UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATLIN SUELLEN RECH

CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO DOS FUNGOS *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. E *Suillus* sp., ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*

CURITIBA

2017

KATLIN SUELLEN RECH

CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE CULTIVO DOS FUNGOS *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. E *Suillus* sp., ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadores: Prof. Dr. Celso Garcia Auer
Dr.ª Beatriz Cristina Konopatzki Hirota

CURITIBA

2017

Rech, Katlin Suellen
Caracterização e otimização de cultivo dos fungos *Bjerkandera adusta, Rhizoctonia sp. e Suillus sp.,* estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extratos de *Bjerkandera adusta* / Katlin Suellen Rech – Curitiba, 2017.
159 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Coorientador: Professor Dr. Celso Garcia Auer
Coorientadora: Professora Dra. Beatriz Cristina Konopatzki Hirota
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Fungos. 2. *Rhizoctonia. 3.* Pinus. 4. Cromatografia líquida. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Auer, Celso Garcia. III. Hirota, Beatriz Cristina Konopatzki. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título

. CDD 615.19

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
http://www.farmaceuticas.ufpr.br

TERMO DE APROVAÇÃO

KATLIN SUELLEN RECH

Título: **"CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE CULTIVO DOS FUNGOS *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia sp.* e *Suillus sp.*, ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Profª. Drª. Marilis Dallarmi Miguel
Orientadora

Dr. Celso Garcia Auer
Co-orientador

Profª. Drª. Deise Prehs Montrucchio
Universidade Federal do Paraná

Drª. Cristiane Vieira Helm
Embrapa Florestas

Curitiba, 21 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido o dom da vida, por ser minha fortaleza, a força que me permite seguir sempre em frente independente dos altos e baixos que possam surgir, minha paz interior, meu sustento.

À minha mãe, Sônia, por ser um exemplo de pessoa, mulher e mãe. Nada que eu faça será suficiente para retribuir tudo o que você fez e continua fazendo por mim. Obrigada por estar ao meu lado nas horas boas e ruins, por apoiar minhas decisões, pelas palavras e gestos de carinho.

Ao meu pai, Wilson, pelo incentivo aos estudos, por me repreender quando preciso, por me fazer me tornar uma pessoa determinada e forte.

Aos meus irmãos, Caroline e Welington, pelo companheirismo, por tornarem minha vida mais feliz, por me ajudarem quando preciso, por me fazerem ser uma pessoa melhor a cada dia.

A minha família curitibana, família Neves. Mari, Glória e Idércio agradeço por sempre me tratarem com carinho. Mari, obrigada pela amizade de anos, pelas conversas, pelas noites que passávamos inventando histórias, pelas risadas, por ser minha cobaia quando eu resolvia testar uma receita nova. Glória, obrigada por ter me levado àquela feira de profissões que seria decisiva para o meu futuro.

A família Siqueira, em especial ao Robson, pela amizade e compreensão.

Aos meus amigos da graduação: Caroline, Ellen, Franciele, Allan e Raquel. Obrigada pela amizade de vocês, pelo apoio, pela torcida! Cada um de vocês me ensinou algo que vou levar para sempre comigo. Vocês me fazem ver que a amizade é capaz de superar inúmeras coisas e acreditar em amizades sinceras e duradouras.

À Laerte, Aline e Ivonete da DALL Soluções. Serei eternamente grata pela oportunidade que vocês me deram. Nesse quase um ano em que fiquei com vocês, tenho certeza que aprendi muito e cresci profissionalmente e pessoalmente. Obrigada por terem me apoiado quando eu tomei a decisão de começar o mestrado. Obrigada pela atenção e carinho com que sou tratada por vocês, e por estarem sempre de portas abertas.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Ciências Farmacêuticas e à Embrapa Florestas pela oportunidade.

À minha orientadora, Dra Marilis Dallarmi Miguel, por ter respondido àquele email que enviei a alguns anos atrás me dando a oportunidade de fazer a iniciação científica no laboratório de Farmacotécnica, e que me faria continuar ali até o Mestrado. Professora, muito obrigada pela oportunidade, nunca esquecerei disso. Por ter me recebido tão bem, pela atenção e carinho, pelos ensinamentos, puxões de orelha quando preciso, pelo incentivo, pela confiança.

Ao professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pelos ensinamentos, por ter me acolhido no grupo de Pesquisa de Produtos Naturais, por sempre ser paciente comigo, me tratar com carinho, pela confiança, pelas oportunidades, pelas tentativas como cupido (que não deram muito certo mas agradeço por tentar, professor! Uma hora vai!). Professor, tenha a certeza de que muito do que aprendi durante esses anos devo a você, sou muito grata por tudo que você fez por mim.

Ao meu coorientador, Dr. Celso Garcia Auer, pela oportunidade, pelo auxílio, pelos ensinamentos, pelas conversas descontraídas.

À minha coorientadora Dra Beatriz Hirota. Bia, obrigada pelas contribuições e correções no trabalho, por estar sempre disposta a ajudar, pelo carinho e amizade. Torço muito por você!

À Dra Cristiane Paula por todo o apoio durante o mestrado, pelo auxílio na execução do trabalho, pelas conversas, pelo carinho e amizade.

Aos amigos que fiz durante o mestrado. Em especial, Camila, Paula, Fernando, Angela e Susan. Vocês tornaram meus dias mais leves e alegres!

Cami e Paula obrigada por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, pelo trabalho em equipe, pela parceria, pelo companheirismo, pela força que vocês sempre me deram, pela paciência com os meus atrasos, pelas risadas, pelos momentos de descontração, pelos incentivos, pela compreensão, pelas caronas, por estarem ao meu lado quando eu precisava, por me apoiarem e me incentivarem. O convívio e a amizade de vocês foi um dos presentes mais importantes que tive a oportunidade de ganhar durante o mestrado. Amizade que começou a 2 anos atrás mas que vai durar muitos outros. Contem sempre comigo!

Ao auxílio da doutoranda Camila Freitas de Oliveira, das pós doutorandas Beatriz Hirota e Cristiane de Paula e da mestranda Paula Moura em diversas etapas desse trabalho. À doutoranda Angela Souza pela amizade e ajuda nos ensaios microbiológicos. Ao Dr. Vinicius Bednarczuk pelo treinamento e auxílio com o

HPLC, por ajudar sempre que preciso, pelas dicas, conversas, risadas, carinho desde a época de IC.

Aos amigos e colegas dos laboratórios de Farmacotécnica e Fitoquímica: Filipe Horst, Mariana Oshiro, Fernando Fernandes, Alethéia Furusho, Ligia Burci, Cibéli Martins, Carolina Sette, Ricardo de Lara, Letícia Freire, Gustavo de Oliveira, Francis Merino, Gislene Fujiwara, Natasha Fabri, Natasha Stopinski, Larissa Gatto, Samantha Golin, Yohans Moncada, Ellis Szabo, Isabel Mignoni, Ana Flávia, Mariana Saragioto, Luciane Dalarmi, Fernanda Ocampos, Viviam Porfirio, Gisele Joslin, pelas conversas, e aos demais que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho. Sentirei saudades de passar parte dos meus dias com vocês!

Aos professores Dra Josiane Dias, Dra Sandra Zanin, Dra Deise Montrucchio e Dr. Vitor Kerber pelas contribuições, conversas e ensinamentos.

À Dra Cristiane Bezerra por me incentivar a entrar no mestrado.

À professora M.ª Maria Eugênia do laboratório de Bromatologia da UFPR, e ao técnico Jair Lima do departamento de Nutrição da UFPR pelo auxílio com as análises nutricionais.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Caroline de Bastos Bührer (Carol) e Davi Nunes da Veiga (“Seu” Davi), pelo auxílio, dicas e pela convivência.

Ao Dr. André Rüdiger do laboratório de Difração de Raios X de Monocristal, do Departamento de Química da UFPR, pelo auxílio com a análise de cristalografia.

Ao técnico do laboratório de Farmacoténica, Paulo Diniz pela disponibilidade e auxílio. Aos técnicos Maurício e Maria da Graça da Central Analítica, por auxiliarem sempre que necessário, pela simpatia e alegria.

Ao secretário do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Jean Godoi, pelo auxílio, pela dedicação, pelas conversas animadas.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento repassado.

À CAPES pelo suporte financeiro.

"Eu sou aquela mulher
a quem o tempo muito ensinou.
Ensinou a amar a vida
e não desistir da luta,
recomeçar na derrota,
renunciar a palavras
e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos
e ser otimista".
(Cora Coralina)

RESUMO

Os fungos *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. e *Suillus* sp. são fungos encontrados associados a plantas do gênero *Pinus.* O presente estudo tem como objetivo fornecer informações quanto as melhores condições de cultivo para esses fungos, além da abordagem química, análises físico-químicas e a investigação das atividades biológicas de *Bjerkandera adusta*. As colônias puras foram cultivadas em meio líquido visando maior produção de massa fúngica, variando-se os parâmetros: temperatura, meio de cultivo e tempo de incubação. Observou-se que a produção de massa micelial foi afetada por esses parâmetros, sendo maior quando empregadas as seguintes condições: 24 °C, meio BD ou extrato de malte, 28 a 35 dias de incubação para *Bjerkandera adusta;* 16 °C, meio BD ou extrato de malte, e 21 a 35 dias de incubação para *Rhizoctonia* sp.; e 16 a 20 °C, meio extrato de malte e 28 dias de incubação para *Suillus* sp. A massa fúngica e o caldo fermentado de *B. adusta* proveniente desses ensaios foram utilizados no preparo de extratos, analisados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram positivos para flavonoides e esteroides/triterpenos em CCD e variaram entre si em sua composição química. Cristais foram isolados da massa fúngica de *B. adusta* a 12°C, identificados por cristalografia como sendo o dissacarídeo α,α-trehalose dihidratada. Posteriormente, realizou-se a produção da biomassa do fungo *B. adusta*. Foram realizadas as análises físico-químicas, como resultados obteve-se: 7,97% de umidade, 3,27% de cinzas, 9,32% de proteínas, 1,36% de lipídeos, 63,45% de carboidratos, 5,31% de fibras, 3,33% de quitina e pH de 4,99. O restante foi submetido a extração em Soxhlet, obtendo-se os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico. Esses extratos, além do extrato do caldo fermentado, foram utilizados nos ensaios de atividade biológica: avaliação do potencial tóxico frente à *Artemia salina*; atividade hemolítica; teor de compostos fenólicos totais; avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e Fosfomolibdênio; e avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia da concentração inibitória mínima (CIM). O extrato hexano foi tóxico para *Artemia salina*. Esse extrato exibiu toxicidade sobre as hemácias em placa de ágar sangue. Os extratos hexano e clorofórmio apresentaram atividade hemolítica. Os extratos clorofórmio, acetato de

etila do micélio e do meio, e metanólico apresentaram alto teor de fenóis. Os extratos acetato de etila, da massa micelial e do caldo fermentado, e metanólico apresentaram atividade antioxidante pelo método do DPPH. O extrato acetato de etila do micélio apresentou maior atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio. Os extratos apresentaram baixa atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: *Bjerkandera adusta*; *Rhizoctonia* sp.; *Suillus* sp.; *Pinus* sp.; cultivo; atividades biológicas; análise química.

ABSTRACT

The fungi *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. and *Suillus* sp. are fungi found associated with plants of the genus *Pinus*. The present study aims to provide information about the best cultivation conditions for these fungi, as well as the chemical approach, physicochemical analyzes and the investigation of the biological activities of *Bjerkandera adusta*. The pure colonies were cultivated in liquid medium aiming at higher production of fungal mass, varying the parameters: temperature, culture medium and incubation time. It was observed that the production of mycelial mass was affected by these parameters, being higher when the following conditions were used: 24 °C, BD or malt extract medium, 28 to 35 days of incubation for *Bjerkandera adusta*; 16 °C, BD or malt extract medium, and 21 to 35 days of incubation for *Rhizoctonia* sp .; And 16 to 20 °C, malt extract medium and 28 days of incubation for *Suillus* sp. The fungal mass and fermented broth of *B. adusta* from these tests were used in the preparation of extracts, analyzed by thin layer chromatography (CCD) and high performance liquid chromatography (HPLC), they were positive for flavonoids and steroids/triterpenes in CCD and varied among themselves in their chemical composition. Crystals were isolated from the fungal mass of *B. adusta* at 12 ° C, identified by crystallography as being disaccharide α, α-trehalose dihydrate. Subsequently, the biomass of the fungus *B. adusta* was carried out. The physico-chemical analyzes were performed, as results were obtained: 7.97% moisture, 3.27% ash, 9.32% protein, 1.36% lipids, 63.45% carbohydrates, 5.31% fibers, 3.33% chitin and pH of 4.99. The remainder was subjected to Soxhlet extraction, extracting hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts. These extracts, in addition to the extract of the fermented broth, were used in the biological activity tests: evaluation of the toxic potential against *Artemia salina*; hemolytic activity; content of total phenolic compounds; evaluation of antioxidant activity by DPPH and Phosphomolybdenum methods; and evaluation of the antimicrobial activity by the minimum inhibitory concentration methodology (MIC). The hexane extract was toxic to *Artemia salina*. This extract showed toxicity on the red blood agar plate. The extracts hexane and chloroform showed hemolytic activity. The chloroform, ethyl acetate, of the mycelium and of the medium, and methanolic extracts, presented high phenol

content. The ethyl acetate, mycelial mass and fermented broth, and methanolic extracts presented antioxidant activity by the DPPH method. The ethyl acetate extract of the mycelium presented higher antioxidant activity by the Phosphomolybdenum method. The extracts presented low antimicrobial activity.

Keywords: *Bjerkandera adusta*; *Rhizoctonia* sp.; *Suillus* sp.; *Pinus* sp.; cultivation; biological activities; physicochemical analysis; chemical analysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLORESTA COMERCIAL DE PINUS 28
FIGURA 2 – *Bjerkandera* sp. 39
FIGURA 3 – *Suillus* sp. 40
FIGURA 4 – ASPECTOS PATOLÓGICOS DE *Rhizoctonia* sp. 42
FIGURA 5 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 12 °C 76
FIGURA 6 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 16 °C 77
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 20 °C 78
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C 80
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 28 °C 81
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 32 °C 82
FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta* A 12 °C 84
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 16 °C 85
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 20 °C 86

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C 88
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 28 °C 89
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 32 °C 90
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (MEIO BD HIMEDIA®) 92
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C..... 97
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 24 °C..... 99
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C 101
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO EXTRATO DE MALTE DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C 102
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®) 103
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (EXTRATO DE MALTE HIMEDIA®)..... 104
FIGURA 24 – CURVA TÍPICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO 106
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 7 DIAS DE CRESCIMENTO 111

FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 14 DIAS DE CRESCIMENTO 111
FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 21 DIAS DE CRESCIMENTO 112
FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 28 DIAS DE CRESCIMENTO 113
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 35 DIAS DE CRESCIMENTO 114
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 7 DIAS DE CRESCIMENTO 117
FIGURA 31 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 14 DIAS DE CRESCIMENTO 118
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 21 DIAS DE CRESCIMENTO 119
FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 28 DIAS DE CRESCIMENTO 120
FIGURA 34 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 35 DIAS DE CRESCIMENTO 121
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®) 122
FIGURA 36 – CRISTAIS (SAE12) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*..... 125
FIGURA 37 – ESTRUTURA DA TREALOSE..... 126

FIGURA 38 – ARRANJO DOS ÁTOMOS DA α,α-TREALOSE DIIDRATADA COM 30% DA PROBABILIDADE DA DENSIDADE DE ELETRÔNICA 126
FIGURA 39 – REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO LIGANDO AS MOLÉCULAS DE α,α-TREALOSE E ÁGUA AO LONGO DO EIXO A. AS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIOS ESTÃO REPRESENTADAS POR LINHAS TRACEJADAS 127
FIGURA 40 – ESTRUTURA DA QUITINA..... 130
FIGURA 41 – ESPECTRO EM IV DA QUITINA EXTRAÍDA DO FUNGO *Bjerkandera adusta* 131

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 69
GRÁFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 71
GRÁFICO 3 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 72
GRÁFICO 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 73
GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO 93
GRÁFICO 6 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO 94
GRÁFICO 7 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO 95
GRÁFICO 8 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) 105
GRÁFICO 9 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 20 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) 107
GRÁFICO 10 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD A 16 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) 108
GRÁFICO 11 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* 135
GRÁFICO 12 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH 138
GRÁFICO 13 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH 138

GRÁFICO 14 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH..... 139
GRÁFICO 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C... 141

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – FUNGOS ISOLADOS DE *Pinus* sp. EMPREGADOS NOS ENSAIOS 45
QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÁGAR BATATA DEXTROSE HIMEDIA® 45
QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CALDO BATATA DEXTROSE HIMEDIA® 48
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE MALTE HIMEDIA® 48
QUADRO 5 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO LÍQUIDO CZAPEK 48
QUADRO 6 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CALDO BATATA DEXTROSE KASVI® 50
QUADRO 7 – MARCHA QUÍMICA EM CCD 52
QUADRO 8 – VARIAÇÃO DA FASE MÓVEL NO DECORRER DA CORRIDA 53
QUADRO 9 – DADOS DO CRISTAL E DE REFINAMENTO DE ESTRUTURA PARA TREALOSE 55
QUADRO 10 – REAGENTES UTILIZADOS NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS 64
QUADRO 11 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE DPPH 65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD 70
TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO BD 71
TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE 72
TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD 73
TABELA 5 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* E DO CONTROLE OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 75
TABELA 6 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 12 °C 76
TABELA 7 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 16 °C 78
TABELA 8 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 20 °C 79
TABELA 9 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 24 °C..... 81
TABELA 10 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 28 °C..... 82
TABELA 11 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 32 °C..... 83
TABELA 12 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* E CONTROLE OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA 83
TABELA 13 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 12 °C 85
TABELA 14 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 16 °C 86
TABELA 15 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 20 °C 87
TABELA 16 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C 88
TABELA 17 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 28 °C 89
TABELA 18 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 32 °C 91

TABELA 19 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (MEIO BD HIMEDIA®)..... 92
TABELA 20 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Bjerkandera adusta*..... 94
TABELA 21 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Suillus* sp. 94
TABELA 22 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO Rhizoctonia sp..95
TABELA 23 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* E DOS CONTROLES OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO 96
TABELA 24 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C 98
TABELA 25 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 24 °C..... 99
TABELA 26 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DOS CALDOs FERMENTADOS DE *Bjerkandera adusta* E DOS CONTROLES OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO 100
TABELA 27 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C101
TABELA 28 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO EXTRATO DE MALTE DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C..... 102

TABELA 29 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®) 103
TABELA 30 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (EXTRATO DE MALTE HIMEDIA®) 104
TABELA 31 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C 106
TABELA 32 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 20 °C 108
TABELA 33 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD A 16 °C 109
TABELA 34 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO 110
TABELA 35 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 14 DIAS DE CRESCIMENTO 112
TABELA 36 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 21 DIAS DE CRESCIMENTO 112
TABELA 37 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 28 DIAS DE CRESCIMENTO 114
TABELA 38 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO

BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 35 DIAS DE CRESCIMENTO 115
TABELA 39 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO 115
TABELA 40 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 7 DIAS DE CRESCIMENTO 117
TABELA 41 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 14 DIAS DE CRESCIMENTO 118
TABELA 42 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 21 DIAS DE CRESCIMENTO 119
TABELA 43 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 28 DIAS DE CRESCIMENTO 120
TABELA 44 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 35 DIAS DE CRESCIMENTO 121
TABELA 45 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®) 122
TABELA 46 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NAS CORRIDAS DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....122

TABELA 47 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* 125
TABELA 48 – LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO, DISTÂNCIAS EM ÅNGSTROMS E ÂNGULOS E GRAUS [°]..... 128
TABELA 49 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO FUNGO *Bjerkandera adusta* 129
TABELA 50 – TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* FRENTE À *Artemia salina*..... 132
TABELA 51 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE 134134
TABELA 52 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* COM HEMÁCIAS EM SUSPENSÃO 134
TABELA 53 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO - EAG) NOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* 136
TABELA 54 – ATIVIDADE ANTIXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH..... 139
TABELA 55 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELA REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO 140
TABELA 56 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) 1142

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorvância
atm	atmosfera
ANOVA	Análise de variância
BD	Caldo de cultivo batata dextrose
BDA	Meio de cultivo ágar batata dextrose
CCD	Cromatografia em camada delgada
cm	centímetros
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL_{50}	Concentração letal 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
DAD	Diode array detector
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	gramas
$g.ml^{-1}$	gramas/mililitro
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
IA	Índice antioxidante
IAA	Ácido-indol-3-acético
IC_{50}	Concentração inibitória 50%
IFSP	Instituto Florestal de São Paulo
IV	Infravermelho
m	metros
M	Mol por litro
$m^3/ha/ano$	metros cúbicos/hectare/ano
m/v	massa/volume
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
min	minutos

mm	milimetros
mL	mililitros
N	Normal
n°	número
nm	nanometros
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
PR	Paraná
Rf	Fator de retenção
rpm	rotações por minuto
SC	Santa Catarina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
sp.	espécie
spp.	espécies
T	temperatura
t/ano	toneladas/ano
TSB	Meio de cultura Tryptic Soy Broth
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFC	Unidade Formadora de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UR	Umidade relativa
US$	dólar americano
UV	Ultravioleta
var.	variedade
v/v	volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
>	maior que
<	menor que
°	graus
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
µ	micro
®	registrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 24
1.1 PROJETO..... 26
1.2 OBJETIVO GERAL..... 26
1.2.1 Objetivos Específicos..... 26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 28
2.1. *Pinus* sp..... 28
2.1.1 Aspectos botânicos..... 29
2.1.2 Cultivo de *Pinus* sp. no Brasil..... 30
2.2 FUNGOS..... 31
2.2.1 Fungos micorrízicos..... 32
2.2.2 Fungos fitopatogênicos..... 36
2.2.3 Fungos saprofíticos..... 37
2.2.4 *Bjerkandera* sp..... 38
2.2.5 *Suillus* sp..... 39
2.2.6 *Rhizoctonia* sp..... 41
2.3. METABÓLITOS DE ORIGEM FÚNGICA..... 43
2.3.1 Metabólitos primários..... 43
2.3.2 Metabólitos secundários..... 43
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 45
3.1 ISOLAMENTO E PREPARO DAS CULTURAS..... 45
3.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA..... 46
3.3 DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO..... 47
3.4 CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO..... 48
3.5 PRODUÇÃO EM MASSA DO FUNGO *Bjerkandera adusta*..... 49
3.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO POR MACERAÇÃO A FRIO..... 50
3.7 OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA EM FUNIL DE SEPARAÇÃO..... 50
3.8 OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO POR

MACERAÇÃO A FRIO..... 51
3.9 PREPARO DOS EXTRATOS A PARTIR DA MASSA FÚNGICA EM SOXHLET MODIFICADO..... 51
3.10 ANÁLISE QUÍMICA EM PLACA CROMATOGRÁFICA DE CCD..... 51
3.11 INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)..... 53
3.12 ISOLAMENTO DOS CRISTAIS (SAE12) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*..... 53
3.13 ELUCIDAÇÃO ESTRUTUTAL DOS CRISTAIS (SAE12) POR CRISTALOGRAFIA..... 54
3.14 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS..... 55
3.14.1 Umidade (Perda por dessecação)..... 55
3.14.2 Resíduo por incineração (Cinzas totais)..... 56
3.14.3 Determinação do pH de *Bjerkandera adusta*..... 56
3.14.4 Determinação de lipídeos de *Bjerkandera adusta* – Extração direta em Soxhlet..... 57
3.14.5 Determinação de proteínas de *Bjerkandera adusta*..... 57
3.14.6 Determinação de fibras brutas..... 58
3.14.7 Determinação de Carboidratos..... 59
3.14.8 Determinação de exopolissacarídeos (EPS)..... 60
3.14.9 Determinação de quitina..... 60
3.15 ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 61
3.15.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*..... 61
3.15.2 Atividade hemolítica..... 62
3.15.2.1 Teste da atividade hemolítica em placas de ágar sangue..... 62
3.15.2.2 Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão..... 62
3.15.3 Teor de compostos fenólicos totais..... 63
3.15.4 Avaliação da atividade antioxidante..... 64
3.15.4.1 Redução do DPPH• (2,2 - difenil-1-picril-hidrazila)..... 64
3.15.4.2 Redução do complexo Fosfomolibdênio..... 65
3.15.5 Avaliação da atividade antimicrobiana pela CIM..... 66

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 69
4.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA..... 69
4.1.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes temperaturas..... 75
4.2 DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO..... 92
4.2.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes meios de cultivo..... 96
4.3 CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO..... 105
4.3.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes tempos de incubação..... 109
4.4 PRODUÇÃO EM MASSA DO FUNGO *Bjerkandera adusta*..... 123
4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS CRISTAIS SAE12..... 125
4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS..... 129
4.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... 132
4.7.1 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*..... 132
4.7.2 Atividade hemolítica..... 133
4.7.2.1 Teste da atividade hemolítica em placas de ágar sangue..... 133
4.7.2.2 Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão..... 134
4.7.3 Teor de compostos fenólicos totais..... 136
4.7.4 Avaliação da atividade antioxidante..... 137
4.7.4.1 Redução do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)..... 137
4.7.4.2 Redução do Fosfomolibdênio..... 140
4.7.5 Avaliação da atividade antimicrobiana pela CIM..... 141
5. CONCLUSÃO..... 143
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 145
REFERÊNCIAS..... 146

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente reconhecido por sua diversidade em fauna e flora, possuindo de 15 a 20% da biodiversidade do planeta. Muitas das espécies presentes no país ainda foram pouco exploradas e/ou estudadas e poderiam ser aplicadas no desenvolvimento de novas biomoléculas que apresentem aplicabilidade em vários setores industriais, como os de biotecnologia, farmacêutico, agrícola, alimentício, entre outros (GANEM, 2011).

As plantas e microrganismos apresentam dois tipos de metabolismo, os chamados metabolismos primário e secundário. O primeiro caracteriza-se por produzir substâncias necessárias para a sobrevivência, desenvolvimento e propagação do organismo, como os carboidratos, proteínas, aminoácidos e lipídios. O metabolismo secundário gera compostos que possuem ação reguladora, capaz de atuar de modo direto ou indireto nos processos de crescimento, replicação, defesa, inibindo ou estimulando funções celulares a nível bioquímico e biológico, em baixas concentrações (BÉRDY, 2005).

Muitas vezes são essas substâncias, as geradas pelo metabolismo secundário dos organismos, que apresentam atividade de interesse farmacológico, podendo ser empregadas no tratamento de inúmeras enfermidades (BÉRDY, 2005).

Microrganismos isolados de plantas podem atuar como fonte promissora no desenvolvimento de novos produtos naturais. Os derivados do seu metabolismo apresentam possibilidade de aplicação biotecnológica, terapêutica, de geração de substâncias farmacologicamente ativas e que atuem com reduzido impacto ambiental. Após a seleção e preservação, um microrganismo pode ser alvo de pesquisa, sendo estes procedimentos mais laboriosos no caso de obtenção destes a partir de espécies raras de plantas ou com aquelas de crescimento mais lento (SILVA, 2009).

Abundantes nas plantas, os fungos ainda são pouco conhecidos, principalmente quando se refere a questões de sua natureza química. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, e destas apenas 5% foram descritas, mesmo com o aumento do interesse por seus metabólitos. Este

panorama faz com que as perspectivas de aplicação de metabólitos de fungos na área da saúde, agronomia e veterinária sejam extremamente amplas (KIRK et al., 2008; SILVA, 2009). Um exemplo de molécula extraída de fungos e que conferiu notoriedade a esta classe de microrganismo foi a penicilina, produzida por um fungo do gênero *Penicillium* e que possui ação antibacteriana. Esta foi descoberta ao acaso em 1928 pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming, sendo utilizada desde 1941. A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado tanto em humanos quanto em animais com sucesso (CHAPLA, 2012).

Existem outros fármacos conhecidos e derivados de fungos com função antibacteriana (como a classe das cefalosporinas), hipocolesterolemiante (como a mevastatina e lovastatina), imunossupressora (como a ciclosporina e rapamicina), dentre outras (CHAPLA, 2012).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos com espécies de fungos isolados de espécies vegetais abundantes em uma determinada região geográfica. As espécies do gênero *Pinus sp.* enquadram-se entre elas (KIRK et al., 2008).

O gênero *Pinus* é cultivado em escala comercial no Brasil há mais de 50 anos, com plantios mais extensos estabelecidos na região Sul e Sudeste, principalmente de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var *elliottii* (CIFLORESTAS, 2008).

Alguns fungos se associam de forma simbiótica a espécies de *Pinus*, como os micorrízicos *Suillus sp., Scleroderma sp., Rhizopogon* spp. (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982). Outros são capazes de causar doenças nos vegetais dessa espécie, como os fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*, *Armillaria*, *Botrytis*, *Diplodia* (SANTOS, 2001; KRUGNER, 1997; SILVA, 2014).

É demonstrado que substâncias de origem fúngica são em geral simples, mas podem exibir diversas atividades biológicas. A contínua necessidade de disponibilização de novos produtos farmacêuticos e agrícolas requer pesquisa e desenvolvimento de substâncias inéditas (CRAGG & NEWMAN, 2005). Sendo assim, esses microrganismos são interessantes para estudos de isolamento, identificação e aplicação de seus metabólitos na área farmacêutica, veterinária e agrícola, pois suas vias metabólicas específicas podem conter uma fonte inexplorada de poderosas substâncias com potenciais propriedades antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas, dentre outras (SILVA, 2009).

1.1. PROJETO

O estudo abordado nessa dissertação faz parte de um projeto maior aprovado pelo Edital CAPES n° 015/2014, intitulado “Aspectos de cultivo e abordagem química de fungos patogênicos e micorrízicos de *Pinus* e sua aplicação na área farmacêutica, veterinária e agrícola”, no qual são abordados 6 fungos: *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx, *Botrytis cinerea* Pers. Fr., *Armillaria* sp., *Rhizoctonia* sp, *Suillus* sp. e *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst. Sendo assim, esse trabalho irá abordar a otimização das condições de cultivo para 3 desses fungos (*Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. e *Suillus* sp.) e se restringirá a abordagem química, características físico-químicas e ensaios biológicos de apenas 1 deles (*Bjerkandera adusta*).

1.2. OBJETIVO GERAL

Definir os parâmetros de cultivo dos fungos *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. e *Suillus* sp. isolados de *Pinus* sp., e realizar a investigação química e as atividades biológicas dos extratos da massa micelial e do caldo fermentado de *B.adusta*.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Cultivar em meio líquido os fungos *Bjerkandera adusta*, *Suillus* sp. e *Rhizoctonia* sp*.,* isolados de *Pinus* sp.
- Verificar a influência dos fatores temperatura, meio de cultivo e tempo de incubação, na produção de biomassa de *Bjerkandera adusta*, *Suillus* sp. e *Rhizoctonia* sp.;
- Comparar os extratos obtidos a partir da massa micelial e do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* provenientes da curva de crescimento em função da temperatura, do meio de cultivo e do tempo de incubação através de análises por Cromatografia em Camada Delgada e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Avaliar as características físico-químicas da massa micelial de *Bjerkandera adusta.*

- Extrair compostos presentes na massa fúngica e no caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* utilizando solventes de diferentes polaridades*;*
- Realizar análise química preliminar a fim de identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos obtidos a partir da massa micelial e do caldo fermentado do fungo *Bjerkandera adusta*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos fúngicos obtidos a partir da massa fúngica e caldo fermentado do fungo *Bjerkandera adusta* frente à *Artemia salina;*
- Avaliar a atividade hemolítica dos extratos da massa fúngica e do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta*;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos pelo método de Folin Ciocalteau;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelas metodologias de DPPH e Fosfomolibdênio;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos da massa micelial e do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* pela metodologia de Concentração Inibitória Mínima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Pinus* sp.

Para acompanhar o crescimento do setor industrial madeireiro responsável pela produção de papel, celulose e madeira no Brasil, além de incentivos fiscais para florestamento e reflorestamento e das normas de reposição florestal obrigatória, houve a necessidade de introduzir no país novas espécies de coníferas. Estas apresentavam características desejáveis como o desenvolvimento em áreas de solo arenoso, ácido, pobre, de fácil manejo, rápido crescimento, apresentando ótimas condições para florestamento e reflorestamento (SUASSUNA, 1977; SELLE et al, 2010).

As espécies de *Pinus* (FIGURA 1) são exemplos de coníferas exóticas difundidas em vários países e valorizadas pela característica da sua madeira (de cor clara, variando de branca a amarelada; de fibra longa, apropriada para a fabricação de papel altamente resistente); pela possibilidade de extrair resina em escala comercial; por sua tolerância, permitindo que sejam plantadas em solos marginais para agricultura, agregando valor a terra, pela produção adicional de madeira, formação de cobertura protetora do solo e reflorestamento em ambientes degradados; além de seu valor ornamental (arborização e paisagismo) (EMBRAPA FLORESTAS, 2005).

FIGURA 1 – FLORESTA COMERCIAL DE PINUS

FONTE: Adaptado de AGROPECUÁRIA MAFRA (2012)

2.1.1. Aspectos botânicos

As espécies de *Pinus*, pertencem à subdivisão Gymnospermae, classe Coniferopsida, ordem Coniferae, família Pinaceae, subfamília Pinoideae (SUASSUNA, 1977). É o gênero mais antigo desta família, tendo surgido á aproximadamente 180 milhões de anos (FACCIO, 2010).

Os *Pinus* são resistentes à seca, exigem luz para crescer, suportam temperaturas entre -65 °C e 50 °C, entre as espécies existem diferentes exigências quanto às melhores características ambientais para o seu crescimento (CIFLORESTAS, 2008).

Ocorrem desde a região dos polos até os trópicos, sendo encontradas na Europa, Ásia, América do Norte e Central. Apesar de serem encontradas na América do Sul sua ocorrência não é natural neste continente (CIFLORESTAS, 2008). Ocorrem em latitudes entre 0 e 700 metros e altitudes que variam de 0 a 3500 metros (FACCIO, 2010).

Os *Pinus* são plantas lenhosas, arborescentes, altas e monóicas. Apresentam folhas de dois tipos: as escamiformes e as aciculiformes (em forma de agulha, longas, presas em ramos laterais curtos, de entrenós estreitos, com estruturas que minimizam a perda de água para o ambiente). Possuem tronco retilíneo, que sustenta a copa. Sua semente é alada, com alas formadas a partir da porção da escama carpelar, são formadas de 15 a 30 meses, e dispersas pelo vento. Os cones masculinos são alongados, pequenos (com até 4 cm de comprimento), organizados em cachos e os femininos são cilíndricos/globosos, com até 15 cm de comprimento, com escamas lenhosas, persistentes, espessadas no ápice, com duas sementes aladas cada uma (CIFLORESTAS, 2008; FACCIO, 2010).

A identificação das espécies de *Pinus* é feita com base na análise da disposição, número e coloração das acículas, na forma e cor das sementes, no formato e tipo de abertura do cone, as características das resinas (quantidade, cor), dentre outras (SUASSUNA, 1977).

2.1.2. Cultivo de *Pinus* sp. no Brasil

Os primeiros relatos que se tem notícia a respeito das primeiras plantações de *Pinus* no Brasil são de 1880, da espécie de *Pinus canariensis,* oriunda das Ilhas Canárias*,* no estado do Rio Grande do Sul (HILLIG, 2013).

Em 1936, iniciou-se a introdução de espécies de coníferas exóticas no estado de São Paulo (SP) pelo Instituto Florestal de São Paulo (IFSP), com finalidade ornamental, com destaque para o *Pinus pinaster,* proveniente da Europa (SUASSUNA, 1977). Entre 1947 e 1948 foram introduzidos o *Pinus elliotti* e o *Pinus taeda*, originários da região sudeste dos Estados Unidos, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Cantarina, Paraná e sul de São Paulo, e o *Pinus radiata*, do Chile, este último praticamente desapareceu anos depois devido à infestação pelo fungo *Diplodia pinea* (SUASSUNA, 1977).

A partir de 1950, as espécies de *Pinus* começaram a ser plantados em escala industrial para produção de madeira (EMBRAPA FLORESTAS, 2005). A versatilidade dessas espécies em crescer nos mais variados ambientes, além da sua ampla gama de usos, possibilitou sua expansão em todo o território nacional e o aumento do número de produtores interessados no manejo e plantio de *Pinus*, principalmente de pequenos e médios proprietários rurais (EMBRAPA FLORESTAS, 2005).

Com o passar dos anos, começaram a ser implantadas no país espécies híbridas de *Pinus*. Esse melhoramento genético permite que estas espécies estejam adaptadas ao clima e ao solo das regiões ecológicas nas quais serão plantadas, como exemplo, pode-se citar a implantação do híbrido de *Pinus* elilliondurensis (*Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii* x *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*) no ano 2000 após seu registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (HILLIG, 2013).

As espécies mais cultivadas no Brasil são: *Pinus taeda, P. elliottiI* var. *elliottii* (resistentes a geadas), *P. caribaea* var. hondurensis, *P. oocarpa* e *P. tecunumanii* (toleram déficit hídrico) (CIFLORESTAS, 2008).

Dos quase 4,6 milhões de hectares em florestas plantadas no território brasileiro, cerca de 1,7 milhões representam áreas plantadas com espécies do gênero *Pinus,* sendo o estado do Paraná o maior produtor (cerca de um terço do

total), com produtividade variando em média de 18 a 28 m³/ha/ano, equivalente a 37% da área de reflorestamento existente (SELLE et al., 2010; IPEF, 2011).

2.2. FUNGOS

Os fungos fazem parte do Reino Fungi, domínio Eukaria (NASCIMENTO, 2015). Segundo a classificação de Kirk e colaboradores (2001), são divididos em 7 filos: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota.

Sua identificação é feita com base em caracteres citológicos e morfológicos, além do emprego de técnicas bioquímicas e moleculares como PCR ("*Polymerase chain reaction"*), sequenciamento de DNA e isoenzimas, dentre outras (NASCIMENTO, 2015).

Esse grupo de organismos é composto por seres cosmopolitas, herotróficos, que acumulam glicogênio como fonte de reserva, aeróbicos (em sua grande maioria), eucariontes, com reprodução sexuada ou assexuada, possuem parede celular constituída por quitina, podem ser uni ou multicelulares, apresentam-se sob a forma de levedura, pseudomicélio ou hifas (PEREIRA, 2012; SANTOS, 2015).

As leveduras possuem características morfológicas bastante semelhantes, sem apresentar grandes diferenças em suas estruturas microscópicas. Em geral são unicelulares e reproduzem-se por brotamento (PEREIRA, 2012).

Os fungos filamentosos são constituídos por hifas ou micélio, contendo septos. Essas podem ser vegetativas, auxiliando na captação de nutrientes, ou especializadas, originando o sistema reprodutor para que ocorra a formação de esporos (PEREIRA, 2012).

Para que os fungos cresçam é necessário que além de matéria orgânica, sejam fornecidos água, oxigênio (em sua maioria), e condições adequadas de temperatura e pH (SANTOS, 2015).

São essenciais na decomposição de matéria orgânica e no controle biológico de insetos e pragas. Algumas espécies são responsáveis por causar diversas doenças em seres humanos e animais, como aspergilose, candidíase, dermatoses, alergias; e plantas (ferrugens, podridão). A aplicação biotecnológica dos fungos e seus metabólitos é extensa, sendo utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas,

podendo-se citar a produção de cogumelos comestíveis, vinho, cerveja, pães, queijos, entre outros. Na indústria farmacêutica, a importância destes microrganismos pode ser reconhecida na produção de β-caroteno, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, amilases, proteases, cortisona por fungos zigomicetos; produção de biotina pelos fungos do gênero *Rhizopus;* e a obtenção de penicilina de *Penicillium* sp. (TELLES, 2010).

Os metabólitos secundários de origem fúngica podem ser divididos em 4 classes químicas: os policetídeos, terpenoides, substâncias derivadas do ácido chiquímico e peptídeos não-ribossomais. A maior parte dos metabólitos é formada a partir da junção de substâncias dessas classes (PUTSZTAHELYI et al., 2015). Alguns deles podem ser tóxicos como é o caso das micotoxinas, porém muitas dessas substâncias possuem atividades biológicas desejáveis, como no caso da penicilina e lovastatina. No ano de 1995, 6 das 20 drogas mais vendidas no mundo foram originadas a partir de metabólitos fúngicos (SEYMOUR et al., 2004). Porém apenas um número restrito de espécies foram investigadas quanto a produção de compostos bioativos, sendo que a maior parte dos cerca de 6400 compostos conhecidos produzidos por fungos foram isolados de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (950, 900 e 350, respectivamente). Frente a estes dados, pode-se constatar que ainda restam muitas espécies a serem investigadas, e as perspectivas de detecção de substâncias inéditas são altamente promissoras (BÉRDY, 2005).

2.2.1. Fungos micorrízicos

Os primeiros trabalhos envolvendo a associação entre fungos e raízes de árvores foram desenvolvidos pelo botânico Albert Bernard Frank em 1885, a qual foi denominada como *micorriza*, termo de origem grega no qual “*mico*” significa “fungo” e “*riza*”, “raízes”. Esta associação era conhecida anteriormente aos trabalhos de Frank, entretanto, pensava-se que se tratava de uma forma de parasitose. Para Frank, esta associação seria resultante da união entre o micélio dos fungos e as raízes de árvores em que ocorre dependência fisiológica entre ambos. Os fungos micorrízicos seriam responsáveis por absorver nutrientes, minerais e água do solo e transferi-los para a árvore com a qual se associavam,

sem causar injúrias a raiz, e em troca receberiam em troca açúcares simples necessários para o seu metabolismo.

A presença de micorrizas permite que as plantas captem nutrientes de regiões de solo mais extensas e auxiliem no seu crescimento através da produção de fito-hormônios como o ácido indol-3-acético (AIA), citocinas e substâncias semelhantes à giberelina, aumentando a resistência a fatores externos e protegendo contra patógenos (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982). Strzelczyk & Pokojska-Burdziej (1984) demonstraram a produção de auxinas e de substâncias semelhantes à giberilina pelos fungos micorrízicos *Amanita muscaria*, *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Suillus bovinus* e *Rhizopogon luteolus,* e pelos fungos *Suillus luteus* e *Rhizopogon luteolus,* respectivamente. Esse fenômeno é observado na maior parte das plantas vasculares, algumas das exceções são as famílias da mostarda (Brassicaceae), dos juncos (Cyperaceae) e algumas espécies de plantas aquáticas (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982; SIRI-IN et al., 2014; SOUZA et al., 2006).

Estudos monstraram que os fungos são capazes de absorver e transportar diversos nutrientes do solo, além de nitrogênio, como fósforo, zinco, cobre, dentre outros. As plantas as quais não possuem micorrizas e que são cultivadas em condições nas quais a concentração dos elementos essenciais é limitada, apresentaram dificuldade para crescer ou não se desenvolveram (SOUZA et al*.,* 2006).

A classificação das micorrizas leva em conta o arranjo das hifas nas células do córtex da raiz, sendo divididas em (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982):

1) Ectomicorrizas: o desenvolvimento das hifas é intercelular, as células do córtex da raiz são envolvidas pelo fungo, mas ele não as penetra. Inicialmente ocorre a ativação dos propágulos do fungo, com formação de hifas na rizosfera e colonização da superfície das raízes, posteriormente as hifas penetram a raiz pelas junções celulares na Zona de Infecção Micorrízica, localizada atrás da zona meristemática apical da raiz. O córtex é colonizado pelas hifas formando uma rede chamada de rede de Hartig, a qual é capaz de prolongar a vida das células e da raiz. Observa-se ainda, várias hifas circundando as raízes, a partir das quais se formam cordões miceliais que alcançam o solo vizinho. Essas ramificações podem

ser do tipo simples, bifurcada ou coraloide as quais são formadas principalmente por basidiomicetos (cogumelos de diversos gêneros). Ocorrem principalmente em árvores e arbustos de regiões temperadas, incluindo a família dos pinheiros (família Pinaceae). Esta associação torna as árvores mais resistentes às drásticas condições de frio e seca desses locais;

2) Endomicorrizas: o fungo cresce intracelularmente, a hifa penetra as células do córtex da raiz da planta, formando estruturas ramificadas, as quais lembram uma pequena árvore, sem causar danos a planta. As hifas se prolongam por vários centímetros, alcançando o solo, favorecendo a absorção de diversos nutrientes essenciais. Esse tipo de micorriza é o mais comum, sendo observado em 80% das plantas vasculares e são formadas por zigomicetos. Não são verificadas modificações anatômicas nas raízes, não sendo reconhecidas a olho nu;

3) Ectoendomicorrizas: as hifas se desenvolvem inter e intracelularmente.

As duas primeiras classes são as mais observadas na natureza (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982).

Existem inúmeros relatos de casos em que a tentativa de introduzir espécies do gênero *Pinus* em diversos ambientes não ocorreu de modo satisfatório (as mudas não cresceram o suficiente, não conseguiam captar certos nutrientes do solo, observou-se até mesmo a morte das plantas), devido a falta da associação com fungos micorrízicos. Os fungos aumentam a superfície de absorção das raízes, permitem a absorção seletiva de substâncias do solo e protegem as raízes da planta contra o ataque de patógenos por diversos mecanismos como por exemplo, formação de uma barreira física ao redor das raízes ou produção de substâncias com ação antibiótica (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982).

A primeira constatação de simbiose de fungos com raízes de espécies de *Pinus* ocorreu em 1964, em que foi observado o crescimento do fungo *Thelephora terrestris* em ambientes onde havia o cultivo de *Pinus elliottii var. elliottii.* Já foram observadas associações do fungo *Thelephora terrestris* a diversas espécies de *Pinus* no Brasil, como *Pinus elliottii var. elliottii, P. taeda, P. oocarpa, P. caribaea var. caribaea, var. hondurensis e var. bahamensis* (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982).

A associação de *Pisolithus tinctorius* em espécies de *Pinus* é recente, com relatos do ano de 1980, em Santa Catarina, São Paulo e Bahia. Outros fungos ectomicorrízicos são frequentemente observados no Brasil, como o *Rhizopogon spp*. nas regiões Sul (Santa Catarina), Sudeste (São Paulo) e Nordeste (Bahia); *Scleroderma spp*. no Sul (Santa Catarina) e Sudeste (São Paulo e cerrado de Minas Gerais); *Suillus* sp. em Santa Catarina, São Paulo e Bahia. Provavelmente, segundo relatos, esses fungos foram trazidos para o Brasil pelos primeiros colonizadores que chegaram ao país juntamente com as mudas de árvores ou então na forma de esporos junto às sementes que trouxeram de seus países de origem (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982).

Os fungos micorrízicos podem atuar no controle de microrganismos fitopatogênicos, de insetos, na proteção das plantas contra os herbívoros. Apresentam potencial biotecnológico, uma vez que cerca de 80% produzem algum composto com ação biológica (antimicrobiana, antifúngica, herbicida), produzem diversas enzimas, degradam corantes, matéria orgânica e poluentes orgânicos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SCHULZ et al., 2002; HAO et al., 2007)

Dentre os metabólitos secundários isolados a partir desses organismos pode-se citar esteroides, quinonas, xantonas, fenóis, terpenoides, furandionas, citochalasinas, isocumarinas, dentre outros (SCHULZ et al., 2002).

Existem evidências que demonstram que a colonização de plantas por fungos micorrízicos é capaz de modificar quantitativamente e qualitativamente o metabolismo secundário das espécies vegetais (AKIYAMA; HAYAHI, 2014). Andrade e colaboradores (2013) observaram que a presença de fungos micorrízicos (*Glomus etunicatum* e *Glomus intraradices*) é capaz de modificar a síntese e o acúmulo de alcaloides pelas espécies *Catharanthus roseus* e *Nicotiana tabacum*, demonstrando que essa associação pode alterar o metabolismo vegetal, alterando a expressão de genes. Akiyama e Hayahi (2014) relataram que os níveis e o acúmulo de 3 terpenoides aumentou significativamente em espécies de *Cucumis sativus* L. inoculadas com o fungo micorrízico *Glomus caledonium*, o que não foi observado pela inoculação com o fungo patogênico *Fusarium oxysporum f.* sp. *cucumerinum.*

2.2.2. Fungos fitopatogênicos

Cerca de 8.000 espécies de fungos causam doenças em plantas, podendo atacar suas sementes como é o caso de espécies dos gêneros *Fusarium* e *Curvularia* ou suas mudas e sistema radicular, como as espécies do gênero *Diplodia* e *Cylindrocladium*, além de outros órgãos vegetais (GOMES, 2013; SANTOS, 2001).

As doenças causadas por fungos são comuns e relevantes pois são importantes causas de perda de culturas, causando efeitos negativos significativos na agricultura (TINOCO, 2010).

Grande parte dos fungos fitopatogênicos passa parte do seu ciclo associado a suas plantas hospedeiras e a outra parte no solo ou em restos vegetais. Entretanto, alguns deles permanecem associados a seu hospedeiro durante todo o seu ciclo de vida e apenas seus esporos permanecem no solo em fase de dormência, até que se reproduzam em um novo hospedeiro (GOMES, 2013).

O ciclo patógeno-hospedeiro inclui a disseminação do inóculo (transferência do patógeno para diversos ambientes), sua inoculação (transferência do fungo para o local da infecção), germinação (transformações que permitem a penetração do patógeno no tecido do hospedeiro), penetração (implantação do patógeno), colonização (fase em que o fungo começa a se desenvolver e se nutrir a partir do hospedeiro, essa fase pode envolver a secreção de toxinas, enzimas, hormônios), presença de sintomas (fase em que a doença se torna perceptível), reprodução do patógeno (formação de novas formas de propagação do patógeno para que se iniciem novos ciclos) (GOMES, 2013).

A sobrevivência está diretamente associada às condições do ambiente em que está crescendo, fatores como temperatura e umidade podem favorecer ou prejudicar a atividade e crescimento desses organismos (GOMES, 2013).

Como exemplos de patógenos que causam doenças em *Pinus* sp. pode-se citar as espécies de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cylindrocladium, Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Diplodia* (AUER; SANTOS, 2016).

Alguns metabólitos secundários provenientes de fungos fitopatogênicos já foram caracterizados, como o fungo *Botrytis cinerea,* que apresenta o chamado sesquiterpeno botridial e compostos a ele relacionados os quais estão diretamente

relacionados a sua virulência, além do ácido botcinico e seus derivados. Fungos da espécie *Fusarium graminearum* produzem diversas micotoxinas, incluindo policetideo zearalenona, fusarin C, derivados tricotecenos, os quais causam necroses e uma série de doenças nas plantas, além de sesquiterpenos (PUTSZTAHELYI; HOLB; PÓCSI, 2015). *Aspergillus fumigatus* produz diversas toxinas como fumiquinzolinas, fumagilina, ácido fitióico, piripiropeno A, restrictocina, tripacidina, dentre outras (GARVEY; KELLER, 2010). Além de uma série de enzimas importantes na colonização do hospedeiro pelo patógeno, como pectinases, celulases, xilanases, proteases, glicanases (i.e. serina proteasese em *Fusarium solani*; pectinase, xilanase e proteases em *Myrothecium verrucaria;* celulase, pectina liase, urease, amidase, fostase, arilsulfatase em *Rhizoctonia solani;*) (MOREIRA et al., 2005).

Algumas dessas substâncias podem ser aplicadas industrialmente como é o caso das enzimas pectinases, galacturonases, metil e acetiesterases, pectaloliases, galacturonases, produzidas por *Aspergillus niger,* utilizadas na indústria de alimentos e bebidas, de pectinases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* empregadas na indústria têxtil, de papel, dentre outras (SANTI, 2005; COSTA; NAHAS, 2012; NESHICH, 2013; CHANDRASEKARAN et al., 2016).

2.2.3. Fungos saprofíticos

Organismos saprófitos são aqueles que dependem da absorção de substâncias orgânicas, geralmente provenientes de matéria orgânica em decomposição, para sobreviverem. Podem ser classificados em saprófitas obrigatórios, aqueles encontrados exclusivamente em matéria orgânica morta e que não parasitam outros organismos, ou em saprófitas facultativos, fungos que são capazes de causar doenças ou de viver em ambientes com matéria orgânica morta. Possuem importante papel ecológico pois possibilitam a reciclagem de nutrientes (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009). Como exemplo de fungos saprófitas pode-se citar as espécies pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Penicillium* (SILVA; COELHO; 2006).

2.2.4. *Bjerkandera* sp.

Esse gênero foi relatado pela primeira vez por Karsten em 1876 (JUNG et al., 2014). Pertencem à divisão Basidiomycota, subdivisão Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Meruliaceae (MYCOBANK DATABASE, 2016). Em 1966, Pouzar incluiu o gênero *Bjerkandera* como um subgênero do gênero Tyromyces, porém com o avanço da biologia molecular, esses gêneros foram novamente separados e considerados independentes (JUNG et al., 2014).

Até o presente momento, o gênero inclui apenas 2 espécies: *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst e *Bjerkandera fumosa* (Pers.) P. Karst, as quais são morfologicamente semelhantes, diferenciadas pelo tamanho dos poros, formato do corpo de frutificação, espessura do tubo (JUNG et al., 2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Bjerkandera* (FIGURA 2) são cosmopolitas e conhecidas como “fungos de podridão branca”, sendo caracterizadas por apresentarem basideomas pileados, com basidiósporos hialinos e hifas do tipo monomítica (WESTPHALEN et al., 2015).

Esses fungos causam danos à madeira e ao cultivo de cogumelos comestíveis. São conhecidas como decompositores frequentes de madeira de espécies vegetais de Angiospermas (DORADO et al., 2001).

A espécie *Bjerkandera adusta* também é conhecida por estar associada a tosse crônica, devido a ação de seus esporos assexuados os quais agem como alérgenos (LIU et al., 2014).

Entretanto, apresentam importante papel ecológico como no ciclo do carbono por decomporem árvores mortas, são altamente eficazes na decomposição da lignina catalisada principalmente por enzimas oxidases e peroxidases. Também ão capazes de degradar poluentes ambientais, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos antraceno, benzopireno, além de pesticidas e corantes com diferentes cromóforos (azo, diazo, ftalocianina, triarilmetano) (FIELD et al., 1993; HEINFLING et al., 1998; WESTPHALEN et al., 2015). Devido a essas ações, interesse em utilizar esses fungos industrialmente vem crescendo, principalmente aplicados à biorremediação (degradação de agentes tóxicos por microrganismos) (KORNILLOWICZ-KOWALSKA et al., 2006).

FIGURA 2 – *Bjerkandera* sp.

FONTE: Adaptado de ZEMKO (2007).

Trabalhos relatam que esse fungo é capaz de secretar diversas enzimas como as ligninolíticas, as quais podem degradar inúmeros poluentes, incluindo hidrocarbonetos de alto peso molecular (ANDRIANI; TACHIBANA; ITOH, 2016), peroxidases (SINGH; ELTIS, 2015), xilanases, celulases (QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011), esterases (CUERVO-SOTO et al., 2015), hidrolases, glucosidases, chitosanases, glucanases e amilases (REINA et al., 2014).

2.2.5. *Suillus* sp.

O gênero *Suillus* (FIGURA 3) possui cerca de 50 espécies de fungos micorrízicos distribuídas por todos os continentes, habitam regiões temperadas, boreais e o Mediterrâneo. Apesar de poucos relatos, também podem ser encontrados em regiões tropicais. A maior parte das espécies ocorre no Hemisfério Norte (VERMA; REDDY, 2015).

De acordo com a base de dados Mycobank Database (2016), os fungos que fazem parte desse gênero são classificados como sendo da divisão Basidiomycota, subdivisão Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, orde, Boletales, família Suillaceae.

Os basidiomas crescem na superfície do solo, apresentam forma característica de cogumelo com estipe e píleo liso e com brilho, consistência carnosa, além de perfurações na região inferior do píleo; o píleo apresenta coloração que varia do creme ao marrom e estipe branca a creme claro (TOMAZELLO FILHO; KRÜGNER, 1982).

FIGURA 3 – *Suillus* sp.

FONTE: Adaptado de STEVENS (1996).

Associam-se com raízes de plantas, principalmente com membros da família Pinaceae e espécies de caducifólias formando ectomicorrizas (VERMA; REDDY, 2015). Esses fungos apresentam um importante papel na tentativa de reflorestamento de ecossistemas. São utilizados como bioindicadores da qualidade do meio ambiente. Servem também como fonte de alimento para seres humanos e animais (SARWAR; KHALID, 2014).

Pinho et al. (2007) analisaram os compostos voláteis e semi-voláteis de algumas espécies de fungos, dentre elas, *Suillus granulatus*, *Suillus bellini* e *Suillus boveus*. A espécie *Suillus bellini* apresentou o maior teor de álcoois dentre as espécies estudadas, *Suillus luteus* apresentou alta quantidade de aldeídos, as substâncias trans-geranilcetona e (E,E)-farnesilacetona estavam presentes em elevada concentração nos três fungos, podendo ser utilizados como marcadores desse gênero, além de alto teor de compostos norisoprenoides.

Em trabalho publicado por Tomasi et al. (2003) testando extratos metanólicos de basidiomicetos sobre células de linhagens cancerígenas, observou-

se que o extrato metanólico feito a partir de cogumelos de *Suillus granulatus* foi um dos mais ativos contra uma linhagem de leucemia linfocítica (L1210) e de carcinoma pulmonar de Lewis (3LL). O extrato de *Suillus bovinus* apresentou boa atividade contra as células da linhagem L1210, enquanto que o de *Suillus luteus* demonstrou significativa citotoxicidade contra a linhagem 3LL. O fungo *Suillus granulatus* também foi objeto de estudo de Wang et al. (2007), que isolaram e identificaram um composto da classe das β-carbolinas, chamado de flazina, a partir do corpo de frutificação desse fungo. Os pesquisadores constataram que esse composto possui atividade anti-HIV.

Segundo trabalho de Reis e colaboradores (2014), a espécie *Suillus granulatus* pode ser considerada como um alimento funcional devido a sua constituição nutricional (rico em proteínas, vitaminas), além de possuir ação antioxidante e antimicrobiana.

2.2.6. *Rhizoctonia* sp.

Os fungos que fazem parte do gênero *Rhizoctonia* (FIGURA 4) são filamentosos, não produzem esporos assexuais, pertencem a ordem dos basidiomicetos, crescem no solo e geralmente se associam a raízes. As espécies pertencentes a esse gênero podem ser fitopatogênicas, micorrízicas e saprofíticas. Estão distribuídas em todo o território mundial, encontradas principalmente em regiões de clima temperado e tropical. Algumas dessas espécies, como *Rhizoctonia solani,* causam doenças em plantas do gênero *Pinus*, como podridão de estacas e tombamento de mudas (AUER; SANTOS, 2016).

Os fungos desse gênero possuem micélio ramificado em ângulo reto com septação localizada imediatamente e após o ramo, a base da ramificação possui constrições e septo doliporo. Sua primeira descrição relata de 1815, sendo estabelecida pelo micologista De Candolle (GARCÍA; ONCO; SUSAN, 2006). A classificação das espécies dentro desse gênero se baseia na citomorfologia das hifas, morfologia das culturas e do teleomorfo e padrão ou não de anastomose das hifas (CASTRO, 2007).

FIGURA 4 – ASPECTOS PATOLÓGICOS DE *Rhizoctonia* sp.

LEGENDA: A – Lesão de folhas de soja causadas por *Rhizoctonia* sp.; B – Cultura de *R.solani.*
FONTE: Adaptado de WILLIAMSON; ROTHROCK; MUELLER (2006).

Referente às possíveis atividades biológicas, Carvalho (2013) demonstrou a presença de compostos fenólicos no extrato bruto de *Rhizoctonia* sp.; Harris et al. (1987) relataram a presença de dois alcaloides indolizidínicos em *Rhizoctonia leguminicola* (slaframina e swainsonina) e a presença de (1S,2R,8aS)-1,2-Dihidroxindolizidina. Outros trabalhos relatam que espécies de *Rhizoctonia solani* produzem ácido fenil acético e seus derivados, compostos fenólicos, e uma fitotoxina, que estão associados a sua patogenicidade (BARTZ et al., 2013). Além de uma série de outros metabólitos, como ácidos graxos (ácido 9-(Z)-octadecenóico e ácido 9,12-octadecadienóico), compostos fenólicos (ácido *m*-hydroxifenilacético, ácido *m*-methoifenilacético, ácido *p*-hidróxibenzóico, metil *p*-hidróxibenzoato), alcaloides (acetiltriptamina), sacarídeos, glicoproteínas, ciclopeptídeos e esteroides (XU et al., 2015). Xu e colaboradores (2015) isolaram e identificaram oito compostos provenientes do fungo *Rhizoctonia solani*: ergosterol, 6β-hidroxisitostenonsitostenona, ácido m-hidroxiphenilacético, metil m-hidroxifenilacetato, m-hidroximetilfenil pentanoato, ácido (Z)-3-metilpent-2-en-1,5-dióico e ácido 3-metóxifurano-2-carboxílico. Alguns desses compostos apresentaram moderada atividade antibacteriana, ação antioxidante moderada sobre o DPPH, atividade inibitória sobre a germinação de sementes de arroz.

2.3. METABÓLITOS DE ORIGEM FÚNGICA

2.3.1. Metabólitos primários

Os metabólitos primários são moléculas pequenas produzidas durante a fase de crescimento vegetativo dos fungos que fornecem energia e que atuam como precurssores químicos às células, essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento. Muitos desses metabólitos são empregados industrialmente, como por exemplo o etanol, aminoácidos (triptofano, fenilalanina, lisina), vitaminas (riboflavina, biotina), ácidos orgânicos (ácido acético, láctico, fumárico), polioóis (manitol, glicerol), açúcares (ribose, frutose), polissacarídeos (xantana), enzimas (lipase, celulase, amilase), dentre outros (LOPES, 2011).

2.3.2. Metabólitos secundários

Os metabótos secundários não são essenciais ao crescimento vegetativo dos fungos, não apresentando nenhuma função metabólica essencial, são produzidos quando os microrganismos estão na fase estacionária de crescimento. São substâncias com estruturas químicas mais complexas, das mais diversas naturezas, sintetizados a partir de produtos ou intermediários gerados pelo metabolismo primário, e que geralmente apresentam ação biológica. (LOPES, 2011).

Devido a suas atividades muitos deles vem sendo empregados industrialmente, utilizados como antibióticos, imunossupressores, agentes hipocolesterolemiante, inibidores tumorais. Outras, como as micotoxinas são responsáveis por aumentar a virulência des organismos.

Dentre os metabóticos secundários produzidos por fungos pode-se citar os policetídeos, substâncias derivadas do chiquimato e da isocumarina, flavonoides, quinonas, xantonas, lactonas, terpenoides, alcaloides, pepetídeos, ácidos fenólicos, compostos alifáticos, lignanas e tetralonas (SILVA, 2014).

Como exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos têm-se: a penicilina G (isolada do gênero *Penicillium*) e a cefalospotina C, com ação antibacteriana; a fumagilina (isolada do fungo *Aspergillus fumigatus*), com ação

anticancerígena; a ergotamina (isolada do gênero *Neotyphodium*), usada no tratamento de enxaquecas; a hipericina (isolada na espécie *Thielavia subthermophila* e *Dermocybe austrovenata*) com ação antidepressiva, dentre outras substâncias (ABREU, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ISOLAMENTO E PREPARO DAS CULTURAS

Os fungos *Bjerkandera adusta*, *Suillus* sp. e *Rhizoctonia* sp. (QUADRO 1), utilizados no estudo foram obtidos no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas e estão depositados na Coleção de Fungos Florestais (Embrapa). Os isolados estão preservados em tubos com óleo mineral em sala climatizada a 18 °C e geladeira a 4 °C.

Os fungos foram repicados em placas contendo meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose) Himedia® (composição química descrita no QUADRO 2) (ALFENAS; MAFIA, 2007). As placas foram colocadas em BOD com temperatura (T) e umidade relativa (UR) controladas (T: 24 °C ± 2 °C; UR: 80% ± 5%), com foto período desligado, por um período de 15 a 30 dias (tempo suficiente para que os fungos fossem capazes de se desenvolver e preencher as placas). As placas contendo as culturas puras foram mantidas em BOD a 24 °C e quando necessário eram repicadas em novas placas de BDA Himedia® (SILVA, 2014).

Foram preparadas sub amostras e estas foram depositadas no herbário UNOP *Algae* da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, sob os códigos UNOP 4243 (*Rhizoctonia* sp.), UNOP 4244 (*Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst) e UNOP 4245 (*Suillus* sp.).

QUADRO 1 – FUNGOS ISOLADOS DE *Pinus* spp. EMPREGADOS NOS ENSAIOS

Fungo	**Origem**	**Hospedeiro**	**Parte da planta**
Bjerkandera adusta (Willd.) P. Karst	Jaguariaíva/PR	*Pinus taeda*	Basidioma (cogumelo)
Suillus sp.	Colombo/PR	*Pinus taeda*	Basidioma (cogumelo)
Rhizoctonia sp.	Itapeva/SP	*Pinus caribaea var. hondurensis x Pinus elliottii var. elliottii*	Muda jovem

FONTE: O autor (2017).

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÁGAR BATATA DEXTROSE HIMEDIA®

Ingredientes	**Quantidade (em gramas/litro)**
Infusão de batata	200 g
Dextrose	2 g
Ágar	15 g
pH final (a 25 °C)	5,6 ± 0,2

FONTE: (INFORMAÇÕES DO FABRICANTE – HIMEDIA) POTATO DEXTROSE AGAR (2016).

3.2. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Para identificar a temperatura ótima de crescimento, os fungos foram colocados para se desenvolver em ambiente com temperatura controlada, testando-se diferentes temperaturas. Para a realização das curvas foram testadas as seguintes temperaturas: 12, 16, 20, 24, 28 e 32 °C. Foram preparados 10 frascos contendo 100 mL de meio líquido BD (Batata Dextrose) Himedia®, para cada uma das temperaturas testadas. Os frascos foram autoclavados por 40 minutos a 121 °C, 1 atm. Após resfriamento do meio de cultura, em câmara de fluxo laminar, adicionou-se a cada um dos frascos 2 discos de micélio-ágar de 5 mm retirados de placas de meio BDA Himedia® puras (preparadas confome descrito no item 3.1.). Os frascos foram incubados em câmaras BOD com temperatura e umidade controladas e fotoperíodo desligado, e retirados após 35 dias. Os controles foram preparados da mesma forma porém sem o inóculo dos discos de micélio-ágar.

Após esse período, o material foi filtrado a fim de separar a massa micelial do caldo fermentado. O caldo e os controles foram concentrados em estufa a 50 °C. O caldo fermentado foi extraído em funil de separação com acetato de etila PA (conforme descrito no item 3.7.).

A massa fúngica foi transferida individualmente para placa de Petri previamente seca e pesada, levada para secar em estufa a 40 °C por 72 h. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa, colocadas para resfriar em dessecador até temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram pesadas em balança analítica, a massa seca individual e a média foram calculadas para cada uma das temperaturas (Adaptado de SILVA, 2014). Os dados foram analisados estatisticamente pelo Teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955) para verificar seu nível de significância.

A massa fúngica foi colocada em potes plásticos, congelada em freezer a -6 °C ± 2 °C, e liofilizada (em liofilizador Bench Top Pro sp-scientific), a -78 °C, durante cinco dias, posteriormente triturada com auxílio de gral e pistilo e utilizada no preparo de extratos com acetato de etila (descrito no item 3.6.), os quais foram analisados por Cromatografia de camada delgada (CCD - descrito no item 3.10) e Cromatografia líquida de alta efeiciência (CLAE - conforme descrito no item 3.11).

3.3. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Após a determinação da temperatura de crescimento foram realizados testes para selecionar qual meio de cultivo propicia o maior crescimento dos fungos estudados. Foram testados 3 meios de cultivo líquidos: BD Himedia® (obtido comercialmente – composição descrita no QUADRO 3), Extrato de Malte Himedia® (obtido comercialmente – composição descrita no QUADRO 4) e Meio Czapek (composição descrita no QUADRO 5). Foram retirados 2 discos de micélio-ágar de 5 mm de placas de meio BDA Himedia® contendo os fungos, os quais foram transferidos para frascos de vidro contendo 100 mL de caldo BD (2,4 g.100 mL^{-1} de meio líquido), meio extrato de Malte (2,0 g.100 mL^{-1} de meio líquido) e meio Czapek, previamente esterilizados por 40 minutos a 121 °C, 1 atm. Os controles foram preparados da mesma forma, porém não foram inoculados. Os frascos foram transferidos para BOD regulada na temperatura de crescimento selecionada, no item 3.2., com foto período desligado, por um período de 35 dias. Para cada meio testado foram utilizados 10 frascos.

Ao final desse período, a biomassa fúngica e o caldo fermentado foram separados por filtração. O caldo fermentado e os controles foram transferidos para frascos de vidro, guardados em freezer, e posteriormente, concentrados até secura em estufa a 50 °C. O caldo fermentado concentrado e os controles foram extraídos com acetato de etila PA (conforme descrito no Item 3.7).

A biomassa fúngica de cada frasco foi transferida para uma placa de Petri previamente pesada, e levada para secar em estufa a 40 °C por 72 horas. Após o tempo de secagem, as placas contendo os fungos foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador até que atingissem a temperatura ambiente, foram então pesadas em balança analítica.

Calculou-se a média de crescimento dos fungos em cada um dos meios testados, além de análise estatística pelo Teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955).

Posteriormente a biomassa fúngica foi transferida para potes plásticos, congeladas a -6 °C ± 2 °C, liofilizadas (utilizando liofilizador Bench Top Pro sp-scientific, a -78 °C, durante 5 dias) e triturados com gral e pistilo para serem utilizadas no preparo do extrato metanólico bruto (conforme descrito no item 3.8), os quais foram analisados por CCD e CLAE.

QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CALDO BATATA DEXTROSE HIMEDIA®

Ingredientes	Quantidade (em gramas/litro)
Infusão de batata	200 g
Dextrose	2 g
pH final (a 25 °C)	5,1 ± 0,2

FONTE: INFORMAÇÕES DO FABRICANTE (HIMEDIA) POTATO DEXTROSE BROTH (2015).

QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DE MALTE HIMEDIA®

Ingredientes	Quantidade (em gramas/litro)
Extrato de Malte	30 g
pH final (a 25 °C)	5,5 ± 0,2

FONTE: INFORMAÇÕES DO FABRICANTE (HIMEDIA) MALT EXTRACT POWDER (2015)

QUADRO 5 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO LÍQUIDO CZAPEK

Ingredientes	Quantidade (gramas)
Sacarose	30 g
Nitrato de sódio	2 g
Fosfato dibásico de potássio	1 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Cloreto de potássio	1 g
Sulfato ferroso	0,01 g
Água	1000 mL

FONTE: TUITE (1969).

3.4. CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

Após a seleção da melhor temperatura de crescimento e do melhor meio de cultivo para cada um dos fungos estudados, os 3 fungos foram colocados para crescer no meio e na temperatura nos quais houve maior produção de massa micelial (selecionados a partir dos itens 3.2. e 3.3.) a fim de verificar a influência do tempo de incubação sobre a produção de massa micelial dos mesmos. Foram preparados 10 frascos de meio líquido (BD Himedia® ou extrato de Malte), para cada um dos períodos analisados. A cada um dos frascos contendo o meio previamente esterilizados a 121 °C por 40 minutos (a 1 atm), foram adicionados, 2 discos de micélio-ágar de 5 mm retirados de placas de meio BDA HIMEDIA®. Os frascos foram transferidos para BOD com temperatura e umidade controladas (80% ± 5%), com fotoperíodo desligado, e retirados após 7, 14, 21, 28 e 35 dias de crescimento. Os controles foram preparados da mesma forma, porém os frascos não foram inoculados com o fungo.

Após cada período, os fungos foram filtrados, para separar a massa fúngica do caldo fermentado. O caldo fermentado (amostras e controles) foi concentrado

até secura em estufa a 50 °C e extraído com acetato de etila PA em funil de separação (item 3.7.).

A massa fúngica de cada um dos frascos foi transferida individualmente para placas de Petri previamente secas e pesadas, e levadas para secar em estufa a 40 °C por 72 horas. Após esse período, foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica para verificar a variação do teor de massa fúngica em função dos dias de crescimento. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955) para verificar se havia diferença significativa entre eles.

Após a pesagem, as amostras foram transferidas para potes plásticos, congeladas a -6 °C ± 2 °C, liofilizadas (em liofilizador Bench Top Pro sp-scientific, a -78 °C, durante 5 dias) e trituradas com auxílio de gral e pistilo, e utilizadas no preparo do extrato metanólico bruto (conforme descrito no item 3.8).

Tanto os extratos metanólicos brutos, quanto os extratos acetato de etila obtidos foram analisados por métodos de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.5. PRODUÇÃO EM MASSA DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

Após a seleção da melhor temperatura de crescimento, do melhor meio de cultivo e tempo de crescimento para o fungo *Bjerkandera adusta,* foram utilizados aproximadamente 300 frascos de vidro contendo meio líquido BD Kasvi® (selecionado no item 3.3.; composição química descrita no QUADRO 6), previamente esterilizados em autoclave (40 minutos, 121 °C, 1 atm), foram inoculados em fluxo laminar com partes de micélio do fungo *Bjerkandera adusta* retirados das placas de micélio repicado em meio BDA Himedia®. Os frascos foram colocados em BOD a 24 °C (selecionada no item 3.2.) (UR: 80% ± 5%) por um período de 28 dias (selecionado no item 3.4.). O controle foi preparado da mesma maneira porém sem o que houvesse a adição dos discos de micélio-ágar aos frascos contendo o meio líquido.

Após esse período, separou-se o micélio do caldo fermentado por filtração. O caldo fermentado (produção em massa e controle) foi concentrado em estufa a 50 °C até secura e posteriormente extraídos com acetato de etila PA (conforme

descrito no item 4.7). A massa fúngica foi transferida para potes de plástico, congelada em freezer a -6 °C ± 2 °C, liofilizada (em liofilizador Bench Top Pro sp-scientific, a -78 °C, por 5 dias) e triturada com auxílio de gral e pistilo, posteriormente foi utilizada no preparo de extratos (extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico).

Os extratos obtidos a partir da massa fúngica, do caldo fermentado e do controle foram analisados por CCD, e testados em ensaios de atividade biológica.

QUADRO 6 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CALDO BATATA DEXTROSE KASVI®

Ingredientes	Quantidade (em gramas/litro)
Infusão de batata	200 g
Glicose	2 g
pH final (a 25 °C)	5,1 ± 0,2

FONTE: INFORMAÇÕES DO FABRICANTE (KASVI) CALDO BATATA DEXTROSE (2014).

3.6. OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA POR MACERAÇÃO A FRIO

As massas fúngicas liofilizadas e trituradas de *Bjerkandera adusta* provenientes do ensaio de crescimento em função da temperatura, foram transferidos para frasco de vidro, colocados para macerar em 100 mL de acetato de etila PA por 7 dias, sendo este procedimento repetido três vezes com a renovação do solvente a cada repetição, gerando um total de 300 mL de extrato. Após esse período, a suspensão foi filtrada em papel de filtro, o extrato acetato foi transferido para um frasco seco e previamente pesado e levado para concentrar em banho maria a 70°C até secura (Adaptado de MONTOVANI et al., 2009).

3.7. OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA EM FUNIL DE SEPARAÇÃO

O caldo fermentado de *Bjerkandera adusta*, obtidos a partir das curvas de crescimento em função da temperatura, do meio de cultivo empregado e do tempo de incubação, concentrados até secura em estufa a 50 °C foram resuspendidos com 100 mL de água destilada. Transferidos para funil de separação e extraídos com 150 mL de acetato de etila, o extrato acetato de etila foi recolhido em um frasco de vidro, os caldos foram extraídos novamente até se obter um extrato praticamente límpido. Todo o extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador a cerca de 100 °C até reduzir cerca de 2/3 do seu volume, posteriormente foi colocado em um

frasco de vidro previamente pesado e levado a banho maria a 70 °C até secura (Adaptado de GUIMARÃES, 2006).

3.8. OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO

A massa fúngica liofilizada e triturada de *Bjerkandera adusta*, proveniente do teste de crescimento em função do meio de cultivo e do crescimento em função do tempo, foram extraídas com metanol PA. Essas amostras foram transferidas para frascos de vidro tarados e pesadas em balança analítica. Aos frascos adicionou-se 1:9 Metanol PA (m/v). A suspensão ficou em maceração a frio durante 3 dias, sendo que a cada 24 horas o conteúdo dos frascos era filtrado em papel filtro, o filtrado transferido para um frasco de vidro previamente pesado e levado para concentrar em banho-maria a 70 °C e o resíduo novamente extraído com a mesma quantidade de metanol PA utilizada inicialmente (Adaptado de TONIAL, 2014).

3.9. PREPARO DOS EXTRATOS A PARTIR DA MASSA FÚNGICA EM SOXHLET MODIFICADO

A produção em massa do fungo *Bjerkandera adusta* liofilizada e triturada foi pesada em balança analítica (29,1260 g) e transferida para aparelho de Soxhlet modificado (no qual foi extraída com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio, acetato e metanol PA, obtendo-se no final do processo 4 extratos: extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico. Cada um dos extratos foi concentrado inicialmente em rotaevaporador a 100 °C até redução de 2/3 do volume e posteriormente colocados para concentrar até secura em banho maria a 70 °C. Após sua completa secura, os frascos foram pesados novamente e calculou-se o rendimento final.

3.10. ANÁLISE QUÍMICA EM PLACA CROMATOGRÁFICA DE CCD

A fim de ter uma ideia inicial das possíveis classes de compostos químicos presentes nos extratos e frações da massa fúngica e do caldo fermentado estes foram analisados por CCD, de acordo com o QUADRO 7. Os extratos de

Bjerkandera adusta e dos controles concentrados foram resuspendidos com os respectivos solventes utilizados em sua extração, foram aplicados de 5 a 10 µL das amostras em cromatoplacas de sílica gel 60 UV_{254} (marca Whatman®), com auxílio de tubo capilar. Após a saturação da cuba cromatográfica com a fase móvel, as placas foram colocadas na cuba e retiradas após o final da corrida (5 cm). Foram secas em estufa a 100 °C e reveladas com seus respectivos reveladores, indicados no QUADRO 7. Foram observadas a olho nu e/ou com auxílio de luz ultravioleta (UV) no comprimento de 254 nm.

QUADRO 7 – MARCHA QUÍMICA EM CCD

Constituinte químico	Fase Móvel	Revelador	Resultado esperado	Metodologia
Esteroides e Triterpenos	Tolueno:Acetato de etila (93:7)	Vanilina Sulfúrica (1%)	Presença de banda azu-violácea e/ou verde (a olho nu) Presença de banda marrom escura (polifenóis)	Wagner, 1996
Flavonoides e Taninos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (Flavonoide)	Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente e/ou castanha (sob luz UV – 254 nm)	Wagner, 1996
		Cloreto férrico (Taninos e Polifenóis)	Presença de banda azul (taninos hidrolisados) e/ou verde escura (taninos condensados) Presença de banda castanha escura a preta (polifenóis) (a olhu nu)	
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5) universo amônio	Dragendorff	Presença de banda de coloração tijolo (a olho nu)	Valente et.al, 2006
Cumarinas	Tolueno:Acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e NaOH 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm) que se intensifica com a adição de NaOH	Miguel, 2003

LEGENDA: Reativo de NEU: Difenolboriloxietilamino a 1% em metanol; Dragendorff: tetraiodeto bismuto de potássio
FONTE: WAGNER (1996); MIGUEL (2003); VALENTE et al. (2006)

3.11. INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)

O sistema cromatográfico utilizado consistiu de um cromatógrafo MERCK HITACHI Elite Lachrom, com detector DAD L-2450, leitura na faixa de 220 a 400 nm, com injetor manual, coluna cromatrográfica XTerra® RP18 5µm (4,6 x 250 mm). Como fase móvel utilizou-se metanol grau HPLC (100%) e fase ácida (200 mL de ácido sulfúrico 0,1N, 2 mL de ácido fosfórico PA, 800 mL de água miliQ). O método empregado foi o modo gradiente (conforme descrito no QUADRO 8), com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e 46 minutos de corrida.

Os extratos de B. adusta e dos controles foram diluídos em metanol grau CLAE com concentração final de 5 $mg.mL^{-1}$. Centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos e injetados no equipamento.

QUADRO 8 – VARIAÇÃO DA FASE MÓVEL NO DECORRER DA CORRIDA

Tempo (min)	Metanol (%)	Fase Ácida (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	20,0	80,0	1,000
3,0	20,0	80,0	1,000
35,0	100,0	0,0	1,000
40,0	100,0	0,0	1,000
43,0	20,0	0,0	1,000
46,0	20,0	0,0	1,000

FONTE: O autor (2017).

3.12. ISOLAMENTO DOS CRISTAIS (SAE12) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

Observou-se que, após o preparo dos extratos acetato de etila a partir do micélio obtido da curva de crescimento do fungo *Bjerkandera adusta* em função da temperatura (item 3.2.), houve a formação de pequenos cristais no frasco contendo a massa fúngica seca de *Bjerkandera adusta* crescida a 12 °C/35 dias. Esses precipitados foram lavados com etanol PA, por algumas vezes, filtrado em papel filtro, e após alguns dias foram obtidos cristais, chamados de SAE12, identificados por cristalografia.

3.13. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS CRISTAIS (SAE12) POR CRISTALOGRAFIA

A amostra foi analisada por difração de raio X para determinar seus parâmetros cristalinos. A análise foi realizada no Laboratório de Difração de Raios X de Monocristal, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Os cristais prismáticos incolores, de aproximadamente 0,15 x 0,15 x 0,08 mm, foram colocados em suporte do tipo MicroMesh^{TM} fixo com óleo Nujol em um difratômetro Bruker D8 Venture, equipado com um detector Photon 100 CMOS. As análises foram realizadas utilizando radiação gerada pela fonte Cu-Kα μS-microsource com monocromador de espelhos Gobbel. A intensidade dos dados foram medidas por varreduras finas em ω e φ. O número total de reflexões coletadas para θ_{max} = 77,3°, foram 26040 onde 3463 foram medidas únicas (R_{int} = 0,040); 3220 foram observadas com o parâmetro $I > 2\sigma_I$.

Os dados foram processados usando o programa APEX3. A estrutura foi determinada pelas rotinas de métodos “dual-space” no programa SHELXT e refinada por métodos de mínimos quadrados de matriz completa, em F^{2}'s, em SHELXL. Os átomos (com exceção dos átomos de hidrogênio) foram refinados com parâmetros térmicos anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono e a maioria dos átomos de hidrogênio ligados a átomos de oxigênio foram incluídos em posições idealizadas e os seus valores de Uiso foram ajustados para rodar nos valores Ueq dos átomos de carbono/oxigênio originais. Os átomos de hidrogênio da água foram localizados em um mapa de diferenças e refinados livremente. Na finalização do refinamento, foram obtidos valores de wR_2 = 0,064 e R_1 = 0,032 (2B) para todas as 3463 reflexões ponderadas por $w=[\sigma^2(Fo^2)+(0,0287P)^2+0,3119P]^{-1}$ onde $P=(Fo^2+2Fc^2)/3$; e para os dados observados , R_1 = 0,028. O mapa de densidade eletrônica final apresentou o pico mais intenso (*aproximadamente* 0,21 e.$Å^{-3}$) próximo ao átomo O(8W).

Os fatores de dispersão para átomos neutros foram retirados da Tabela Internacional de Cristalografia de Raios-X (International Tables for X-ray Crystallography, 1992).

Os detalhes da determinação cristalográfica encontram-se no QUADRO 9.

QUADRO 9 – DADOS DO CRISTAL E DE REFINAMENTO DE ESTRUTURA PARA TREALOSE

Formula Elementar	$C_{12}H_{22}O_{11}$, $2(H_2O)$
Massa Molecular por Unidade de Z	378,33
Sistema Cristalino, Grupo Espacial	Ortorrômbico, P 2_1 2_1 2_1
Dimensões da Cela Unitária	a = 7,60310(10) Å α = 90 °
	b = 12,2382(2) Å β = 90 °
	c = 17,8987(3) Å γ = 90 °
Volume	1665,44(4) $Å^3$
Z; densidade Calculada	4; 1,509 Mg/m^3
F(000)	808
Coeficiente de Absorção	1,212 mm^{-1}
Temperatura	300(2) K
Comprimento de Onda	1,54178 Å
Cor e Forma do Cristal	Prisma Incolor
Dimensões do Cristal	0,153 x 0,149 x 0,085 mm
Montagem do cristal:	em MicroMoutn™, fixo com Nujol
Parâmetros do Difratômetro:	
Varredura de θ para coleta dos dados	4,376 a 77,267 °
Varredura limite dos índices	$-9 \leq h \leq 9$, $-15 \leq k \leq 15$, $-22 \leq l \leq 22$
Completeza para θ = 67,679 °	99,7 %
Correção de absorção	Semi-empírico para equivalentes
Transmissão max. e min.	0,7542 e 0,6881
Reflexões coletadas (abstenções não incluídas)	26040
Reflexões independentes	3463 [R_{int} = 0,040]
Nº de reflexões observadas ($I > 2\sigma_I$)	3220
Estrutura determinada pelo:	método “dual-space”, em SHELXT
Método de refinamento:	Matriz completa de mínimos quadrados em F^2, em SHELXL
Dados / restrições / parâmetros	3463 / 6 / 250
Ajuste (GOOF) em F^2	1,061
Índices R finais ($I>2\sigma_I$)	R_1 = 0,028, wR_2 = 0,062
Índices R (todos os dados)	R_1 = 0,032, wR_2 = 0,064
Reflexões ponderadas:	$w=[\sigma^2(Fo^2)+(0,0287P)^2+0,3119P]^{-1}$ onde $P=(Fo^2+2Fc^2)/3$
Parâmetro de estrutura absoluta	-0,01(7)
Coeficiente de Extinção	n/a
Maiores diferença de pico e abissais	0,21 e -0,18 e.$Å^{-3}$
Localização do maior pico de diferença	0,89 Å distante de O(8W)

FONTE: O autor (2017).

3.14. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.14.1. Umidade (Perda por dessecação)

Seguiu-se a metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Foram pesadas cerca de 1 g de amostra do fungo *Bjerkandera adusta in natura* e do fungo liofilizado e triturado, em cadinho de porcelana previamente seco em estufa e tarado. Os cadinhos foram transferidos para estufa a 105 °C por 3 horas. Após esse período, foram retirados da estufa e transferidos para dessecador até apresentarem massa constante. Foram feitas triplicatas para

cada uma das amostras (*in natura* e liofilizada). A umidade foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$U(\%) = \frac{Pu\ x\ Ps}{Pa} \times 100$$

LEGENDA:

U(%): umidade a 105 °C por centro m/m;
Pu: massa da amostra (em gramas);
Ps: massa do cadinho + massa da amostra após dessecação (em gramas);
Pa: massa do cadinho + massa da amostra antes da dessecação (em gramas)

3.14.2. Resíduo por incineração (Cinzas totais)

A metodologia utilizada seguiu àquela descrita na Farmacopeia 5ª ed. (BRASIL, 2010). Pesou-se 3 g de amostra do fungo *Bjerkandera adusta in natura* e do fungo liofilizado, triturado e homogeneizado. A amostra foi colocada em cadinho de porcelana previamente seco e tarado. Os cadinhos foram colocados para incinerar em para mufla, aumentando gradativamente a temperatura até que atingisse 600 °C ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Posteriormente, os cadinhos foram resfriados em dessecador até atingir peso constante, e pesados em balança analítica. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até peso constante. A análise foi feita em triplicata para cada uma das amostras. O resultado final foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir:

$$CZ(\%) = \frac{100\ x\ N}{P}$$

LEGENDA:

CZ(%): cinzas totais por cento m/m;
N: massa final (cápsula + cinzas em gramas);
P: massa inicial (cápsula + amostra pesada inicialmente em gramas)

3.14.3. Determinação do pH de *Bjerkandera adusta*

Pesou-se 2 g da amostra do fungo *Bjerkandera adusta* liofilizado em béquer de 250 mL, a amostra foi diluída com cerca de 20 mL de água destilada. O conteúdo do béquer foi agitado até obter uma mistura homogênea. O pH foi medido com

auxílio de pHmetro (MS TECNOPON mPA210), previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata (Adaptado de INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.14.4. Determinação de lipídeos de *Bjerkandera adusta* – Extração direta em Soxhlet

O ensaio foi realizado no departamento de nutrição da UFPR seguindo a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Foram pesados cerca de 3 g de amostra do fungo *Bjerkandera adusta* liofilizado, triturado e homogeneizado, a amostra foi transferida para um cartucho de Soxhlet, e colocada no aparelho de Soxhlet. Ao extrator acoplou-se um balão de fundo chato previamente seco em estufa a 105 °C e pesado em balança analítica. O lipídeos foram extraídos com éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. O aparelho foi mantido sob aquecimento em banho-maria dentro da faixa de ebulição do solvente por 8 horas. Após esse período, o balão contendo o resíduo extraído foi levado para estufa a 105 °C por aproximadamente 1 hora, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado em balança analítica. O balão foi novamente aquecido em estufa por 30 minutos, resfriado e pesado. Essa etapa de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante por no máximo 2 horas. Foram utilizadas triplicatas da amostra. O teor de lipídeos na amostra foi calculado em função da massa fúngica seca, conforme fórmula a seguir:

$$\text{LT(\%)} = \frac{100\ x\ N}{P}$$

LEGENDA:

LT(%): teor de lipídeos por centro m/m;
N: massa final (balão + extrato etéreo em gramas)
P: massa inicial (balão + amostra pesada inicialmente em gramas)

3.14.5. Determinação de proteínas de *Bjerkandera adusta*

A determinação de proteínas na amostra de fungo seguiu a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) e foi realizado no

departamento de nutrição da UFPR. Cerca de 1 g da amostra liofilizada do fungo *Bjerkandera adusta* foi pesada em papel filtro, transferida para o balão de Kjeldahl (papel e amostra) (equipamento DK 20 Heating Digester – marca VELP Scientifica®). Adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico e aproximadamente 6 g da mistura catalítica (dióxido de titânio anidro:sulfato de cobre anidro:sulfato de potássio, na proporção de 0,3:0,3:6). O sistema foi aquecido, até que a solução adquirisse coloração de tom azul-esverdeado e ausência de material não digerido (pontos pretos). Posteriormente, aquecido por mais 1 hora e então resfriado. Realizou-se a destilação por arraste de vapor de amônia em equipamento UDK 139 Semi-Automatic Destilattion Unit (marca VELP Scientifica®), conectado a um erlenmeyer contendo solução de ácido bórico a 4%. Posteriormente, o excesso de amônia foi titulado com solução de ácido sulfúrico 0,1 N até que houvesse mudança de coloração do verde para o rosa. Foram realizadas triplicatas. O cálculo do teor de proteínas da amostra foi realizado de acordo com a fórmula descrita a seguir levando-se em consideração a massa fúngica seca.

$$\text{PT(\%)} = \frac{V\ x\ 0{,}14\ x\ f\ x\ fc}{P}$$

LEGENDA:

PT(%): teor de proteínas por cento m/m;
V: volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (mL);
P: massa da amostra (gramas);
f: fator de conversão (4,38);
fc: fator de conversão do ácido (0,937)

3.14.6. Determinação de fibras brutas

O ensaio foi realizado no laboratório de Bromatologia do depatamento de Farmácia da UFPR, seguindo a metodologia descrita na AOAC (1970). Cerca de 1g de amostra de massa fúngica de *Bjerkandera* adusta, liofilizada e triturada, foi pesada em balança analítica e transferida para um Erlenmeyer de 500 mL. Foi realizada a digestão ácida da amostra com 200 mL de solução 0,255 N de ácido sulfúrico (1,25%) a quente. O Erlenmeyer foi colocado em chapa aquecedora durante 30 minutos contados a partir da fervura. O conteúdo foi filtrado, ainda a quente, em pano resistente e lavado com água destilada fervida a fim de neutralizar

esse resíduo (até que o pH da solução filtrada estivesse neutro, verificado com auxílio de fita indicadora de pH). O resíduo contido no pano foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL adicionando-se uma solução 0,313 N de hidróxido de sódio (1,25%) a quente. O erlenmeyer foi colocado em banho-maria/chapa aquecedora por 30 minutos a partir da fervura. O conteúdo foi filtrado em cadinho de Gooch previamente pesado. O papel foi levado para secar em estufa a 60 °C. Posteriormente, após resfriar, foi pesado em balança analítica. Adicionou-se 3 gotas de ácido nítrico concentrado no conteúdo do cadinho. Esse foi transferido para mufla a 500 °C, até a formação de cinzas. Posteriormente, foi colocado em dessecador até esfriar e pesado em balança analítica. O experimento foi realizado em triplicata. Calculou-se a média e o desvio padrão das amostras (AOAC, 1970). O teor de fibras totais presente nas amostras foi calculado levando-se em consideração a massa fúngica seca de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{FB (\%)} = \frac{(massa\ do\ resíduo\ em\ gramas - massa\ das\ cinzas\ obtidas)\ x\ 100}{massa\ da\ amostra\ em\ gramas}$$

LEGENDA:

FB(%): fibras brutas por cento m/m;

3.14.7. Determinação de Carboidratos

O teor de carboidratos totais presentes na amostra liofilizada de *Bjerkandera adusta* foi estimado pela diferença de 100% menos a soma dos teores de umidade, lipídeos, proteínas, fibras brutas e cinzas (AOAC, 2002), de acordo com a fórmula a seguir.

$$CT(\%) = (100\%) - (U\% + LT\% + PT\% + FB\% + CZ\%)$$

LEGENDA:

CT(%): teor de carboidratos por cento m/m;
U% = % de umidade presente na amostra liofilizada;
LT% = % de lipídeos presente na amostra liofilizada;
PT% = % de proteínas presente na amostra liofilizada;
FB% = % de fibras brutas presentes na amostra liofilizada;
CZ% = % de cinzas totais presentes na amostra liofilizada;

3.14.8. Determinação de exopolissacarídeos (EPS)

Cerca de 200 mL do caldo fermentado (meio BD), obtido a partir da análise do crescimento do fungo em função do tempo, foram concentrados até secura em frasco de vidro em estufa a 40 °C. Posteriormente, foi suspendido novamente com 20 mL de água destilada. Adicionou-se 10 mL de etanol PA. Após homogeneização, a solução foi filtrada a vácuo com auxílio de funil de Bücher em papel de filtro previamente seco em estufa e pesado. Novamente, adicionou-se 10 mL de etanol PA a solução e filtrou-se. O procedimento foi novamente repetido. O papel de filtro foi seco em estufa a 40 °C até peso constante, e pesado em balança analítica. Foram feitas triplicatas (COVIZZI, 2007).

3.14.9. Determinação de quitina

Pesou-se 3 g de amostra liofilizada (fungo *Bjerkandera adusta*) em um béquer de 250 mL. Adicionou-se 75 mL de água destilada a amostra, esta foi levada ao ultrassom por 40 minutos e posteriormente filtrada em papel filtro. O filtrado foi descartado e o resíduo foi transferido para um béquer de 250 mL. Adicionou-se 75 mL de etanol PA ao resíduo, o qual foi deixado em repouso por 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se com a etapa de desproteinização com solução de hidróxido de sódio 4M na proporção de 1:20 (m/v), sob aquecimento em banho-maria a 100 °C por 2 horas. Essa etapa foi repetida 3 vezes. Essa suspensão foi filtrada, o filtrado foi descartado e o resíduo foi lavado com água destilada até atingir o pH neutro, identificado com o auxílio de fita indicadora de pH. O resíduo foi novamente transferido para um béquer, e tratado com 75 mL de solução de permanganato de potássio 10 $g.L^{-1}$, por 1 hora. Posteriormente, essa suspensão foi filtrada através de funil de Bücher. A amostra retida no papel filtro foi transferida para um béquer de 250 mL e tratada com 75 mL de uma solução $10g.L^{-1}$ de ácido oxálico durante 1 hora. Após essa etapa, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos, o precipitado foi lavado com água destilada em quantidade suficiente para que atingisse o pH neutro, o qual foi verificado com auxílio de fita indicadora de pH. O precipitado foi transferido para uma placa de Petri previamente seca e

pesada e seco em estufa a 100 °C até peso constante. O teor de quitina (% m/m) foi calculado de acordo com o cálculo descrito na fórmula apresentada a seguir:

$$Q(\%) = \frac{100\ x\ (m - p)}{q}$$

LEGENDA:

Q(%): teor de quitina por cento m/m;
m = massa final (placa de Petri + quitina em gramas);
p = massa da placa de Petri (em gramas);
q = massa inicial (amostra pesada inicialmente em gramas)

A caracterização da quitina presente nas amostras foi realizada em equipamento de Infravermelho (IV) Nicolet iS10 FT-IR da marca Spectrometer Thermo Fisher Scientific®, utilizando a amostra diretamente no equipamento. Os resultados obtidos foram comparados com dados descritos na literatura (Adaptado de ÁLVAREZ et al., 2014). O valor foi calculado em função da massa fúngica seca.

3.15. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.15.1. Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Foi preparada uma solução de água do mar artificial com 38 g de sal marinho (Blue Treasure Reef Sea Salt, adquirido comercialmente) e 1000 mL de água destilada. O pH dessa solução foi ajustado para 9,0 com solução a 10% de carbonato de sódio, aferido com auxílio de pHmêtro (MS TECNOPON mPA210), para evitar a morte das larvas durante a incubação (LEWAN; ANDERSON; MORALES-GOMEZ, 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram eclodidos em água do mar artificial por um período 48 horas sob aeração contínua, expostos à luz diurna e temperatura controlada (27-30 ºC, em BOD). As amostras (extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico da massa fúngica de *Bjerkendera adusta* e extrato acetato de etila do caldo fermentado), foram preparadas nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$, diluídas em metanol PA. Como controle positivo foi utilizado o dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu g.mL^{-1}$; como controle negativo utilizou-

se metanol PA. Todos os testes foram realizados em triplicata. Após a eclosão dos ovos, 10 naupilos de *Artemia salina* foram transferidos para cada um dos eppendorfs contendo as amostras e controles. Após 24 horas, o número de larvas mortas e vivas foi contado com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Os dados foram analisados estaticamente pelo método de PROBITOS (FINNEY, 1971) empregando o programa IBM SPSS 22, determinados os valores de $CL_{50,}$ aceitando 95% de intervalo de confiança. As frações foram consideradas ativas quando o valor de CL_{50} foi menor que 1000 ppm (VEIGA; VITAL, 2002).

3.15.2. Atividade hemolítica

3.15.2.1. Teste da atividade hemolítica em placas de ágar sangue

Foram aplicados 20 µL das amostras de extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico da massa fúngica de *Bjerkendera adusta* e extrato acetato de etila do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta*, na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$, diluídas em metanol PA, em discos de papel filtro Whatman (n°1) de 7 mm de diâmetro. Depois de secos, os discos foram transferidos para placas de ágar sangue e incubados por 24 horas a 35 °C em estufa. Posteriormente, verificou-se a existência de halo de hemólise ao redor dos discos, a presença desse halo indica resultado positivo para atividade hemolítica. Como controle positivo foram utilizadas solução de saponina e de Triton na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$, diluídos em metanol PA (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

3.15.2.2. Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

A metodologia empregada seguiu a descrita por Banerjee e colaboradores (2008) adaptada. Foi utilizado sangue de carneiro da empresa Newprov®. O sangue foi homogeneizado brandamente, 5 mL foram transferidos para um tubo de ensaio, levado para centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o restante da amostra lavado com cerca de 5 mL de PBS gelado (tampão fosfato-salina), centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante foi descartado, a amostra novamente lavada com PBS até que o

sobrenadante não apresentasse mais coloração. Em seguida, os eritrócitos foram diluídos com PBS até obter uma diluição de 2%.

Foram utilizadas amostras de extrato de *Bjerkandera adusta* (extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila da massa micelial e do caldo fermentado, e metanólico) nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 $\mu g.mL^{-1}$, diluídas com 10% de metanol PA e PBS.

Como controle positivo utilizou-se 200 µL de água destilada e Triton, como controle negativo 200 µL de PBS em 200 µL de solução de eritrócito a 2% e como branco 200 µL de metanol PA. Foram transferidos 200 µL das amostras e dos controles e 200 µL de solução de eritrócitos a 2% para eppendorfs. Os eppendorfs foram agitados manualmente e incubados por 3 horas em estufa a temperatura de 37 °C. Após esse período, eles foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para placa de Elisa de 96 poços. A leitura das amostras foi feita em aparelho espectrofotômetro (Multiskan FC Thermo Scientific) em 540 nm.

A análise dos resultados foi feita por comparação entre as médias dos índices de atividade (IA%), utilizando o teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$.

3.15.3. Teor de compostos fenólicos totais

A técnica se baseia na reação entre o reagente de Folin Ciocalteau com compostos fenólicos, em meio básico, formando um ânion fenolato que reduz o reagente de molibdato em óxido de molibdênio, com formação de um complexo (molibdênio-tungstênio) de coloração azul intensa (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Esse ensaio seguiu a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), adaptada. As amostras (extratos de *Bjerkandera adusta*) foram preparadas na concentração de $1mg.mL^{-1}$ em metanol PA.

Inicialmente as amostras foram transferidas para tubos de ensaio, misturou-se a elas água destilada e o reagente de Folin-Ciocalteau (nas quantidades descritas no QUADRO 10), os tubos foram agitados e deixados em repouso durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se a essa mistura uma solução de carbonato de cálcio a 10%, deixada em repouso por 30 minutos. Após esse período, as

absorbâncias das amostras foram verificadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 760 nm. As amostras foram preparadas em triplicata.

Como controle utilizou-se uma curva preparada com ácido gálico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; e 20 $\mu g.mL^{-1}$.

O teor de polifenóis totais foi determinado em função da curva de calibração feita com o ácido gálico, os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra.

QUADRO 10 – REAGENTES UTILIZADOS NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Amostra (mL)	Água (mL)	Folin-Ciocalteau (mL)	Carbonato de Cálcio (mL)
0,32	3,080	0,2	0,4

3.15.4. Avaliação da atividade antioxidante

3.15.4.1. Redução do DPPH• (2,2 - difenil-1-picril-hidrazila)

O objetivo desse ensaio foi avaliar se as amostras testadas possuem a capacidade de reduzir o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, em difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, através de leitura em espectofotômetro, seguindo a técnica descrita por Mensor et al. (2001).

As amostras do extrato acetato de etila da massa fúngica de *Bjerkandera adusta* foram preparadas na faixa de 100 a 400 $\mu g.mL^{-1}$, para o extrato metanólico da massa micelial de *Bjerkandera adusta* foram testadas concentrações variando de 200 a 600 $\mu g.mL^{-1}$ e entre 250 a 500 $\mu g.mL^{-1}$ para o extrato acetato de etila do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta*, foram preparados pelo menos 5 pontos dentro dessas faixas conforme QUADRO 11. Os padrões utilizados foram a vitamina C, na concentração de 1,6 a 8,0 $\mu g.mL^{-1}$, e a rutina, na concentração de 2,0 a 12,0 $\mu g.mL^{-1}$. Como branco, utilizou-se 2,5 mL de metanol PA e 1 mL de DPPH. No momento da análise, foi preparada uma solução de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL, diluída em metanol PA. Aos tubos contendo as amostras foi adicionado 1 mL da solução de DPPH, deixados em repouso por 30

minutos protegidos da luz, e posteriormente foram lidas as absorbâncias das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 518 nm.

QUADRO 11 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE DPPH

Concentração da amostra ($\mu g.mL^{-1}$)	Solução da amostra (µL)	Etanol PA (mL)	DPPH (mL)
100	250	2,250	1
150	375	2,125	1
200	500	2,000	1
250	625	1,875	1
300	750	1,750	1
350	875	1,625	1
400	1000	1,500	1
450	1125	1,375	1
500	1250	1,250	1
550	1375	1,125	1
600	1500	1,000	1

A capacidade antioxidante das amostras foi calculada de acordo com a fórmula a seguir.

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = 100 - \frac{(absorvância\ da\ amostra - absorvância\ do\ branco)}{absorvância\ do\ controle} \times 100$$

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955) e análise de variância (ANOVA), $p<0,05$.

3.15.4.2. Redução do complexo Fosfomolibdênio

Esse método se baseia capacidade de substâncias com atividade antioxidante em reduzir o molibdênio VI em molibdênio V, com formação de um complexo entre o fosfato e o molibdênio V, de coloração verde, conforme técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999).

As amostras (extratos de *Bjerkandera adusta* – extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico da massa fúngica e extrato acetato de etila do caldo

fermentado) e padrões (rutina e vitamina C) foram preparados na concentração de 200 µg.mL^{-1} em metanol PA. Como controle negativo utilizou-se 0,3 mL de metanol PA e 1 mL do reativo. O reativo utilizado foi preparado no momento do seu uso, misturando-se 28 mL de uma solução de fosfato de sódio 0,1M, 12 mL de uma solução de molibdato de amônio 0,03 M, 20 mL de uma solução de ácido sulfúrico 3 M, o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Cerca de 0,3 mL das amostras foram transferidos para tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL do reativo. Os tubos foram colocados em banho-maria a 95 °C por 90 minutos, após esse período, foram resfriados até temperatura ambiente e lidos em espectrofotômetro em 695 nm.

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram calculados através das fórmulas a seguir, frente a rutina e a vitamina C:

$$\text{AA(\%) em relação à Rutina} = \frac{(abs.\ da\ amostra - abs.\ do\ branco)}{(abs.\ da\ rutina - abs.do\ branco)} \text{ x } 100$$

$$\text{AA(\%) em relação à Vitamina C} = \frac{(abs.\ da\ amostra - abs.\ do\ branco)}{(abs.\ da\ vitamina\ C - abs.do\ branco)} \text{ x } 100$$

LEGENDA:
AA(%): atividade antioxidante por cento

E analisados estatisticamente pelo teste de DUNCAN (DUNCAN, 1955) e análise de variância (ANOVA) sendo as diferenças consideradas significativas quando o valor de $p<0,05$.

3.15.5. Avaliação da atividade antimicrobiana pela CIM

Para a avaliação da atividade antimicrobiana seguiu-se o método de concentração inibitória mínima (CIM) seguindo a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008).

Uma coleção de microrganismos foi utilizada, incluindo 7 bactérias: *Staphylococcus aureus (*ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis (*ATCC 12228)*, Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli (*ATCC 25922)*,*

*Pseudomonas aeruginosa (*ATCC 27853)*, Klebsiella pneumoniae (*ATCC 700603)*, Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e 1 fungo: *Candida albicans (*ATCC 14053)*.*

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em microplacas de 96 poços de cultura.

Para verificar a atividade antibacteriana das amostras, os extratos de *Bjerkandera adusta* (extrato hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólico da massa fúngica e extrato acetato de etila do caldo fermentado) foram diluídos em 100 µL de caldo Muller Hilton (MHB - Merck), preparadas nas concentrações de 7,81 a 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina com densidade de 1,0 x 10^8 $UFC.mL^{-1}$, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland, Dessa suspensão, 5µL foram inoculados nos orifícios das placas, resultando em uma concentração final de 10^4 $UFC.mL^{-1}$. O controle positivo (com objetivo de verificar a viabilidade bacteriana) foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. Preparou-se um controle negativo para os diluentes utilizados no ensaio, adicionou-se 100 µL de solução de etanol a 10% e solução de DMSO 2% em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. Como controle de esterilidade utilizou-se 100 µL do meio Muller Hinton e 100 µL das amostras. Como controle positivo (atividade antimicrobiana) utilizou-se vancomicina (CLSI, 2008), nas concentrações entre 32 a 0,015 $\mu g.mL^{-1}$. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 16 a 20 horas a 35 °C. Após esse período acrescentou-se 20 µL de solução aquosa de TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) a 5%, e incubou-se as placas por mais 3 horas a 35 °C. Após este período, os poços que apresentaram crescimento microbiano (sem atividade antimicrobiana) são caracterizados por formação de coloração vermelha, a presença de outra coloração indica resultado positivo para inibição do crescimento das bactérias testadas.

Para verificar a atividade antifúngica das amostras, essas foram preparadas nas concentrações entre 7,81 a 1000 $\mu g.mL^{-1}$ em meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogem, Nova York, EUA). As suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina na concentração inicial de 1,0x10^8 $UFC.mL^{-1}$, em seguida foram diluídas até a concentração final de 1,0 a 5,0 x 10^3 $UFC.mL^{-1}$, 100 µL dessa solução foram inoculados nos orifícios da microplaca. Como controle positivo (atividade antifúngica) utilizou-se vancomicina no intervalo de concentração de 32 a 0,015 $\mu g.mL^{-1}$. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 horas.

Retiradas da estufa, adicionados 20 µL de solução de TTC a 0,5% e incubadas novamente por 3 horas a 35 °C. Após esse período, os poços nos quais houve crescimento dos fungos testados coram-se de vermelho, a presença de qualquer outra coloração indica ausência de crescimento (atividade antifúngica positiva).

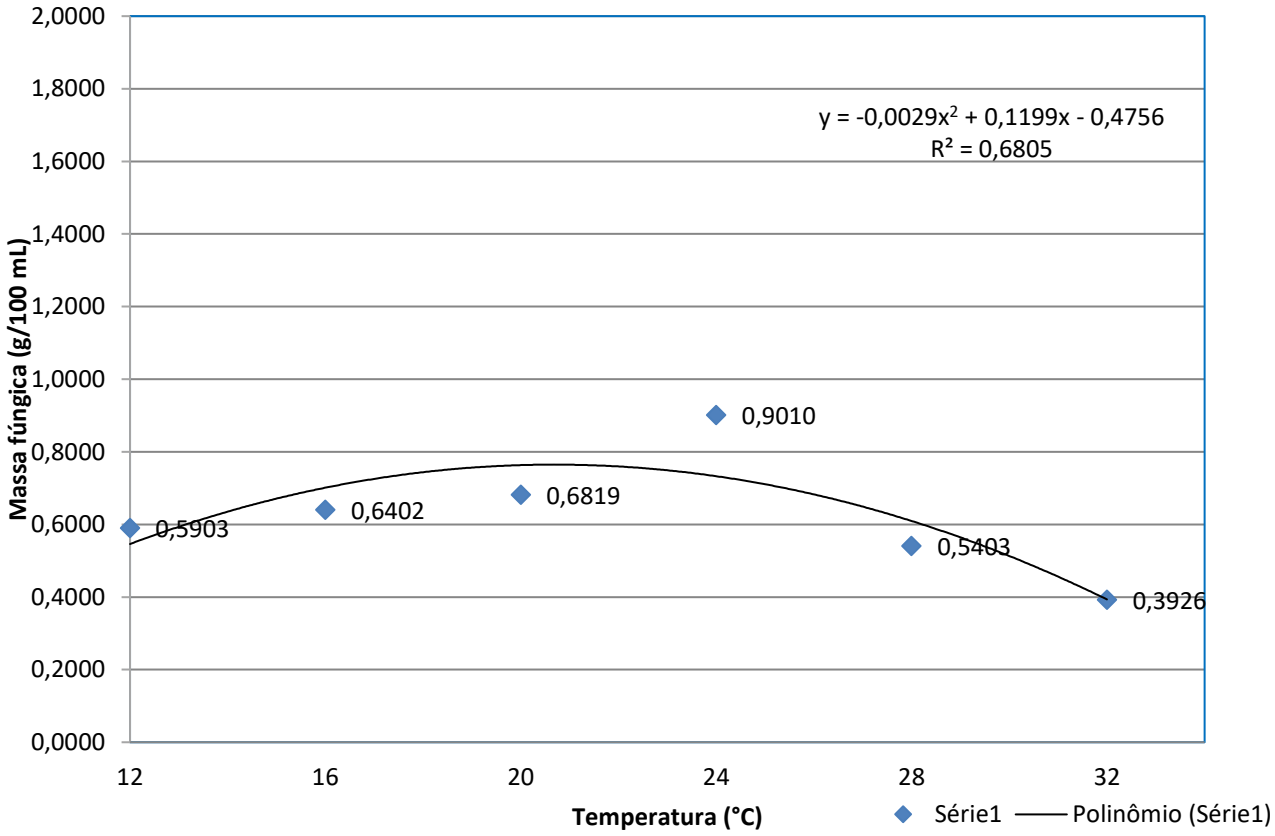
As culturas que não apresentaram crescimento foram usadas para inocular placas de meio sólido (Agar Muller Hinton e Agar Soubouraund) com o objetivo de determinar a concentração mínima letal (CML). As amostras controle e testes foram ensaiadas simultaneamente, em triplicata, conforme técnica descrita previamente (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Calculou-se a média da massa seca obtida para as temperaturas testadas para cada um dos 3 fungos, os resultados foram plotados em gráficos (GRÁFICO 1, 2, 3 e 4) e analisados estatisticamente (TABELA 1, 2, 3 e 4).

GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2017).

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD

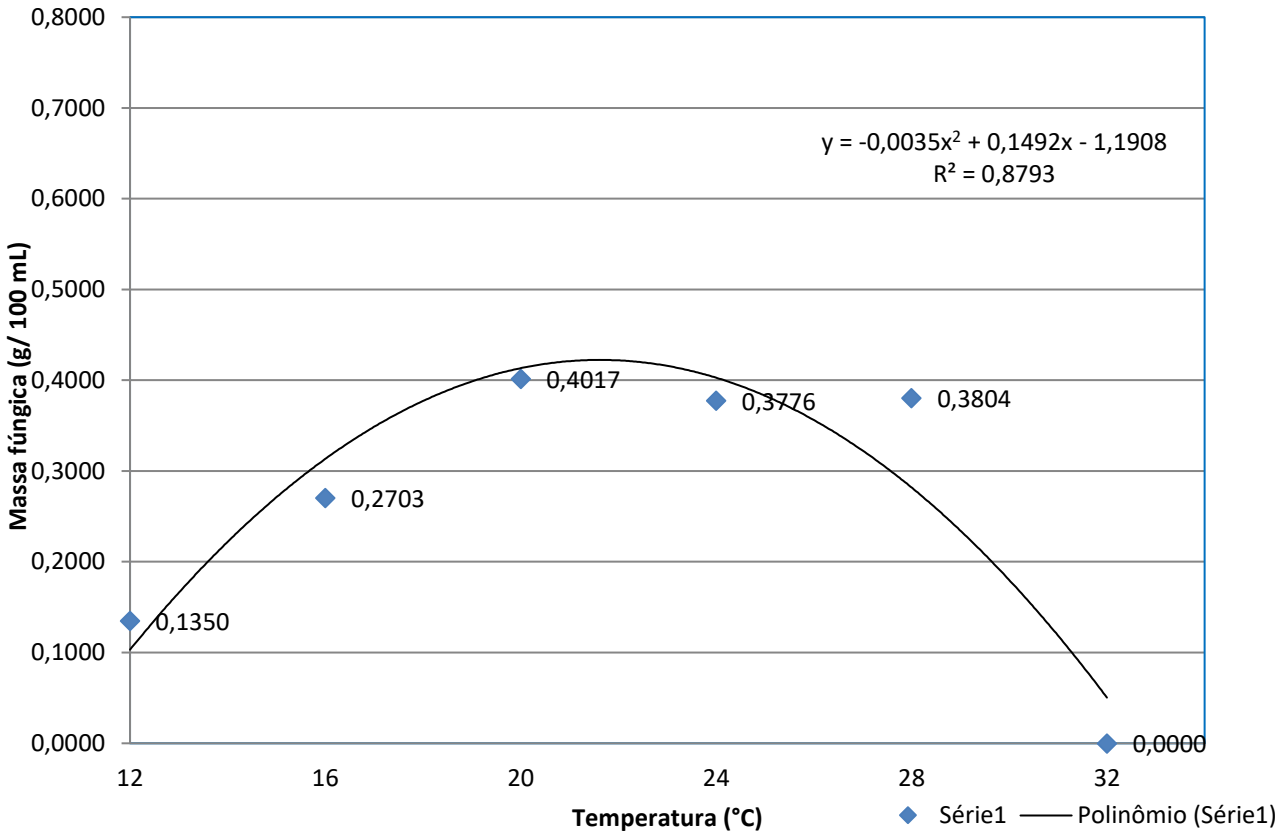
Temperatura (°C)	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*	
12	0,5903		b
16	0,6402		b
20	0,6819		b
24	0,9010	a	
28	0,5403		b
32	0,3926		b

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

De acordo com o GRÁFICO 1, observa-se que a temperatura na qual houve maior crescimento de massa fúngica para o fungo *Bjerkandera adusta* foi a 24 °C, com diferença estatisticamente significante com relação aos demais resultados (TABELA 1), com massa seca média de 0,9010 g. Sendo que o crescimento obtido nas outras temperaturas pode ser considerado semelhante pois não apresentou diferença estatística no Teste de DUNCAN. Sendo assim, a temperatura ótima de crescimento para o fungo *Bjerkandera adusta*, nas condições testadas, foi de 24 °C.

No caso do fungo *Suillus* sp. (GRÁFICO 2) nota-se que ocorre produção de quantidades mais elevadas de massa micelial em temperaturas superiores a 12 °C, com crescimento semelhante estatisticamente (TABELA 2) nas temperaturas de 16, 20, 24 e 28 °C (média de 0,2703 g; 0,4017 g; 0,3776 g e 0,3804 g de massa micelial seca, respectivamente), não havendo crescimento do mesmo em temperaturas superiores a 32 °C. Observou-se que o padrão de crescimento quando o mesmo ensaio foi realizado em meio Extrato de Malte (GRÁFICO 3) apresentou diferenças, as maiores quantidades de massa micelial também foram produzidas nas temperaturas de 16 e 20 °C (média de 0,5531 g e 0,5259 g de massa micelial seca, respectivamente), observando-se quantidades mais elevadas que as obtidas com o uso do meio BD, porém esse crescimento decai em temperaturas acima de 24 °C (TABELA 3), sendo que não observa-se crescimento desse fungo nem no meio BD nem no extrato de malte a 32°C. A partir desses resultados, sugere-se que o fungo *Suillus sp.* cresce melhor nas temperaturas de 16 e 20 °C.

GRÁFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2017).

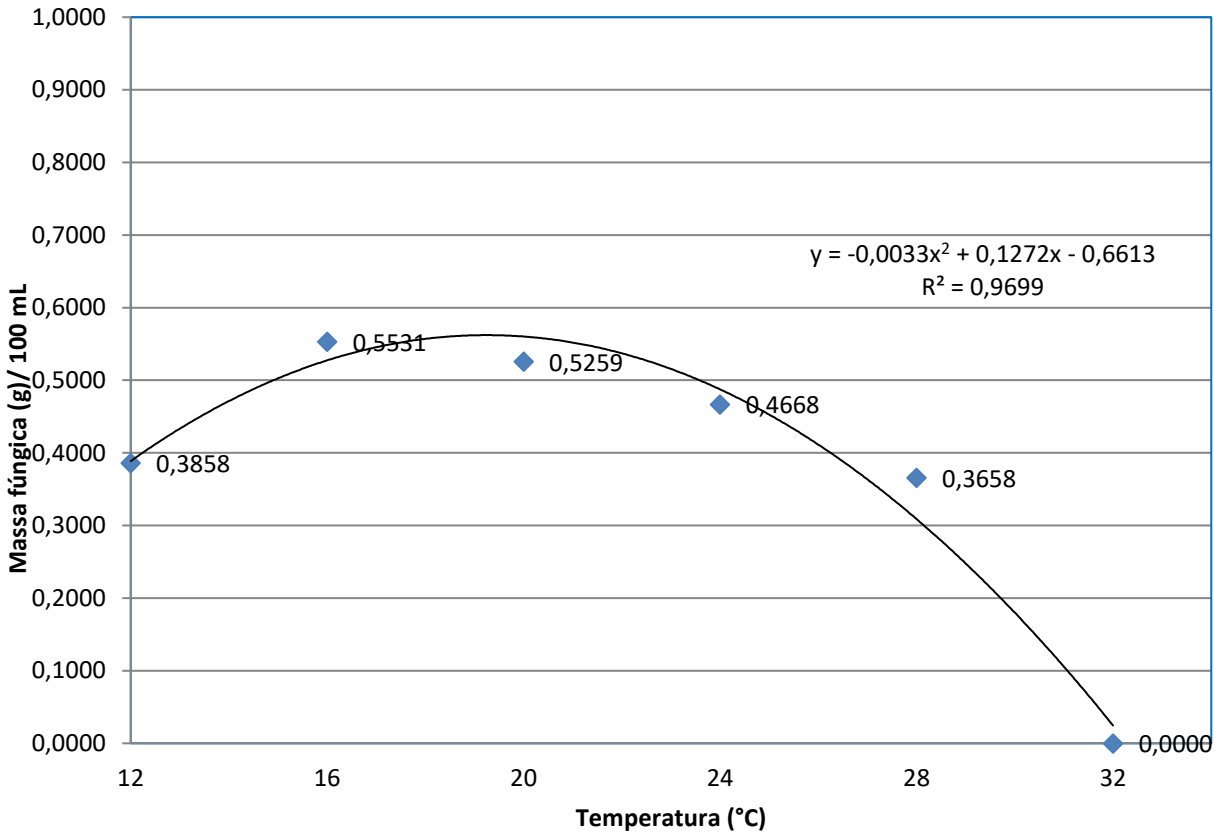
TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO BD

Temperatura (°C)	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*		
12	0,1350		b	
16	0,2703	a		
20	0,4017	a		
24	0,3776	a		
28	0,3804	a		
32	0,0000			c

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.

FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 3 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2017).

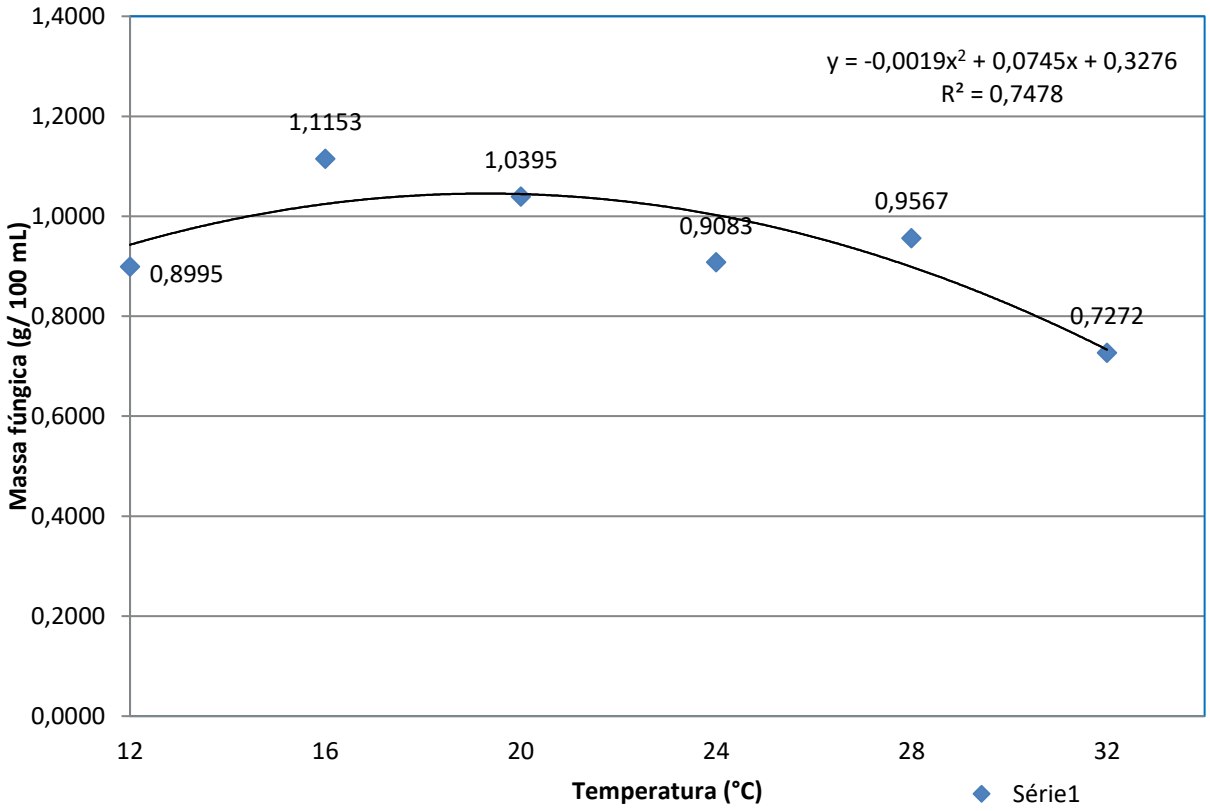
TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE

Temperatura (°C)	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*			
12	0,3858			c	
16	0,5531	a			
20	0,5259	a			
24	0,4668		b		
28	0,3658			c	
32	0,0000				d

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.

FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2017).

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD

Temperatura (°C)	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*			
12	0,8995			d	
16	1,1153	a			
20	1,0395	a	b		
24	0,9083			d	
28	0,9567		b	d	
32	0,7272				e

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

Para o fungo *Rhizoctonia* sp. (GRÁFICO 4) observa-se que a quantidade de massa fúngica começa a aumentar a partir de 16 °C, com melhor crescimento nas temperaturas de 16 °C (média de 1,1153 g de massa micelial seca), seguida pela temperatura de 20 °C (conforme TABELA 4). Em condição de temperatura acima de 24 °C nota-se um decaimento na produção de massa fúngica, a qual atinge seu valor mais baixo a 32 °C (média de 0,7272 g de massa micelial seca).

Inúmeros fatores são capazes de influenciar no crescimento vegetativo dos fungos, bem como na morfologia do micélio, pigmentação e esporulação. Dentre estes pode-se citar o meio de cultivo utilizado, a temperatura, a luz, umidade, teor de oxigênio atmosférico, o pH (SHARMA; PANDEY, 2010).

A temperatura ótima de crescimento das culturas varia de acordo com cada espécie de fungo. A maior parte dos fungos filamentosos é classificada como mesofílicos, ou seja, apresentam bom crescimento em temperaturas entre 10 e 35 °C, com melhores crescimentos entre 15 e 30 °C. Um número menor de espécies é classificada como termofílica pois esses organismos conseguem crescer em temperaturas mais elevadas (45 °C ou mais) mas são incapazes de crescer em temperaturas mais baixas (20 °C). Outras espécies são chamadas de psicrófilas pois conseguem crescer em ambientes de baixa temperatura (abaixo de 0 °C). De um modo geral, fungos provenientes de regiões tropicais e desertos crescem melhor em temperaturas mais elevadas, enquanto aqueles provenientes de regiões mais frias apresentam melhor crescimento em temperaturas mais baixas (LI, 2006; SIRI-IN et al., 2014).

Sánchez, Honrubia e Torres (2001) relataram que a maioria das espécies de fungos ectomicorrízicos provenientes de regiões Mediterrâneas apresentou maior produção micelial *in vitro* a 23 °C, sendo que a 3 espécies de *Suillus* analisadas (*Suillus collinitus, Suillus granulatus* e *Suillus luteus*) também tiveram melhor crescimento a 23 °C, seguida pela temperatura de 18 °C e apenas a espécie *Suillus collinitus* cresceu a 30 °C, sendo que esta havia sido coletada em uma região de temperaturas médias mais elevadas. Cazin, Wiemer e Howard (1989) também observaram resultados semelhantes para fungos coletados em uma floresta tropical da Costa Rica, quando comparado o crescimento micelial *in vitro* a 24 e a 30 °C, observou-se crescimento superior das culturas na temperatura de 24 °C. Ritchie, Bain e Mcquilken (2009) verificaram o efeito de diversos fatores, dentre eles da temperatura, sobre o crescimento micelial de culturas de *Rhizoctonia solani* isoladas de batata na região da Inglaterra e da Escócia, e todas elas apresentaram melhor crescimento em 20 a 25 °C, enquanto que a mesma espécie isolada no Iraque apresentou melhor crescimento a 30 °C, conforme descrito por Muhsin e Selman (2013).

4.1.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes temperaturas

Os resultados de CCD e CLAE para os 6 extratos acetato de etila da massa micelial de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir da curva de crescimento em função da temperatura em meio BD são observados na TABELA 5 e nas FIGURAS 5 a 10, respectivamente.

TABELA 5 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* E DO CONTROLE OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

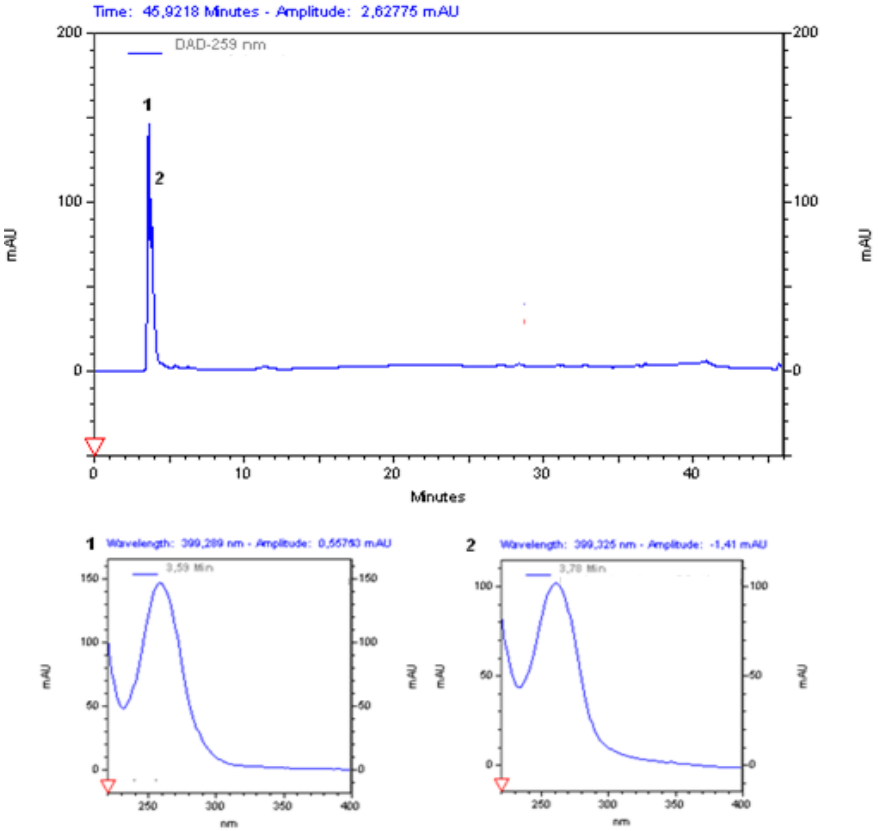
Amostra	**Esteroides/ Triterpenos**	**Flavonoides**	**Taninos**	**Alcaloides**
Extrato Acetato de Etila – 12 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,88	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 16 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,88	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 20 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,64 e 0,88	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 24 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,88	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 28 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,88	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 32 °C	Presença de banda esverdeada em Rf 0,10; bandas azuis em Rf 0,34; 0,40 e 0,82	Presença de banda esverdeada com Rf de 0,88	Negativo	Negativo
Controle	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,8	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

Observou-se que todas as amostras possuem esteroides/triterpenos e flavonoides, e todas foram negativas para taninos e alcaloides, além disso, os valores de Rf obtidos nos extratos de *Bjerkandera adusta* foram diferentes daqueles obtidos no controle, portanto os compostos presentes nas amostras não são provenientes do meio de cultivo utilizado.

Com relação ao perfil do CLAE, nota-se que as amostras apresentam diferenças uma em relação a outra. O perfil cromatográfico das amostras foi analisado em comprimento de onda próximo a 260 nm, pois a maioria dos picos cromatográficos apresentou maior intensidade nessa região. A corrida da amostra de 12 °C (FIGURA 5) exibiu apenas 2 picos logo no início da corrida, com tempo de retenção de 3,59 e 3,78 minutos, ambos com absorção em 261 nm (TABELA 6).

FIGURA 5 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 12 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 6 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 12 °C

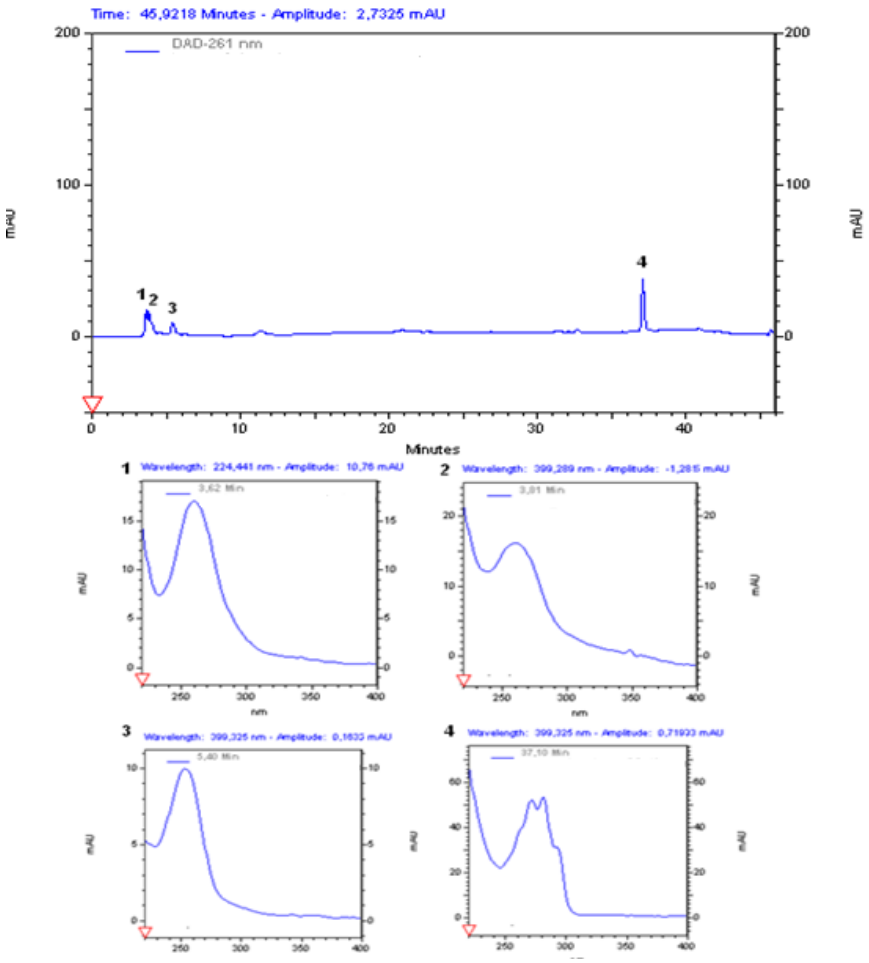
Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,59	261
2	3,78	261

FONTE: O autor (2017).

A amostra de 16 °C (FIGURA 6) exibiu os mesmos 2 picos encontrados na amostra de 12 °C, com tempo de retenção de 3,62 e de 3,81 minutos (absorção em

260 e 261 nm, respectivamente), porém em concentrações bem menores (mais de 10 vezes menor) que na amostra de 12 °C, além de exibir outros picos com tempo de retenção de 5,40 minutos (absorção em 254 nm) e 37,09 minutos (absorção em 271 e 281 nm) (TABELA 7). De modo semelhante as amostras de 12 e 16 °C, o extrato acetato de etila de *Bjerkandera adusta* a 20 °C (FIGURA 7 e TABELA 8) apresentou os picos com tempo de retenção em 3,57 e 3,73 minutos (aborção em 262 nm para os dois picos), em 4,47 minutos (absorção em 284 nm) e 5,30 minutos (absorção em 254 nm), esse último em concentração um pouco mais elevada que na amostra de 16 °C.

FIGURA 6 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 16 °C



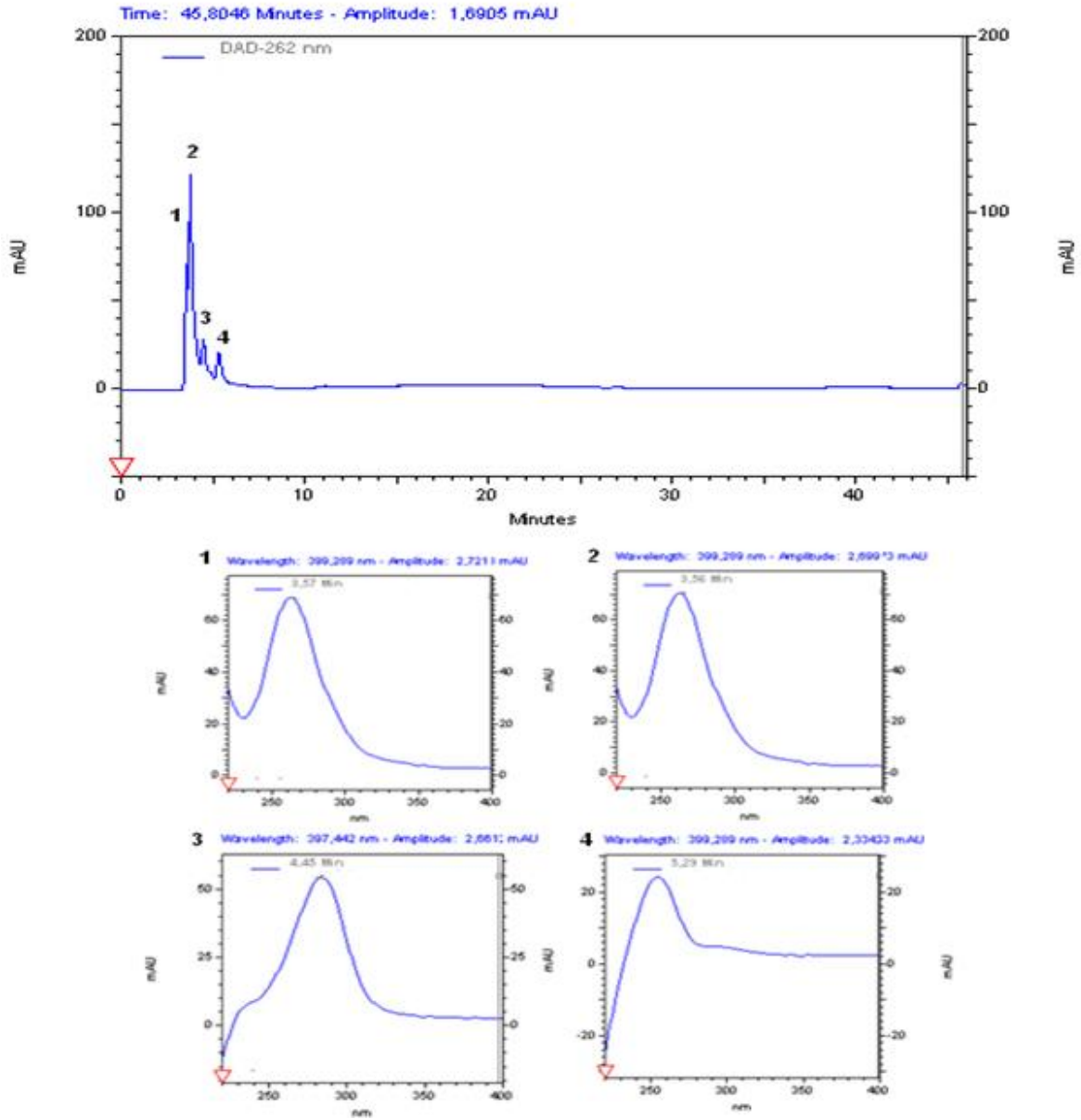
FONTE: O autor (2017).

TABELA 7 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 16 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,62	260
2	3,78	261
3	5,40	254
4	37,09	271;281

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 20 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 8 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 20 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,57	262
2	3,73	262
3	4,47	284
4	5,30	254

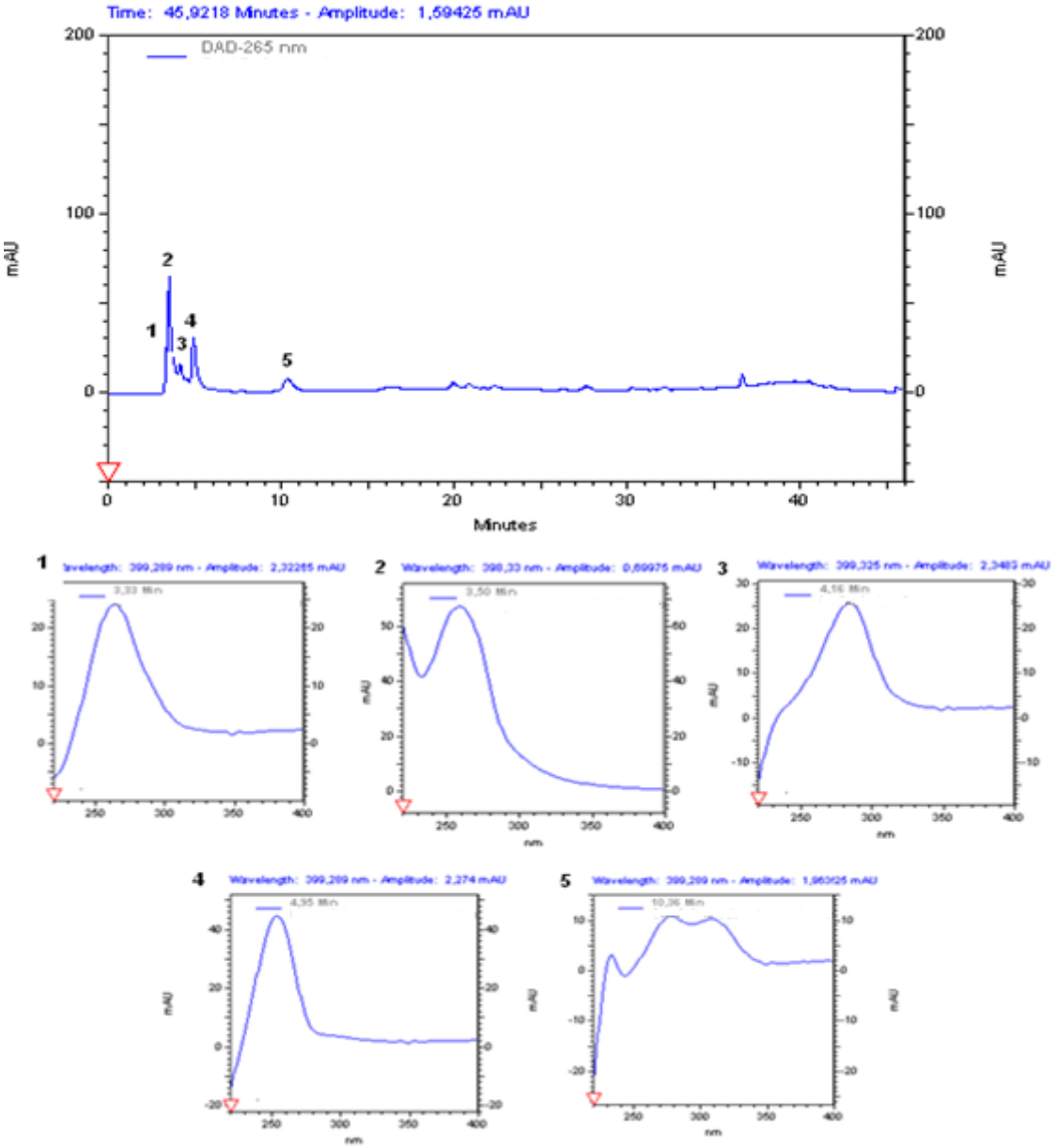
FONTE: O autor (2017).

O extrato Acetato de Etila de *Bjerkandera adusta* a 24 °C (FIGURA 8 e TABELA 9) apresentou o pico com tempo de retenção de 3,33 minutos (absorção em 263), 3,50 minutos (absorção em 258 nm), pico em 4,15 minutos, em 4,92 minutos e em 10,36 minutos (absorção em 233, 276 e 308 nm). O perfil cromatográfico do extrato Acetato de Etila de *Bjerkandera adusta* a 28 °C (FIGURA 9 e TABELA 10) foi bastante semelhante ao do extrato acetato de etila do fungo crescido em meio BD a 24 °C, observa-se a presença de um pico com tempo de retenção de 3,33 minutos, em 3,50 minutos, 4,14 minutos, 4,95 minutos (esses últimos três em concentrações um pouco mais baixas que no extrato de 24 °C) e 10,40 minutos. O extrato da massa micelial de *Bjerkandera adusta* a 32°C apresentou 3 picos principais na corrida cromatográfica (FIGURA 10 e TABELA 11), o primeiro composto, de característica mais polar, apresentou tempo de retenção de 3,52 minutos (absorção em 263 nm), o mesmo foi observado nos demais extratos porém nessa temperatura o pico foi mais intenso. Os outros 2 compostos, com tempo de retenção de 25,92 e 31,18 minutos, não foram observados nos outros extratos.

Comparando-se os cromatogramas, pôde-se observar que ao variar a temperatura de crescimento, no mesmo meio de cultivo, ocorreu variação nas substâncias produzidas por este, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A 12 °C têm-se a presença de 2 picos mais evidentes, enquanto que nas temperaturas mais altas observa-se a presença de mais 2 ou 3 sinais. Em todas as temperaturas nota-se a presença de uma substância com tempo de retenção em torno de 3,5 a 3,6 minutos, porém sua concentração varia de acordo com a temperatura testada. A proporção da substância com menor tempo de retenção é maior na amostra de 12 °C, e sua concentração começa a decair com o aumento da temperatura. Observou-se que ocorre uma inversão desse padrão no caso das

substâncias com tempo de retenção entre 3,7 e 3,8 minutos, as quais apresentaram aumento na concentração com o aumento da temperatura.

FIGURA 8 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C



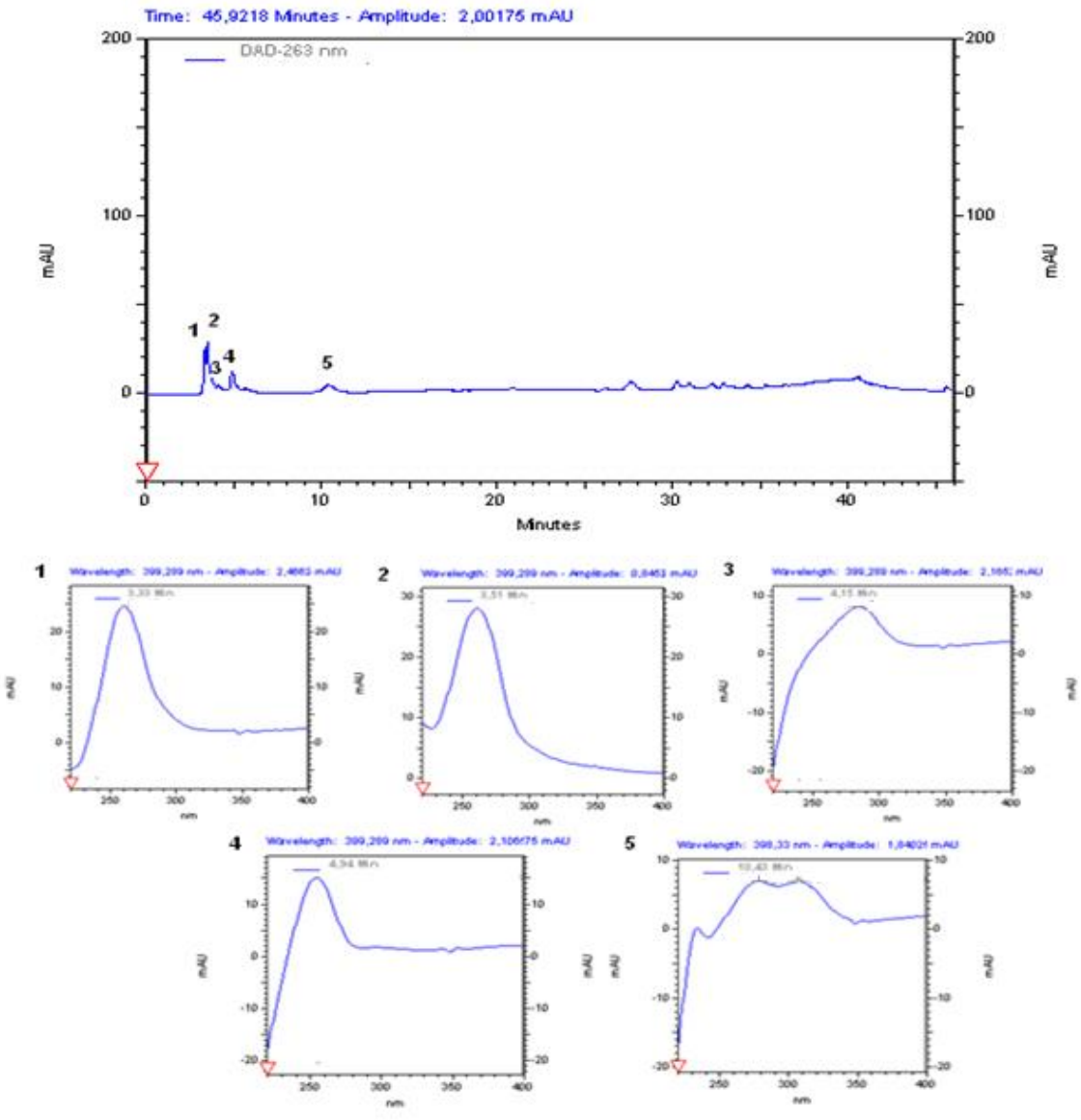
FONTE: O autor (2017).

TABELA 9 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 24 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,33	263
2	3,50	259
3	4,15	284
4	4,92	254
5	10,36	233;276;308

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE Bjerkandera adusta EM MEIO BD A 28 °C



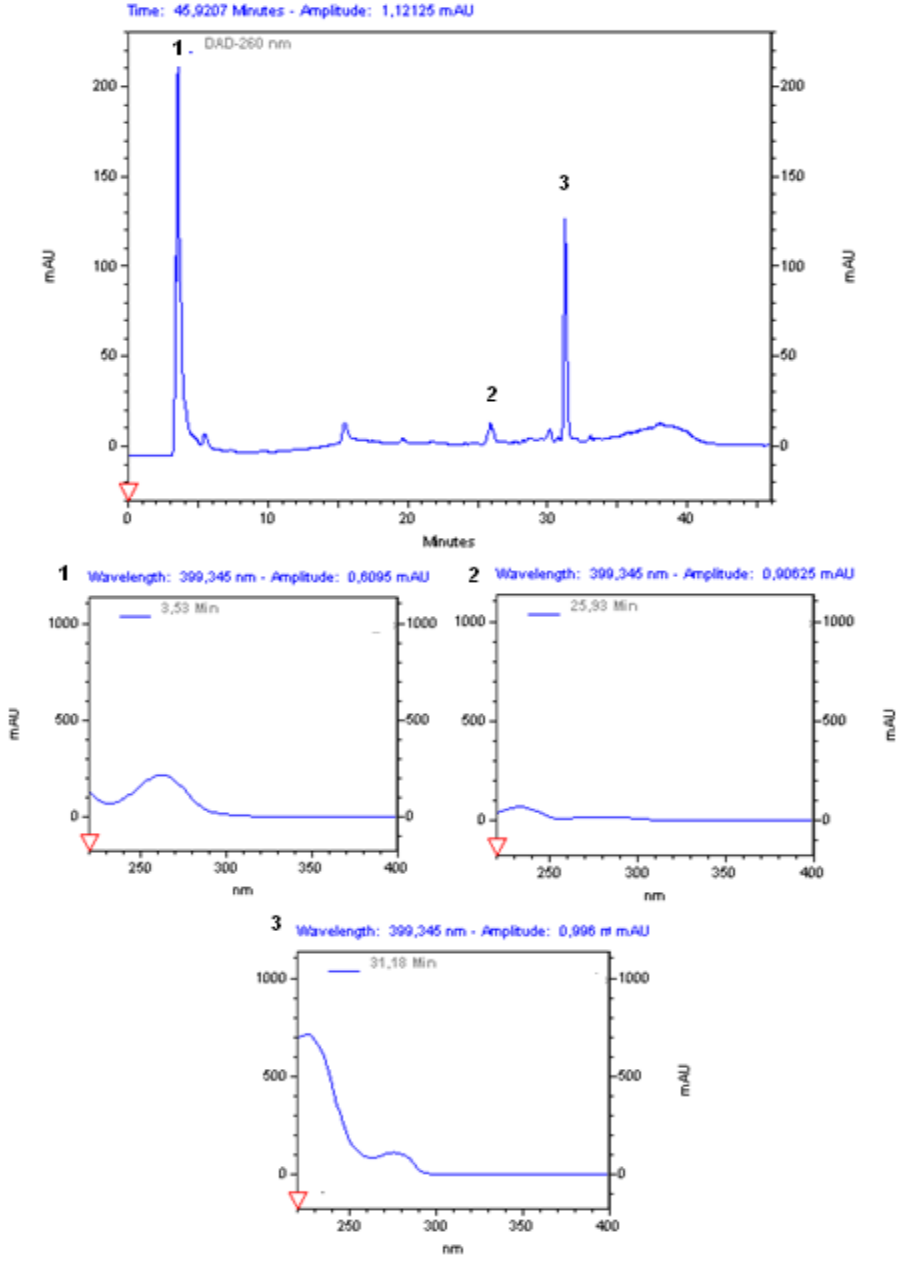
FONTE: O autor (2017).

TABELA 10 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 28 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,33	261
2	3,50	261
3	4,14	283
4	4,95	251
5	10,40	234; 277; 310

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 32 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 11 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* CRESCIDO EM MEIO BD A 32 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,52	263
2	25,92	234
3	31,18	226; 276

FONTE: O autor (2017).

Com relação aos extratos acetato de etila obtidos a partir do caldo fermentado do fungo *Bjerkandera adusta* sob diferentes temperaturas, notou-se que os resultados das CCDs foram parecidos com os obtidos para os extratos feitos a partir da massa micelial, todos foram positivos para esteroides/triterpenos e flavonoides e negativos para alcaloides e taninos (TABELA 12), porém as bandas obtidas apresentaram diferentes valores de Rf (TABELA 5 e 12), portanto apesar de serem encontradas as mesmas classes de substâncias nos extratos do micélio e do caldo fermentado, tratam-se de compostos diferentes.

TABELA 12 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* E CONTROLE OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Amostra	**Esteroides/ Triterpenos**	**Flavonoides**	**Taninos**	**Alcaloides**
Extrato Acetato de Etila – 12 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 16 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda azul em Rf 0,60 e amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 20 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda azul em Rf 0,60 e amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 24 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda azul em Rf 0,60 e amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 28 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda azul em Rf 0,60 e amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Extrato Acetato de Etila – 32 °C	Presença de banda azul clara em Rf 0,06 e violácea em Rf 0,72	Presença de banda azul em Rf 0,60 e amarela fluorescente em Rf 0,94	Negativo	Negativo
Controle	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,8	Negativo	Negativo

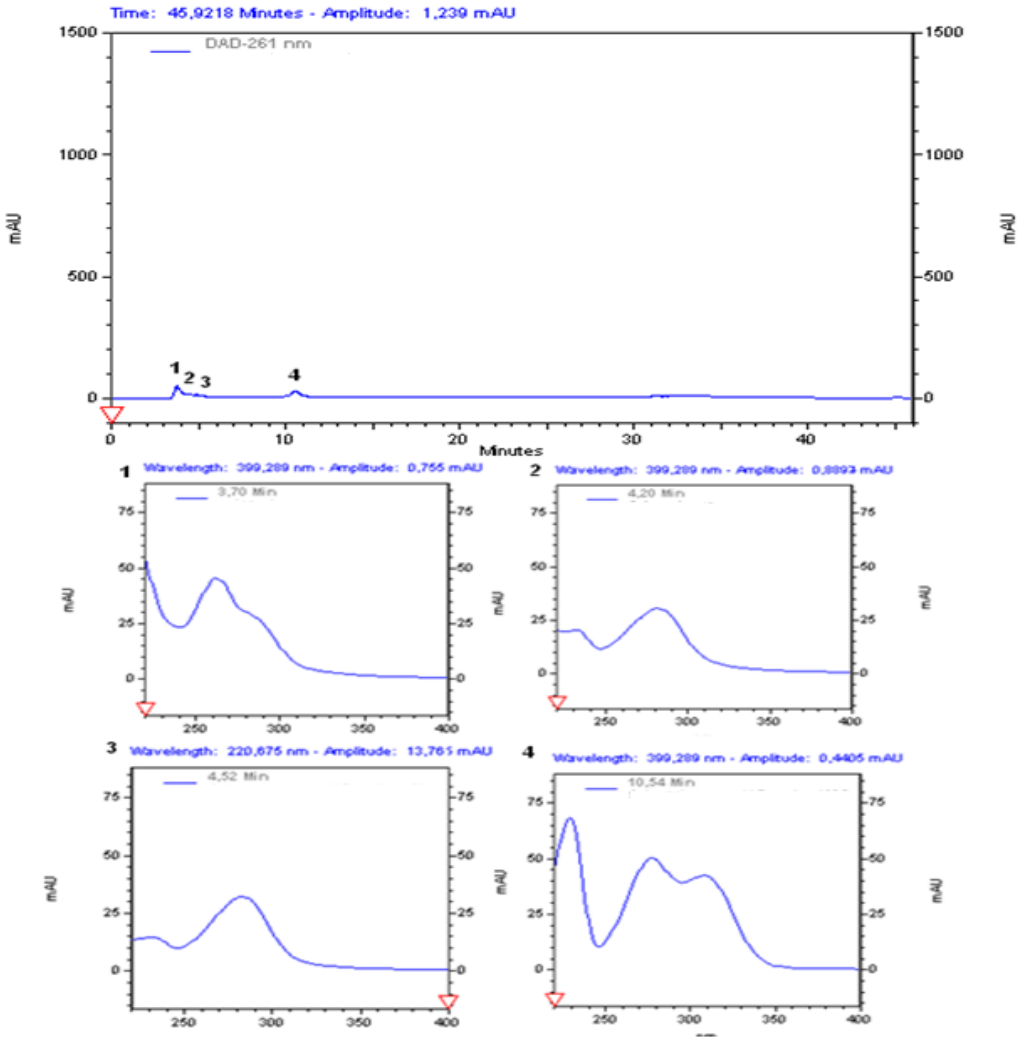
FONTE: O autor (2017).

Além disso, pôde-se observar que nenhuma das bandas encontradas nos extratos do controle coincidiram com aquelas observadas nos extratos da amostras. Portanto as bandas presentes nas amostras estão relacionadas aos metabólitos

secundários produzidos pelo fungo *Bjerkandera adusta* sob diferentes condições de temperatura.

Quanto aos resultados obtidos por CLAE, pôde-se observar que os compostos presentes nos extratos de 12, 16 e 20 °C foram muito parecidos (FIGURAS 11, 12 e 13 e TABELAS 13, 14 e 15, respectivamente), até mesmo com relação a sua concentração, nota-se no entanto que com o aumento da temperatura ocorre aumento na concentração da substância com tempo de retenção próximo de 10 minutos, substância essa que pode ser um flavonoide devido a seu perfil de absorção no UV. Os flavonoides apresentam 2 máximos de absorção característicos, um entre 240-285 nm (Banda II) e outro entre 300-400 nm (Banda I) (MÜLLER, 2006).

FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO Bjerkandera adusta a 12 °C



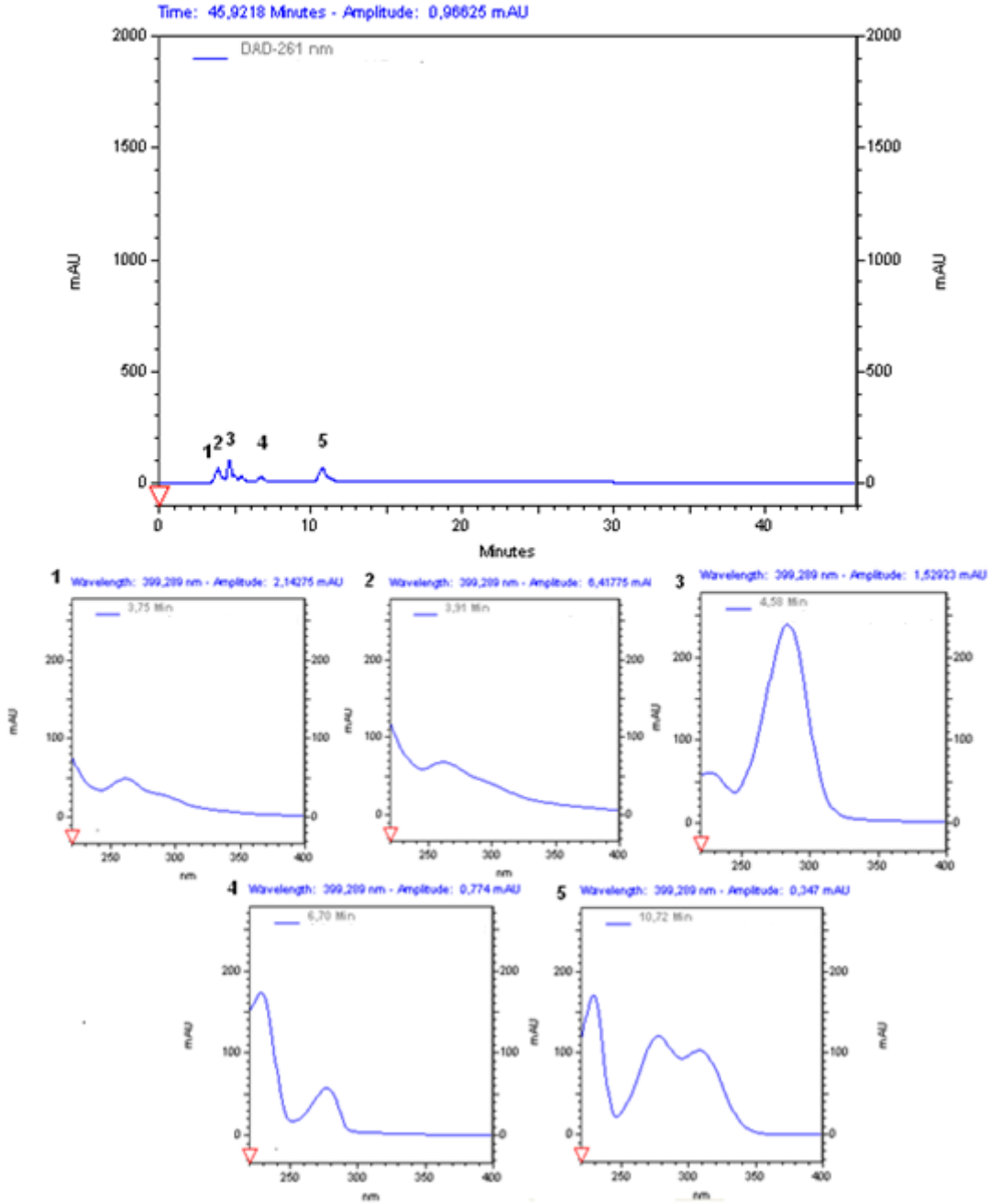
FONTE: O autor (2017).

TABELA 13 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 12 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,70	220; 263; 287
2	4,20	282
3	4,52	230; 283
4	10,54	229; 277; 310

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 16 °C



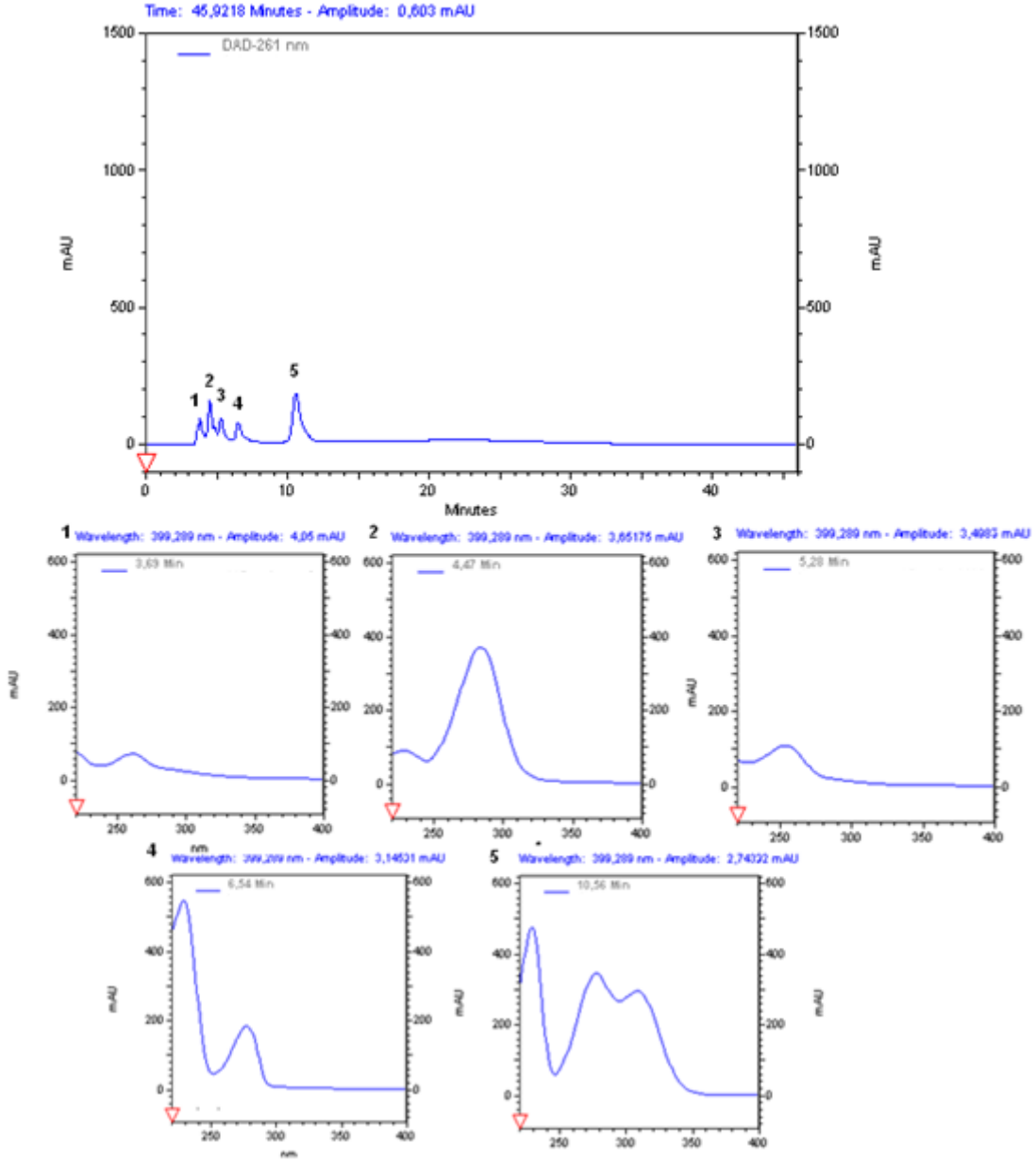
FONTE: O autor (2017).

TABELA 14 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 16 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,75	262
2	3,88	261
3	4,61	227;284
4	6,70	229;278
5	10,70	229;277;310

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 20 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 15 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 20 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,69	261
2	4,47	228;284
3	5,28	254
4	6,54	229;277
5	10,56	229;277;309

FONTE: O autor (2017).

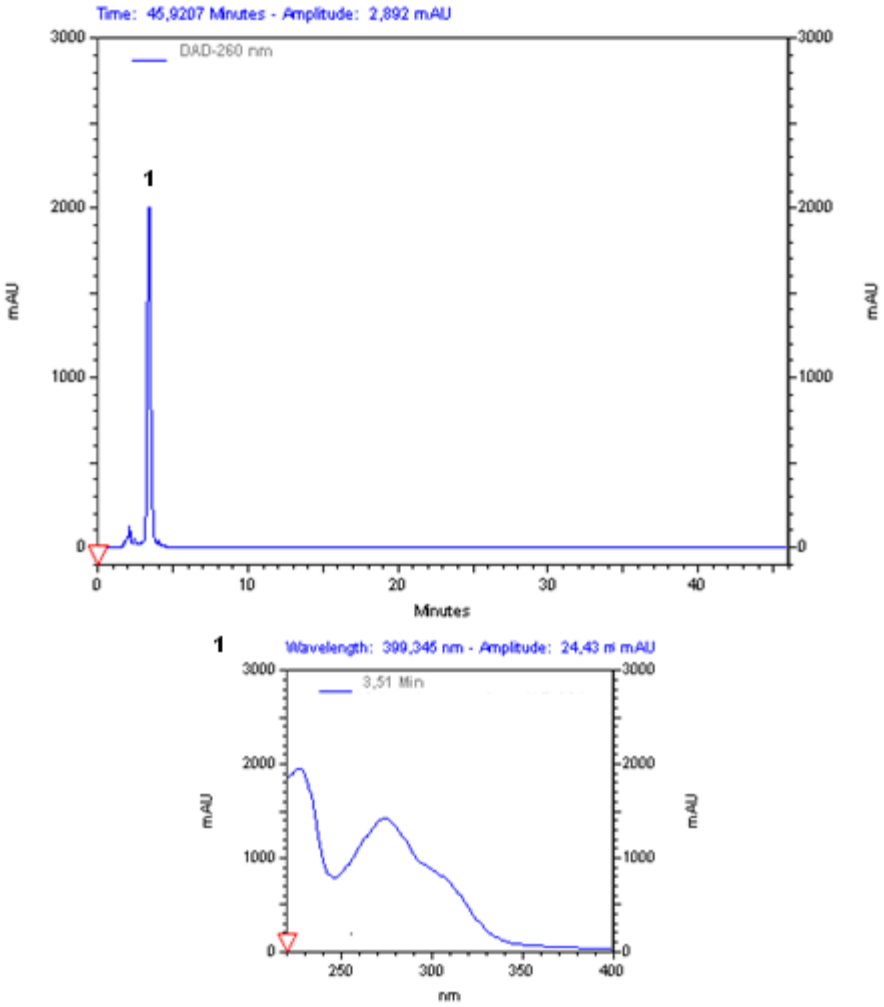
Os extratos do caldo fermentado a 24 e 28° C (FIGURA 14 e 15, e TABELAS 16 e 17) apresentaram apenas 2 picos cromatográficos.

Observou-se que na temperatura de 32 °C (FIGURA 16 e Tabela 18) há a presença de outros compostos que não foram observados nos cromatogramas dos extratos obtidos a partir dos caldos em temperaturas mais baixas, muitos deles em concentrações mais elevadas. Além disso, nota-se que as substâncias encontradas nos extratos do caldo fermentado são bastante diferentes daquelas encontradas no extrato do micélio a 32°C. De acordo com Brakhage (2013) e Palková (2004), alguns metabólitos secundários são produzidos quando os microrganismos estão sujeitos a determinadas condições específicas, isso permite que os microrganismos consigam sobreviver mesmo quando estão sob condições de crescimento não ideais, sendo que em situações normais, favoráveis ao seu crecimento, eles deixam de produzí-los ou reduzem a sua produção. Provavelmente por isso, foram observadas diversas substâncias no caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* cultivado a 32°C, como tentativa de se proteger e permitir sua sobrevivência.

Comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos a partir da massa micelial de *Bjerkandera adusta* com aqueles obtidos a partir do seu caldo fermentado pode-se notar que alguns compostos são encontrados nos 2 extratos, como é o caso do pico cromatográfico com tempo de retenção próximo a 3,8 minutos presente em ambos os extratos de 16 °C, do pico com tempo de retenção próximo a 5,3 minutos observado nos extratos de 20 °C e do pico que sai próximo a 10 minutos (10,4 e 10,7 minutos) nos extratos a 28°C.

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que a produção de metabólitos secundários pelo fungo *Bjerkandera adusta* varia de acordo com a temperatura no qual esse cresce, além disso a massa micelial apresenta substâncias diferentes daquelas encontradas no caldo fermentado.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C



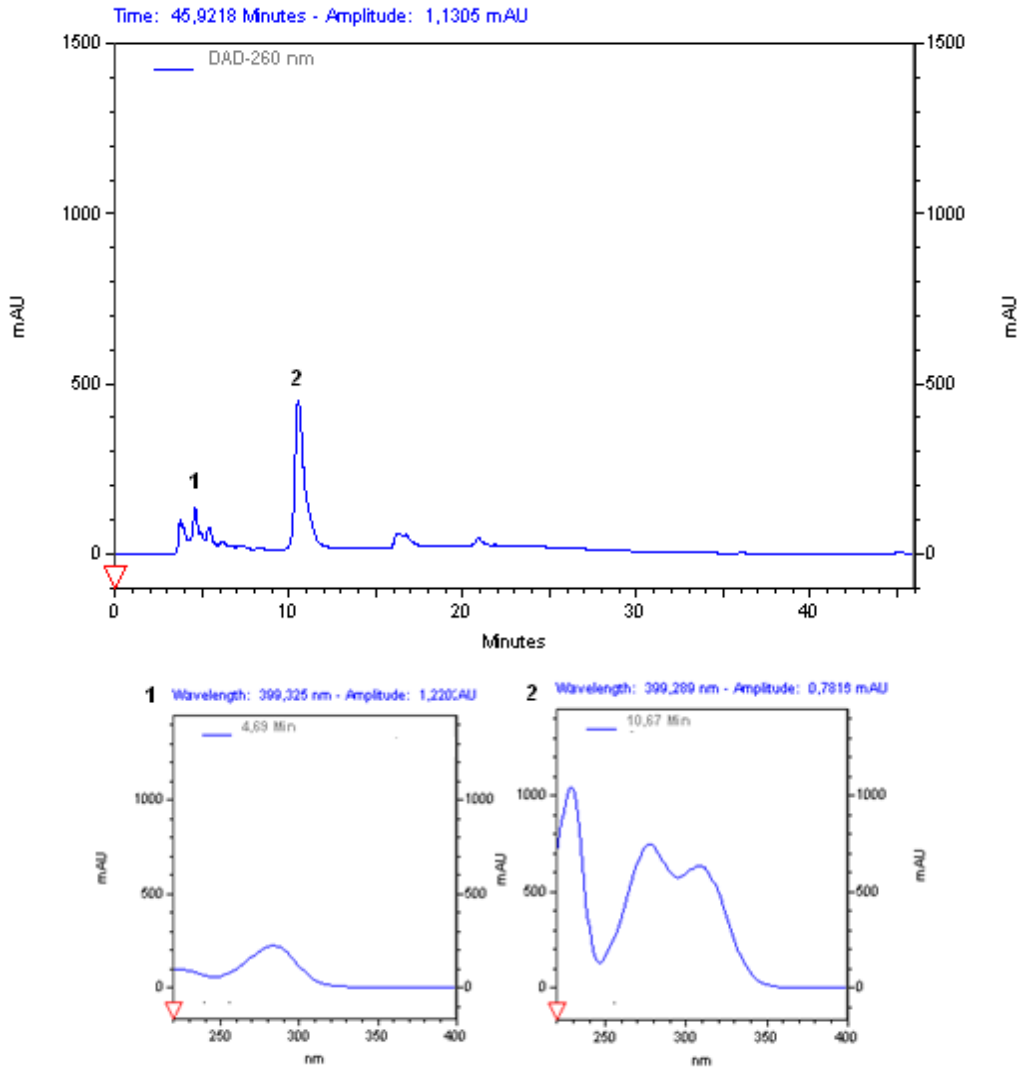
FONTE: O autor (2017).

TABELA 16 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,51	226; 276; 307

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 28 °C



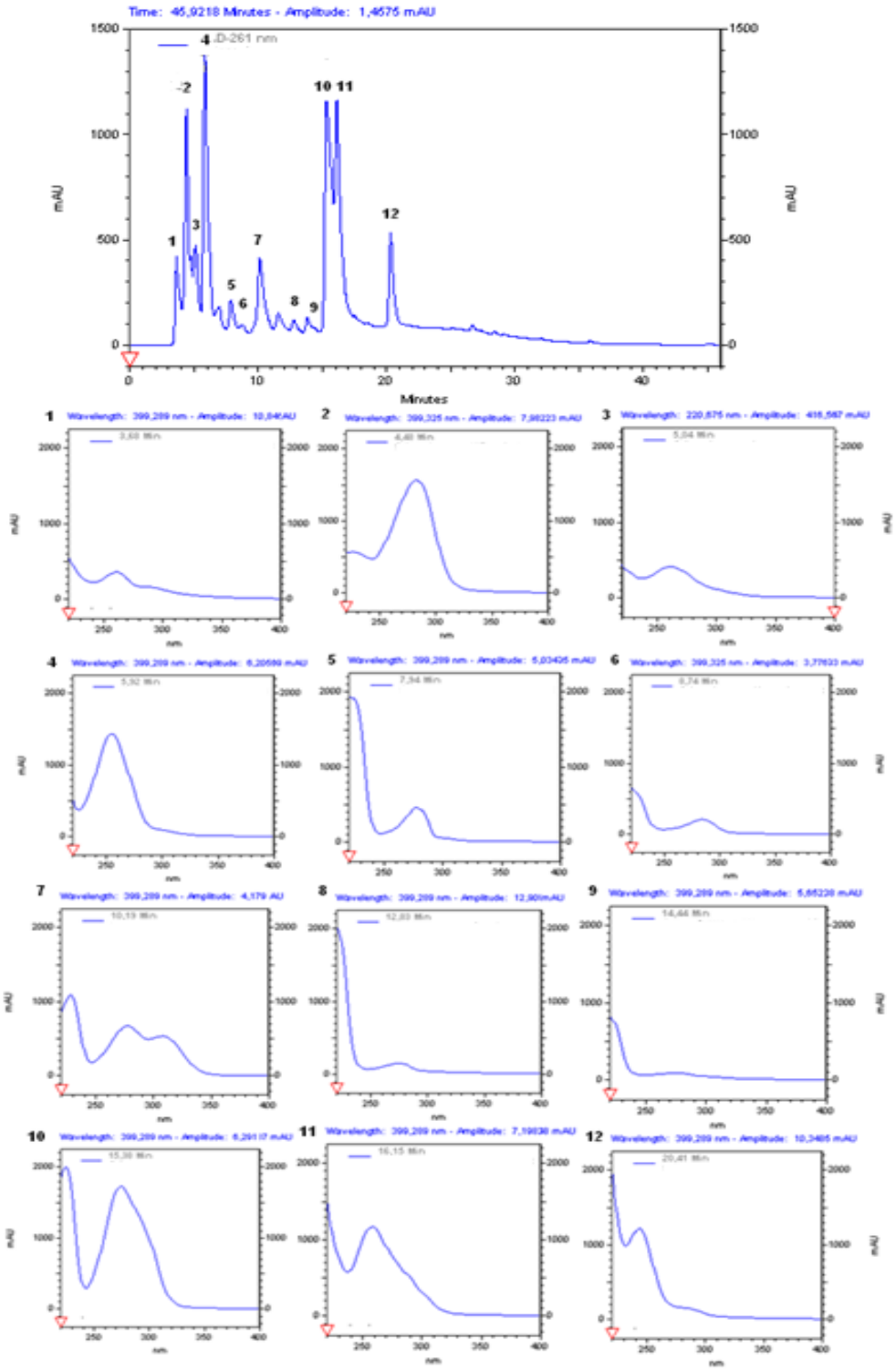
FONTE: O autor (2017).

TABELA 17 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 28 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,69	285
2	10,67	229;277;310

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 32 °C



FONTE: O autor (2017).

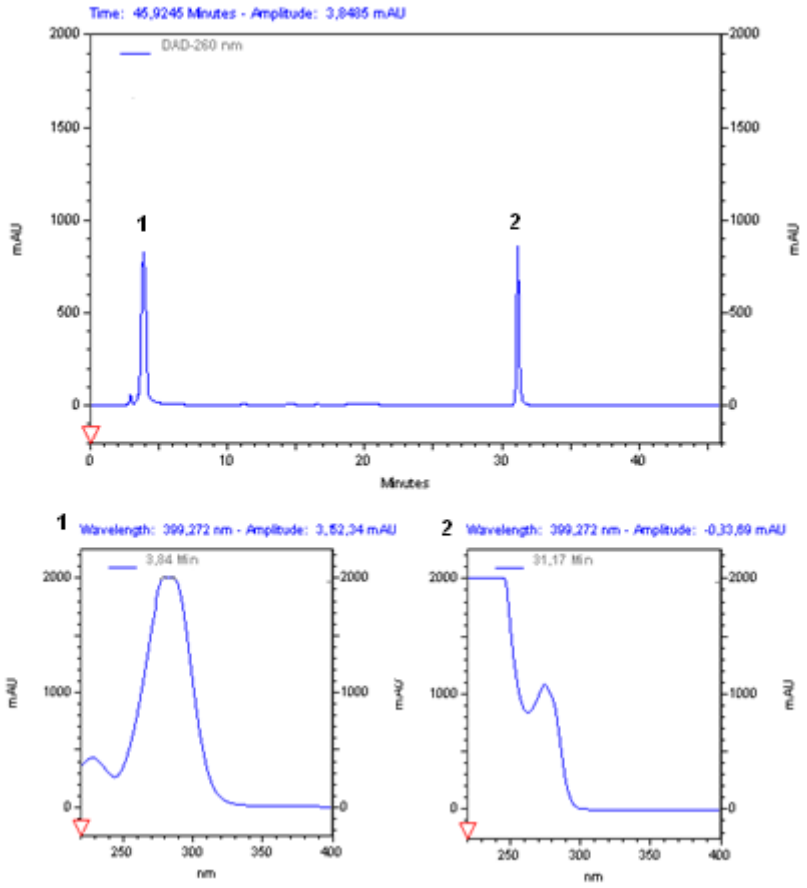
TABELA 18 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO (BD) DE *Bjerkandera adusta*, 32 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,68	261
2	4,48	282
3	5,04	263
4	5,92	255
5	7,94	220;278
6	8,74	220;286
7	10,19	228;278;310
8	12,83	220;273
9	14,44	220
10	15,38	224;274
11	16,15	220;258
12	20,41	220;244

FONTE: O autor (2017).

Comparando-se os cromatogramas dos extratos feitos para a massa micelial e para o caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* em todas as temperaturas testadas com o controle (FIGURA 17 e TABELA 19), notou-se que nenhum dos picos encontrados nos extratos das amostras foi observado no cromatograma do controle, portanto os compostos extraídos das amostras não fazem parte das substâncias que constituem o caldo fermentado BD mas sim de substâncias produzidas pelo fungo.

FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (MEIO BD HIMEDIA®)



FONTE: O autor (2017).

TABELA 19 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (MEIO BD HIMEDIA®)

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,84	283
2	31,17	220;276

FONTE: O autor (2017).

4.2. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Os fungos *Bjerkandera adusta*, *Suillus* sp. e *Rhizoctonia* sp. foram colocados para crescer em BOD nas temperaturas de 24 °C, 20 °C e 16 °C, respectivamente, nos meios líquidos BD, Malte e Czapek, pois foram as temperaturas que forneceram maior quantidade de massa micelial seca.

De acordo com a análise estatística (TABELA 20) dos dados presente no GRÁFICO 5, pode-se observar que o fungo *Bjerkandera adusta* cresceu de modo semelhante nos meios BD e extrato de Malte, sendo estatisticamente semelhantes,

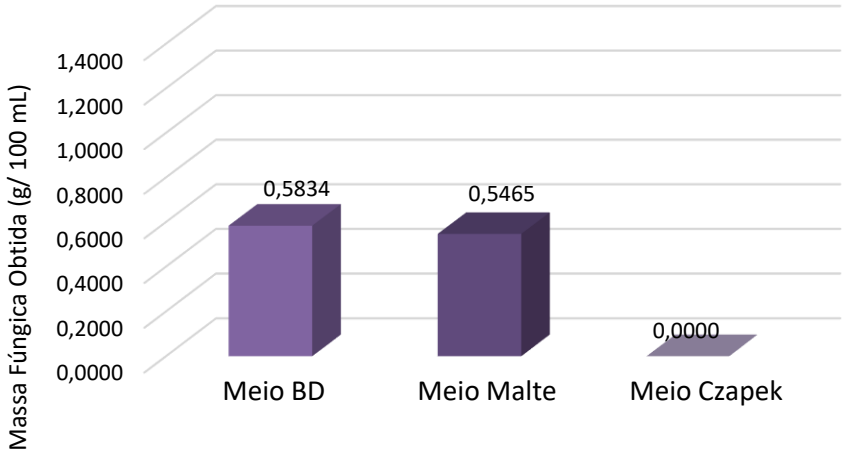
porém não foi capaz de crescer no meio Czapek durante o período em que permaneceu incubado nessas condições.

No caso do fungo *Suillus* sp. (GRÁFICO 6 e TABELA 21), observou-se que houve melhor crescimento deste fungo quando utilizado o meio líquido extrato de malte, com quantidade de massa micelial seca cerca de 2 vezes maior que a obtida em meio BD e Czapek. Devido a esse resultado, a curva de crescimento em função da temperatura para esse fungo foi refeita utilizando meio extrato de Malte com a finalidade de certificar que o crescimento se manteria de forma semelhante ao obtido com meio BD.

O fungo *Rhizoctonia* sp. (GRÁFICO 7 e TABELA 22) cresceu melhor nos meios BD e extrato de Malte, com quantidade de massa micelial seca cerca de 2 vezes maior que a obtida com o meio Czapek.

O meio de cultura Czapek é considerado um meio pobre em nutrientes devido a sua constituição bastante simples, o que pode justificar a maior dificuldade em produzir massa fúngica no caso do fungo *Rhizoctonia* sp. e a ausência de crescimento do fungo *Bjerkandera adusta* neste meio de cultivo (ZANÃO, 2013). Trabalhos já publicados demostram que grande parte dos fungos cresce melhor em meio ricos em carboidratos livres contendo uma fonte de nitrogênio orgânico, além de vitaminas (CAZIN; WIEMER; HOWARD, 1989; SIRI-IN et al., 2014).

GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO



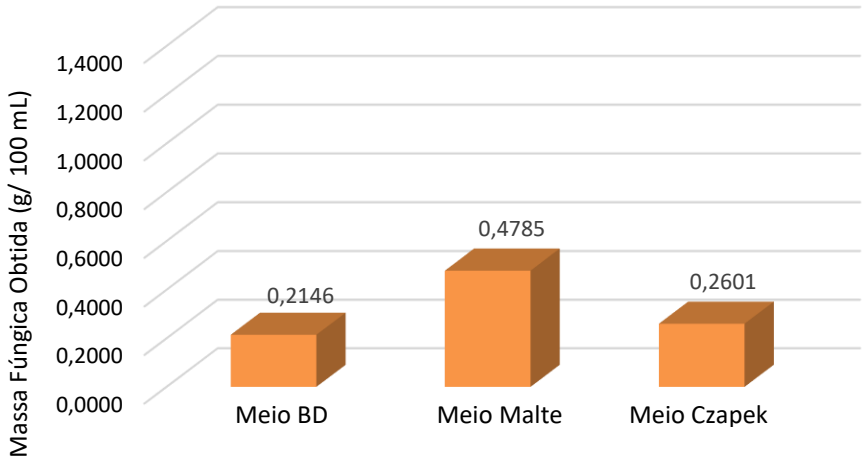
FONTE: O autor (2017).

TABELA 20 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

Meio	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*	
BD	0,5834	a	
Malte	0,5465	a	
Czapek	0,0000		b

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente
FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 6 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO



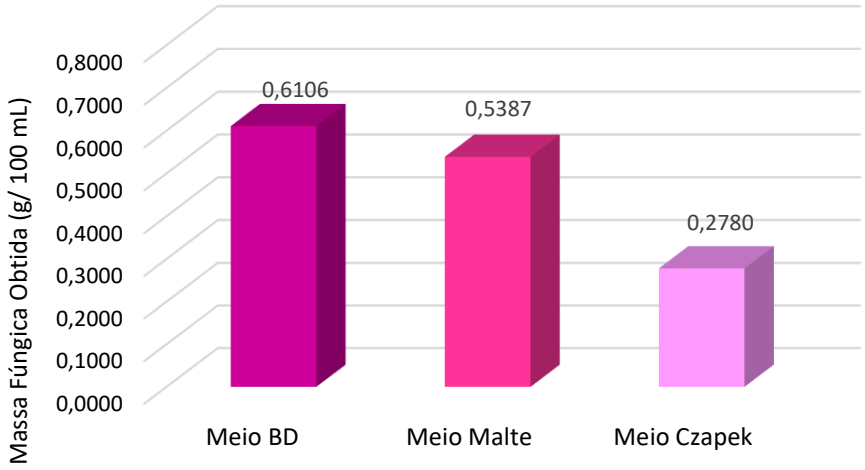
FONTE: O autor (2017).

TABELA 21 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Suillus* sp.

Meio	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*	
BD	0,2146		b
Malte	0,4785	a	
Czapek	0,2601		b

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente
FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 7 – CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. DE ACORDO COM O MEIO DE CULTIVO TESTADO



FONTE: O autor (2017).

TABELA 22 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp.

Meio	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*	
BD	0,6106	a	
Malte	0,5387	a	
Czapek	0,2780		b

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente
FONTE: O autor (2017).

De modo similar ao que ocorre com a temperatura, diversos trabalhos demonstram que o meio de cultivo no qual o fungo é inoculado afeta significativamente o seu crescimento micelial. Siri-in e colaboradores (2014) ao estudarem fatores que poderiam afetar o desenvolvimento micelial de uma espécie de *Scleroderma* sp. testaram seu crescimento em 10 meios de cultivo diferentes, as melhores taxas de crescimento foram observadas em ágar “fungal-host”, seguidas pelo meio Murashige e Skoog modificado. Mushin e Selman (2013) relataram que no caso de uma espécie de *Rhizoctonia solani* houve maior produção de massa fúngica quando empregado o meio TSB (trypto soy broth), sendo que o crescimento deste fungo foi bastante semelhante nos meios extrato de malte e BD, menor quantidade de massa fúngica foi observada para os meios Czapek’s Dox e “Rose Bengal” (RB). Sharma e Pandey (2010) afirmam que o meio BDA é um dos

meios mais utilizados devido a sua formulação simples e sua capacidade de permitir o crescimento micelial de uma variedade de fungos, além de ser rico em nutrientes. Tiberius e Catalin (2013) ao estudarem o desenvolvimento do fungo *Bjerkandera adusta* sob diversas condições, observaram que este cresceu melhor em meios de cultivo contendo açúcares simples, polialcoóis e fontes de nitrogênio orgânico (como os meios extrato de malte, extrato de levedura e peptona), enquanto que meios contendo fontes de nitrogênio inorgânico não estimularam o desenvolvimento do mesmo.

4.2.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes meios de cultivo

Os extratos metanólicos brutos obtidos a partir da maceração da massa micelial de *Bjerkandera adusta* do teste de crescimento em função do meio de cultura foram analisados por CCD (TABELA 23) e por CLAE (FIGURAS 18 e 19). Devido a ausência de crescimento do fungo *Bjerkandera adusta* em meio Czapek, não foi possível fazer o extrato metanólico bruto dessa amostra, portanto esse não foi analisado. Com relação aos extratos metanólicos do meio BD e do meio Extrato de Malte, ambos foram positivos para esteroides/triterpenos e flavonoides e negativos para taninos e alcaloides e nenhuma da bandas obtidas para os extratos corresponde àquelas encontradas no controle.

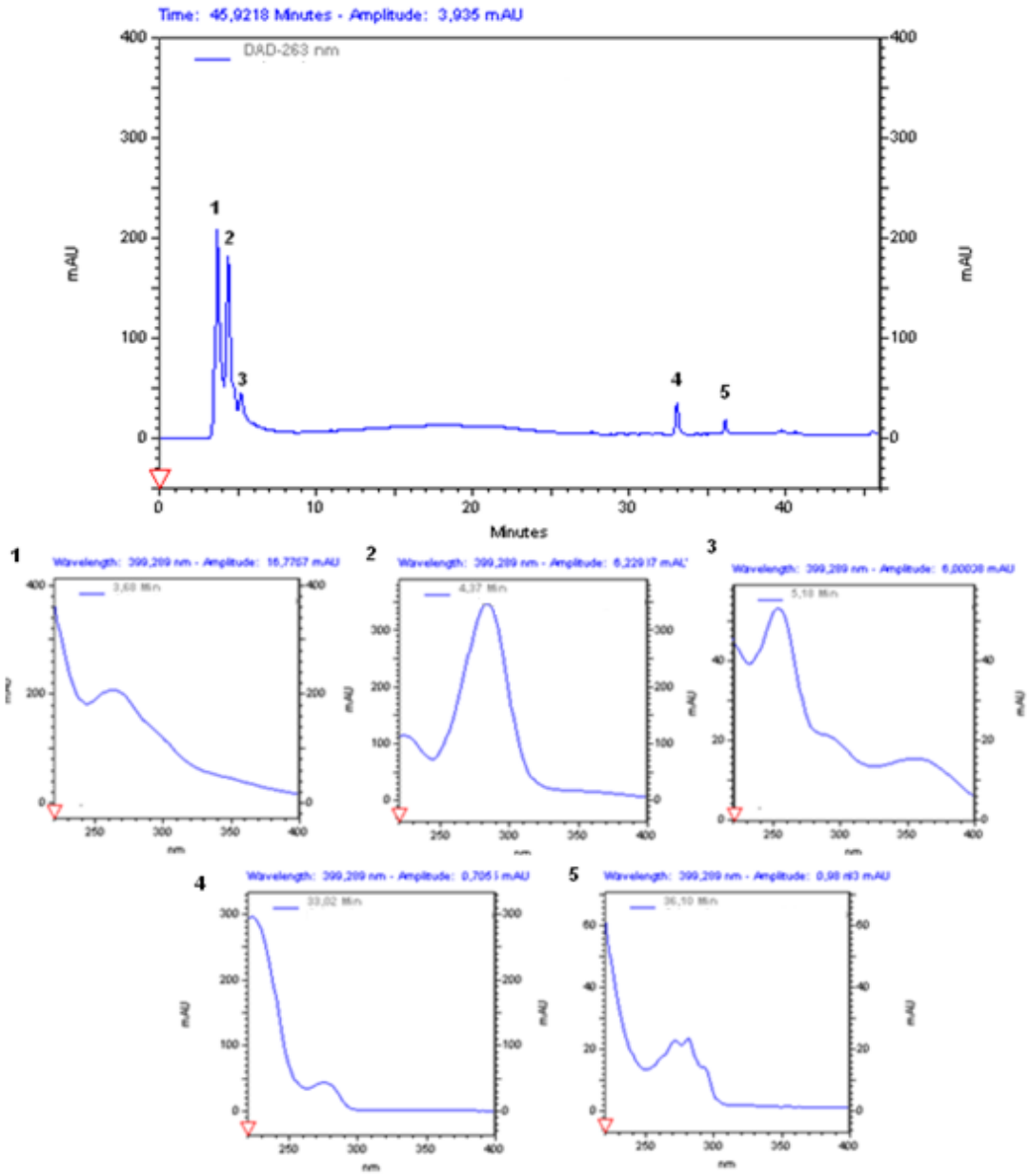
TABELA 23 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* E DOS CONTROLES OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Amostra	Esteroides/Triterpenos	Flavonoides	Taninos	Alcaloides
Extrato Metanólico – Meio BD	Presença de banda verde em Rf 0,06 e de bandas azuis em Rf 0,28; 0,36; 0,88 e 0,98	Presença de bandas amarelas com Rf de 0,12 e 0,90	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico – Meio Extrato de Malte	Presença de banda verde em Rf 0,06 e de banda azuis em Rf 0,28; 0,36; 0,88 e 0,98	Presença de banda azul com Rf de 0,16	Negativo	Negativo
Controle BD	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,8	Negativo	Negativo
Controle Extrato de Malte	Banda azul com Rf de 0,06	Presença de banda amarela com Rf 0,08	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

Com relação ao perfil cromatográfico das amostras, nota-se que esses são bastante semelhantes, apresentando algumas variações na concentração de seus compostos. O extrato metanólico bruto da massa micelial crescida em meio BD a 24 °C apresentou 5 picos principais (FIGURA 18 e TABELA 24), o primeiro com tempo de retenção em 3,67 minutos (absorção em 261 nm), em seguida foram observados picos com tempo de retenção em 4,37 minutos, 5,17 minutos, 33,01 minutos e 36,09 minutos.

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C



FONTE: O autor (2017).

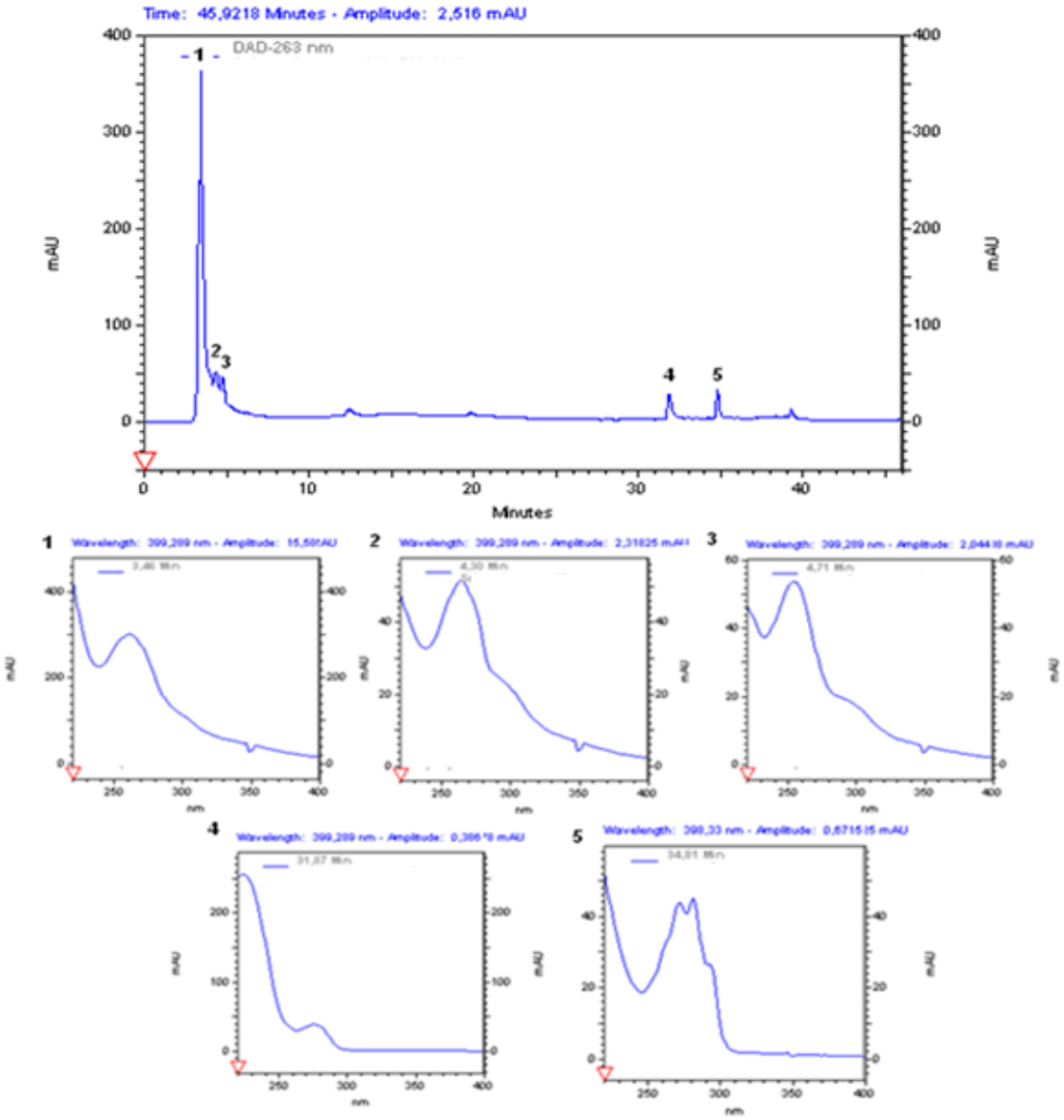
TABELA 24 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,67	261
2	4,37	265
3	5,17	255
4	33,01	278
5	36,09	271;281

FONTE: O autor (2017).

A amostra de extrato metanólico bruto da massa micelial crescida em meio Extrato de Malte a 24 °C também apresentou 5 picos principais (FIGURA 19 e Tabela 25) com tempos de retenção de 3,42, 4,32, 4,71, 31,86 e 34,81 minutos, de acordo com o padrão de absorção no UV pode-se relacionar essas substâncias àquelas presentes no extrato metanólico bruto do fungo em meio BD com pequena variação no tempo de retenção. A concentração das substâncias 1 e 5 é maior quando o fungo é cultivado em meio líquido extrato de malte, enquanto a substância 2 apresenta maior concentração no extrato obtido pelo cultivo do fungo em meio BD, a 24 °C. As substâncias 3 e 4 apresentaram praticamente a mesma concentração nos 2 extratos.

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 24 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 25 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 24 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,42	261
2	4,32	265
3	4,71	255
4	31,86	220; 278
5	34,81	271; 281

FONTE: O autor (2017).

Os resultados obtidos para a prospecção química dos extratos dos caldos fermentados de *Bjerkandera adusta* obtidos na curva de crescimento em função do meio de cultivo empregado estão descritos na TABELA 26.

TABELA 26 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DOS CALDOS FERMENTADOS DE *Bjerkandera adusta* E DOS CONTROLES OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

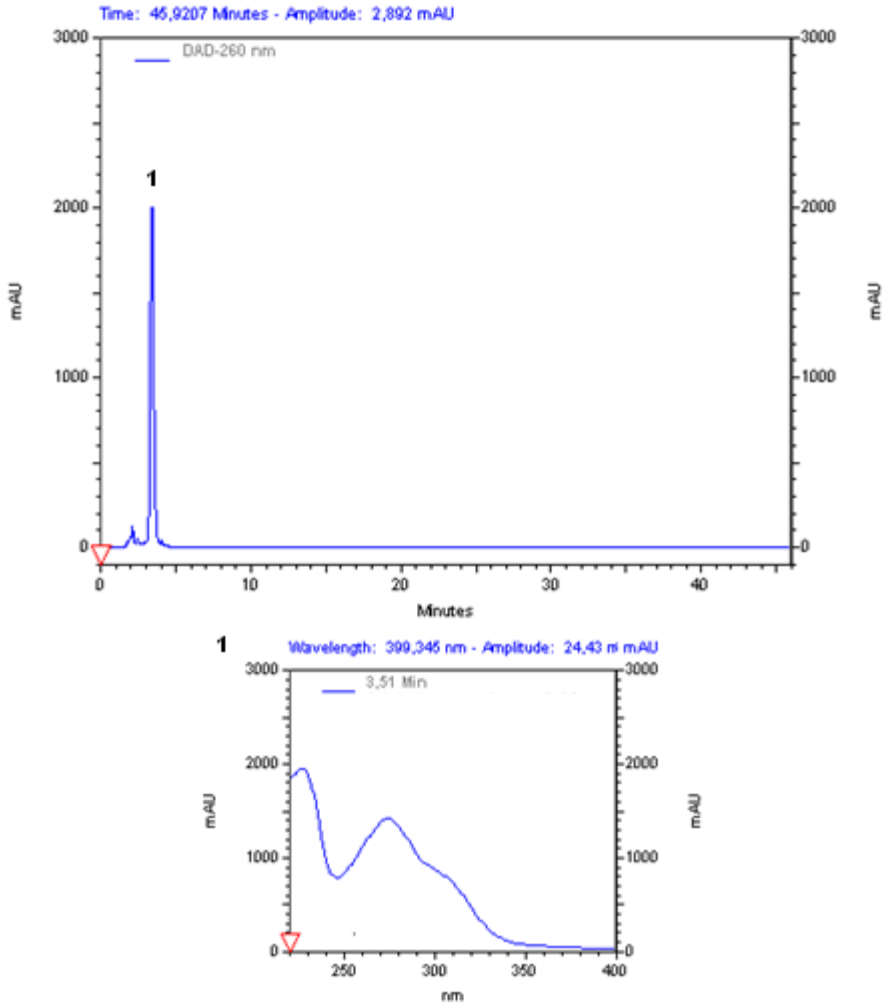
Amostra	**Esteroides/ Triterpenos**	**Flavonoides**	**Taninos**	**Alcaloides**
Extrato Acetato Etila – Meio BD	Presença de banda azul clara em Rf 0,06; banda violácea em Rf 0,16, 0,30, 0,50, 0,66, 0,72	Presença de banda amarela em Rf 0,16 e 0,90 e azul com Rf 0,60	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila – Meio Extrato de Malte	Positivo	Presença de banda amarela com Rf de 0,90	Negativo	Negativo
Controle BD	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,8	Negativo	Negativo
Controle Extrato de Malte	Banda azul com Rf de 0,06	Presença de banda amarela com Rf 0,08	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

Ambos os extratos foram positivos para flavonoides e esteroides/triterpenos e negativos para taninos e alcaloides, porém o extrato do meio BD apresentou outras bandas na análise de flavonoides que não foram observadas no extrato do meio malte. As bandas obtidas para os controles não coincidiram com aquelas obtidas para os extratos das amostras.

Com relação a análise por CLAE desses extratos, pode-se observar a partir dos cromatogramas (FIGURAS 20 e 21, TABELAS 27 e 28), que os extratos apresentam substâncias químicas diferentes pois os tempos de retenção das substâncias encontradas varia de um para o outro. É possível observar no cromatograma do extrato do meio malte a presença de um pico com tempo de retenção próximo a 10 minutos com perfil de absorção no UV característico de flavonoide.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C



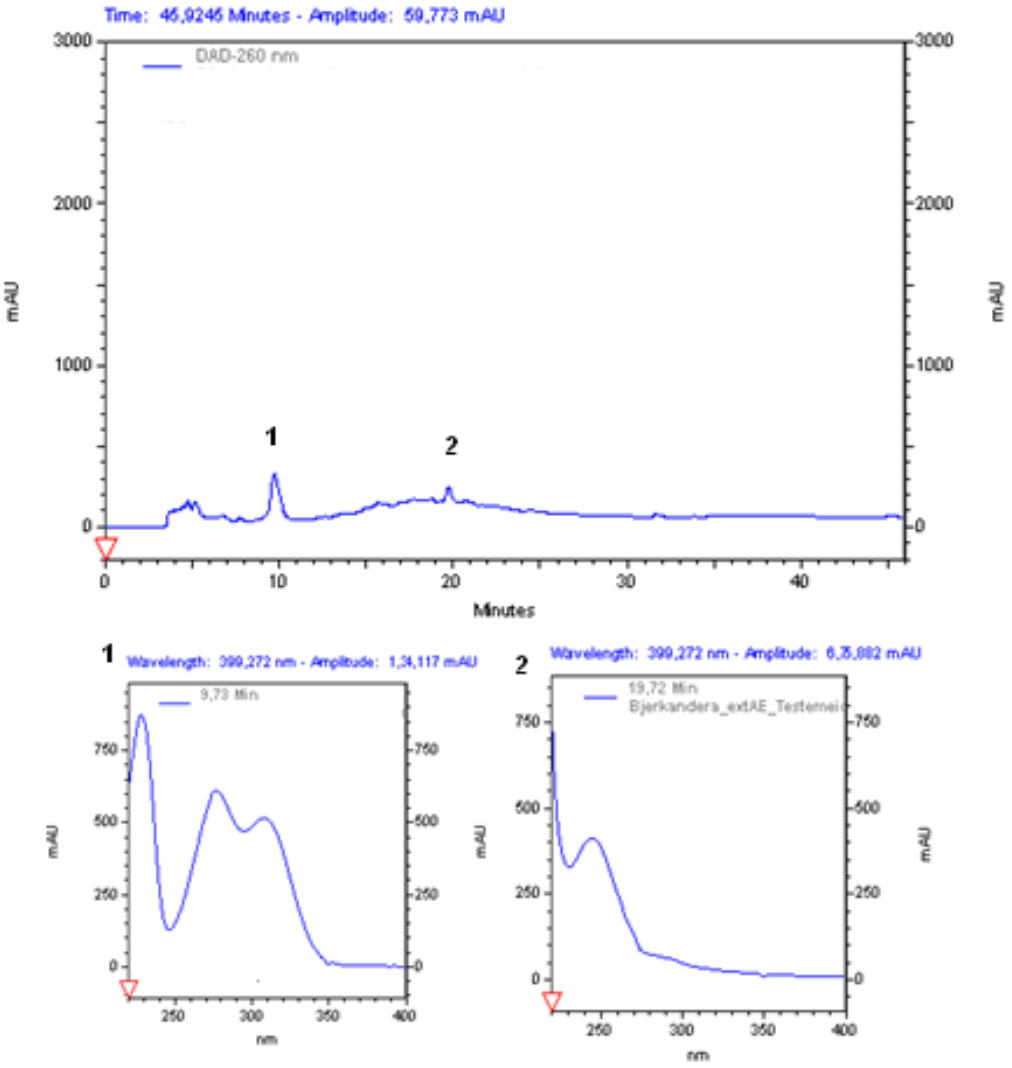
FONTE: O autor (2017).

TABELA 27 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,51	226; 276; 307

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO EXTRATO DE MALTE DO FUNGO *Bjerkandera adusta*, 24 °C



FONTE: O autor (2017).

TABELA 28 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO EXTRATO DE MALTE DE *Bjerkandera adusta*, 24 °C

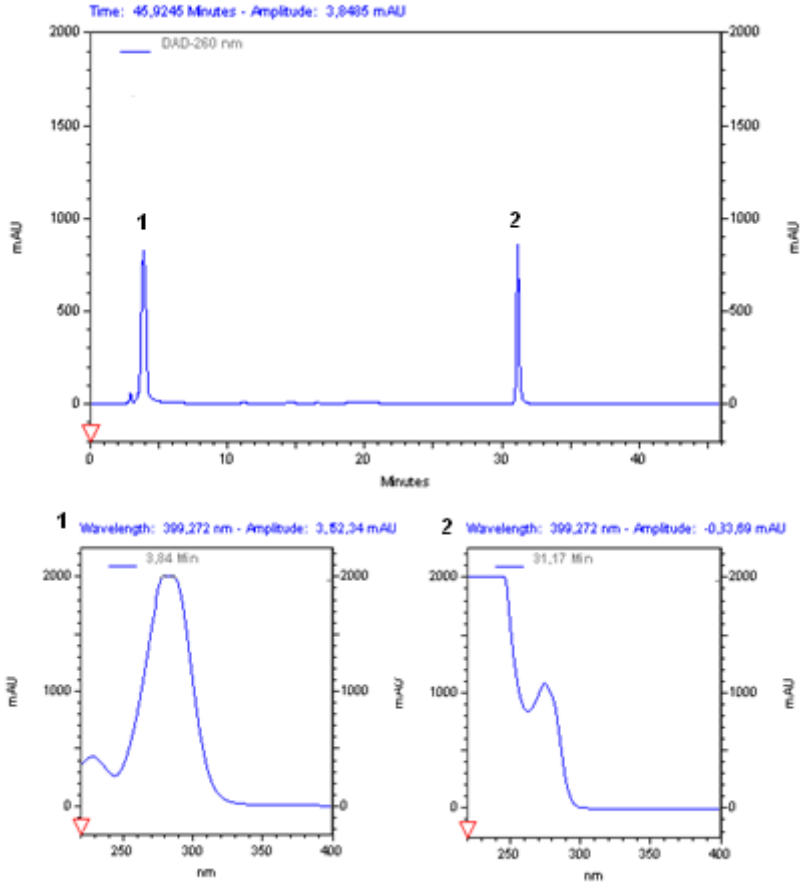
Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	9,72	228; 277; 308
2	19,72	220; 245

FONTE: O autor (2017).

Além disso, pode-se afirmar que as substâncias extraídas nas amostras não são provenientes da composição do meio de cultivo para nenhum dos casos ao comparar os cromatogramas das amostras com os dos controles (FIGURAS 22 e

23, TABELAS 29 e 30), nenhum dos picos obtidos nos controles coincide com os obtidos na corrida das amostras.

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®)



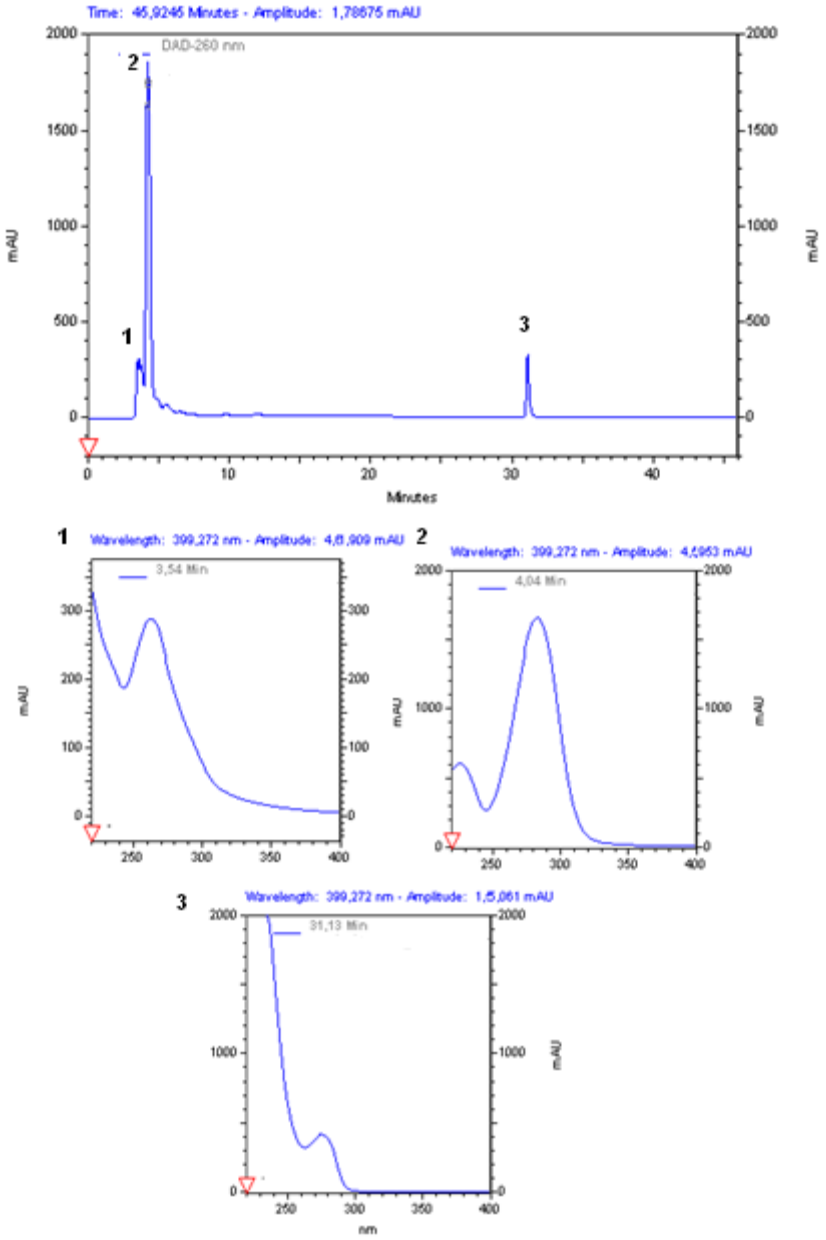
FONTE: O autor (2017).

TABELA 29 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®)

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,84	283
2	31,17	220; 276

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (EXTRATO DE MALTE HIMEDIA®)



FONTE: O autor (2017).

TABELA 30 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (EXTRATO DE MALTE HIMEDIA®)

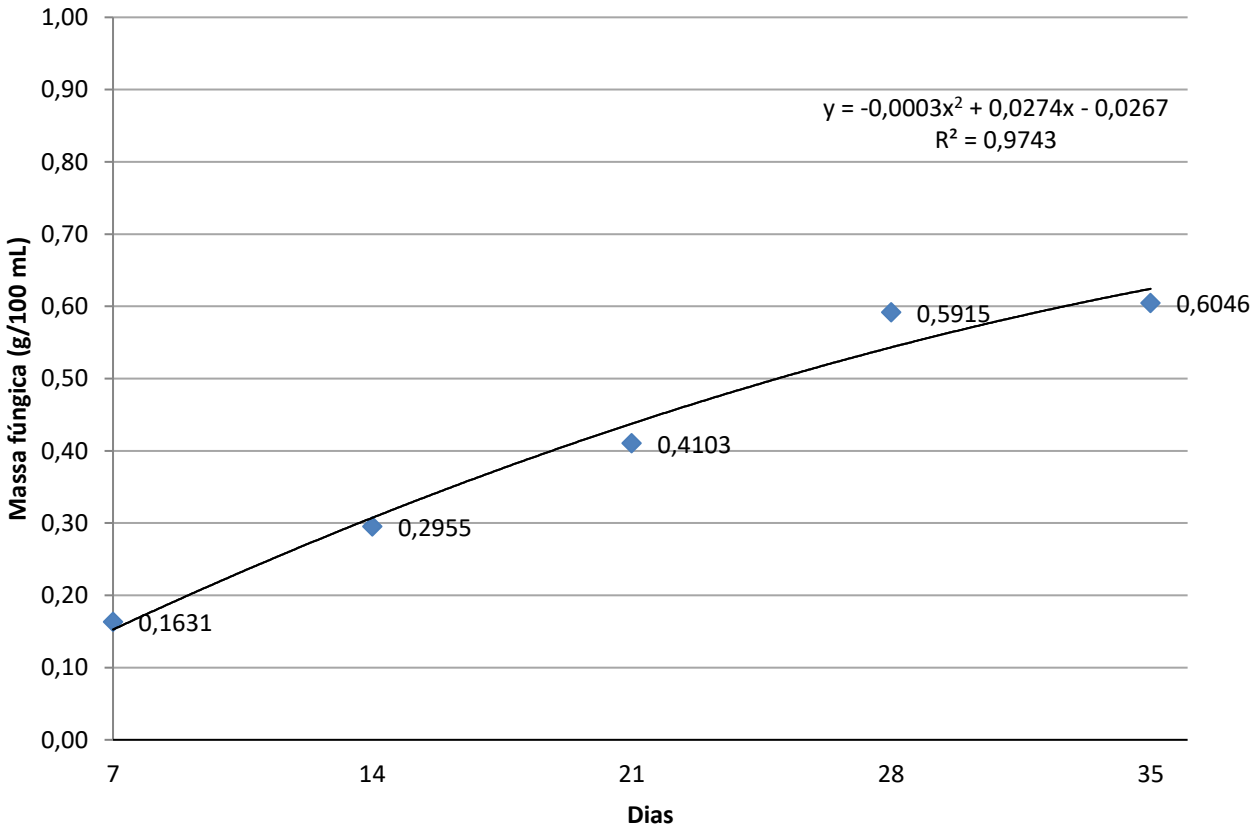
Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,54	263
2	4,19	226; 280
3	31,13	220; 277

FONTE: O autor (2017).

4.3. CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

De acordo com o GRÁFICO 8, nota-se um aumento na quantidade de massa fúngica para o fungo *Bjerkandera adusta* com o decorrer dos dias, com maior produção micelial após 28 e 35 dias de crescimento, sendo esses estatisticamente semelhantes (conforme TABELA 31).

GRÁFICO 8 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS)



FONTE: O autor (2017).

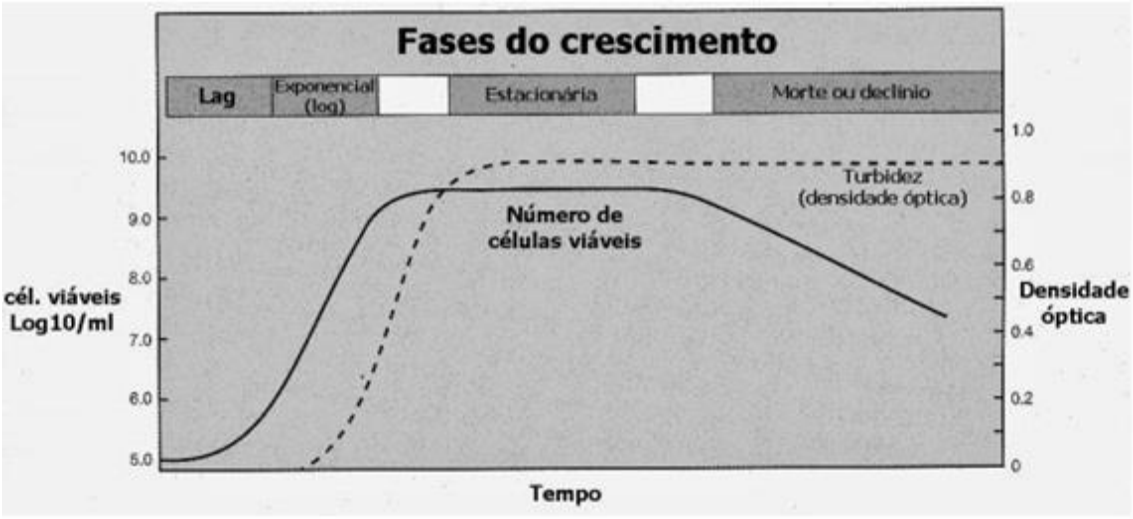
TABELA 31 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C

Tempo	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*			
7 dias	0,1631				d
14 dias	0,2955			c	
21 dias	0,4103		b		
28 dias	0,5915	a			
35 dias	0,6046	a			

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

O crescimento micelial de um fungo sobre um determinado período de tempo pode ser representado por uma curva sigmoidal típica (FIGURA 24).

FIGURA 24 – CURVA TÍPICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO



FONTE: LIMA (2016).

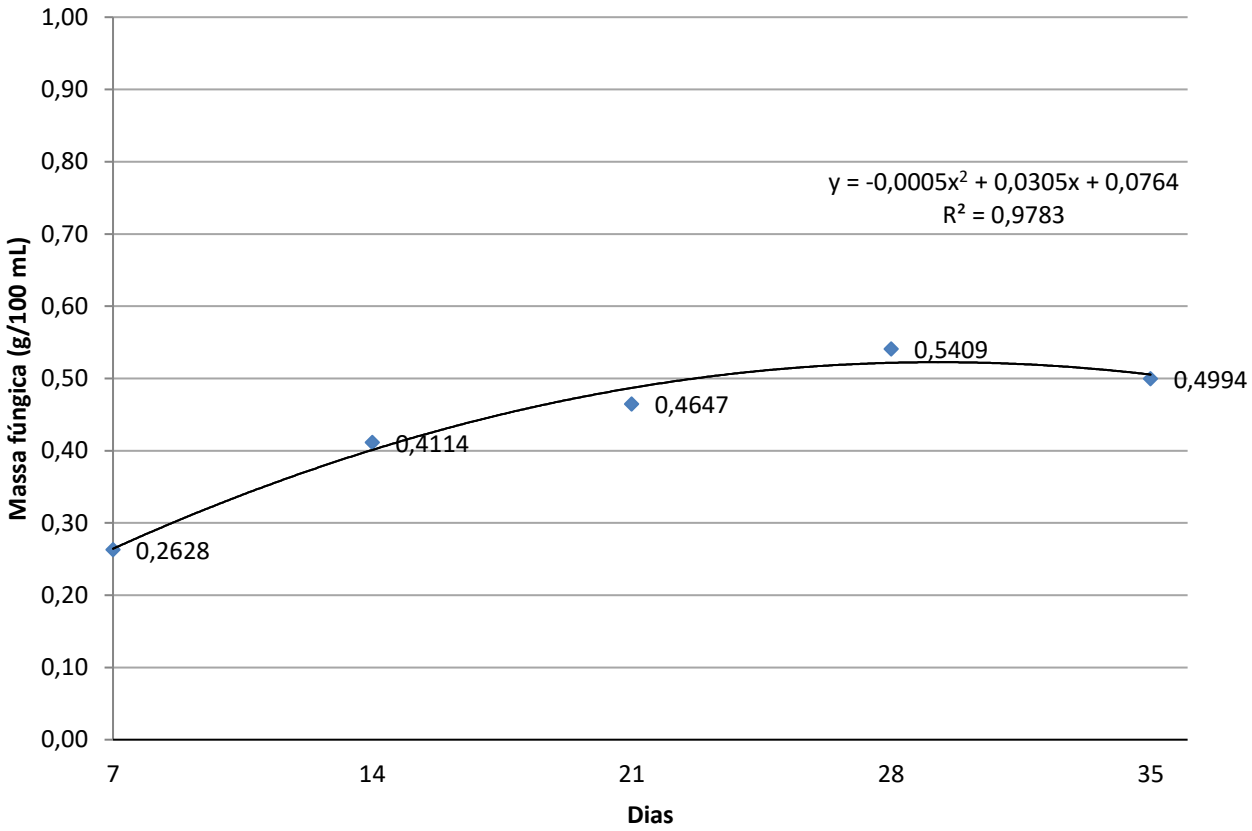
A primeira fase é chamada de fase-lag ou fase de adaptação, nessa fase observa-se ausência ou pouca divisão celular, com intensa atividade metabólica, como síntese de enzimas e de DNA. Essa fase pode durar algumas horas ou até dias. Sua duração está diretamente relacionada com as características do fungo e a quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo. A segunda fase, conhecida como log ou exponencial, é caracterizada pelo aumento logarítmico no número de células, é o período de maior atividade metabólica com níveis máximos de crescimento. Esta fase é extremamente afetada pelos níveis de carbono e de nitrogênio presentes no meio. Posteriormente, os organismos entram na chamada fase estacionária, fase de curta duração em que o número de células que se divide é igual ao número de células que morrem. Nessa fase ocorre escassez de

nutrientes, com acúmulo de substâncias tóxicas, além da produção de diversos metabólitos secundários. A última fase, conhecida como fase de declínio ou morte, ocorre autólise, o número de células mortas é maior que o de células vivas (MONTINI; PASSO; EIRA, 2006).

Com relação ao crescimento do fungo *Bjerkandera adusta* em função do tempo de incubação, provavemente até o 28° dia o fungo encontra-se na fase log de crescimento, após esse período seu crescimento entra na fase estacionária.

Os resultados da curva de crescimento do fungo *Suillus* sp. em função do tempo de incubação são apresentados no GRÁFICO 9, a análise estatística dos mesmos é encontrada na TABELA 32.

GRÁFICO 9 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 20 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS)



FONTE: O autor (2017).

TABELA 32 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Suillus* sp. EM MEIO EXTRATO DE MALTE A 20 °C

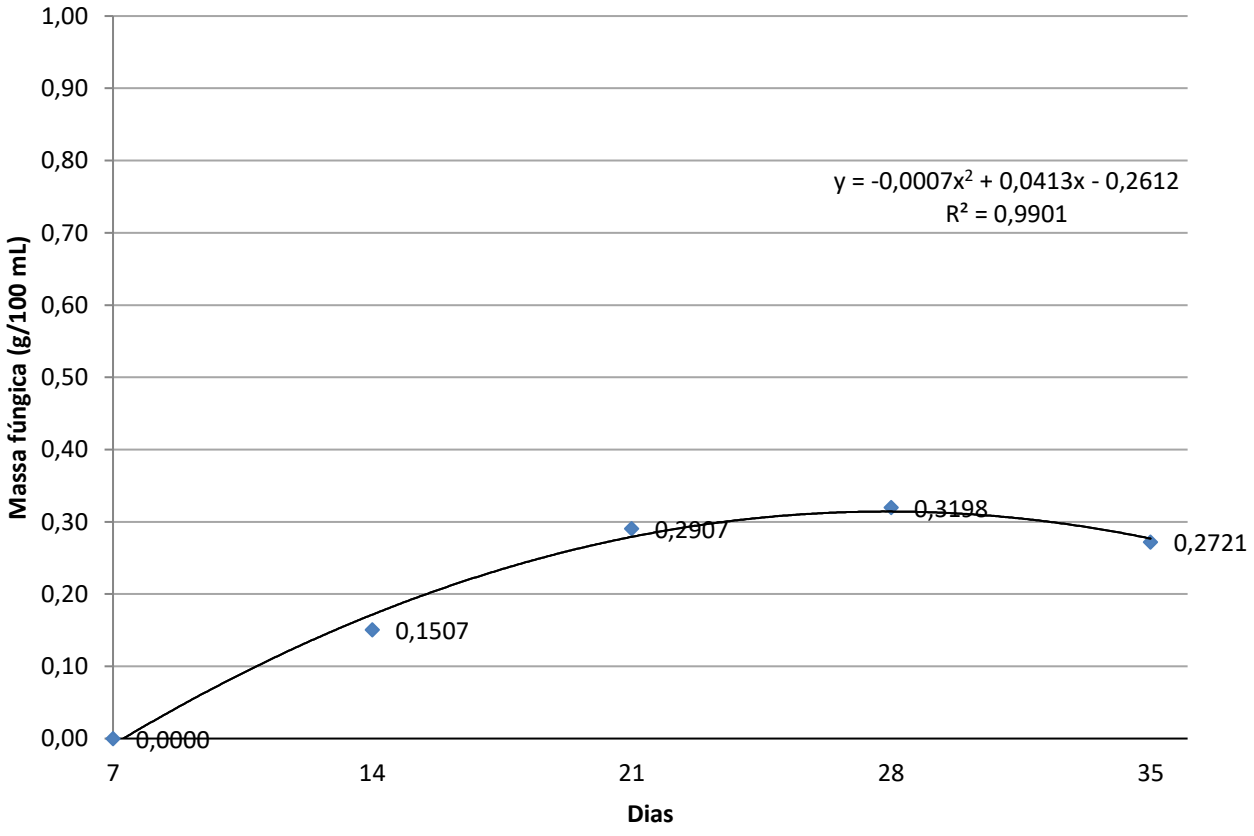
Tempo	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*			
7 dias	0,2628	d			
14 dias	0,4114			c	
21 dias	0,4647		b	c	
28 dias	0,5409	a			
35 dias	0,4994	a	b		

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

Pode-se observar que ocorre um aumento na quantidade de massa micelial de *Suillus* sp. ao longo dos 28 primeiros dias, quando observa-se seu crescimento máximo, após esse período o fungo entra na fase de declínio.

Os resultados da variação de crescimento em função do tempo de incubação para o fungo *Rhizoctonia* sp. encontra-se no GRÁFICO 10. A análise estatística desses resultados etá presente na TABELA 33.

GRÁFICO 10 – CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD A 16 °C EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS)



FONTE: O autor (2017).

TABELA 33 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DO FUNGO *Rhizoctonia* sp. EM MEIO BD A 16 °C

Tempo	Massa fúngica (g/100 mL)	Classificação do Teste de Duncan*		
7 dias	0,0000			c
14 dias	0,1507		b	
21 dias	0,2907	a		
28 dias	0,3198	a		
35 dias	0,2721	a		

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

Conforme observado no GRÁFICO 10, nota-se a ausência de produção de massa fúngica de *Rhizoctonia* sp. nos primeiros 7 dias de incubação, nas condições testadas. Posteriormente observa-se o crescimento micelial com máxima produção entre o 21° e o 35° dia (estatisticamente semelhantes).

4.3.1. Análises de CCD e CLAE dos extratos de *Bjerkandera adusta* obtidos a partir de incubação em diferentes tempos de incubação

Os resultados das CCDs dos extratos feitos a partir da massa micelial de *Bjerkandera adusta* obtidos da curva de crescimento em função do tempo são apresentados na TABELA 34. Pode-se observar que todos os extratos apresentaram positividade para flavonoides e esteroides/tripernos e foram negativos para taninos e alcaloides. Além disso houve variação na composição do extrato de acordo com a condição testada, pois algumas bandas só foram observadas em determinados extratos. Nenhuma das bandas observadas para os extratos foi observada na corrida do controle, portanto as substâncias encontradas nos extratos metanólicos do micélio de *Bjerkandera adusta* foram produzidas pelo fungo.

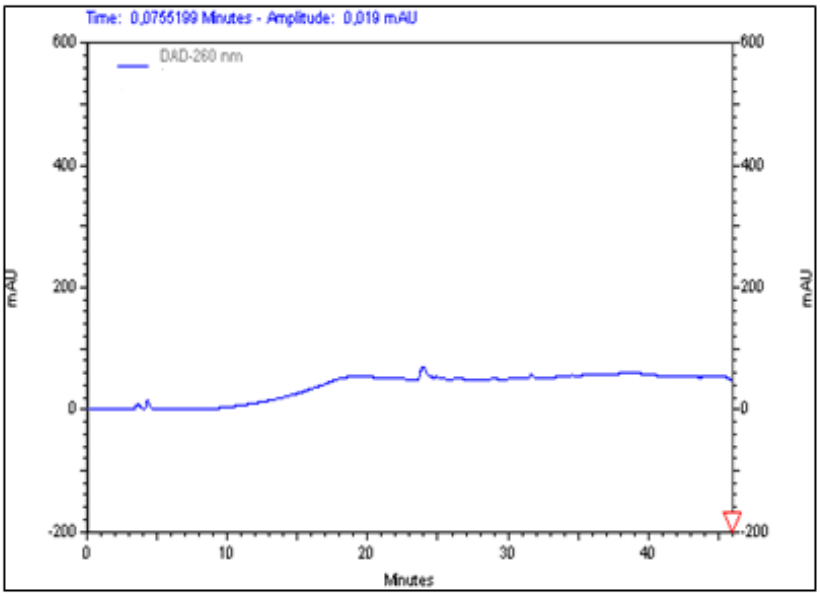
TABELA 34 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Amostra	**Esteroides/ Triterpenos**	**Flavonoides**	**Taninos**	**Alcaloides**
Extrato Metanólico – 7 dias	Presença de banda verde em Rf 0,06 e de bandas azuis em Rf 0,28; 0,70	Presença de banda azul fluorescente em Rf 0,12; banda azul fluorescente em Rf 0,60	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico – 14 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06, bandas violáceas em Rf 0,16; 0,30; 0,50; 0,66 e 0,72	Presença de banda amarela fluorescente em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44; banda verde fluorescente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico – 21 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06, bandas violáceas em Rf 0,16; 0,30; 0,50; 0,66 e 0,72	Presença de banda amarela fluorescente em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44; banda verde fluorescente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico – 28 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06, bandas violáceas em Rf 0,16; 0,30; 0,50; 0,66 e 0,72	Presença de bandas amarelas em Rf 0,20; 0,60 e 0,80	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico – 35 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06, bandas violáceas em Rf 0,16; 0,30; 0,50; 0,66 e 0,72	Presença de banda amarela fluorescente em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44; banda verde fluorescente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Controle	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,80	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

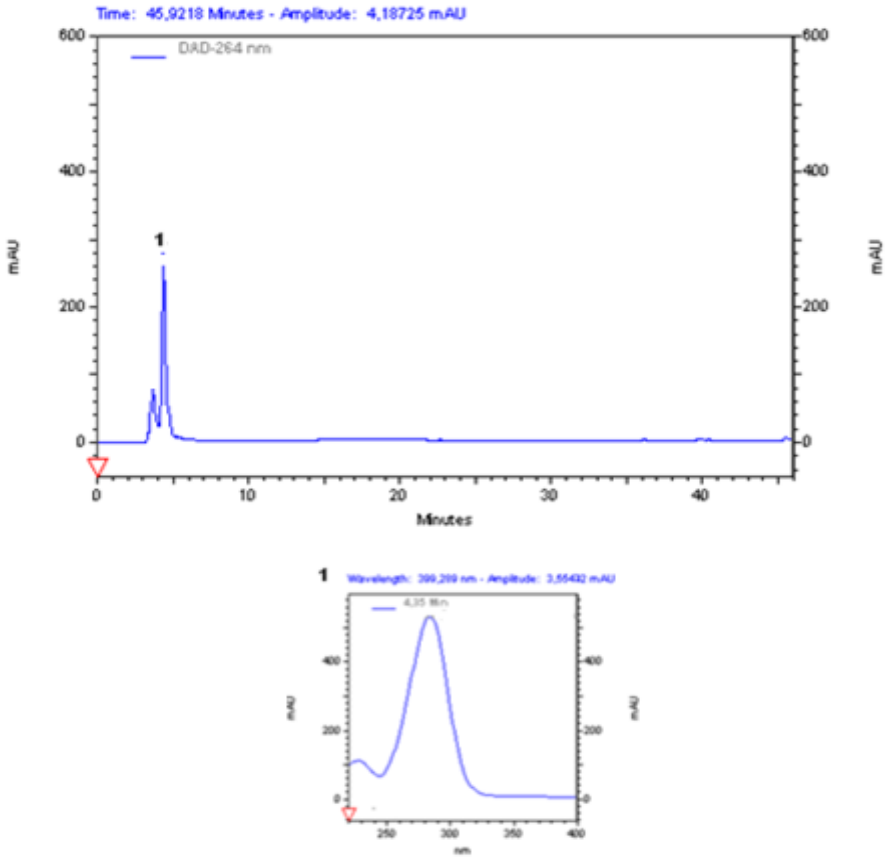
Com relação as ánalises por CLAE, pode-se observar a ausência de picos cromatográficos expressivos no extrato do micélio de *Bjerkandera adusta* com 7 dias de crescimento (FIGURA 25). Com o decorrer do tempo observa-se o aparecimento de alguns picos, provavelmente devido a produção de metabólitos secundários pelo microrganismo. Após 14 dias de crescimento do fungo (FIGURA 26, TABELA 35), observa-se um pico cromatográfico mais evidente com tempo de retenção um pouco acima de 4 minutos. Esse pico também é observado no extrato de 21 dias (FIGURA 27 e TABELA 36), em concentração um pouco mais elevada, porém essa diminui bastante com o passar dos dias, conforme observado nos cromatogramas do extratos de 28 e de 35 dias (FIGURAS 28 e 29, e TABELAS 37 e 38, respectivamente).

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 7 DIAS DE CRESCIMENTO



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE Bjerkandera adusta EM MEIO BD A 24 °C, 14 DIAS DE CRESCIMENTO



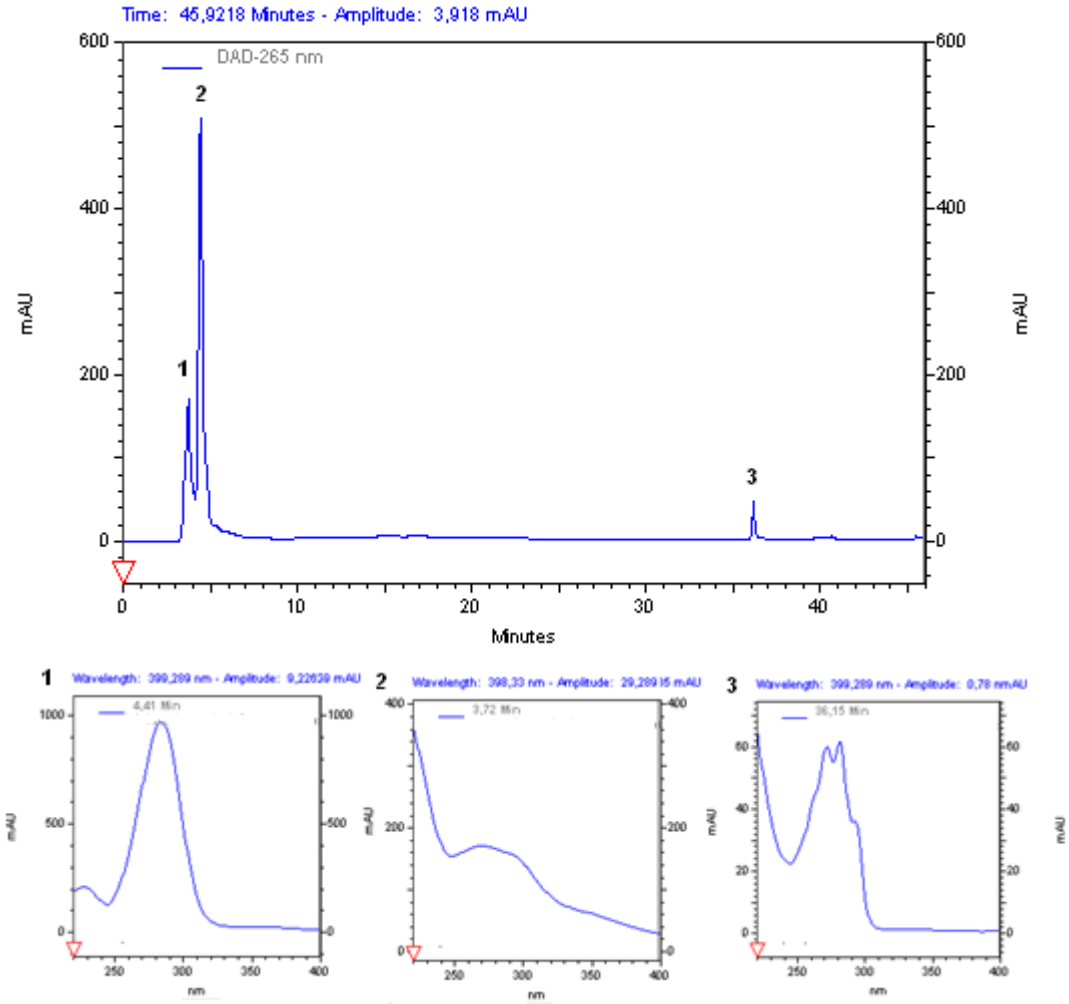
FONTE: O autor (2017).

TABELA 35 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 14 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,35	284

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 21 DIAS DE CRESCIMENTO



FONTE: O autor (2017).

TABELA 36 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 21 DIAS DE CRESCIMENTO

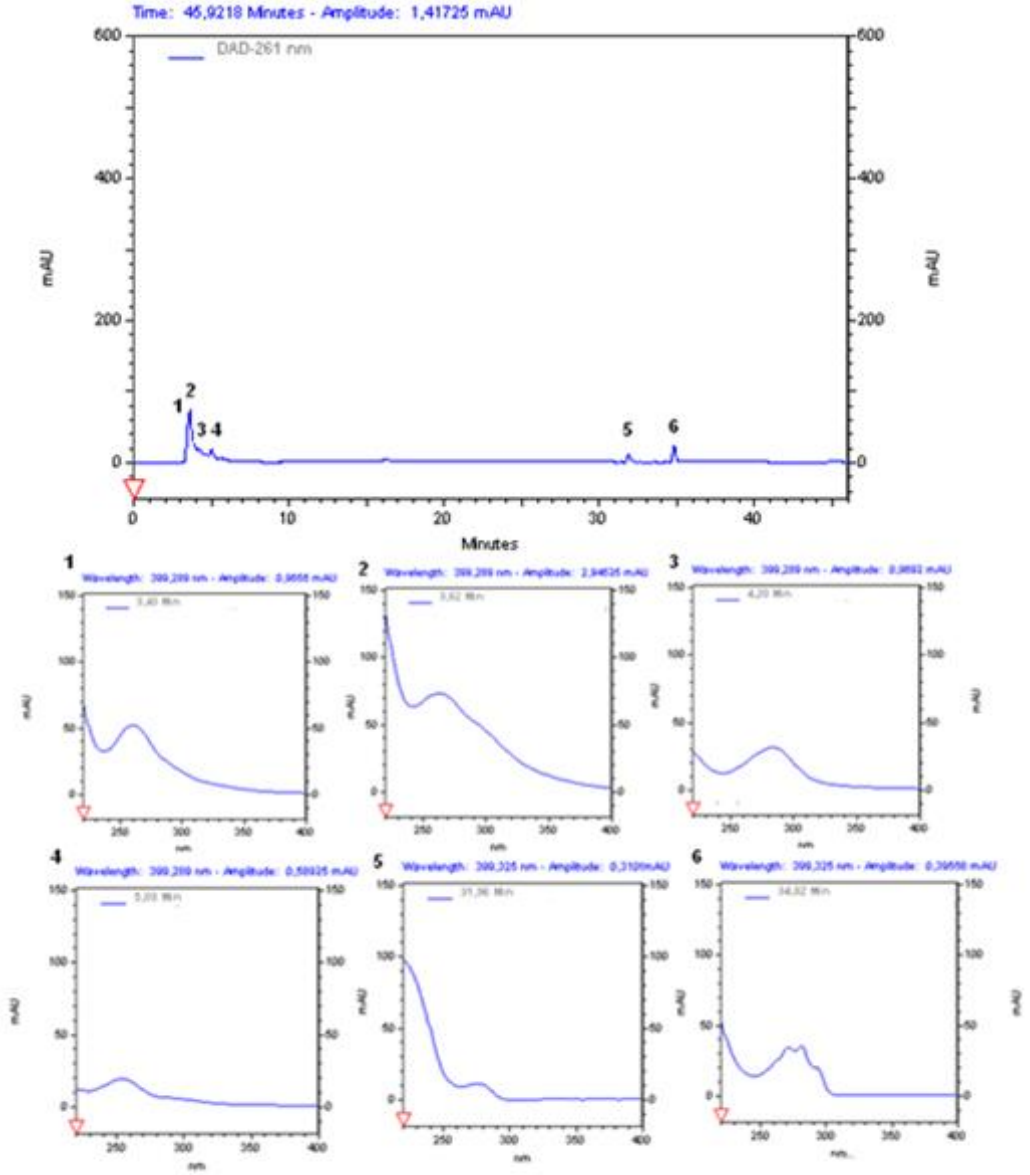
Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,75	281
2	4,40	284
3	36,14	271; 281

FONTE: O autor (2017).

O pico cromatográfico observado no extrato de 21 dias possui perfil de UV e tempo de retenção bastante parecido com o primeiro pico encontrado na corrida do controle (FIGURA 35, TABELA 45), assim possivelmente trata-se de uma substância extraída do meio de cultivo BD e não de uma substância metabolizada pelo fungo.

É possível observar o aparecimento de outras substâncias nos extratos de 28 e 35 dias de crescimento que não foram observadas nos cromatogramas dos outros extratos, porém em concentrações bem baixas.

FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 28 DIAS DE CRESCIMENTO



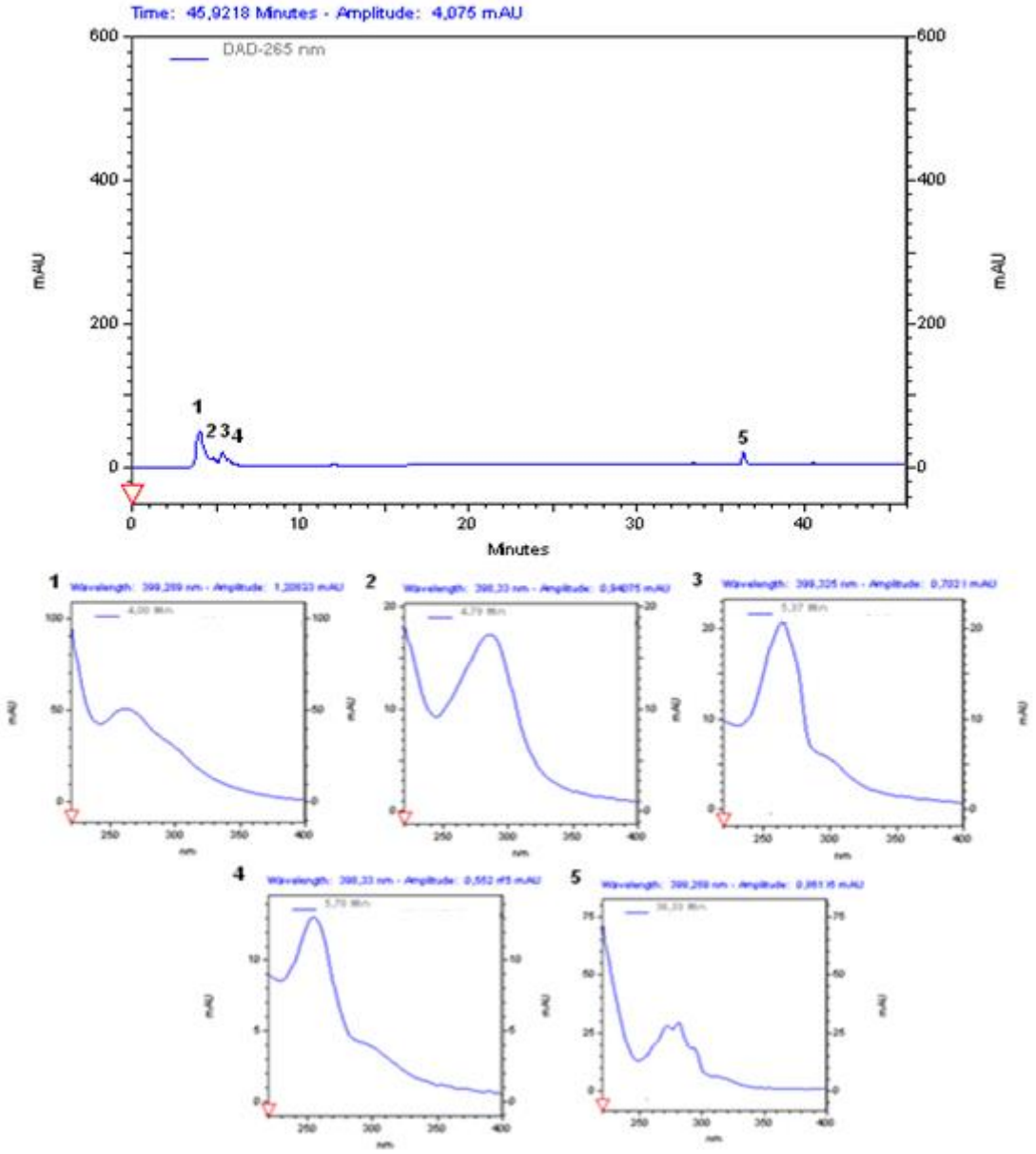
FONTE: O autor (2017).

TABELA 37 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 28 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,43	261
2	3,62	262
3	4,24	285
4	4,99	255
5	31,88	277
6	34,82	271;281;293

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 29 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA FÚNGICA DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 35 DIAS DE CRESCIMENTO



FONTE: O autor (2017).

TABELA 38 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DA MASSA MICELIAL DE *Bjerkandera adusta* EM MEIO BD A 24 °C, 35 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,98	262
2	4,79	287
3	5,34	265
4	5,74	255
5	36,32	271;282;294

FONTE: O autor (2017).

Da mesma forma que os extratos feitos a partir da massa micelial de *Bjerkandera adusta* em diferentes tempos de crescimento, os extratos do caldo fermentado foram positivos para esteroides/triterpenos e flavonoides e negativos para taninos e alcaloides (resultados expressos na TABELA 39). Sendo que esses apresentaram valores de Rf diferentes dos obtidos para o controle, logo, as substâncias encontradas nos extratos são provenientes do metabolismo do fungo.

TABELA 39 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO

Amostra	**Esteroides/ Triterpenos**	**Flavonoides**	**Taninos**	**Alcaloides**
Extrato Acetato Etila – 7 dias	Presença de banda verde em Rf 0,06 e de bandas azuis em Rf 0,28; 0,70	Presença de bandas azuis em Rf 0,12 e 0,60	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila – 14 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06; bandas violáceas em Rf 0,16, 0,30, 0,50, 0,66, 0,72	Presença de banda amarela em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44 e verde fluorecente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila – 21 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06; banda violácea em Rf 0,16, 0,30, 0,50, 0,66, 0,72	Presença de banda amarela em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44 e verde fluorecente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila – 28 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06; banda violácea em Rf 0,16, 0,30, 0,50, 0,66, 0,72	Presença de bandas amarelas em Rf 0,20; 0,60 e 0,80	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila – 35 dias	Presença de banda azul clara em Rf 0,06; banda violácea em Rf 0,16, 0,30, 0,50, 0,66, 0,72	Presença de banda amarela em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44 e verde fluorecente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Controle	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda azul com Rf de 0,8	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

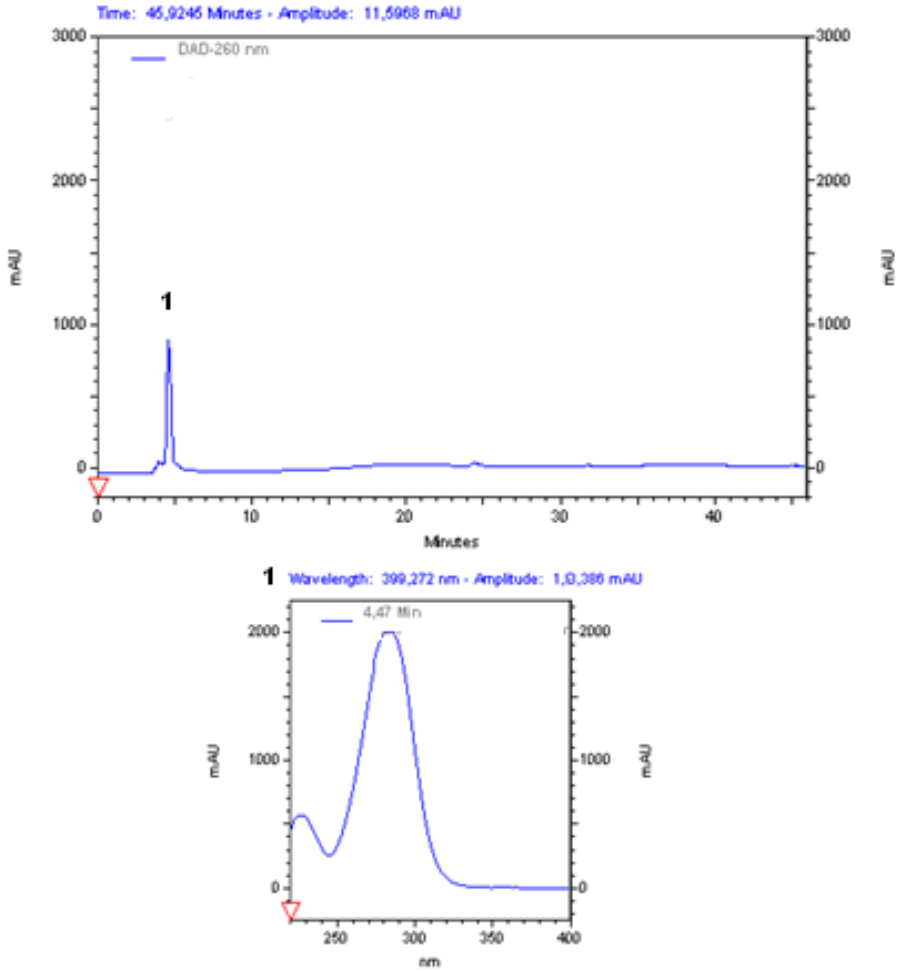
Observando o screening por CLAE feito para os extratos do caldo fermentado do fungo *Bjerkandera adusta* obtidos sob diferentes tempos de crescimento, nota-se que algumas substâncias encontradas no caldo fermentado são diferentes daquelas encontradas na massa micelial sob as mesmas condições testadas, ou possuem concentrações diferentes. No caso do extrato do caldo fermentado de 7 dias (FIGURA 30 e TABELA 40), nota-se a presença de um pico cromatográfico com tempo de retenção de 4,50 minutos que não é observado no extrato do micélio de 7 dias. Esse mesmo pico aparece nos cromatogramas dos extratos do meio de cultura de 14 dias (FIGURA 31 e Tabela 41), 21 dias (FIGURA 32, TABELA 42) e 28 dias (FIGURA 33, TABELA 43), porém em concentrações menores.

A substância com tempo de retenção ao redor de 4 minutos, encontrada nos extratos da massa micelial de 14 dias, 21 dias, 28 dias e 35 dias (FIGURA 34, TABELA 44), também é vista no extratos do caldo de 14, 21 e 28 dias, nos 2 primeiros casos em concentrações bastante parecidas (entre 300 e 500 mAU) com as do extrato do micélio, no caso do extrato de 28 dias do caldo observa-se que essa substância encontra-se em concentração maior nesse do que no extrato da massa micelial, não sendo observada no extrato de 35 dias do caldo fermentado.

Nota-se que os cromatogramas de 28 e de 35 dias do micélio apresentam substâncias que não são observadas para os mesmos extratos do caldo fermentado. O extrato do caldo fermentado de 28 dias apresentam em 10,10 minutos um pico cromatográfico que possui características de absorção no UV semelhantes aquelas observadas para os flavonoides, presença de picos de absorção em 230, 277 e 311 nm.

Nenhum dos picos cromatográficos observados para os extratos do caldo fermentado foram observados no extrato do controle (FIGURA 35, TABELA 45), portanto as substâncias extraídas a partir do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* devem ser provenientes do metabolismo desse.

FIGURA 30 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 7 DIAS DE CRESCIMENTO



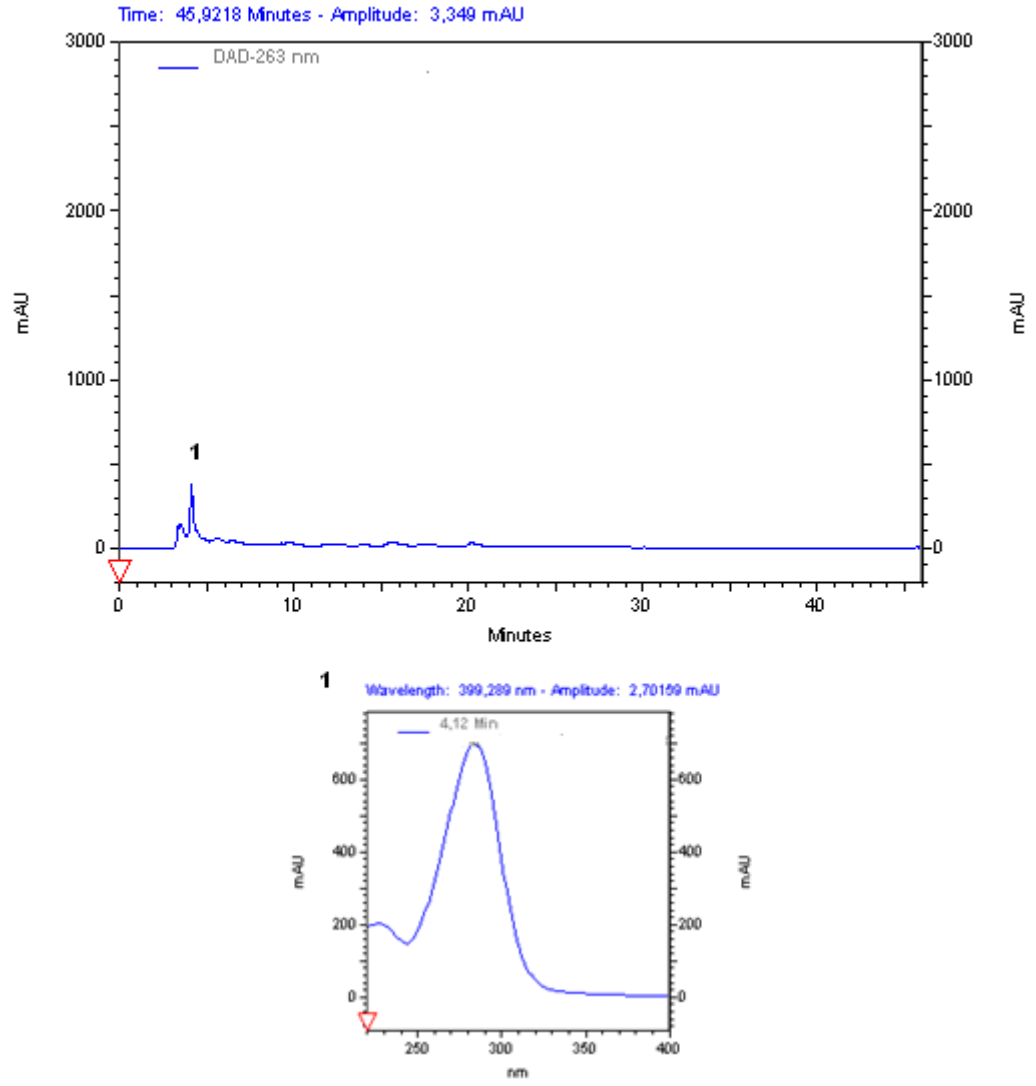
FONTE: O autor (2017).

TABELA 40 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 7 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,50	228; 283

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 31 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 14 DIAS DE CRESCIMENTO



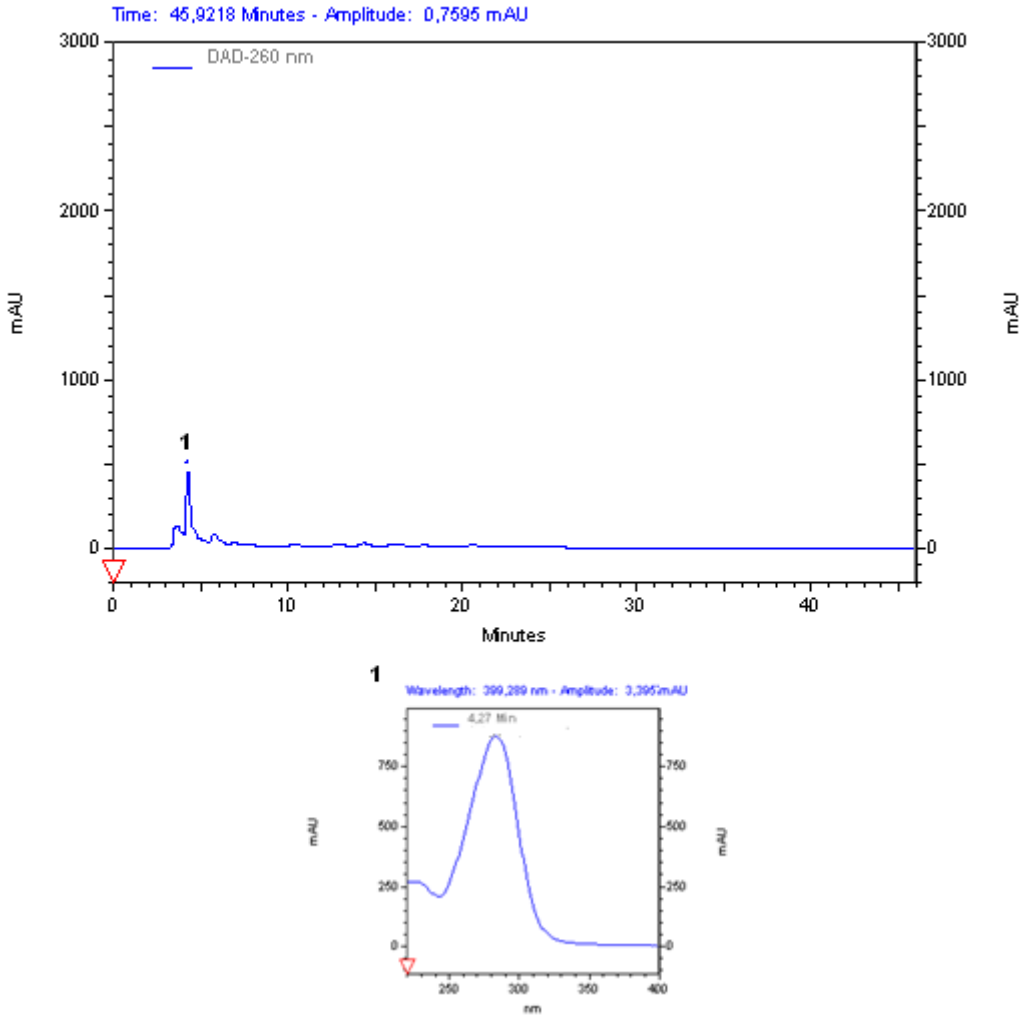
FONTE: O autor (2017).

TABELA 41 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 14 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,12	227; 284

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 21 DIAS DE CRESCIMENTO



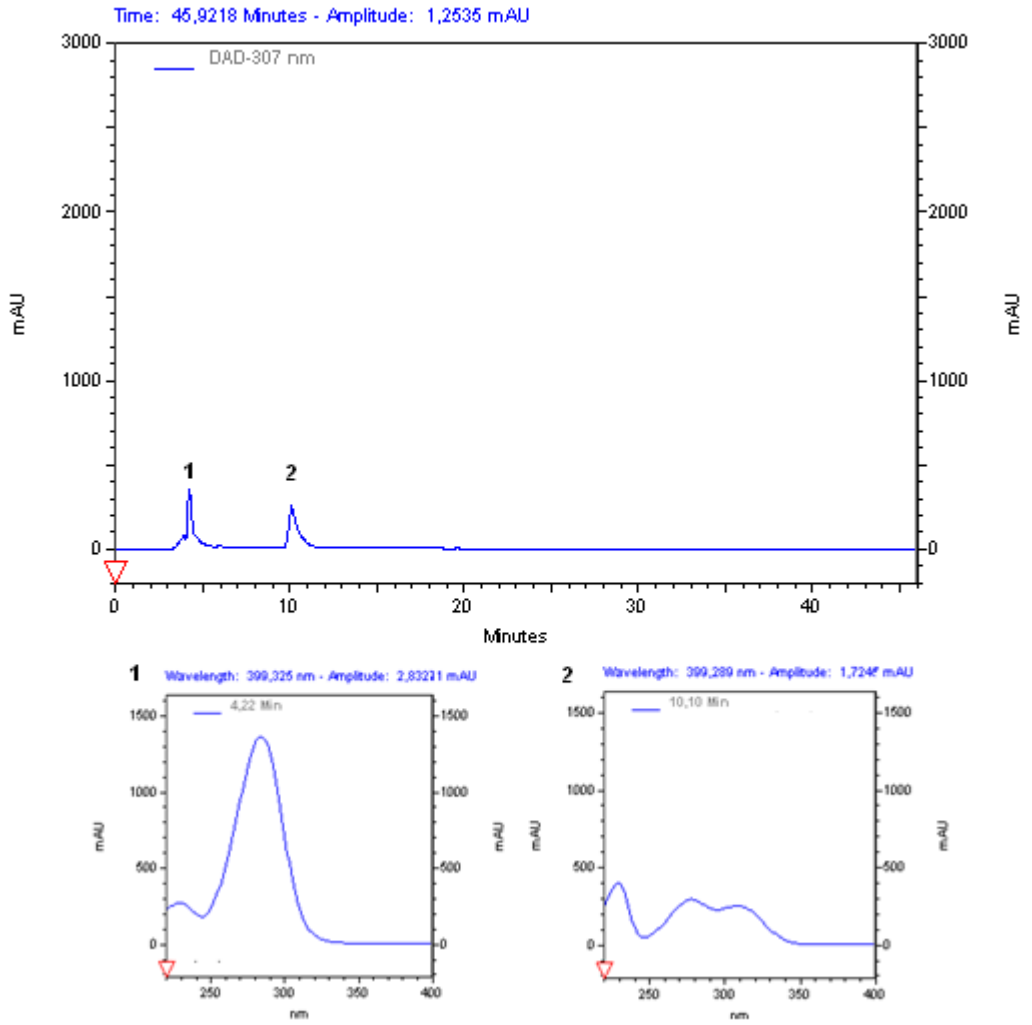
FONTE: O autor (2017).

TABELA 42 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 21 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,27	227; 284

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 28 DIAS DE CRESCIMENTO



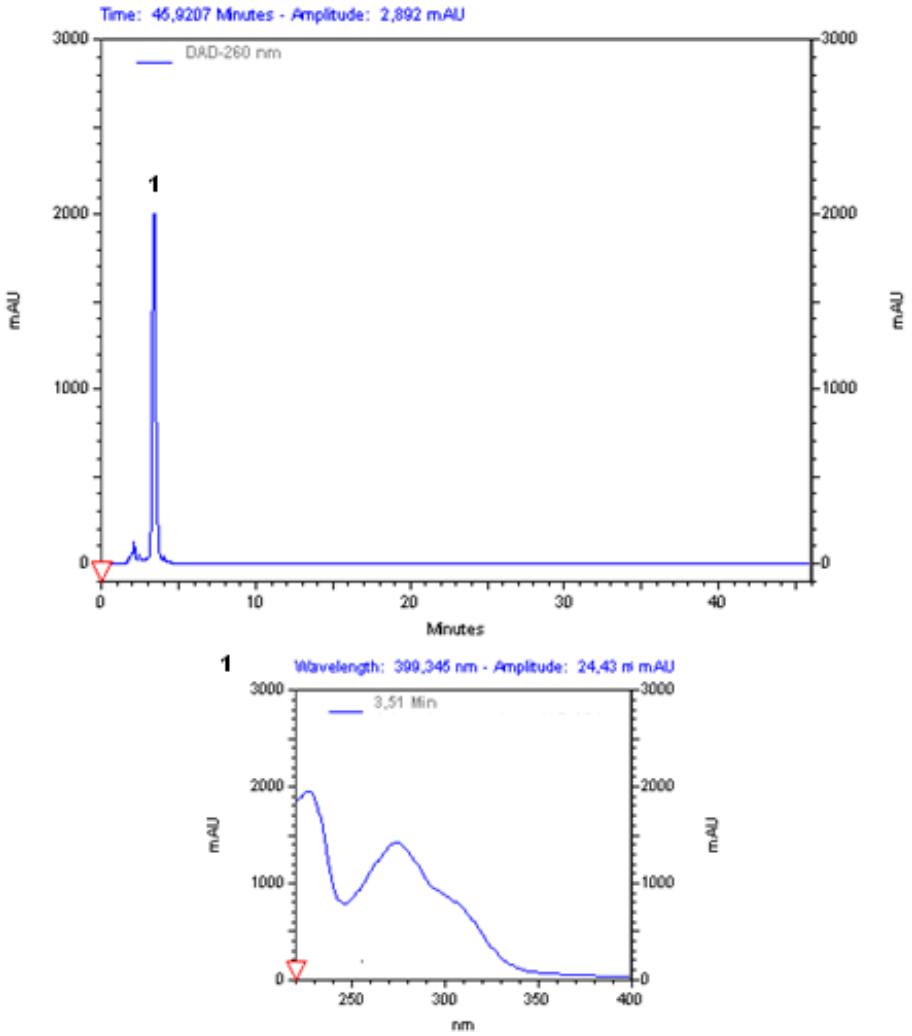
FONTE: O autor (2017).

TABELA 43 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 28 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,22	227; 284
2	10,10	230; 277; 311

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 34 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD (24 °C) DE *Bjerkandera adusta*, 35 DIAS DE CRESCIMENTO



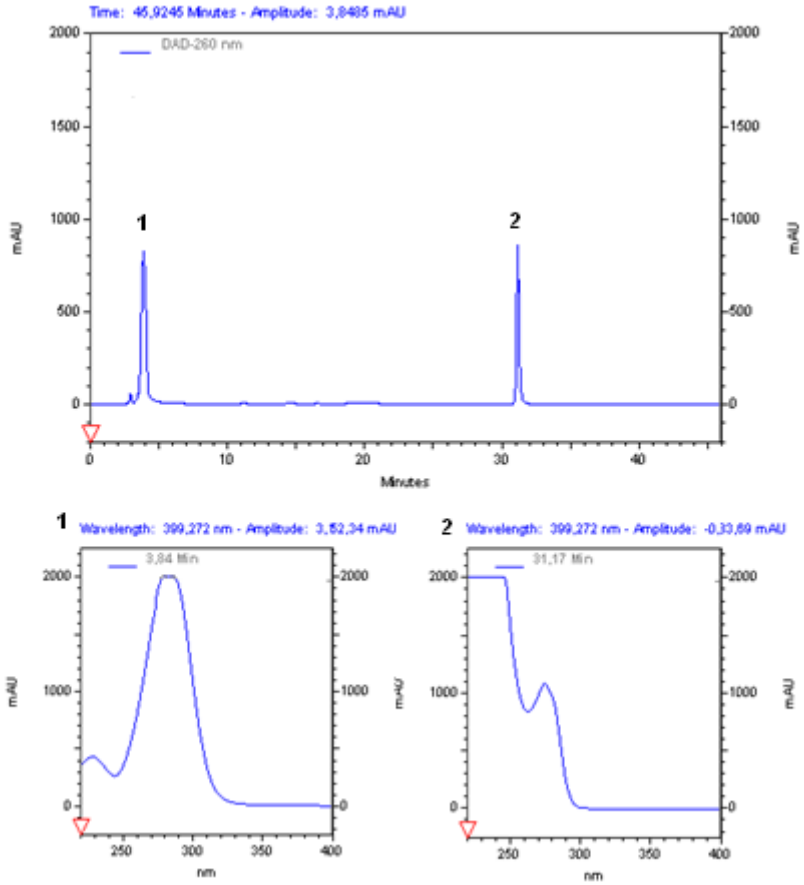
FONTE: O autor (2017).

TABELA 44 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CALDO FERMENTADO BD DE *Bjerkandera adusta* (24 °C), 35 DIAS DE CRESCIMENTO

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,38	226; 276; 307

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®)



FONTE: O autor (2017).

TABELA 45 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NA CORRIDA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO CONTROLE (BD HIMEDIA®)

Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,84	283
2	31,17	220;276

FONTE: O autor (2017).

A tabela 46 apresenta o resumo dos resultados obtidos para os extratos de *Bjerkandera adusta* em função dos parâmetros temperatura, meio de cultivo e tempo de incubação.

TABELA 46 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NAS CORRIDAS DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Amostra	Tempo de retenção (minutos)
Extrato AE da massa micelial meio BD a 12 °C	3,59 e 3,78
Extrato AE da massa micelial meio BD a 16 °C	3,62; 3,78; 5,40; 37,09
Extrato AE da massa micelial meio BD a 20 °C	3,57; 3,73; 4,47; 5,30

(continua)

TABELA 46 – TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORÇÃO DOS PICOS OBTIDOS NAS CORRIDAS DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

(conclusão)

Extrato AE da massa micelial meio BD a 24 °C	3,33; 3,50; 4,15; 4,92; 10,36
Extrato AE da massa micelial meio BD a 28 °C	3,33; 3,50; 4,14; 4,95; 10,40
Extrato AE da massa micelial meio BD a 32 °C	3,52; 25,92; 31,18
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 12 °C	3,70; 4,20; 4,52; 10,54
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 16 °C	3,75; 3,88; 4,61; 6,70; 10,70
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 20 °C	3,69; 4,47; 5,28; 6,54; 10,56
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 24 °C	3,51
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 28 °C	4,69; 10,67
Extrato AE do caldo fermentado meio BD a 32 °C	3,68; 4,48; 5,04; 5,92; 7,94; 8,74; 10,19; 12,83; 14,44; 15,38; 16,15; 20,41
Extrato AE do controle das curvas de temperatura	3,84; 31,17
Extrato MeOH da massa micelial em meio BD (24 °C)	3,67; 4,37; 5,17; 33,01; 36,09
Extrato MeOH da massa micelial em meio malte (24 °C)	3,42; 4,32; 4,71; 31,86; 34,81
Extrato AE do caldo fermentado em meio BD (24 °C)	3,51
Extrato AE do caldo fermentado em meio malte (24 °C)	9,72; 19,72
Extrato AE do controle da curvas do meio – meio BD	3,84; 31,17
Extrato AE do controle da curvas do meio – meio malte	3,54; 4,19; 31,13
Extrato AE da massa micelial meio BD – 7 dias incubação	-----
Extrato MeOH da massa micelial meio BD – 14 dias incubação	4,35
Extrato MeOH da massa micelial meio BD – 21 dias incubação	3,75; 4,40; 36,14
Extrato MeOH da massa micelial meio BD – 28 dias incubação	3,43; 3,62; 4,24; 4,99; 31,88; 34,82
Extrato MeOH da massa micelial meio BD – 35 dias incubação	3,98; 4,79; 5,34; 5,74; 36,32
Extrato AE do caldo fermentado meio BD – 7 dias incubação	4,50
Extrato AE do caldo fermentado meio BD – 14 dias incubação	4,12
Extrato AE do caldo fermentado meio BD – 21 dias incubação	4,27
Extrato AE do caldo fermentado meio BD – 28 dias incubação	4,22; 10,10
Extrato AE do caldo fermentado meio BD – 35 dias incubação	3,38
Extrato AE do controle das curvas de tempo de incubação	3,84; 21,17

FONTE: O autor (2017).

4.4. PRODUÇÃO EM MASSA DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

A partir dos resultados obtidos para as curvas de crescimento em função da temperatura, do meio de cultura e do tempo de incubação, foram adotadas as seguintes condições para realizar a produção em massa do fungo *Bjerkandera adusta*: temperatura de 24°C, caldo batata dextrose (BD) e tempo de incubação de

28 dias, escolhidas por proporcionarem a obtenção de maiores quantidades de micélio. Os extratos obtidos das culturas de produção em massa foram utilizados nas análises físico-químicas, investigação de substâncias por CCD e avaliação das possíveis atividades biológicas. O método de extração utilizando aparelho de Soxhlet foi selecionado para o preparo dos extratos da produção em massa de *Bjerkandera adusta* pois de acordo com outros estudos já realizados (KARABEGOVIĆ et al., 2014; OLIVEIRA, 2016) comparando e eficiência de diferentes métodos de extração no preparo de extratos provenientes de plantas demonstraram que o rendimento final dos extratos foi maior quando empregou-se o método por Soxhlet, independente do solvente utilizado na extração.

Os resultados das CCDs feitas para os extratos da massa micelial de *Bjerkandera adusta* extraídos em Soxhet encontram-se na TABELA 47. Pode-se notar que da mesma forma que já havia sido observado para os demais extratos produzidos, nenhum dos extratos foi positivo para taninos e alcaloides. Os extratos hexano e clorofórmio foram positivos para esteroides/triterpenos e negativos para flavonoides, provavelmente devido a característica de polaridade desses extratos que permite a extração de substâncias mais apolares. Os extratos acetato de etila e metanólico apresentaram-se positivos para flavonoides e negativos para esteroides/triterpenos. Foi possível notar que a extração usando solventes de polaridades crescentes foi eficiente pois conseguiu separar as substâncias presentes na massa micelial de acordo com sua polaridade, as mais apolares estão presentes nos extratos hexano e clorofórmio, enquanto que as mais polares foram extraídas com o acetato de etila e o metanol.

TABELA 47 – RESULTADOS DAS CCDS DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*

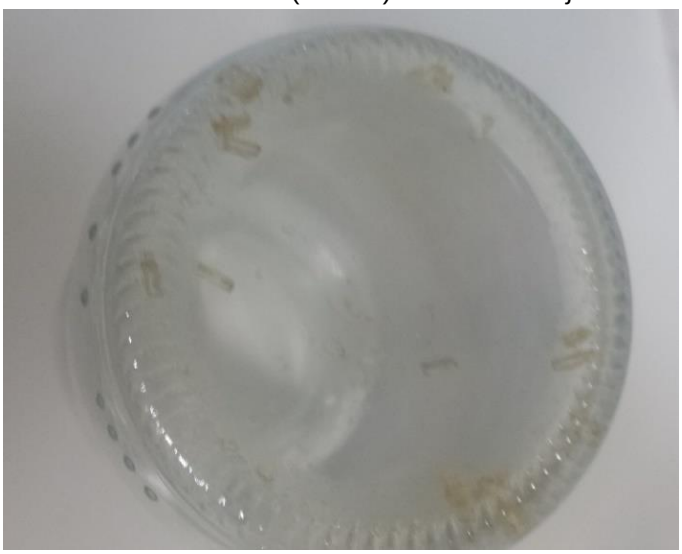
Amostra	Esteroides/ Triterpenos	Flavonoides	Taninos	Alcaloides
Extrato Hexano	Presnça de banda violeta com Rf de 0,2 e de banda azul-violácea com Rf de 0,9	Negativo	Negativo	Negativo
Extrato Clorofórmio	Presença de banda violeta com Rf de 0,14 e de banda azul-violácea com Rf de 0,9	Negativo	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila (Micélio)	Negativo	Presença de banda amarela com Rf de 0,98	Negativo	Negativo
Extrato Metanólico	Negativo	Presença de banda azul com Rf de 0,98	Negativo	Negativo
Extrato Acetato Etila (Caldo Fermentado)	Negativo	Presença de banda amarela em Rf 0,20; banda azul fluorescente em Rf 0,44 e verde fluorecente em Rf 0,96	Negativo	Negativo
Controle	Banda retida no ponto de aplicação	Presença de banda amarela com Rf 0,08	Negativo	Negativo

FONTE: O autor (2017).

4.5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS CRISTAIS SAE12

Os cristais (FIGURA 36) obtidos a partir da amostra de massa micelial de *Bjerkandera adusta* inoculada em meio BD a 12 °C foram analisados por difração de Raios X.

FIGURA 36 – CRISTAIS (SAE12) DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

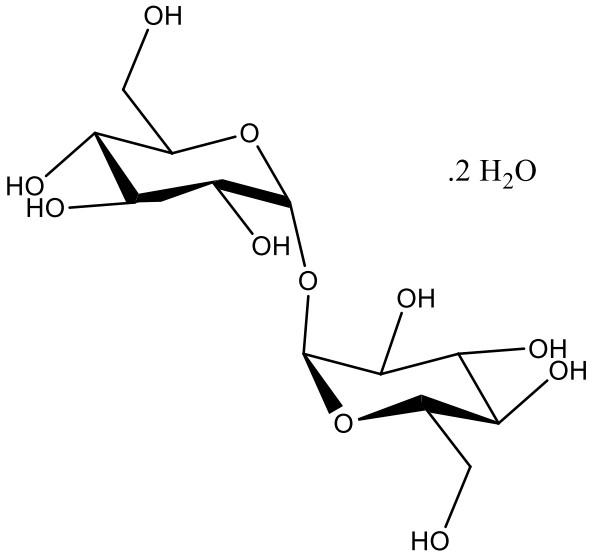


FONTE: O autor (2017).

A amostra consiste de um sistema cristalino Ortorrombico P 2_1 2_1 2_1, com parâmetros de cela de a: 7,60 Å, b: 12,23 Å, c: 17,89 Å, ângulos alfa, beta e gama

de 90,0 graus, de acordo com o banco de dados trata-se de uma substância já conhecida, a α,α-trehalose dihidratada (FIGURA 37).

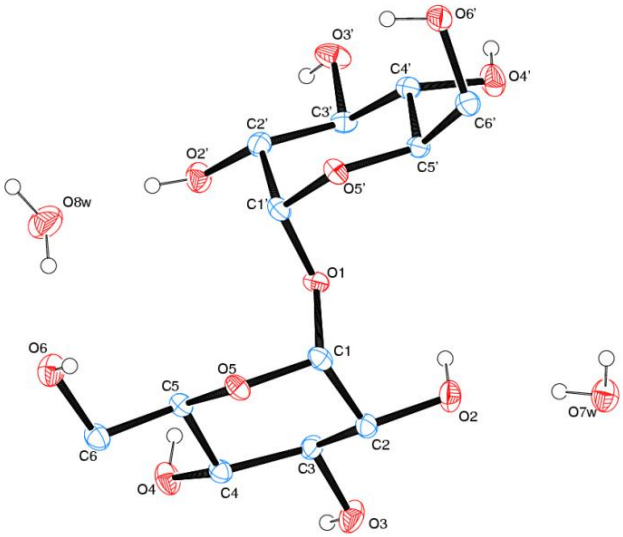
FIGURA 37 – ESTRUTURA DA TREALOSE



FONTE: O autor (2017).

A conformação da molécula é ilustrada na FIGURA 38. Esta possui 2 anéis (anel A e B), formados cada um por 6 átomos que se ligam por meio de uma ligação C—O—C.

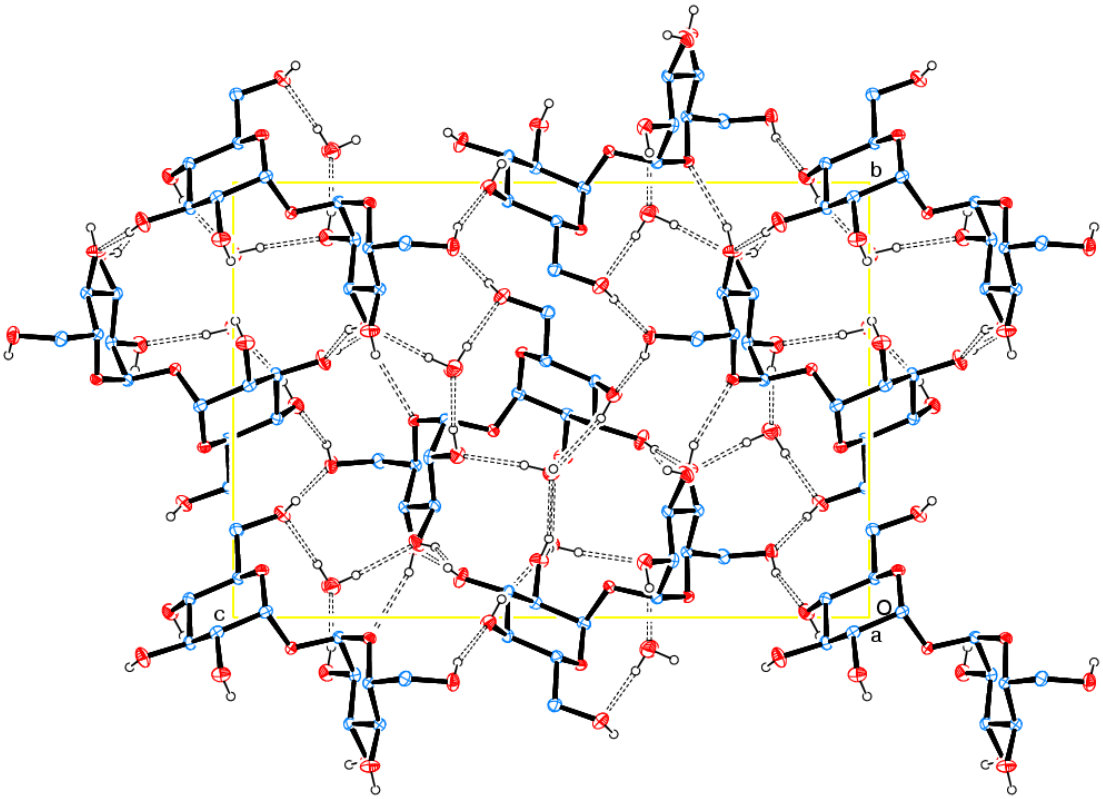
FIGURA 38 – ARRANJO DOS ÁTOMOS DA α,α-TREALOSE DIIDRATADA COM 30% DA PROBABILIDADE DA DENSIDADE DE ELETRÔNICA



FONTE: O autor (2017).

A molécula apresenta diversas ligações de hidrogênio intermoleculares capazes de estabilizar sua estrutura, o arranjo dos átomos envolvendo ligações de hidrogênio das moléculas de α,α-trealose e água está ilustrado na FIGURA 39, a geometria das ligações de hidrogênio está descrita na TABELA 48.

FIGURA 39 – REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO LIGANDO AS MOLÉCULAS DE α,α-TREALOSE E ÁGUA AO LONGO DO EIXO A. AS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIOS ESTÃO REPRESENTADAS POR LINHAS TRACEJADAS



FONTE: O autor (2017).

A trealose (fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ e peso molecular de 342,31, quando na forma anidra) é um açúcar não-redutor, mais especificamente um dissacarídeo (2 moléculas de glicose unidas), bastante estável, resistente a hidrólise, comumente encontrado na forma dihidratada. A descoberta desse dissacarídeo foi relatada pela primeira vez no ano de 1832, por Wiggers em soluções do fungo do gênero *Claviceps*. Alguns anos depois, em 1858, esse mesmo açúcar foi isolado de cogumelos e na época chamado de “micose”. No ano de 1923, Berthelot isolou esse dissacarídeo em maior quantidade em insetos, o qual foi chamado de trealose, e estudou mais sobre ele descobrindo características como sua capacidade não-

redutora, rotação óptica específica, fórmula molecular (FEOFILOVA; USOVB; KOCHKINAC*,* 2014).

TABELA 48 – LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO, DISTÂNCIAS EM ÂNGSTROMS E ÂNGULOS E GRAUS [°]

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(2)-H(2A)...O(7W)#1	0,82	2,00	2,773(2)	156,1
O(3)-H(3A)...O(4')#1	0,82	2,09	2,907(2)	175,3
O(4)-H(4A)...O(7W)#2	0,82	2,09	2,887(2)	164,5
O(6)-H(6)...O(6')#3	0,82	1,89	2,705(2)	170,4
O(2')-H(2'1)...O(8W)	0,82	1,92	2,731(2)	171,2
O(3')-H(3'1)...O(3)#1	0,82	1,98	2,756(2)	157,1
O(4')-H(4'1)...O(5')#4	0,82	2,17	2,8869(19)	145,6
O(6')-H(6')...O(4)#5	0,82	1,94	2,732(2)	162,7
O(7W)-H(7A)...O(2)	0,81(2)	1,90(2)	2,701(2)	173(3)
O(7W)-H(7B)...O(2')#6	0,83(2)	1,94(2)	2,769(2)	173(3)
O(8W)-H(8A)...O(6)	0,84(2)	1,93(2)	2,770(2)	175(3)
O(8W)-H(8B)...O(3')#7	0,83(2)	1,98(2)	2,801(2)	169(3)

Transformações de simetria para gerar átomos equivalentes: #1 x+1/2,-y+1/2,-z+1; #2 x+1,y,z; #3 -x+1,y+1/2,-z+3/2; #4 -x+1,y-1/2,-z+3/2; #5 -x+3/2,-y+1,z+1/2; #6 x-1,y,z; #7 -x+2,y+1/2,-z+3/2

FONTE: O autor (2017).

Quanto a sua ocorrência, sabe-se que existem cerca de 80 organismos diferentes, dentre eles plantas, fungos (em alguns cogumelos sua concentração pode variar entre 8 e 17% m/m), bactérias, insetos (constitui de 80 a 90% da hemolinfa), capazes de produzir a trealose, não sendo encontrada em mamíferos, têm-se apenas relatos da presença da enzima trelase no intestino desses. A trealose apresenta diversas funções, dentre elas, serve como fonte de energia para organismos inferiores, tem função estrutural em algumas bactérias, protege as células de vários organismos contra a ação de temperaturas baixas, evitando seu congelamento atuando como agente crioprotetor (RICHARDS et al. 2004). Um estudo realizado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou que esse açúcar possui ação antioxidante, e que sua concentração aumenta com o aumento da produção de etanol pelas leveduras, protegendo as células contra sua ação tóxica (FEOFILOVA; USOVB; KOCHKINAC*,* 2014).

Provavelmente, devido a capacidade de proteger as células contra a ação de temperaturas drásticas, esse açúcar foi isolado e identificado nas amostras de fungo (*Bjerkandera adusta*) que cresceram em temperatura mais baixa (12 °C), a trealose age sobre as membranas celulares ajudando a estabilizá-las evitando seu rompimento e a morte celular, além de prevenir a degradação de enzimas (BUREK, et al., 2015; RICHARDS et al. 2004).

Esse açúcar foi isolado em uma cepa do gênero *Scleroderma* por Morandi e colaboradores (2016), porém na configuração α,β-trealose, sendo identificado por RMN, isolado do extrato metanólico bruto do fungo isolado de Eucalipto.

A identificação desse açúcar é inédita para o gênero *Bjerkandera*.

4.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados obtidos para a massa micelial de *Bjerkandera adusta* são apresentados na TABELA 49.

TABELA 49 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO FUNGO *Bjerkandera adusta*

Análise	Massa micelial liofilizada do fungo *Bjerkandera adusta*
Umidade (g/100 g)	7,97 ± 0,30
Cinzas (g/100 g)	3,27 ± 0,95
pH	4,99 ± 0,01
Exopolissacarídeos (g/100 g)	0,0
Quitina (g/100 g)	3,33
Lipídeos (g/100 g)	1,36 ± 0,07
Proteínas (g/100 g)	9,32 ± 0,03
Fibras Alimentares (g/100 g)	5,31 ± 2,18
Carboidratos (g/100 g)	63,45

FONTE: O autor (2017).

Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados pela literatura, que demonstram que os principais componentes dos fungos são os carboidratos e as proteínas (KALAC, 2013)., sendo que os carboidratos correspondem a mais da metade da sua massa seca, aproximadamente 64% da massa seca no caso do fungo *Bjerkandera adusta* conforme observado na TABELA 49.

A maioria dos fungos apresenta baixo teor de lipídeos, de 2 a 6% da sua massa seca (KALAC, 2009), sendo que os mais comuns incluem: os fosfolipídeos, esteróis, trigligerideos e ácidos graxos livres (SADLER, 2003).

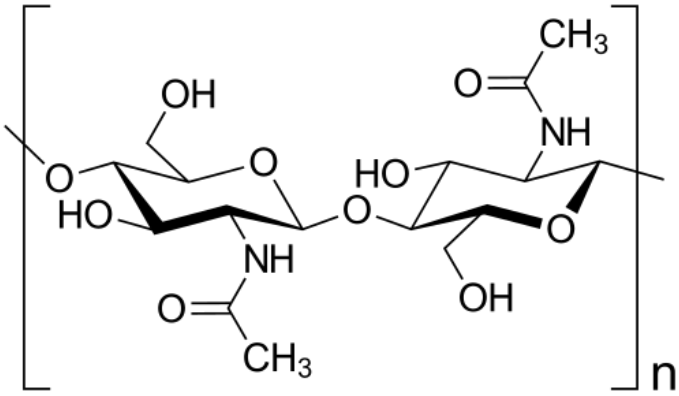
Com relação ao teor de fibras, observam-se valores bastante variados, de acordo com os resultados publicados por Sadler (2003) o conteúdo de fibras para diferentes espécies de fungos variou de 0,6 a 11,5 g/100 g.

Quanto ao teor de cinzas, segundo Kalac (2009) o valor usual situa-se na faixa de 5 a 12%, porém variam bastante de uma espécie de fungo para outra, sendo que foram encontrandos resultados na faixa de 3,5 a 32,0% de cinzas. O resultado encontrado para o fungo *Bjerkandera adusta* encontra-se um pouco

abaixo desses resultados, apresentando cerca de 3,27% de cinzas (conforme TABELA 49).

A quitina (FIGURA 40) é um polímero de ocorrência natural, formada por inúmeras unidades de β-1,4 N-acetil D-glicosamina, é encontrada principalmente em crustáceos, insetos e na parede celular de fungos. A partir da desacetilação da quitina têm-se a quitosana, bastante empregada industrialmente. Dentre seus usos pode-se citar: como agente no tratamento de água, como aditivo em produtos cosméticos e alimentares, na formulação de medicamentos, dentre outros. Porém, a extração de quitina e quitosana a partir da carapaça de crustáceos apresenta elevado custo, é sazonal, prejudicial ao meio ambiente pois requer o uso de altas temperaturas e de soluções alcalinas fortes, além de poder causar algum tipo de alergia em seus usuários (BERGER, 2015). Como alternativa têm-se a obtenção da quitina a partir de fungos, processo mais vantajoso que o empregado tradicionalmente pois causa menos poluição ao meio ambiente, é mais barato, permite que haja a produção em alta escala em um período de tempo relativamente curto, dentre outras vantagens (YEN; MAU, 2007; BERGER, 2015).

FIGURA 40 – ESTRUTURA DA QUITINA

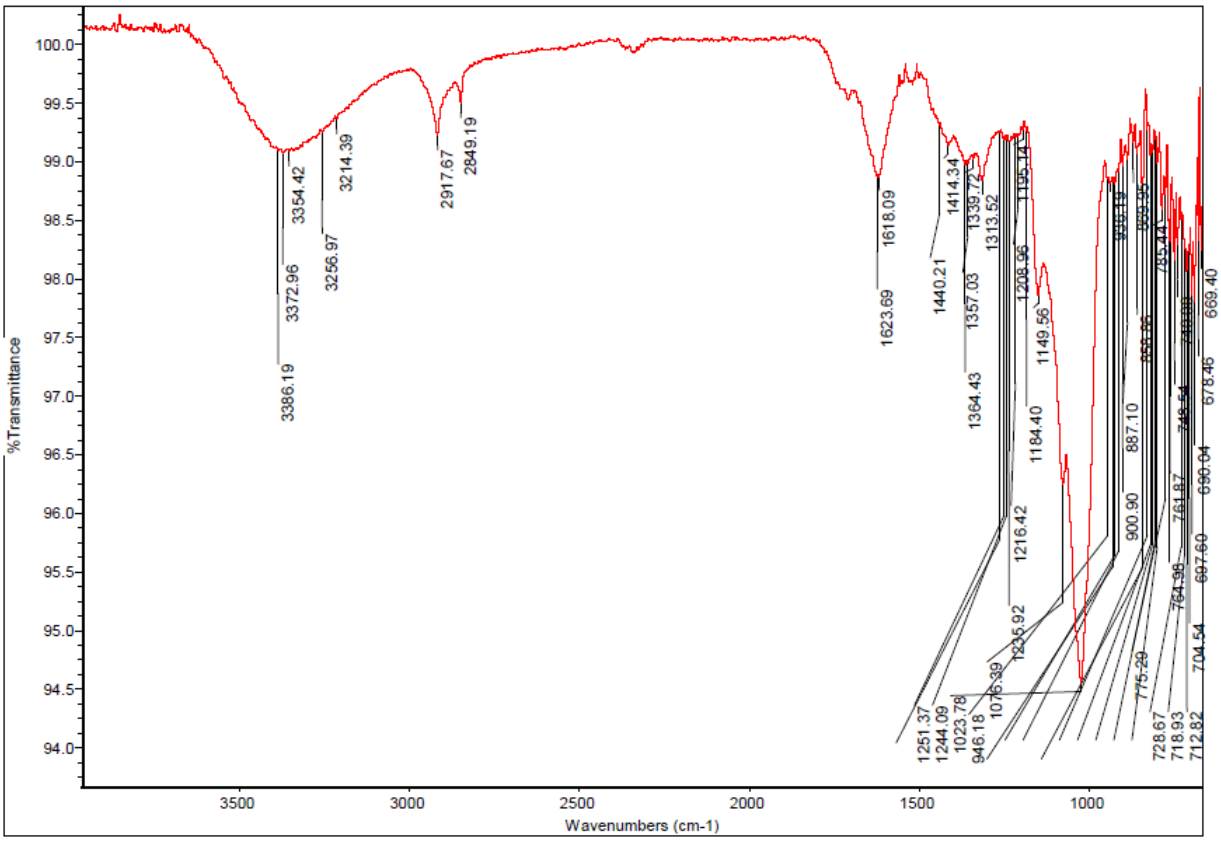


FONTE: DSCHANZ (2007).

O teor de quitina encontrado para o fungo *Bjerkandera adusta*, igual a 3,33 g/100 g de massa fúngica seca (TABELA 49), pode ser considerado elevado quando comparado ao valor observado para outras espécies de fungos por Nitschke e colaboradores (2011), em que o valor médio de quitina para o micélio de espécies de cogumelos foi de 2,5 g/100 g e para o corpo de frutificação de 3,5 g/100 g.

Na caracterização da quitina realizada por IV (FIGURA 41), observa-se a presença de uma banda ao redor de 3300 cm^{-1}, que corresponde a presença de grupamentos hidroxila, a banda em 2917 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-H, essa banda é característica da quitina, a banda ao redor de (1623 cm^{-1}) corresponde ao estiramento C-O da amida I que ocorre na faixa de 1680 a 1630 cm^{-1}. As bandas próximas de 1300 cm^{-1} e 887 cm^{-1} correspondem a deformação da amida III (PAVIA et al., 2015; ÁLVAREZ et al., 2014). Trata-se da quitina porém a presença de outras bandas pode ser justificada por sua incompleta purificação, restando na amostra traços de outras substâncias.

FIGURA 41 – ESPECTRO EM IV DA QUITINA EXTRAÍDA DO FUNGO *Bjerkandera adusta*



FONTE: O autor (2017).

4.7. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.7.1. Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Os resultados estão descritos na TABELA 50.

TABELA 50 – TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* FRENTE À *Artemia salina*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO ($\mu g.mL^{-1}$)					CL_{50} ($\mu g.mL^{-1}$)	IC de 95% ($\mu g.mL^{-1}$) (limite inferior – limite superior)
	10	100	250	500	1000		
Hexano	MORTALIDADE					449,51	285,79 – 832,58
	2	5	11	12	24		
Clorofórmio	12	12	10	14	14	> 1000	-
Acetato etila (micélio)	2	6	8	11	11	> 1000	-
Metanol	7	14	14	12	10	> 1000	-
Acetato etila (caldo fermentado)	6	6	5	5	8	> 1000	-
Controle (SDS)	CONCENTRAÇÃO ($\mu g.mL^{-1}$)					24,74	1,349 – 1,551
	10	20	30	40	50		
	MORTALIDADE						
	3	5	10	19	23		

FONTE: O autor (2017).

A *Artemia salina,* um microcrustáceo de água salgada, é empregada em testes preliminares para avaliar a toxicidade de produtos químicos e naturais através da estimativa da CL_{50} (concentração letal média), devido a seu baixo custo, simplicidade, rapidez, reprodutibilidade, uso de pequenas quantidades de amostra durante a execução dos ensaios, dentre outras vantagens (MCLAUGHLIN, SAIZARBITORI, ANDERSON, 1995; PARRA et al., 2001). É capaz de indicar se as amostras-teste serão bem toleradas e não causarão injúrias aos sistemas biológicos (NASCIMENTO et al., 2008). A toxicidade sobre esse crustáceo vêm demonstrando estar diretamente relacionada a presença de atividade citotóxica

contra tumores, atividade antiprotozoária e antiviral (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991; ALVES et al., 2000).

Segundo Meyer e colaborados (1982) amostras que apresentam valor CL_{50} abaixo de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ frente a *Artemia salina* são consideradas tóxicas. Segundo Amarantes e colaboradores (2011) as amostras podem ser classificadas com relação a sua toxicidade de acordo com a CL_{50} em: pouco tóxicas, quando o valor de CL_{50} foi superior a 500 $\mu g.mL^{-1}$; com toxicidade moderada, nos casos em que o valor de CL_{50} ficou na faixa de 100 a 500 $\mu g.mL^{-1}$ e altamente tóxicas para aquelas com valor de CL_{50} abaixo de 100 $\mu g.mL^{-1}$.

De acordo com Veiga e Vital (2002), o valor de CL_{50} para o controle dodecilsulfato de sódio (SDS) quando testado em *Artemia salina* sob um período de 24 horas deve ficar entre 13,1 a 30,9 $\mu g.mL^{-1}$. Logo, o resultado encontrado (24,44 $\mu g.mL^{-1}$, conforme TABELA 50) encontra-se dentro desta faixa. Isso permite a padronização do ensaio, e reduz a probabilidade de ocorrerem resultados muito exarcebados ou baixos.

No tempo de 24 horas a maioria dos extratos não causou letalidade nas artemias, a única amostra que pode ser considerada tóxica sobre os indíviduos testados é o extrato hexano da massa micelial de *Bjerkandera adusta*, classificado como sendo de toxicidade moderada (CL_{50} = 449,51 $\mu g.mL^{-1}$).

4.7.2. Atividade hemolítica

Durante a investigação da atividade de extratos foi importante determinar se esses possuiam alguma atividade hemolítica pois a mesma serve como indicadora de citotoxicidade e bioatividade. Dessa forma os testes de hemólise *in vitro* servem como uma triagem para substâncias com potencial tóxico (KUBLIK et al., 1996).

4.7.2.1. Teste da atividade hemolítica em placas de ágar sangue

Os resultados da atividade hemolítica dos extratos de *Bjerkandera adusta* utilizando ágar sangue estão expressos na TABELA 51.

TABELA 51 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE

AMOSTRA	HALO (cm)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN*				
Saponina	0,5	a				
Triton	0,7		b			
Controle Solvente	0,1				d	
Hexano	0,2			c		
Clorofórmio	0,0					e
Acetato etila (Micélio)	0,0					e
Metanol	0,0					e
Acetato etila (Caldo fermentado)	0,0					e

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

Pode-se observar que o único extrato que apresentou alguma atividade hemolítica nesse ensaio foi o extrato hexano de *Bjerkandera adusta*. Os demais extratos não foram capazes de causar danos aos eritrócitos sob as condições testadas.

4.7.2.2. Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

Os resultados da atividade hemolítica *in vitro*, utilizando hemácias em suspensão, dos extratos de *Bjerkandera adusta* estão descritos na TABELA 52.

TABELA 52 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* COM HEMÁCIAS EM SUSPENSÃO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	% HEMÓLISE + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN								
Água	-	100	a								
Triton		96,91		b							
Hexano	100	82,33 ± 3,94					e				
	200	90,96 ± 2,14			c						
	500	85,85 ± 0,78				d					
	1000	68,34 ± 2,41						f			
Clorofórmio	100	9,24 ± 1,05									i
	200	13,22 ± 0,67							g		
	500	82,05 ± 2,48					e				
	1000	100,59 ± 0,85	a								
Acetato Etila (Micélio)	100	7,38 ± 0,53									i
	200	8,63 ± 0,58									i
	500	9,44 ± 1,03									i
	1000	12,53 ± 0,73								h	i

(continua)

TABELA 52 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* COM HEMÁCIAS EM SUSPENSÃO

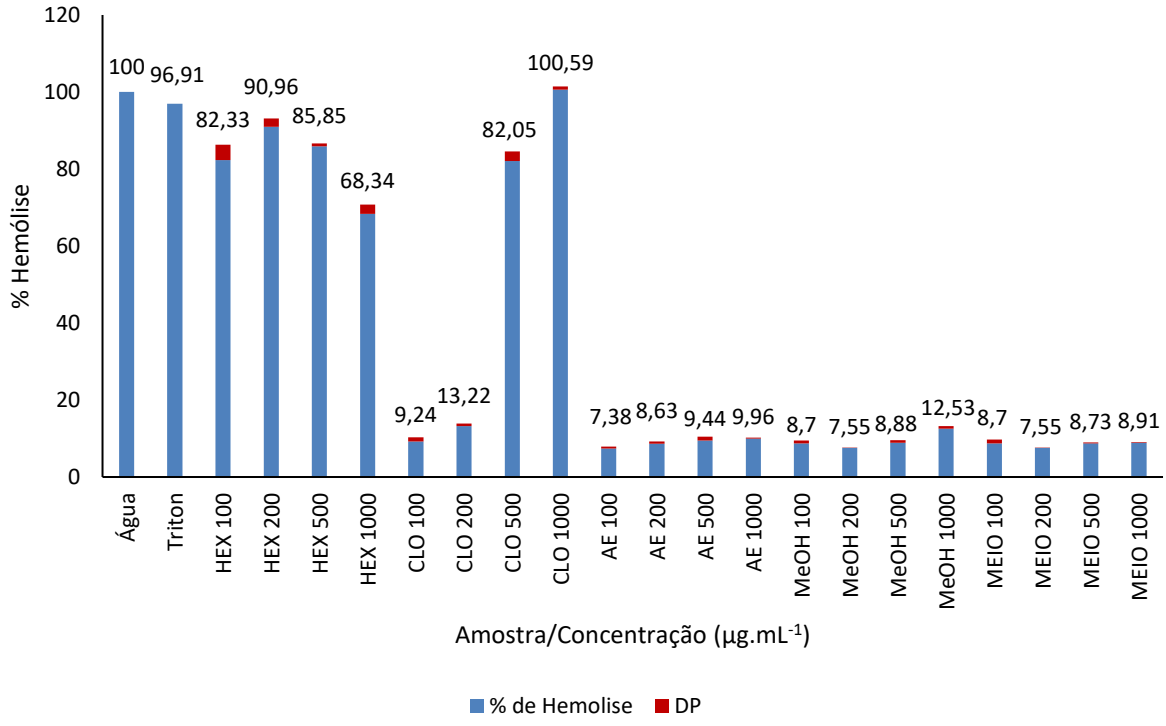
(conclusão)

Metanol	100	8,70 ± 0,74									i
	200	7,55 ± 0,09									i
	500	8,88 ± 0,69						f	g		
	1000	12,53 ± 0,73							g	h	
Acetato Etila (Caldo fermentado)	100	8,70 ± 1,06								h	i
	200	7,55 ± 0,13									i
	500	8,73 ± 0,22									i
	1000	8,91 ± 0,18									i

As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

Pode-se observar (GRÁFICO 11) que grande parte dos extratos não apresentou atividade hemolítica, resultados bastante semelhantes com aqueles observados no ensaio de atividade hemolítica empregando placa de ágar sangue. Sendo que no caso dos extratos acetato de etila do micélio (AE) e do Caldo fermentado (MEIO) não houve diferença estatística entre as concentrações testadas.

GRÁFICO 11 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*



NOTA: Extrato Hexano (HEX), Extrato Clorofórmio (CLO), Extrato Acetato de Etila do micélio (AE), Extrato Metanólico (MEOH) e Extrato Acetato de Etila do meio de cultura (MEIO), Desvio Padrão (DP).
FONTE: O autor (2017).

Os extratos hexano (HEX) e clorofórmio (CLO) apresentam alto potencial hemolítico, o extrato hexano apresenta elevada ação hemolítica em todas as concentrações testadas. Já para o extrato clorofórmio, observou-se atividade hemolítica dependendente da concentração empregada, ou seja, concentrações mais elevadas desse extrato apresentam maior ação sobre as hemácias de carneiro, sendo que esse extrato na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ possui potencial hemolítico (100,29%) estatisticamente semelhante ao da água (100%).

4.7.3. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de fenóis totais dos extratos de *Bjerkandera adusta* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteau, os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama (mg $EAG.g^{-1}$) e estão descritos na TABELA 53.

TABELA 53 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO - EAG) NOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (mg $EAG.g^{-1}$ DA AMOSTRA)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN*			
Hexano	0				d
Clorofórmio	81,84 ± 0,01			c	
Acetato etila (Micélio)	107,55 ± 0,01	a			
Metanol	110,96 ± 0,005	a			
Acetato etila (Caldo fermentado)	96,50 ± 0,02		b		

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente
FONTE: O autor (2017).

Seguindo-se a classificação de Chew e colaboradores (2011), pode-se afirmar que de um modo em geral os extratos, exceto o extrato hexano, apresentaram alto teor de compostos fenólicos (> 50 $mg.EAG.g^{-1}$).

Os compostos fenólicos incluem os fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos (condensados e hidrolisáveis), lignanas, ligninas e estilbenos, substâncias capazes de inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro,* devido a sua estrutura química e ação redutora. Esses compostos podem

sequestrar ou neutralizar os radicais livres, quelar metais, formar intermediários de reação estáveis (SOUSA et al., 2007). A triagem química preliminar realizada em CCD revelou a presença de flavonoides nos extratos acetato de etila, tanto do micélio quanto do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta*, e no extrato metanólico. Esses extratos que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais provavelmente devido a natureza desses solventes (solventes polares) e a afinidade desses compostos pelos mesmos.

4.7.4. Avaliação da atividade antioxidante

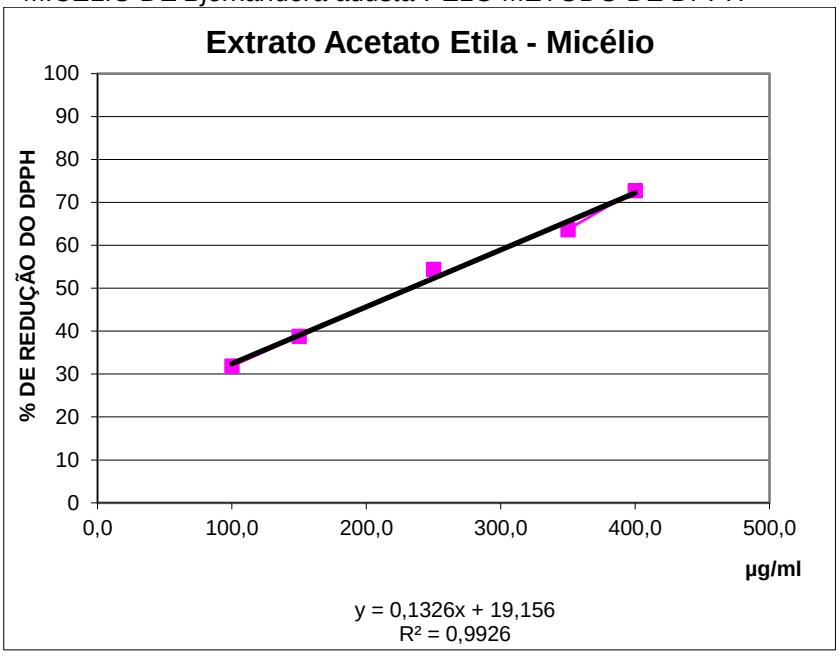
Existem inúmeras metodologias para se determinar a capacidade antioxidante de uma amostra. A maioria delas baseiam-se no mesmo princípio: forma-se de um radical sintético e avalia-se a capacidade da amostra em eliminá-lo ou neutralizá-lo, podendo-se monitorar tal capacidade em espectrofotômetro. Como esses ensaios estão sujeitos a interferências, recomenda-se que sejam empregadas pelo menos 2 técnicas diferentes para se caracterizar um composto completamente como antioxidante (ARNAO, 2000; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

4.7.4.1. Redução do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Segundo Sánchez-Moreno (2002), a avaliação da atividade antioxidante de extratos pelo método do DPPH é simples e preciso quando comparado a outras técnicas com a mesma finalidade.

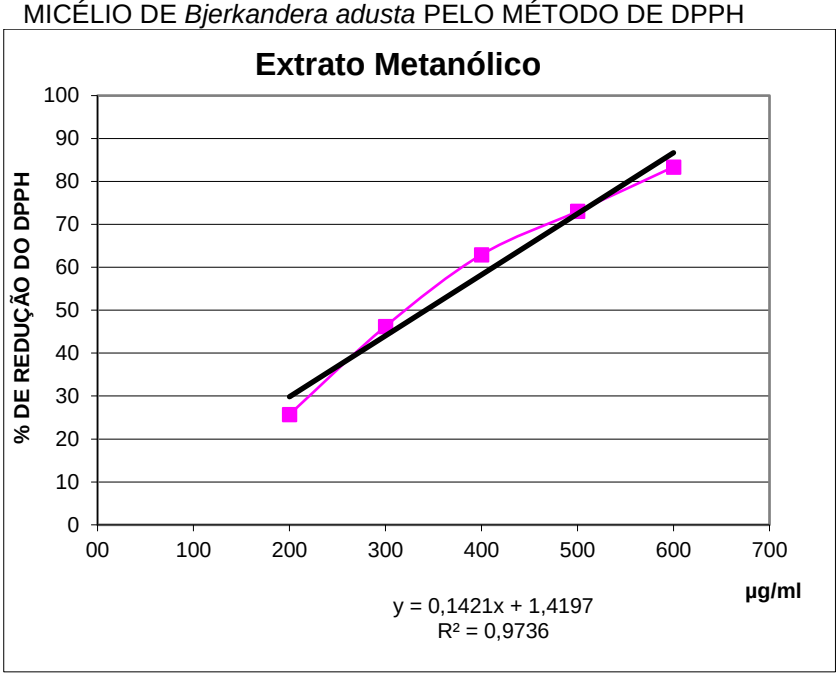
Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *Bjerkandera adusta* pelo método de redução do DPPH empregou-se as curvas cujos resultados estão demonstrados nos GRÁFICOS 12, 13 e 14.

GRÁFICO 12 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH



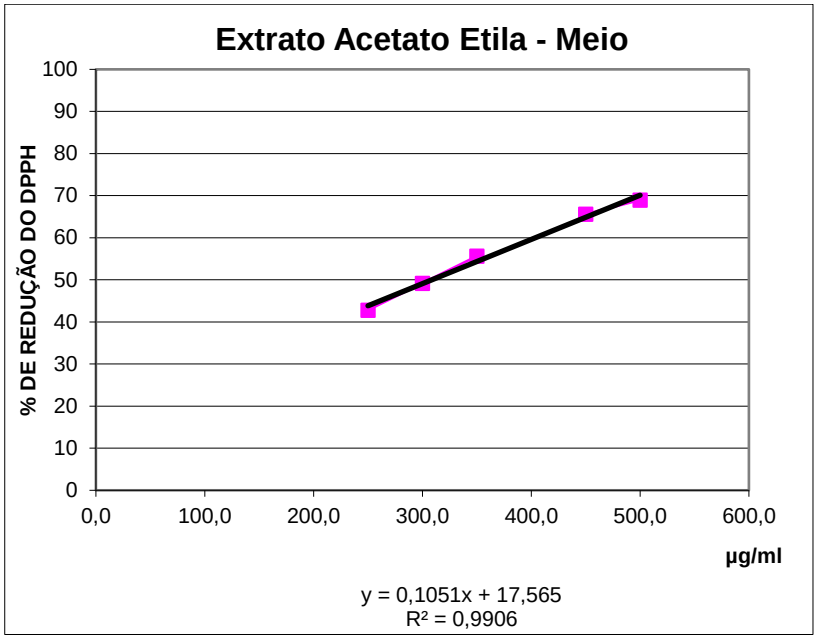
FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 13 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH



FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 14 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH



FONTE: O autor (2017).

A partir da equação da reta fornecida (y= ax + b, em que y representa a porcentagem de redução do DPPH e x indica a concentração da amostra) para cada um dos gráficos (GRÁFICOS 12, 13 e 14), calculou-se o valor de IC_{50} (concentração na qual o extrato apresenta 50% da sua atividade antioxidante) das amostras.

Os resultados de IC_{50} dos extratos foram comparados com os dos padrões vitamina C e rutina frente ao teste de Duncan e estão descritos na TABELA 54.

TABELA 54 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE DPPH

AMOSTRA	IC_{50} DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO A VITAMINA C E A RUTINA ($\mu g.mL^{-1}$) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN*			
Vitamina C	4,92 ± 0,06	a			
Rutina	6,15 ± 0,08	a			
Hexano	>500,00				
Clorofórmio	>500,00				
Acetato etila (Micélio)	231,40 ± 1,3		b		
Metanol	341,87 ± 2,0				d
Acetato etila (Caldo fermentado)	308,62 ± 0,7			c	

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente
FONTE: O autor (2017).

Com exceção dos extratos hexano e clorofórmio, com valores de IC_{50} acima de 500 µg.mL^{-1}, os demais extratos de *Bjerkandera adusta* apresentam atividade antioxidante pelo método de DPPH.

Os resultados mais significativos foram observados para o extrato acetato de etila do micélio de *Bjerkandera adusta*, pois dentre todos os extratos testado é o que apresenta 50% da sua ação antioxidante em menores concentrações (231,40 ± 1,3 µg/mL), seguidos pelo extrato acetato de etila do caldo fermentado e extrato metanólico. Essa atividade também tem sido correlacionada com a presença de flavonoides (NASCIMENTO et al., 2011), os quais foram observados para esses 3 extratos durante a prospecção química por CCD, além de serem os extratos com maior teor de fenóis totais de acordo com o método de Folin-Ciocalteau.

4.7.4.2. Redução do Fosfomolibdênio

Outro método utilizado para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *Bejerkandera adusta* foi o da redução do complexo fosfomolibdênico. Trata-se de uma metodologia simples e de baixo custo capaz de analisar a capacidade antioxidade de uma mistura complexa de compostos, tanto de carácter lipofílico quanto hidrofílico (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

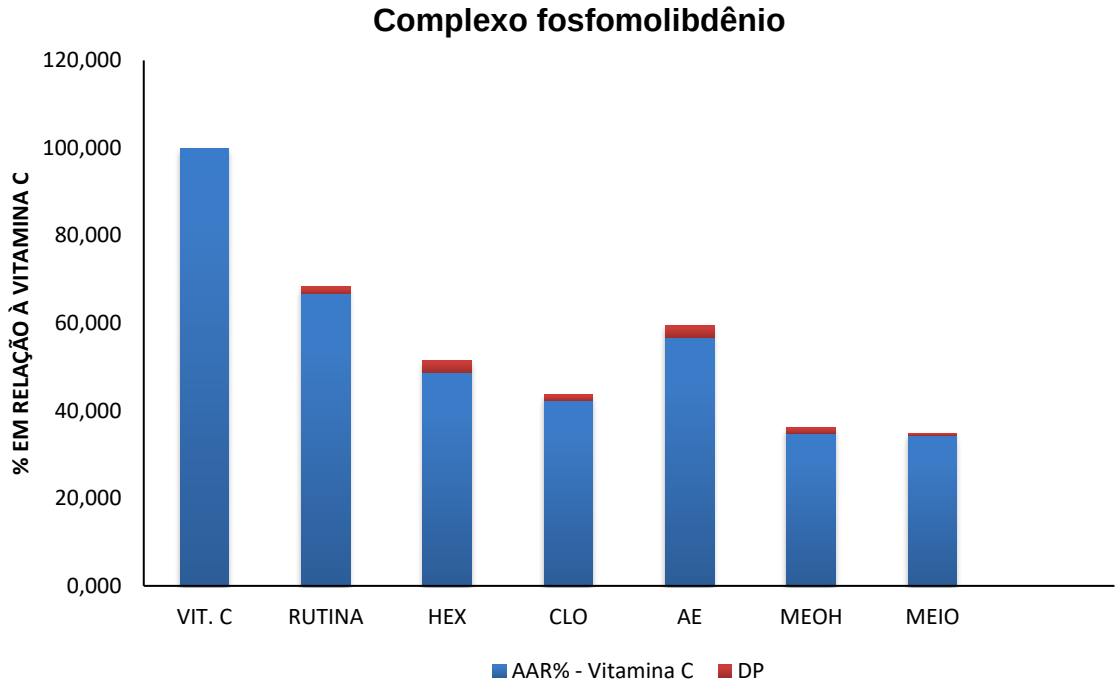
Os resultados da atividade antioxidante foram calculados em relação ao padrão de vitamina C, considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante, e estão representados na TABELA 55 e no GRÁFICO 15.

TABELA 55 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELA REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO A VITAMINA C (%) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN*					
Vitamina C	100,00	a					
Rutina	66,67 ± 1,62		b				
Hexano	48,66 ± 2,86				d		
Clorofórmio	42,33 ± 1,31					e	
Acetato etila (Micélio)	55,64 ± 2,92			c			
Metanol	34,89 ± 1,31						f
Acetato etila (Caldo)	34,40 ± 0,51						f

* Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente. As diferenças foram consideradas significativas quando p< 0,05.
FONTE: O autor (2017).

GRÁFICO 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA COM A VITAMINA C



NOTA: Atividade antioxidante relativa (AAR), Desvio Padrão (DP), Vitamina C (VIT. C), Extrato Hexano (HEX), Extrato Clorofórmio (CLO), Extrato Acetato de Etila do micélio (AE), Extrato Metanólico (MEOH) e Extrato Acetato de Etila do caldo fermentado (MEIO).
FONTE: O autor (2017).

Pode-se obervar que o extrato acetato de etila do micélio de *Bjerkandera adusta*, de modo semelhante ao observado na análise de redução do DPPH, foi a amostra com maior atividade antioxidante, sua atividade corresponde a cerca de 55% da atividade da vitamina C.

4.7.5. Avaliação da atividade antimicrobiana pela CIM

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos extratos de *Bjerkandera adusta* frente a diferentes microrganismos encontram-se na TABELA 56.

TABELA 56 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Bjerkandera adusta* PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

	CIM ($\mu g.mL^{-1}$)							
MICRORGANISMOS AMOSTRA	*S.a.*	*E.c.*	*P.a.*	*E.f.*	*K.p.*	S.e.	*S.t.*	*C.a.*
Hexano	500	1000	>1000	500	1000	1000	1000	1000
Clorofórmio	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Acetato Etila (Micélio)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	>1000
Metanol	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000
Acetato Etila (Caldo fermentado)	500	500	500	500	1000	500	500	>1000

NOTA: *Staphylococcus aureus* (*S.a*), *Escherichia coli* (*E.c*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*), *Enterococcus faecalis* (*E.f*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.p*), *Staphylococcus epidermidis* (*S.e*.), *Salmonella typhimurium (S.t.) e Candida albicans (C.a.)*, Concentração inibitória mínima (CIM).
FONTE: O autor (2017).

De acordo com trabalhos já publicados (TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008), os valores de CIM podem ser classificados como tendo bom potencial inibitório (< 100 $\mu g.mL^{-1}$); moderada atividade inibitória (100 a 500 $\mu g.mL^{-1}$); pequena atividade inibitória (500 a 1000 µg/mL) e inativos (> 1000 $\mu g.mL^{-1}$).

Pode-se observar que a maior parte dos extratos testados apresentou baixa atividade inibitória sobre as bactérias e a cepa de fungo testadas. O extrato clorofórmio (EC) não apresentou atividade frente a nenhum dos organismos-teste. Os melhores resultados foram observados para o extrato acetato de etila do caldo fermentado de *Bjerkandera adusta* (EAM), essa diferença com relação ao extrato acetato de etila da massa micelial de *Bjerkandera adusta* pode ser explicada devido a presença de substâncias diferentes nesses 2 extratos conforme observado no perfil por CLAE e análise por CCD.

5. CONCLUSÃO

Os parâmetros temperatura, meio de cultura e tempo de incubação afetaram o crescimento dos fungos *Bjerkandera adusta*, *Suillus* sp. e *Rhizoctonia* sp. As condições ótimas de crescimento constatadas foram: 24 °C, meio BD ou meio extrato de malte, e de 28 a 35 dias de incubação para o fungo *Bjerkandera adusta*; 16 a 20 °C, meio extrato de malte e 28 dias de incubação para o fungo *Suillus* sp; e 16 a 20 °C, meio BD ou extrato de malte e de 21 a 35 dias de incubação para o fungo *Rhizoctonia* sp.

Além disso, foi possível verificar que esses parâmetros também foram capazes de afetar a produção de metabólitos pelo fungo *Bjerkandera adusta* tanto na concentração dos compostos sintetizados quanto na natureza desses compostos.

As substâncias encontradas nos extratos da massa micelial de *Bjerkandera adusta* e nos extratos do caldo fermentado, de um modo em geral, variaram quanto ao seu teor e natureza química.

As análises químicas preliminares por CCD revelaram a presença de flavonoides e esteroides/triterpenos nos extratos de *Bjerkandera adusta*.

Isolou-se um açúcar a partir da massa micelial de *Bjerkandera adusta* obtida a 12 °C, em meio BD, durante 35 dias de incubação. Esse foi identificado por cristalografia e trata-se da α,α-trehalose dihidratada.

O fungo *Bjerkandera adusta* apresentou baixos teores de lipídeos, altos teores de proteínas e de fibras, altas quantidades de carboidratos e de quitina e ausência de exopolissacarídeos.

Apenas o extrato hexano de *Bjerkandera adusta* apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*, com valor de CL_{50} igual a 449,51 $\mu g.mL^{-1}$.

No ensaio de atividade hemolítica em placa de ágar sangue, o único extrato que apresentou toxicidade sobre as hemácias foi o extrato hexano de *Bjerkandera adusta.* De modo semelhante, esse extrato também demonstrou ter ação hemolítica no ensaio de hemólise usando hemácias em suspensão, com hemólise acima de 80% para os extratos nas concentrações de 100, 200 e 500 $\mu g.mL^{-1}$. O extrato clorofórmio apresentou atividade hemolítica concentração dependente, sendo que

na concentração de 1000 µg.mL^{-1} seu potencial hemolítico foi estatisticamente semelhante ao do controle positivo.

Os extratos clorofórmio, acetato de etila da massa micelial e do caldo fermentado, e metanólico de *Bjerkandera adusta* apresentaram alto teor de compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocalteau (> 50 mg.EAG.g^{-1}).

Os extratos acetato de etila, da massa micelial e do caldo fermentado, e metanólico (massa) de *Bjerkandera adusta* apresentaram atividade antioxidante pelo método do DPPH. A melhor atividade foi observada para o extrato acetato de etila do micélio, com valor de IC_{50} igual a 231,40 ± 1,3 µg.mL^{-1}. De modo semelhante, esse extrato foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio, cerca de 55% da atividade observada para a vitamina C.

A maior parte dos extratos de *Bjerkandera adusta* testados apresentou baixa atividade inibitória contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans.*

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos quanto as substâncias químicas e atividades biológicas para as espécies de *Bjerkandera adusta* ainda são escassos, portanto é fundamental que as pesquisas envolvendo esse fungo continuem a fim de obter novas informações relevantes que permitam a aplicação desse fungo ou de substâncias isoladas dele nas mais diversas áreas.

Deve-se prosseguir com o isolamento e a identificação das substâncias químicas observadas nas análises por CCD e CLAE. E posteriormente verificar a possível atividade dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. M. Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e estudos quimiotaxonômicos de fungos endófitos. 2010. 172 p. Tese de doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

AGROPECUÁRIA MAFRA. Reflorestamento de Pinus. 2012. Disponível em: <http://www.agromafra.com.br/reflorestamento.html>. Acesso em: 14/01/2017.

AKIYAMA, K.; HAYAHI, H. Arbuscular Mycorrhizal Fungus-promoted Accumulation of Two New Triterpenoids in Cucumber Roots. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** v. 66, n. 4, p. 762–769, 2002.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa. Ed. UFV. 382p. 2007.

ÁLVAREZ, S. P. O.; CADAVID, D. A. R.; SIERRA, D. M. E.; OROZCO, C. P. O.; VAHOS, D. F. R.; OCAMPO, P. Z.; ATEHORTÚA, L. Comparison of Extraction Methods of Chitin from *Ganoderma lucidum* Mushroom Obtained in Submerged Culture. **BioMed Research International,** v. 2014, p. 1-7, 2014.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA J. R. A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 95, p. 367-373, 2000.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardia linifera). **Acta Amazonica,** v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.

ANDRADE, S. A. L.; MALIK, S.; SAWAYA, A. C. H. F.; BOTTCHER, A.; MAZZAFERA, P. Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* plants. **Acta Physiologiae Plantarum,** v. 35, n. 3, p.867-880, 2013.

ANDRIANI, A.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. Effects of saline-alkaline stress on benzo[a]pyrene biotransformation and ligninolytic enzyme expression by *Bjerkandera adusta* SM46. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** p. 32-39, 2016.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12th edition, Washington, D.C. **A.O.A.C**. Internacional, 1970.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th edition, Horowitz. **A.O.A.C**. Internacional, Maryland. 2002.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology,** v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.

AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos . Riscos potenciais de patógenos florestais exóticos para o setor florestal brasileiro. **Revisão Anual de Patologia de Plantas,** v. 24, p. 104-114, 2016.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S., SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BARTZ, F. E.; GLASSBROOK, N. J.; DANEHOWER, D. A.; CUBETA, M. A. Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of Rhizoctonia solani anastomosis group 3. **Mycologia,** v. 104, n.4, p. 793–803, 2012.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics,** v. 58, n.1, p. 1–26, 2005.

BERGER, L. R. R. Produção e Caracterização de Quitina e Quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e Aplicação em Membranas na Remoção de Cádmio. 2013. 180 p. **Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas)** – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology,** v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BUREK, M.; WASKIEWICK, S.; WANDZIK, I.; KAMINSKA, K. Trehalose – properties, biosynthesis and applications. **Chemik,** v. 69, n. 8, p.469-476, 2015.

CALDO BATATA DEXTROSE: meio para cultivo de leveduras e bolores de alimentos. Kasvi. Rev.01, 2014. Ficha técnica.

CARVALHO, J. C. B. Antagonismo entre *Magnaporthe oryzae* e o fungo micorrízico *Rhizoctonia* sp. 2013. 77 p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)** – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4445/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Jacqueline%20Campos%20Borba%20de%20Carvalho%20-%202013.pdf>. Acesso em: 30/06/2015.

CASTRO, C. V. B. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn. 2007. 67 p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em**

Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61106/1/carla-castro.pdf>. Acesso em: 30/06/2015.

CAZIN, J. J.; WIEMER, D. F.; HOWARD, J. J. Isolation, Growth Characteristics, and Long-Term Storage of Fungi Cultivated by Attine Ants. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 55, n. 6, p.1346-1350, 1989.

CHANDRASEKARAN, M.; THANGAVELU, B.; CHUN, S. C.; SATHIYABAMA. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology,** v. 82, p. 233-239, 2016.

CHAPLA, V. M. Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis*. 2010. 174 p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química)** - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010. Disponível em: <http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/165209?locale=pt_BR>. Acesso em: 28/06/2015.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** v. 11, n. 12, 2011

CICLOFLORESTAS. Pinus. 2008. Disponível em: <http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=pinus>. Acesso em: 20/05/2015.

COSTA, B. O.; NAHAS, E. Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.43, n.1, p. 332-340, 2012.

COVIZZI, L.G. Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas. 2007. 84 p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)** – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88405/covizzi_lg_me_sjrp.pdf?sequence=1>. Acesso em: 01/05/2016.

CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.

CUERVO-SOLO, L. VALDÉS-GARCÍA, G.; BATISTA-GARCÍA, SÁNCHEZ-CARBENTE, M. R.; BALCÁZAR-LÓPEZ, E.; LIRA-RUAN, V.; PASTOR, N.; FOLCH-MALLOL, J. L. Identification of a novel carbohydrate esterase from Bjerkandera adusta: structural and function predictions through bioinformatics analysis and molecular modeling. **Proteins,** v. 83, n. 3, p. 533-546, 2015.

DORADO, J.; BEEK, T. A. van; CLAASSEN, F. W.; SIERRA-ALVAREZ, R. Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera sp.* and *Trametes versicolor.* **Wood Science and Technology,** v. 35, n.1, p. 117-125, 2001.

DSCHANZ. Chemical structure of chitin (part of the polymer chain). 2007. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitin.svg>. Acesso em: 08/01/2017.

DUNCAN, D B. Multiple range and multiple *F* testes. Biometrics., v.11, p 1-42, 1955.

EMBRAPA FLORESTAS. Cultivo de Pinus: Guia de orientações básicas sobre o cultivo. 2005. Disponível em: <http://www.piubellaflorestas.com.br/site/pdf/pinnus.pdf>. Acesso em: 19/05/2015.

FACCIO, M. L. R. Importância do gênero *Pinus* spp para o setor madeireiro no Brasil. 2010. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Industrial Madeireira)** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/importancia-do-genero-pinus-spp-para-o-setor-madeireiro-no-brasil/53886/>. Acesso em: 20/05/2015.

FEOFILOVA, E. P.; USOVB, A. I.; KOCHKINAC, G. A. Trehalose: Chemical Structure, Biological Functions, and Practical Application. **Microbiology,** vol.83, n.3, p.184-194, 2014.

FIELD, J. A.; JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; BONT, J. A. M. Screening for ligninolytic fungi aplicable to the biodegradation of xenobiotics. **Trends in Biotechnology,** v.11, n.2, p.44-49, 1993.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis.** Cambridge University Press, 3rd Edition, 1971.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 33, n.3, p. 291-296, 2005.

GANEM, R. S. Conservação da Biodiversidade: Legislação e Políticas Públicas. **Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados.** Brasília, 2011, 437p.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN, V. R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia.* **Spanish Journal of Agricultural Research,** v.4, n.1, p.55-79, 2006.

GARVEY, G. S.; KELLER, N. P. Fungal Secondary Metabolites and Their Fundamental Roles in Human Mycoses. **Current Fungal Infection Reports,** v. 4, p. 256–265, 2010.

GOMES, G. **Fitopatologia.** 2013. Disponível em:< http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/14-39-41-apostilafitopatologia.pdf>. Acesso em: 28/12/2017.

GUIMARÃES, D. O. Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae). 2006. 212 p. **Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-09052007-103936/pt-br.php>. Acesso em: 01/05/2016.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n. 6, p. 985. 1999.

HAO, J. ; SONG, F.; HUANG, F. ; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 34, n. 3, p.233-240, 2007.

HARRIS, T. M.; HARRIS, C. M.; HILL, J. E.; UNGEMACH, F. S.; BROQUIST, H. P.; WICKWIRE, B. M. (1S,2R ,8aS)-1,2-Dihydroxyindolizidine formation by Rhizoctonia leguminicola, the fungus that produces slaframine and swainsonine. **J. Org. Chem.,** v. 52, p. 3094-3098, 1987.

HARTBERG, W.K.; CRAIG-JR, G.B. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution,** v. 24: p. 692-703, 1970.

HEINFLING, A.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. T.; BERGBAUER, M.; SWEZYK, U. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters,** n. 165, p.43-50, 1998.

HILLIG, E. O gênero Pinus no Brasil: Invasor, Injuriado ou Incompreendido? 2013. Disponível em: <http://www.painelflorestal.com.br/noticias/silvicultura/o-genero-pinus-no-brasil-invasor-injuriado-ou-incompreendido>. Acesso em: 19/05/2015.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 53, p. 1841−1856, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, ed. 3. São Paulo: IMESP, 1985.

INTERNATIONAL TABLES FOR X-RAY CRYSTALLOGRAPHY, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992). Vol. C, pp. 500, 219 and 193.

IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais). Programa Cooperativo sobre Produtividade Potencial do *Pinus* no Brasil. 2011. Disponível em: <http://www.ipef.br/pppib/>. Acesso em: 19/05/2015.

JUNG, P. E.; FONG, J. J.; PARK, M. S.; OH, S-Y; KIM, C.; LIM, Y. W. Sequence Validation for the Identification of the White-Rot Fungi Bjerkandera in Public Sequence Databases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.10, p.1301–1307, 2014.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry,** v. 113, p. 9-16, 2009.

KALAC, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 93, n. 2, p. 209-218, 2013.

KARABEGOVIĆ, I. T.; STOJICEVIĆ, S. S.; VELICKOVIĆ, D. T.; TODOROVIĆ, Z. B.; NIKOLIĆ, N. C.; LAZIĆ, M. L. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products,** v. 54, p.142-148, 2014.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi. 9 ed. Wallingford: CAB International, 2001.

KIRK P.; CANNON P. F.; MINTER D. W.; STALPERS J. A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. CAB International, Wallingford, UK, 2008.

KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T.; WRZOSEK, M.; GINALSKA, G.; IGLIK, H.; BANCERZ, R. Identification and application of a new fungal strain *Bjerkandera adusta* R59 in decolorization of daunomycin wastes. **Enzyme and Microbial Technology,** v.38, n. 5, p.583–590, 2006.

KRUGNER, T. L. Controle de doenças fúngicas em viveiros de *Eucalyptus* e *Pinus.* **IPEF – Instituto de pesquisas e estudos florestais.** Circular técnica n° 26, 1997.

KUBLIK, H.; BOCK, T. K.; SCHREIER, H.; MÜLLER, B. W. Nasal absorption of 17-ß estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 42, p. 320-324, 1996.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternative Laboratory Animals***, v.* 20, p. 297-301, 1992.

LI, H. Chemical investigation of natural products from Australian marine spong-derived fungi. 2006. 205p. Tese de Doutorado (Doutorado em Filosofia) - Griffith University, Australia, 2006. Disponível em: <https://www120.secure.griffith.edu.au/rch/file/40adc91d-afa5-8e84-41ce-7ae8b5ef6c41/1/03Chapter2.pdf>. Acesso em: 02/01/2017.

LIMA, Z. N. Curva de crescimento bacteriano. Detalhes Microbiológicos. Universidade Estadual da Paraíba. 2016. Disponível em: <https://microimunoliga.blogspot.com.br/2016/09/curva-de-crescimento.html>. Acesso em: 08/01/2017.

LIU, B.; ICHINOSE, T.; HE, M.; KOBAYASHI, F.; MAKI, T.; YOSHIDA, S.; YOSHIDA, Y.; ARASHIDANI, K.; TAKANO, H.; NISHIKAWA, M.; SUN, G.; SHIBAMOTO, T. Lung inflammation by fungus, *Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin-induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 10, n.1, p.1-12, 2014.

LOPES, F. C. Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos. 2011. 130 P. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/33266/000784383.pdf?sequence=1>. Acesso em: 08/04/2017.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman, A. (Org.). Studies in Natural Product Chemistry, 9th ed., Elsevier, Amsterdam, p. 383-409, 1991.

MCLAUGHLIN, J. L., SAIZARBITORI, T. C., ANDERSON, J. E. Três bioensayos simples para químicos de productos naturales. **Rev. Soc. Venez Quim,** v. 18, p. 13-18, 1995.

MALT EXTRACT POWDER. HiMedia Laboratories. 2015. Ficha técnica.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.;LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research,** v.15, p.127-130, 2001.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**, Curitiba, 2003.

MONTINI, R. M. C.; PASSO, J. R. S.; EIRA, A. F. Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (Lentinula edodes (Berk.) Pegler) on agar medium. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 37, n. 1, p. 90-95, 2006.

MOREIRA, F. G.; REIS, S.; COSTA, M. A. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.36, n. 1, p.7-11, 2005.

MUHSIN, T. M.; SELMAN, M. S. In vitro, optimization of growth and bioactivity of antibacterial metabolite produced by *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Journal of Basrah Researches (Sciences),** v. 39, n.1, p.101-111, 2013.

MYCOBANK DATABASE. Disponível em:<http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>. Acesso em: 27/12/2016

MONTOVANI, P. A. B.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; MORAES, A.; FIORENTINI, F.; MEINERZ, C.; SHIKIDA, S. Atividade Antimicrobiana Do Extrato de Açoita-cavalo (*Luehea* sp.). **Revista Brasileira de Agroecologia,** v.4, n. 2, 2009.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. (Ed.). Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009. p. 399 – 496.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M., ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C.; Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de Artemia salina Leach. de três espécies medicinais do gênero Phyllanthus (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.,** v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NASCIMENTO, I. M. Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno *Colletotrichum sp.* 2015. 101 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-29092015-111043/en.php>. Acesso em: 05/01/2017.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A. Wayne, PA, USA: NCCLS. 1997.

NESHICH, G. Inibidores das enzimas poligalacturonases de fungos fitopatogênicos. Patente Brasileira WO2013097012 A1. Julho de 2013.

NITSCHKE, J.; ALTENBACH, H-J.; MALOLEPSZY, T.; MÖLLEKEN, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 11, p. 1307-1310, 2011.

OLIVEIRA, V. B. Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das frondes da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. (DICKSONIACEAE). 2016. 171p. Tese de doutarado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/43530/R%20-%20T%20-%20VINICIUS%20BEDNARCZUK%20DE%20OLIVEIRA.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15/01/2017.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINANS, I. G.; BUELA, I. Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Revista Cubana Planta Médica,** v. 8, p. 395-400, 2001.

PALKOVÁ, Z.; Multicelular microorganism: laboratory versus nature. **EMBO Reports,** v.5, p.470-476, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 692 p, 2015.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.5, n.29, p.62-76, 2002.

PEREIRA, C. Q. M. Identificação de espécies de fungos causadores de onicomicoses em idosos institucionalizados no município de São Bernardo do Campo. 2012. 71p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-27072012-135045/pt-br.php>. Acesso em: 05/01/2017.

PINHO, P. G.; RIBEIRO, B.; GONÇALVEZ, R. F.; BAPTISTA, P.; VALENTÃO, P.; SEABRAL, R.M.; ANDRADE, P.B. Aroma compounds in eleven edible mushroom species: relationship between volatile profile and sensorial characteristics. 4th Annual Meeting of the Portuguese Proteonomics Network (Procura); 1st Meeting of the Portuguese National Mass Spectrometry Network (RNEM,) Aveiro, 2007.

POTATO DEXTROSE AGAR. HiMedia Laboratories. 2016. Ficha técnica.

POTATO DEXTROSE BROTH. HiMedia Laboratories. 2015. Ficha técnica.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PUTSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science,** v.6, n. 573, p. 1-23, 2015.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; ACOSTA-URDAPILLETA, L.; FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus.* **Biodegradation,** v. 22, n. 3, p. 565–572, 2011.

REINA, R.; KELLNER, H.; JEHMLICH, N.; ULLRICH, R.; GARCÍA-ROMERA, I.; ARANDA, E.; LIERS, C. Differences in the secretion pattern of oxidoreductases

from *Bjerkandera adusta* induced by a phenolic olive mill extract. **Fungal Genetics and Biology,** v.72, p. 99-105, 2014.

REIS, F.S.; STOJKOVIC, D.; BARROS, L.; GLAMOCLIJA, J.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, H.; MORALES, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Can Suillus granulatus (L.) Roussel be classified as a functional food? **Food & Function,** v. 5, p. 2861-2869, 2014.

RICHARDS, A. B.; KRAKOWKA, S.; DEXTER, L. B.; SCHMID, H.; WOLTERBEEK, A. P.; WAALKENS-BERENDSEN D. H.; SHIGOYUKI, A.; KURIMOTO, M. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology,** v.40, n.7, p.871-898, 2002.

RITCHIE, F.; BAIN, R. A.; MCQUILKEN, M. P. Effects of nutrient status, temperature and ph on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. **Journal of Plant Pathology,** v. 91, n. 3, p. 589-596, 2009.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry,** v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SADLER, M. Nutritional properties of edible fungi. **Nutrition Bulletin,** v. 28, p. 305–308, 2003.

SÁNCHEZ, F.; HONRUBIA, M.; TORRES, P. Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. **Cryptogamie Mycologie,** v. 22, n.4, p.243-258, 2001.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International,** v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTI, L. Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. 2005. 90p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8517/000578333.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04/01/2017.

SANTOS, F. E. M.; SOBROSA, R. C.; COSTA, I. F. D.; CORDER, M. P. M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild). **Ciência Florestal,** v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001.

SANTOS, E. R. D. Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos. Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils

obtained from different species of the Copaifera genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SARWAR, S.; KHALID, A. N. Diversity and Phylogeny of *Suillus* (Suillaceae; Boletales; Basidiomycota) from Coniferous Forests of Pakistan. **International Journal of Agriculture & Biology.** v. 16, n. 3, 2014.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research,** v.106, n. 9, p.996-1004, 2002.

SELLE, G.L.; VUADEN, E.; MURARI, A.B.; HACK, C.; FARIAS, J.A.; THOMAS, R. Biomassa radicular, densidade do solo e análise química do solo de um povoamento de *Pinus* sp. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais,** v. 6 n. 1, p.61 – 74, 2010.

SEYMOUR, F. A.; CRESSWELL, J. E.; FISHER, P. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HAAG, H.; TALBOT, N. J. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. **Fungal Genetics and Biology,** v. 41, n.7, p. 721-734, 2004.

SHARMA, G.; PANDEY, R. R. Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. **Journal of Yeast and Fungal Research,** v.1, n. 8, p. 157-164, 2010.

SILVA, F.B. Caracterização morfológica, fisiológica e patogênica de isoladas de *Armillaria sp*. da Região Sul do Brasil. 2014. 66p. **Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia Florestal)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <http://www.floresta.ufpr.br/defesas/pdf_dr/2014/t373_0440-D.pdf>. Acesso em: 20/06/2015.

SILVA, I. P. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 3888-3905, 2014.

SILVA, M.S. Fungos endofíticos: fontes promissoras de novas substâncias com atividades antioxidante e antiviral. 2009. 60p. **Monografia (Especialista em Microbiologia)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <http://www.microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/102.PDF>. Acesso em: 28/06/2015.

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

SINGH, R.; ELTIS, L.D. The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 574, p. 56–65, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteau reagent. **Methods in enzymology,** v. 299, p. 152- 172, 1999.

SIRI-IN, J.; KUMLA, J.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Culture Conditions and Some Properties of Pure Culture of Ectomycorrhizal Fungus, Scleroderma sinnamariense. **Chiang Mai Journal of Science,** v.41, n.2, p.275-285, 2014.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microregiões de Franca (SP) e Passos (MG). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** Campina Grande, v.10, n.3, p.612–618, 2006.

STEVENS, F. *Suillus caerulescens* Smith & Thiers. 1996. Disponível em: <http://www.mykoweb.com/CAF/species/Suillus_caerulescens.html>. Acesso em: 14/01/2017.

STRZELCZYK, E.; POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). **Plant and Soil,** v. 81, p. 185-194, 1984.

SUASSUNA, J. A cultura do Pinus: uma perspectiva e uma preocupação. Fundação Joaquim Nabuco. 1977. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&id=760&Itemid=376>. Acesso em: 19/05/2015.

TANAKA, J. C. A. S.; SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova,** v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TELLES, C. B. S. Análises estruturais e atividades biológicas de exopolissacarídeo extraído do fungo comestível *Pleurotus Sajor-Caju* e de seu derivado sulfatado quimicamente. 2010. 95 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioquímica, Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

TIBERIUS, B.; CATALIN, T. Optimization of nutritional conditions for the mycoremediation of the synthetic dyes. **Romanian Biotechnological Letters,** v. 18, n. 6, 2013.

TINOCO, M. L. P. Silenciamento trans-específico in vivo entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*. 2010. 60 p. **Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia Molecular)** – Universidade de Brasília, Brasília, 2010. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/8468/1/2010_MariaLainePenhaTinoco.pdf>. Acesso em: 28/12/2016.

TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; SAULEAU, P.; BÉZIVIN, C.; BOUSTILE, J. Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. **Pharmazie,** v. 59, n. 4, p.290-293, 2004.

TOMAZELLO FILHO, M.; KRÜGNER, T. S. Aspectos da associação micorrízica em *Pinus spp.* **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – Série Técnica.** Piracicaba, v.3, n.9, p. 1 – 32, Mar. 1982.

TONIAL, F. Bioprospecção de metabólitos secundários de endófitos de S*chinus terebinthifolius.* 2014. 90 p. **Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37263>. Acesso em: 04/04/2015.

TUITE, J. **Plant pathological methods.** Minneapolis: Burguess. 239p. 1969.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo Artemia sp. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

VERMA, B.; REDDY, M. S. *Suillus indicus* sp. nov. (Boletales, Basidiomycota), a new boletoid fungus from northwestern Himalayas, India. **Mycology,** v. 6, n.1, p.35–41, 2015.

WANG, Y-H.; TANG, J-G.; WANG, R-R.; YANG, L-M.; DONG, Z-J.; DU, L.; SHEN, X.; LIU, J-K.; ZHENG, Y-T. Flazinamide, a novel b-carboline compound with anti-HIV actions. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 355, p. 1091-1095, 2007.

WESTPHALEN, M. C.; TOMSOVSKY, M.; KOUT, J.; GUGLIOTTA, A. M. Bjerkandera in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of Tyromyces atroalbus and description of a new species. **Mycological Progress,** v.14, n.100, p.1-8, 2015.

WHO. 1981a. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Geneva.

WHO. 1981b. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides.** Geneva.

WILLIAMSON, M. R.; ROTHROCK, C. S.; MUELLER, J. D. First Report of Rhizoctonia Foliar Blight of Soybean in South Carolina. **Plant Health Progress,** 2006.

XU, L., WANG, X-H.; LUO, R-Y.; LU, S-Q.; GUO, Z-J.; WANG, M-A.; LIU, Y.; ZHOU, L-G. Secondary metabolites of rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn and their biological activities. **Journal of Integrative Agriculture,** v.14, n. 1, p. 80–87, 2015.

YEN, M-T.; MAU, J-L. Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes. **LWT,** v.40, p.558-563, 2007.

ZANÃO, L. R. Avaliação de fungos e complexos de salen na obtenção do metabólito quiral e ativo terbutalina. 2013. 83 p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química)** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-26112013-203126/publico/Dissertacao_Lidia_corrigida.pdf>. Acesso em: 27/03/2016.

ZEMKO, M. M. *Bjerkandera* sp. 2007. Disponível em: <http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=79115>. Acesso em: 14/01/2017.