nas condições fermentativas utilizadas, a espécie de *P. martiusii* foi selecionada para etapas posteriores do trabalho. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas do filtrado e do extrato hidroalcoólico contra as bactérias cuja inibição foi confirmada no teste de difusão em ágar.

3.1.2 Determinação da CIM

A CIM foi obtida pelo método de macrodiluição (Figura 22), também em concordância com os padrões estabelecidos pelo NCCLS (2007). Para tal, os extratos foram liofilizados e diluídos em água em concentrações crescentes, variando de 7,5 µg/mL a 4000 µg/mL. Os resultados são apresentados na tabela 12. Como pode ser visto, a maior eficiência do extrato hidroalcoólico também foi observada pela determinação da CIM. O mesmo perfil de atividade encontrado no antibiograma pode ser visualizado neste experimento, com um maior poder inibitório contra microrganismos Gram-positivos. Entre todos os valores de CIM, os mais baixos foram observados contra as cepas de MRSA, o que sugere que este fungo é uma fonte

potencial para descoberta de novos antibióticos a serem utilizados contra este grupo de microrganismos, principal agente de infecções hospitalares e mortes de imunodebilitados em todo o mundo.

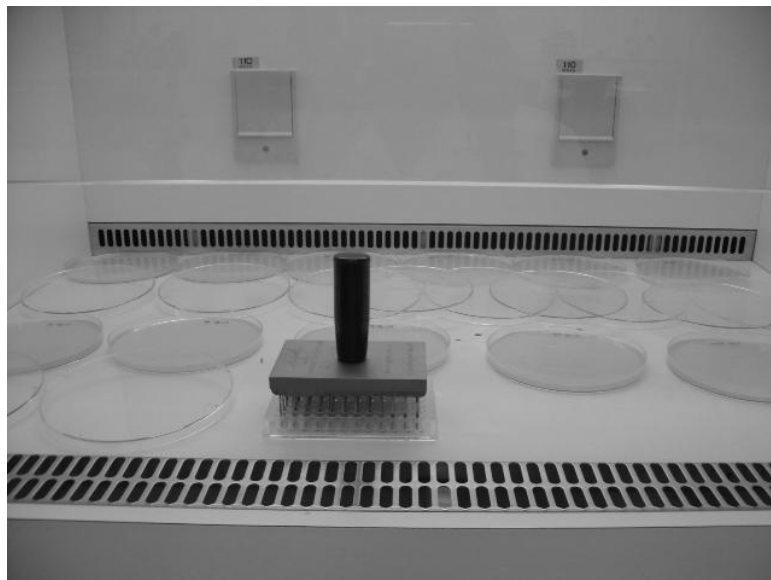


Figura 22: Teste de macrodiluição em placa.

Através desta metodologia, pode ser confirmada também a maior atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico, uma vez que este apresentou menores valores de CIM para quase todos os microrganismos testados. Desta forma, selecionou-se o extrato hidroalcoólico obtido do micélio cultivado de *P. maritiusii* para os experimentos de caracterização, visando encontrar os compostos responsáveis pela sua atividade.

Tabela 12: Resultados dos teste de macrodiluição para determinação da concentração inibitória mínima do filtrado e do extrato hidroalcoólico.

| Microrganismos Testados | Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) | |
|---------------------------------|--|------------------------|
| | Filtrado | Extrato Hidroalcoólico |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 1000 | 500 |
| <i>K. pneumoneae</i> ATCC 70063 | 500 | 500 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 | 1000 | 500 |
| <i>S. agalactae</i> | 500 | 250 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 250 | 250 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 29213 | 500 | 250 |
| MRSA LPB 123 | 250 | 125 |
| MRSA mecIII | 250 | 125 |
| MRSA (MBM-9393)-UFRJ | 500 | 250 |
| MRSA 16 | 250 | 125 |
| MRSA 19 | 125 | 125 |
| MRSA 77 | 500 | 250 |
| <i>S. aureus</i> LPB 034 | 500 | 125 |
| <i>S. aureus</i> LPB 039 | 500 | 125 |
| <i>S. aureus</i> LPB 044 | 250 | 125 |
| <i>S. aureus</i> LPB 056 | 500 | 125 |
| <i>S. aureus</i> LPB 065 | 500 | 125 |

3.2 CULTIVO DE *P. MARTIUSII* EM BIORREATOR

A fim de conhecer o perfil de crescimento do fungo *P. martiusii*, este foi cultivado em biorreator durante 6 dias, sendo retiradas amostras a cada 12 horas para análise de vários parâmetros cinéticos, entre eles, pH, consumo de glucose, produção de biomassa e proteínas. Como pode ser observado na figura 23, a fonte de carbono (glucose) esgotou-se em torno das 140 horas de cultivo. A curva de produção de biomassa apresenta tipicamente o perfil das curvas de crescimento de microrganismos em geral, com uma fase de adaptação (até as 20 hs), uma fase logarítmica (de 20 a 80 hs), uma fase estacionária (de 80 a 110 hs) e uma fase de morte celular (observada a

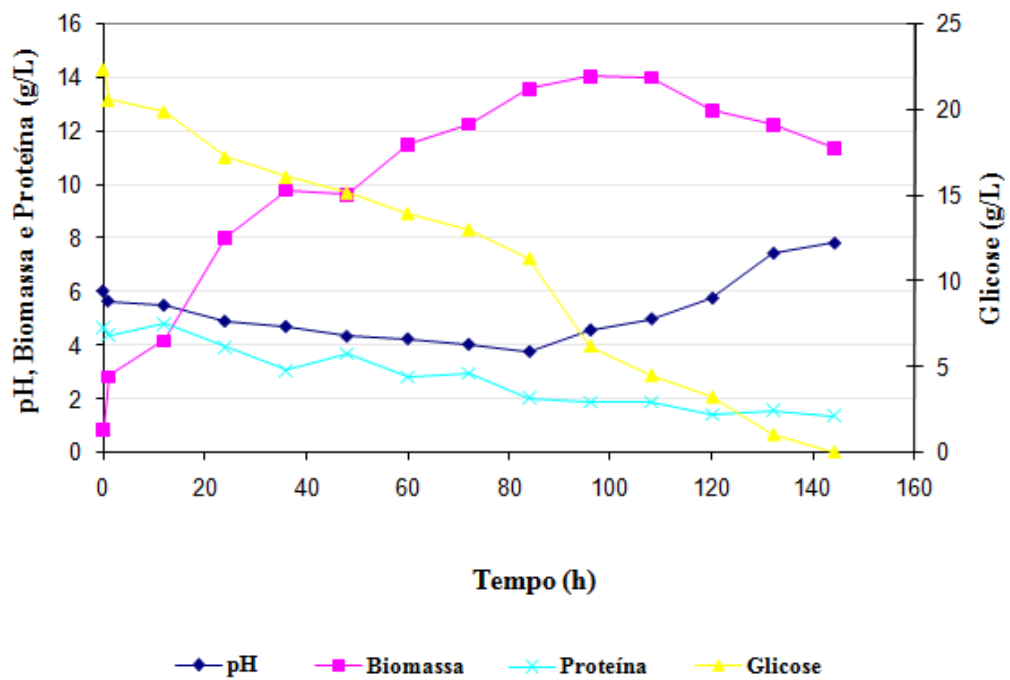


Figura 23: Parâmetros cinéticos avaliados durante o cultivo de *P. martiusii* em biorreator.



Figura 24: Cultivo de *P. martiusii* com 96 horas (micélio marrom claro) e 120 horas (micélio preto) de fermentação.

partir de 110 hs de cultivo). O maior pico de produção de biomassa foi de 14 g/L. Uma característica bastante marcante, observada durante a transição da fase estacionária para a fase de declínio, foi a mudança na coloração do micélio que passa de marrom claro para preto (Figura 24). Este fenômeno foi observado tanto em biorreator, quanto em shaker entre o quarto e quinto dia de cultivo.

Com relação à concentração de proteínas presentes no meio, foi possível observar uma queda contínua, com aproximadamente 4,6 g/L no início do cultivo, chegando a 1,3 g/L no final das 144 h de fermentação. O pH também mostrou uma grande variação ao longo da fermentação, que teve início em pH 6,0. O pH mostrou uma queda contínua até em torno das 80 h de fermentação, chegando a pH 3,75, e voltou a subir até pH 7,83 no final das 144 h de cultivo (Figura 23).

3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

3.3.1 Partição Líquido-Líquido

A fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico, este foi submetido a diferentes formas de fracionamento. Inicialmente, o extrato foi pré-fracionado por meio de extrações sucessivas com diferentes solventes em gradiente crescente de polaridade. Ao final desse processo foram obtidas 5 frações, sendo 4 orgânicas e uma aquosa remanescente: fração hexânica (57 mg), diclorometano (112 mg), acetato de etila (254 mg), clorofórmio (43 mg) e aquosa (2,123 g), partindo-se de 3,0 g do extrato bruto.

A atividade antimicrobiana das frações foi verificada pelo teste de difusão, contra as cepas MRSA mecIII e *S. aureus* ATCC 25923, de acordo com os mesmos padrões descritos anteriormente e estabelecidos pelo NCCLS (2007). As frações foram testadas numa concentração de 10 mg/mL. A única fração que apresentou atividade inibitória sobre os microrganismos testados foi a fração diclorometano, com halos de 27 mm contra MRSA mec III e 22 mm contra a cepa ATCC 25923. Através da medição dos halos de inibição, acredita-se que houve uma concentração dos compostos bioativos, o que levou a uma maior atividade da fração diclorometano em relação ao extrato bruto hidroalcoólico.

3.3.2 Extração com Diclorometano

A partir da identificação da atividade antimicrobiana da fração diclorometano, a biomassa passou a ser extraída diretamente com este solvente. Foram realizadas 5 extrações sucessivas, visando avaliar a eficiência e rendimento das extrações. Os extratos obtidos de cada uma das extrações foram quantificados e avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, também pelo método de difusão em ágar. Os resultados estão apresentados na tabela 13. Como pode ser observado, tanto o rendimento dos extratos como a atividade antimicrobiana pouco variaram ao final das quatro primeiras extrações. Na quinta extração foi observado uma menor rendimento do extrato, mas ainda assim, não tão significativo. Ao contrário, na atividade antimicrobiana, os halos observados com o extrato da quinta extração são relativamente inferiores, variando de 24-15 mm e 19-13 mm para MRSA mecIII e *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente, quando comparados os extratos da primeira extração (Figura 25).

Tabela 13: Resultados de eficiência das extrações consecutivas da biomassa de *P. maritiusii* com diclorometano

| Extração | Rendimento % | Atividade Antimicrobiana (Halos de inibição mm) | |
|----------|-----------------|---|-----------------------------|
| | | MRSA mecIII | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
| 1° | 0,2791 | 24 | 19 |
| 2° | 0,2587 | 20 | 17 |
| 3° | 0,2498 | 23 | 18 |
| 4° | 0,2433 | 20 | 17 |
| 5° | 0,2154 | 15 | 13 |

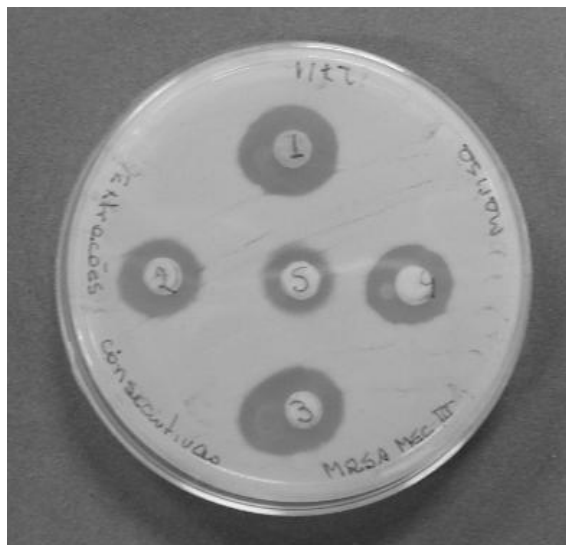


Figura 25: Avaliação da eficiência das extrações sucessivas com diclorometano, com relação a atividade antimicrobiana contra a cepa MRSA mecIII.

3.3.3 Fracionamento do Extrato DCM por Cromatografia em Coluna

O extrato DCM (200 mg) foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel 60, através da eluição com diferentes solventes num gradiente crescente de polaridade. O eluato foi coletado em 75 tubos (15 mL cada um). Após análise por CCD de cada fração, as mesmas foram agrupadas em dez frações (Fr1-Fr10) da seguinte forma: Fr1 (1) 12 mg, Fr2 (2-4) 24mg , Fr3 (5 a 7) 19 mg, Fr4 (8-11) 23 mg, Fr5 (12-20) 15 mg, Fr6 (21-34) 27 mg, Fr7 (35-44) 18 mg, Fr8 (45-48) 8 mg, Fr9 (49-66) 17 mg e Fr10 (67-75) 21 mg.

A atividade antimicrobiana das 10 frações foi verificada pelo método de difusão em ágar, contra *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA mecIII. Como pode ser observado na figura 26, as principais frações responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato foram as frações 2 e 10, halos de 21 e 23 mm, respectivamente, contra a cepa de MRSA mecIII. O perfil cromatografico destas frações comparado com o do extrato DCM está apresentado na figura 27. Como pode ser visualizado, a Fr 2 apresenta uma única banda bem definida, cujo Rf calculado foi de 0,543. Na Fr 10, foram observados duas bandas, Fr 10.I e Fr 10.II, com os respectivos Rfs de 0,857 e 0,324. A fração Fr 10 (21 mg) foi recromatografada por CCD para a separação dos dois compostos observados. Ao final, foram obtidas as duas sufrações Fr 10.I (7,0 mg) e Fr 10.II (5,0 mg).

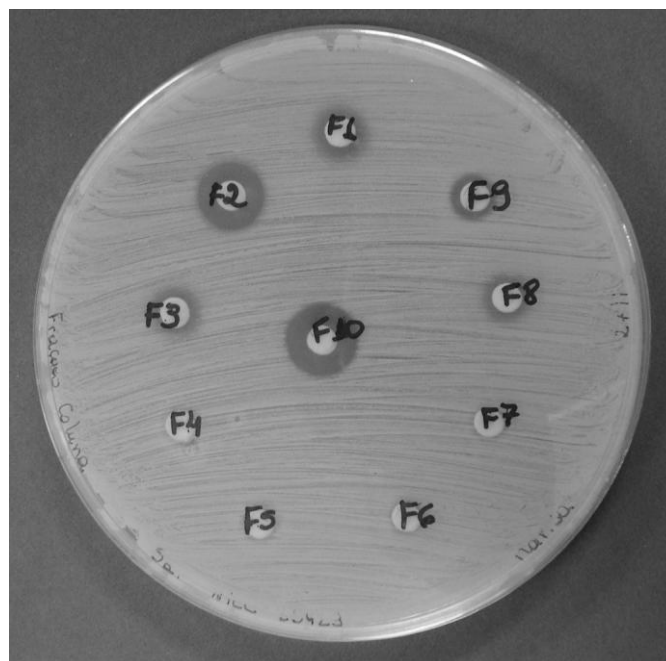


Figura 26: Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas na CC, pelo método de difusão em ágar.

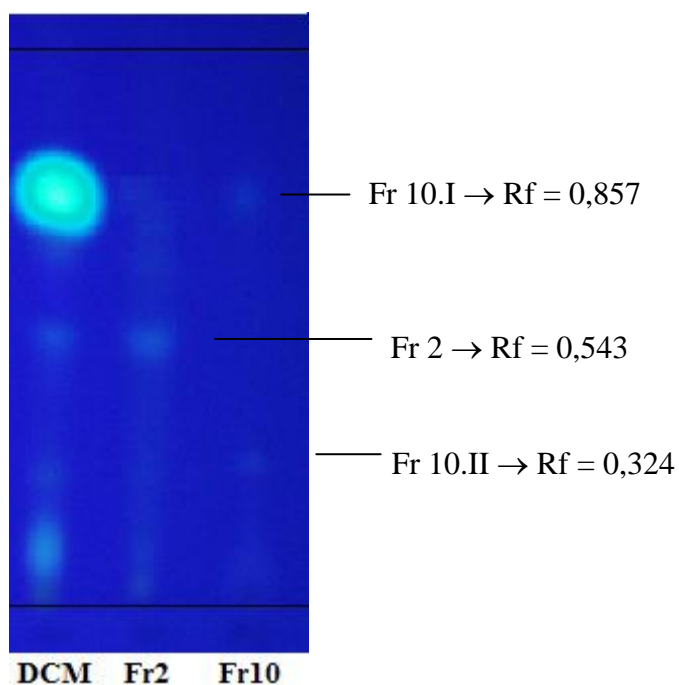


Figura 27: Perfil cromatográfico do extrato DCM, Fr 2 e Fr 10, revelados por UV 360 nm.

As duas sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II foram analisadas quanto a sua atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, numa concentração de 10 mg/mL contra a cepa MRSA mecIII. Como pode ser observado na figura 28, ambos os compostos apresentaram uma forte inibição contra esta bactéria, com halos de inibição de 22 e 24 mm, respectivamente.

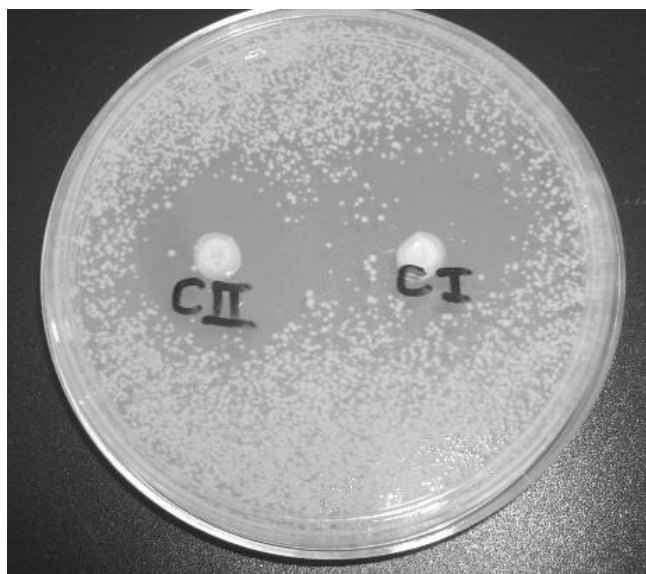


Figura 28: Avaliação da atividade antimicrobiana das sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II, contra a cepa de MRSA mecIII.

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.4.1 Perfil Fitoquímico

Foi analisado o perfil fitoquímico do extrato DCM, Fr 2 e Fr 10 por meio de CCD, com diferentes sistemas de eluição e reveladores específicos para cada grupo de compostos. Os resultados são apresentados na tabela 14. A presença de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos foi evidenciada em todas as amostras, pelo surgimento de manchas com coloração azul escura, após a revelação com vanilina sulfúrica e aquecimento em estufa (100°C), por 5 minutos. A presença de compostos fenólicos foi evidenciada pela visualização de manchas brancas, diante da revelação com DPPH, o que foi observado apenas no extrato DCM. A presença de triterpenos e esteróis no extrato DCM também foi evidenciada, isso ocorreu após a revelação com reagente de

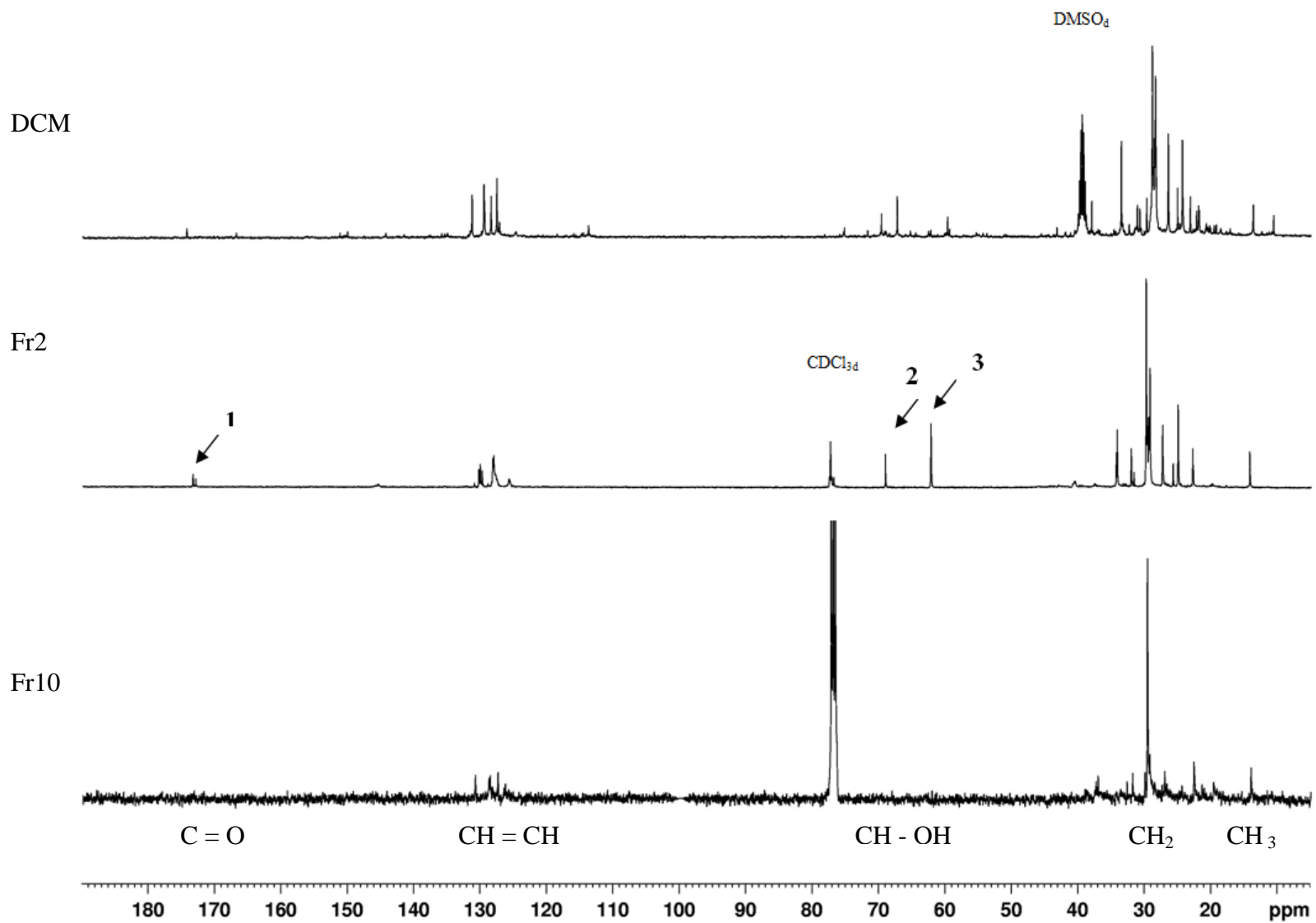
Lieberman/Burchard, seguido por estufa a 100°C por 5 min e visualização em UV(360 nm). Estes compostos foram evidenciados pela presença de manchas rosadas. Os iridóides foram confirmados pela presença de manchas roxas após a revelação com vanilina sulfúrica e estufa a 100°C por 5 min.

Tabela 14: Perfil fitoquímico do extrato DCM, Fr 2 e Fr 10, analisado por CCD.

| Grupos de Compostos Analisados | Revelador | Presença (+)/ Ausência (-) | | |
|---|---------------------|----------------------------|-----|------|
| | | DCM | Fr2 | Fr10 |
| Alcalóides | Dragendorff | - | - | - |
| Compostos Fenólicos | DPPH 0,04% | + | - | - |
| Monoterpenos, Sesquiterpenos e Diterpenos | Vanilina Sulfúrica | + | + | + |
| Triterpenos e Esteróides | Lieberman/ Burchard | + | - | - |
| Iridóides | Vanilina Sulfúrica | + | - | - |
| Cumarinas | UV | - | - | - |
| Quinonas | KOH 10% | - | - | - |

3.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

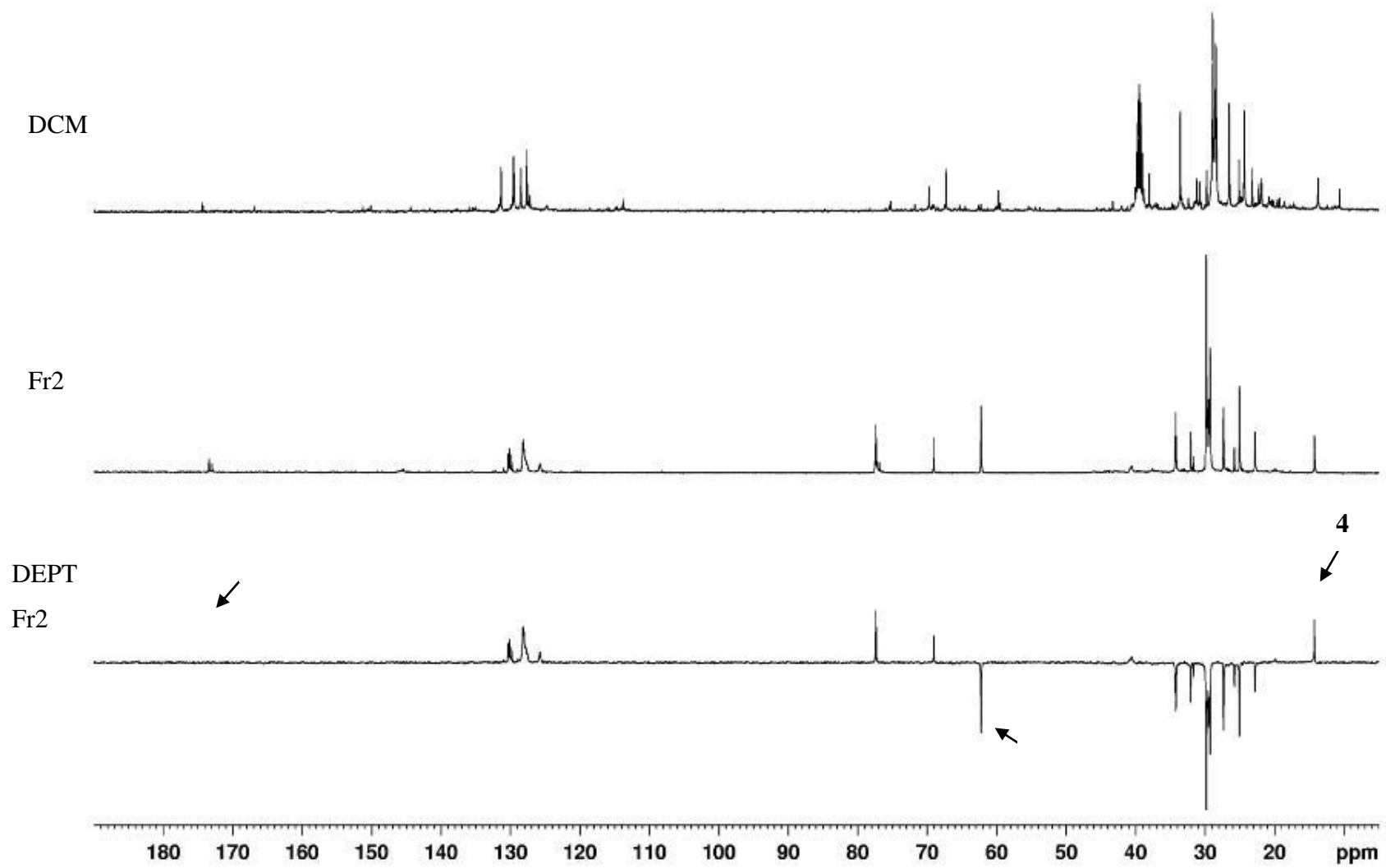
Para as análises de espectrometria de RMN, o extrato DCM foi solubilizado em DMSO_d, enquanto as demais amostras foram diluídas em CDCl₃ e os espectros, calibrados em relação ao pico central do solvente, com referência no padrão interno de TMS. Na figura 29 estão apresentados os espectros de RMN de ¹³C do extrato DCM e das frações obtidas por CC, Fr 2 e Fr 10. Como pode ser observado nos três espectros, existe uma grande quantidade de sinais na região de 20 a 40 ppm, típica de CH₂. No extrato DCM foram observados também, alguns sinais abaixo de 20 ppm que indicam grupo metil (CH₃). Já nas frações Fr 2 e Fr 10, foi observado apenas um pico bem definido de grupamento metil. Na região em torno de 130 ppm, também foram observados vários sinais indicando -CH = CH-, que se mantiveram presentes nas três frações. A fração Fr 2 mostrou um perfil bastante semelhante ao extrato DCM, porém pode-se perceber que com o fracionamento, uma série de pequenos sinais, possivelmente impurezas foram eliminados. As principais diferenças entre as frações Fr2

Figura 29: Espectros de ^{13}C -RMN do extrato DCM; da Fr 2 e Fr 10, respectivamente.

e Fr 10 estão enumeradas na figura 29 (1,2 e 3). No número **1**, é possível observar a ausência da carbonila na fração Fr 10, que se mostra presente nas demais amostras. Mais adiante na figura 30, através do experimento do DEPT, fica claro devida à sua ausência, que este grupamento apontado pelo número **1**, trata-se de um carbono quaternário. O número **2** evidencia um CH-OH, ausente na Fr 10. Enquanto o número **3**, indica um CH₂ ligado a uma hidroxila. Este grupamento também pode ser confirmado pelo DEPT, uma vez que neste experimento, os grupos CH₂ aparecem invertidos, enquanto os CH₃ permanecem no mesmo sentido (número **4**).

Na figura 31, são comparados os espectros da Fr 2 e das duas sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II, obtidas por CCD a partir da fração Fr 10. As principais diferenças observadas entre os espectros das duas sub-frações estão apontadas com os números **5**, **6** e **7**. É possível observar no número **5**, que os sinais obtidos na região em torno de 130 ppm da fração Fr 10 ficaram concentrados na sub-fração Fr 10.II. Nenhum sinal foi observado no espectro da Fr 10.I, nesta região específica de CH=CH. Outra diferença apontada pelo número **6** é a presença de um pico definido na região de 60 ppm (CH-OH), no espectro da Fr 10.II, ausente na Fr 10.I. O número **7** destaca a presença de um pico definido de CH₃, região abaixo de 20 ppm no espectro da Fr 10.II. Outra diferença visível, diz respeito ao número de sinais na região de CH₂ (20 a 40 ppm), que são muito mais intensos na fração Fr 10.II.

A fim de identificar o grupo de compostos presentes no extrato DCM e em cada uma das frações, os resultados obtidos por RMN e os resultados obtidos na caracterização do perfil fitoquímico foram comparados a dados encontrados na literatura (ZIEGENBEIN et al., 2006; TELES et al., 2006; HIROTANI et al, 1984; INO et al., 1984). Hirotani et al. (1984) isolaram e identificaram seis triterpenóides produzidos por *Perenniporia ochroleuca*. Segundo Tuner (1971), os fungos poliporóides são uma rica fonte de terpenos, o que também pode ser observado pela caracterização do perfil fitoquímico do extrato DCM. Porém, ao analisar os espectros de RMN apresentados pelas frações Fr 2, Fr 10.I e Fr 10.II, percebe-se um perfil bastante diferente dos espectros apresentados por compostos desse grupo. Os triterpenos, por exemplo, apresentam um grande número de carbonos quaternários, portanto sinais bastante intensos na região entre 160 e 180 ppm. Estes compostos também apresentam um grande número de dupla ligações e grupos metil, características não tão marcantes nos espectros obtidos.

Figura 30: Espectros de ^{13}C -RMN do extrato DCM e Fr 2 e DEPT-Fr 2.

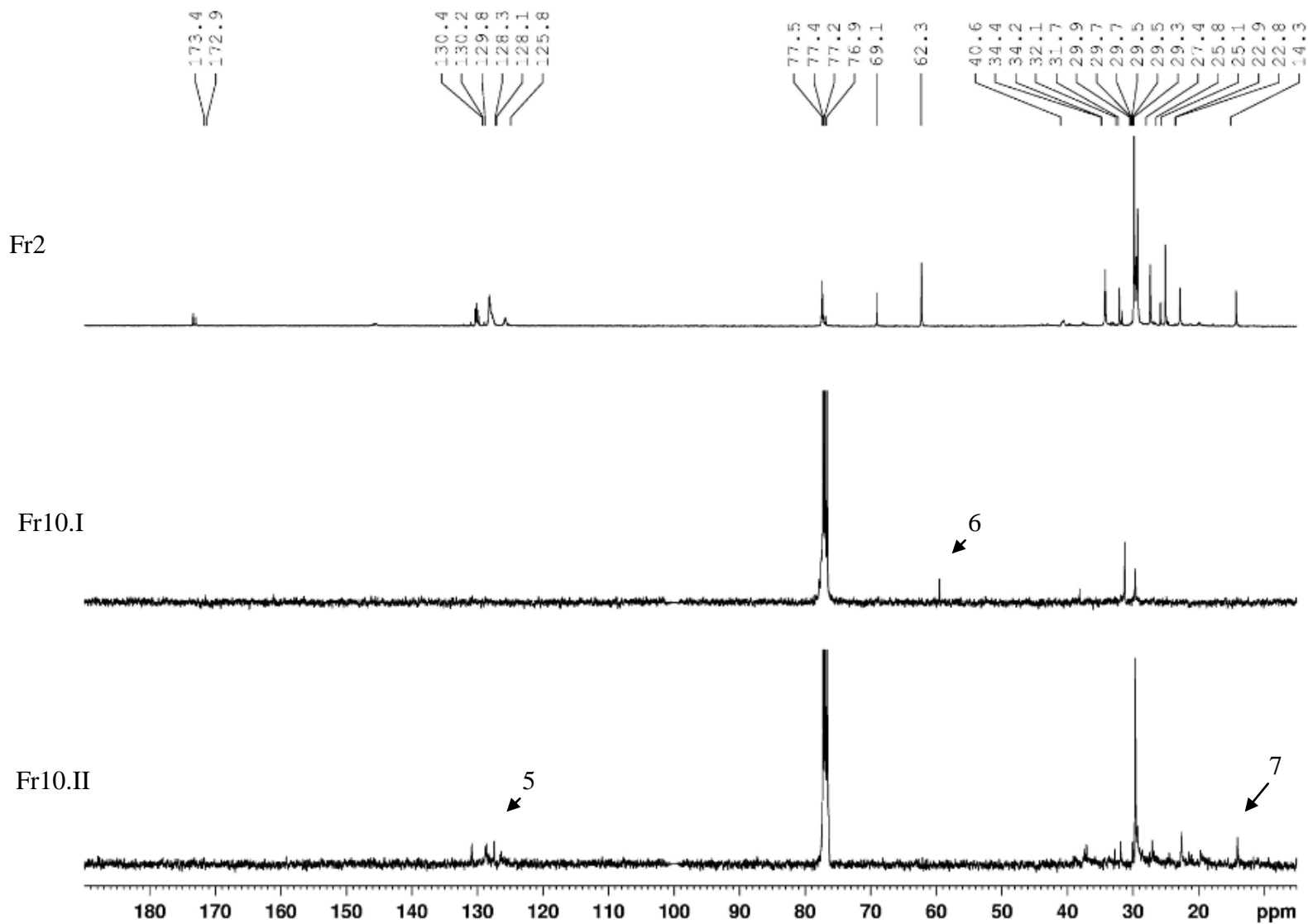


Figura 31: Espectros de ^{13}C -RMN da Fr 2, Fr 10.I e Fr 10.II, respectivamente.

As sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II também foram comparadas em relação aos seus espectros de ^1H -RMN, apresentados na figura 32. Como pode ser observado, os espectros de ^1H -RMN também confirmam o maior número de sinais de CH_2 encontrados no espectro ^{13}C -RMN da fração Fr 10. II. Os sinais apontados com o número **8** (Figura 32), que representam hidrogênios ligados a carbonos insaturados, não são observados na Fr 10.II, confirmando as diferenças encontradas pelo ^{13}C -RMN. Nas figuras 33 e 34, são apresentados os dados de integração dos seus respectivos espectros de ^1H -RMN.

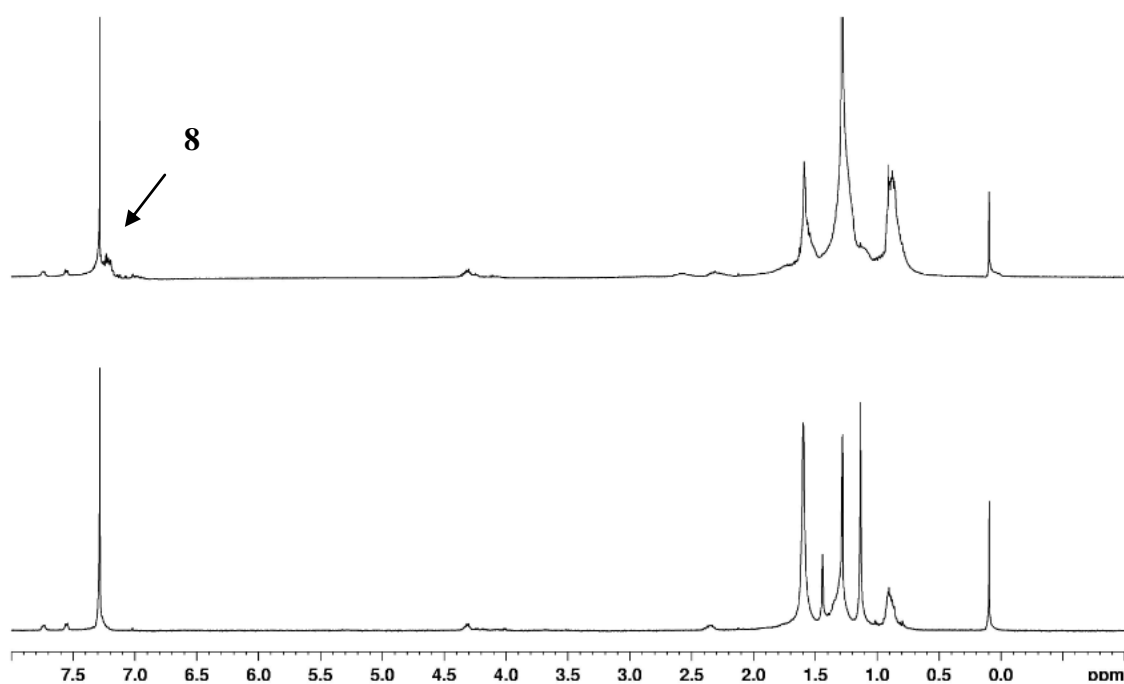


Figura 32: Espectros de ^1H -RMN das sub-frações Fr 10.I e Fr 10.II.

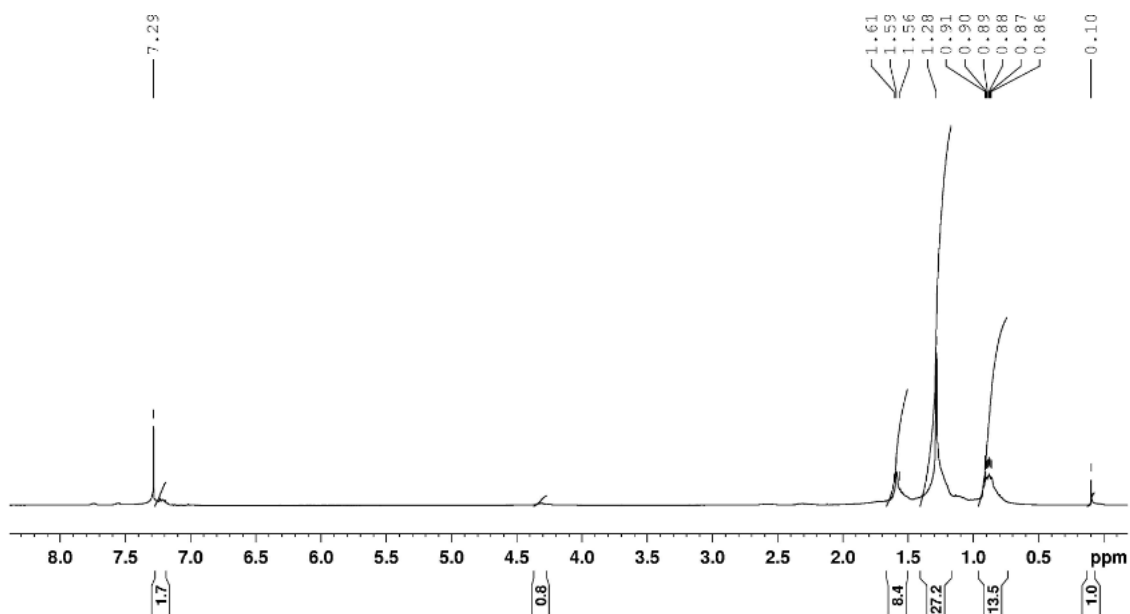


Figura 33: Integração do espectro $^1\text{H-NMR}$ da sub-fração Fr 10.I

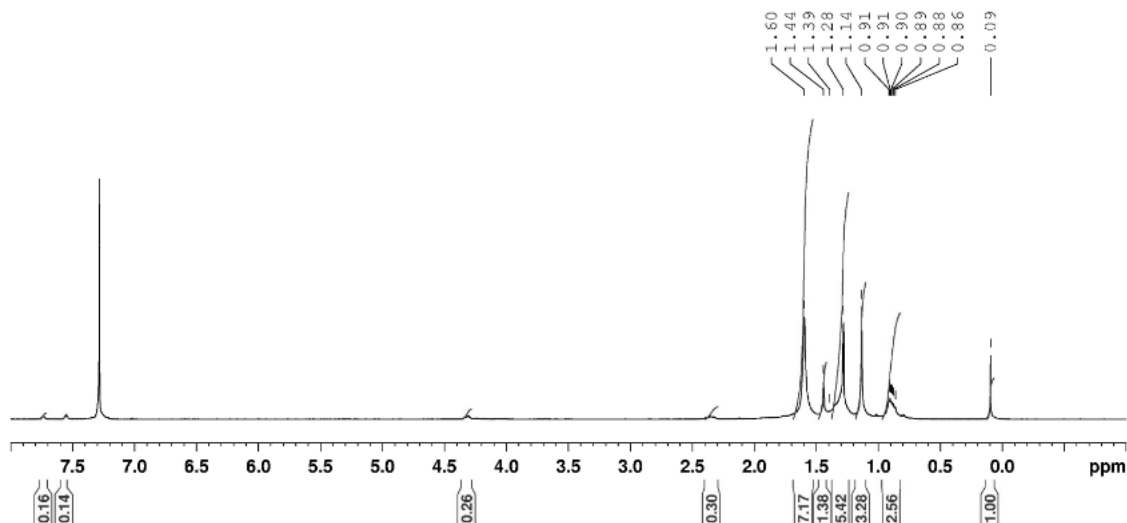


Figura 34: Integração do espectro $^1\text{H-NMR}$ da sub-fração Fr 10.II.

Com base nos resultados apresentados, nas proporções entre grupos CH_2 e CH_3 , os espectros foram comparados, também, aos espectros típicos de ácidos graxos. Como pode ser observado na figura 35, os espectros são muito semelhantes, tanto no que se refere a intensidade de sinais na região de CH_2 , presença de picos definidos na região de

60 a 70 ppm (carbonos hidroxilados), presença de insaturações e o sinal na região da carbonila. Considerando tais semelhanças, é possível afirmar que os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato de *P. martiusii* são ácidos graxos.

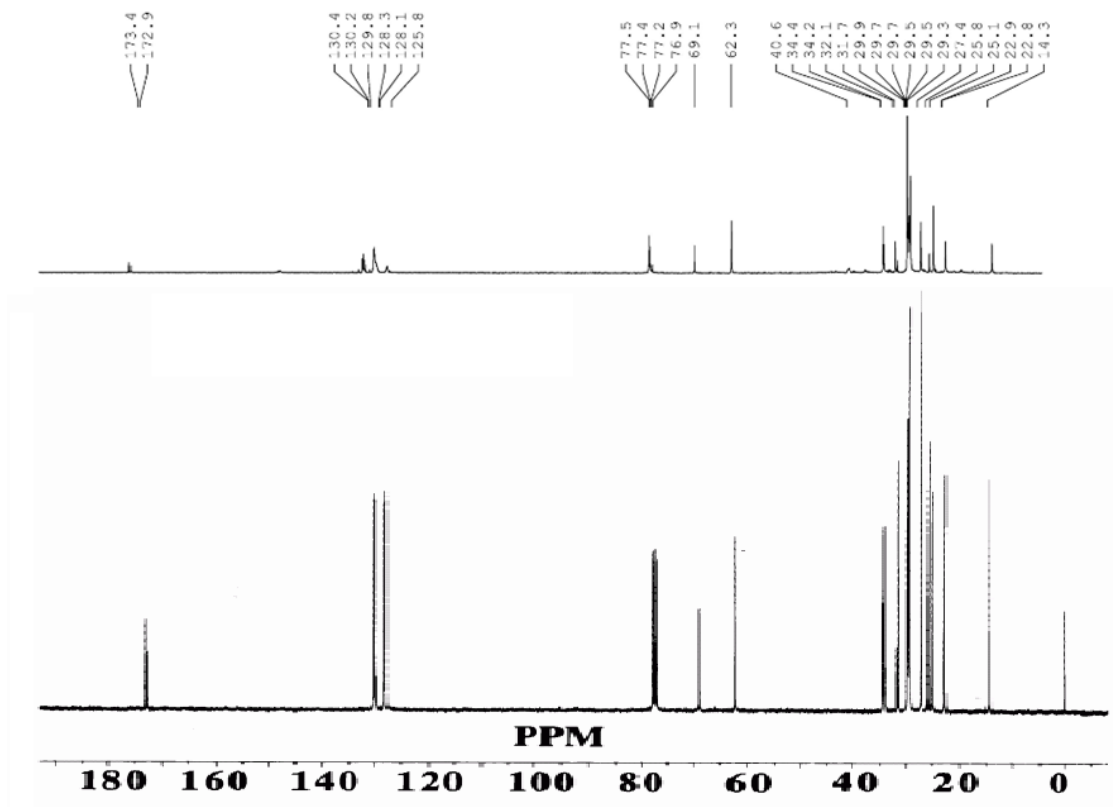


Figura 35: Comparação entre o espectro de RMN de ^{13}C da Fr2 e um espectro de RMN ^{13}C típico de ácidos graxos (Fonte: <http://www.lipidlibrary.co.uk/nmr/nmrsec/index.htm>).

4. CONCLUSÕES

- A espécie *P. martiusii* apresentou uma importante atividade antimicrobiana, com um amplo espectro de ação, agindo inclusive contra MRSA.
- Tanto a fração aquosa (filtrado) como o extrato hidroalcoólico obtido a partir do micélio cultivado apresentaram atividade antimicrobiana, porém o extrato foi eficiente contra um maior número de bactérias.

- A extração do micélio com diclorometano, seguida por fracionamento em coluna de sílica gel 60 permitiu a identificação de 2 frações (Fr2 e Fr10) como responsáveis pela atividade do extrato bruto.
- O refractionamento da fração Fr10 gerou duas novas subfrações (Fr10.I e Fr10.II), as quais apresentaram potente atividade antimicrobiana.
- Análises fitoquímicas e por ressonância magnética nuclear mostraram que as frações que apresentaram atividade contêm ácidos graxos poliinsaturados.
- A fim de se identificar os compostos isolados, uma vez que apresentam um grande potencial para produção de novos medicamentos, pretende-se ainda, confirmar a pureza da frações por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, determinar o padrão de absorbância no região UV, determinar a massa elementar, realizar análise de IR (infra vermelho).

5.REFERÊNCIAS

- AKDEMIR, Z.S. et al. "Phenolic compounds from Geranium pretense and their free radical scavenging activities". **Phytochemistry**, v. 56, p. 180, 2001.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. e BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4th Ed., 1996.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, p. 103-108, 1996.
- ANKE, T. Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. **Progress in Industrial Microbiology**. v. 27, p. 51-66, 1989.
- BARROS, L. et al. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 103, 413–419. 2007
- BENEDICT RG, BRADY LR. Antimicrobial activity of mushrooms. **J Pharm Sci**. v. 61, p.1820-1822, 1972.
- BERBEE, M. L.; e TAYLOR, J. W.; Convergence in ascospore discharge mechanism among pyrenomycete fungi based on 18S ribosomal RNA gene sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, n.1, p. 59-71, 1992.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp Biol. Med.*, v. 229, p. 393–406 2004.
- BOTTERWECK, A. A. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. 599-605, 2000.
- BRANDT CR, PIRAINO F. Mushroom antivirals. **Rec. Res Dev. Antimic. Ag. Chem.** v. 4, p. 11-26, 2000.
- BRIZUELA, M.A. et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolites secundários. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 15, p. 69-74, 1998.

CAZZI, R. et al. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 223-228, 1997.

CHANG, S.T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. **Int. Journal Oriental Medicine**. v. 1, p. 1-7, 1999.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidante activity and total phenolics of edible mushrooms extracts. **Food Chemistry**. v. 81, p. 249-255, 2003.

CHIHARA, G. Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiador. **Int. Journal Oriental Medicine**. v. 17, p. 57-77, 1992.

CHO, E.J. et al. Production of exopolysaccharide by submerged mycelia culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **J. Biotechnology**, v. 127, p. 129-140, 2006.

CUI, F.J. et al. Optimization of the medium composition for production of mycelia biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. **Biossource Technology**, v. 97, p. 1209-1216, 2006.

DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; LEIFA, L. et al. Anti-tumoral effect of supplemented feed with *Agaricus brasiliensis* on Sarcoma 180-bearing mice. In: Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, **Abstracts**, Shangai, China, 160. 2006.

DE MEIJER, A.A.R.; **Preliminary List of the Macromycetes from the Brazilian State of Paraná**; Boletim do Museu Botânico Municipal 28, Prefeitura Municipal de Curitiba, Secretaria Municipal do Meio Ambiente, Departamento de Produção Vegetal, Curitiba –Paraná – Brasil; dezembro, boletim N° 68, 2006.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**. v. 55, p. 396-407, 1997.

DUBOIS, M. et al. “Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chemistry**, v. 28, p. 350, 1956.

EL-ENSHASYA, H.A.; **Filamentous Fungal Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications**. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, New Technologies and Applications, 9 : 225-261, 2007

EL-KATTAN, M.H., AFIFY, A.S., ALY, A.Z.M. Evaluation of *Pleurotus sajor-caju* fungal pellets as food. *Mushrooms J. Trop.* v. 11, p. 13–22, 1991.

ELMASTAS, M.; ISILDAK, O.; TURKEKUL, I.; TEMUR, N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 337–345, 2007.

ESPENSHADE, M.A.; GRIFFITH, E.W. Tumor-inhibiting basidiomycetes. Isolation and cultivation in the laboratory. **Mycologia**. V. 58, p. 511-517, 1966.

FAN, L. Production of extra-cellular polyssacharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect. 2000. Tese, Doutorado em Processos Biotecnológicos.

FIRENZUOLI, F.; GORI, I.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Adv. Access Publicaion**, v. 5 (1), p. 3-15, 2007.

GETHA, K.; HATSU, M.; WONG, H.J.; LEE, S.S. Submerged cultivation of basidiomycete fungi associated with root diseases for production of valuable bioactive metabolites. **J. Trop. Forest Science**. v. 21(1), p. 1-7, 2009.

GHORASHI, S.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Isolation of biologically active compounds from *Ganoderma* sp. Poceedings of the 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and The International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds. p. 189-195, Pattya, 2003.

GONZAGA, M. L. C. ; RICARDO, N. M. P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 43-49, 2005

GREGORY, F.J. et al. Studies of antitumor substances produced by basidiomycetes. **Mycologia**. v. 58, p. 80-90, 1966.

HALLIEWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal** , v. 219, p. 1-4, 1984.

HARDMAN, A, LIMBIRD L, GOODMAN GILLMAN A. (editors) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Tenth Edition. New York: McGraw-Hill; 2001.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.** v. 95, p. 641-645, 2001.

HIROTANI, M.; INO, C.; FURUYA, T.; SHIROT, M. Pereniporiol derivatives six triterpenoids from the cultured mycelia of *Perenniporia ochroleuca*. **Phytochemistry.** v. 23, p. 1129-1134, 1984.

HUANG, S-J.; TSAI, S-Y.; LEE, Y-L.; MAU, J-L. Non volatile taste components of fruit bodies and mycelia of *Cordyceps militaris*. **LWT**, 39, p. 577-583, 2007.

HUANG, G.W. Taste quality and antioxidant and mutagenic properties of *Pleurotus citrinopileatus*. Master's Thesis, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. 2003.

INO, C.; HIROTANI, M.; FURUYA, T. Two pereniporiol derivatives, lanostane-type triterpenoids, from the cultured mycelia of *Perenniporia ochroleuca*. **Phytochemistry.** v. 23, p. 2885-2888, 1984.

ISAKA M, TANTICHAREON M, KONGSAEREE P, THEBTARANONTH Y. Structures of Cordypyridones A-D, anti-malarial N-hydroxy- and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. **Journal of Organic Chemistry.** v. 66(14), p. 4803-4808, 2001.

KANATSU, N. et al. Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities. **J. Antibiot. Ser. A.**, v. 16, p. 139-143, 1963.

KAVANAGH, F.; HERVEY, A.; ROBBINS, W.J. Antibiotics substances from basidiomycetes. VI. *Agrocybe dura*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 36, p. 102-106, 1950.

KIM, S.W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. **Let. Appl. Microbiol.** v. 34, p. 56-61, 2002.

KIM, H. H. et al. Effects of Dissolved Oxygen Control on Cell growth and EPS production in Batch Culture of *Agaricus blazei*. **Korean Journal Chemical Engineering.**, 2, 80-84. 2006

KITTAKOOP, P. et al. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. **Phytochemistry**, 52, p. 453-457, 1999.

- KUPRA, J., ANKE, T., OBERWINKLER, G., SCHRAMN, G., STEGLICH, W. Antibiotics from basidiomycetes VII. *Crinipellis stipitaria* (Fr.) Pat. **Journal of Antibiotics**. v.32, p. 130-135, 1979.
- KURBANOGLU, E.B.; ALGUR, O.F.; ZULKADIR, A. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* in ram horn hydrolysate. **Ind. Crops and Products**. v. 19, p. 225-230, 2003.
- LAM, Y.W.; NG, T.B.; WANG, H.X. Antiproliferative and antimitogenic activities in a peptide from puffball mushroom *Calvatia caelata*. **Bioch. Biophys. Res. Commun.** v. 289, p. 744-749, 2001.
- LEE, S. et al. Antimetastatic and immunomodulating properties of a new herbal prescription, Bojung-bangam-tang. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 147-157, 2006.
- LEE, K.G; MITCHELL, A.E.; SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 4817-4820, 2000.
- LI, S. P.; YANG F. Q.; TSIM K. W. K. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2006.
- LI, S. P. et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. **Phytomedicine**, 2005.
- LITCHFIELD, J.H. Morel mushroom mycelium as a food flavoring material. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 9, p. 289-304. 1967.
- LIU, F.; OOI, V.E.C.; CHANG, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. **Life Sciences**, v. 60, p. 763-771, 1997.
- LIU, F.; OOI, V.E.; FUNG, M.C. Analysis of immunomodulating cytokines mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sciences**, v. 64, p. 1005-1011, 1999.
- LO, S.H. Quality evaluation of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eringii*, *Pleurotus ferulae* and *Pleurotus ostreatus* and antioxidant properties during postharvest storage. Master's Thesis, National Chung-Hsing University, Taiching, Taiwan. 2005.

- LOLIGER, J. The use of antioxidants in foods. In Free radical and food additives (pp. 121-150). London: Taylor e Francis. 1991.
- LOVY A, KNOWLES B, LABBE R, NOLAN L. Activity of edible mushrooms against the growth of human T4 leukemia cancer cells, and *Plasmodium falciparum*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. v. 6(4), p. 49-57, 1999
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANFIO, G. P. Avaliação do Estado Do Conhecimento da Diversidade Biológica do Brasil. COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP. Ministério do Meio Ambiente - Secretaria De Biodiversidade e Florestas - Diretoria de Conservação da Biodiversidade. **Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica (BRA 97 G 31) MMA/GEF/PNUD**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em junho de 2008.
- MAU, J. L.; CHANG, C. N., HUANG, S. J. ; CHEN, C. C. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. **Food Chemistry**, 87, p. 111-118, 2004.
- MAZIERO, R; CAVAZZONI, V.; BONONI, VLR. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharides and biomass in submerged culture. **Rev Microbiol**. v. 30, p. 77-84, 1999.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMY, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.
- MIZUNO, T.; SAITO, H.; NISHITOBA, T. & KAWAGASHI, H. Antitumoractive substances from mushrooms. **Food Research International**, 11, 23-61. 1995b
- MORADALI MOHAMMAD-F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S., et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 701–724, 2007.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival- application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTHANA , R.A.A. et al. Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. **J. Nat. Prod.** v. 63, p. 116-118, 2000.
- OOI, V. E. C.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1, 195-206. 2000
- ORDÓÑEZ, R.M. et al. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**. v. 27, p. 1187-1191, 2006.
- PATERSON, R.R.M. *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1985-2001, 2006.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p.4487-4490, 1998.
- POKHREL, C.P.; OHGA, S. Submerged culture conditions for mycelia yield and polysaccharide production by *Lyophyllum decastes*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 641-646, 2007.
- RIBEIRO, B. et al. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom cap and stipes. **Food Chemistry**. v. 110, p. 47-56, 2008.
- ROSA, L. H. et al. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 98 (7), p. 967-974, 2003
- ROSADO, F.R. et al. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* “florida” Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 119-124, 2003.
- SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 17, p. 73-81, 2000.
- SEKIZAWA, R. et al. Panepophenanthrin, from a mushroom strain, a novel inhibitor of the ubiquitin-activating enzyme. **Journal of Natural Products**. v. 65, p. 1491-1493, 2002.

- SHAMTSYAN, M. et al. Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. **Journal of Biotechnology**, 113, p.77-83, 2004.
- SARKAR, S.; KOGA, J.; WHITLEY, R.J.; CHATTERJEE, S. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus 1. **Antiviral Res.** v. 20(4), p. 293-303, 1993.
- SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 101, p. 10-19, 2007.
- SIMIC, M.G. Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 377-386. 1988.
- SHU, C.H.; LUNG, M.Y. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. **J. Chinese Inst. Chem. Eng.**, v. 39, p. 1-8, 2008.
- SMANIA, E. F. A. et al. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, 74, p. 375-377, 2003.
- SOARES, A.S. et al. Antioxidante activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 112, p. 775-781, 2009.
- SOCCOL, C. R. et al. **Mushrooms, a Promising Source to Produce Nutraceutical and Pharmaceutical Bioproducts**. In: Ashok Pandey and Thanasis Koutinas (Org.).Adv. Bioproc. Food Ind. New Dehi: Asitech Publishers, 2006.
- STAMETS, P. Novel antimicrobials from mushrooms. **J. Am. Bot. Council**. v.54, p. 28-33, 2002.
- SUAY, I. et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 78, p. 129-139, 2001.
- SUZUKI, I. et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-culture *Grifola frondosa*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 37, p. 410-413, 1990.
- TAYLOR, P.R. et al. The b-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of the cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol**, v. 169(7), p. 3876-3882, 2002.

- TANG, Y. J. ZHONG, J. J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodérico acid. **Enzyme and Microbial Technology** 31, p. 20-28, 2002.
- TEISSENDRE, P.L.; LANDRAULT, N. Wine phenolic contribution to dietary intake and bioavailability. **Food Research International**, v. 33, p. 461-467, 2000.
- TELES, H.L. et al. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiá aromática*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2686-2690, 2006.
- TURKOGLU, A. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murril. **Food Chemistry**. v. 101, p. 267-273, 2007.
- VALENTÃO, P. et al. Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 3626-3630, 2005.
- WAGNER, R.; MITCHELL, D. A.; SASSAKI, L. G.; AMAZONAS, M. A. L. A. Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for production of exopolysaccharides. **Journal Biotechnology**, 114, p. 153-164, 2003
- WANG, H e NG, T. B. Ganoderming, na antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, 27, p.27-30, 2006.
- WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 13-32, 2002.
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 65–96. 1999.
- WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J. Anticarcinogenic effects of synthetic phenolic antioxidants. In Oxidants, antioxidants, and free radicals (pp. 341-350). USA: Taylor e Francis. 1997.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963a.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WU, J. Y., ZHANG, Q. X; LEUNG, P. H. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. **Phytomedicine**, 2005.

XIAO, J-H. et al. Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps jiangxiensis* using desirability functions. **Process Biochemistry**, 2006.

ZHONG, J.J.; TANG, Y.J. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. **Adv. Bioch. Eng. Biotech.** v. 87, p. 25-29, 2004.

ZIEGENBEIN, F.C.; HANSSEN, H.P.; KONIG, W.A. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. **Phytochemistry**. v. 67, p. 202-211, 2006.