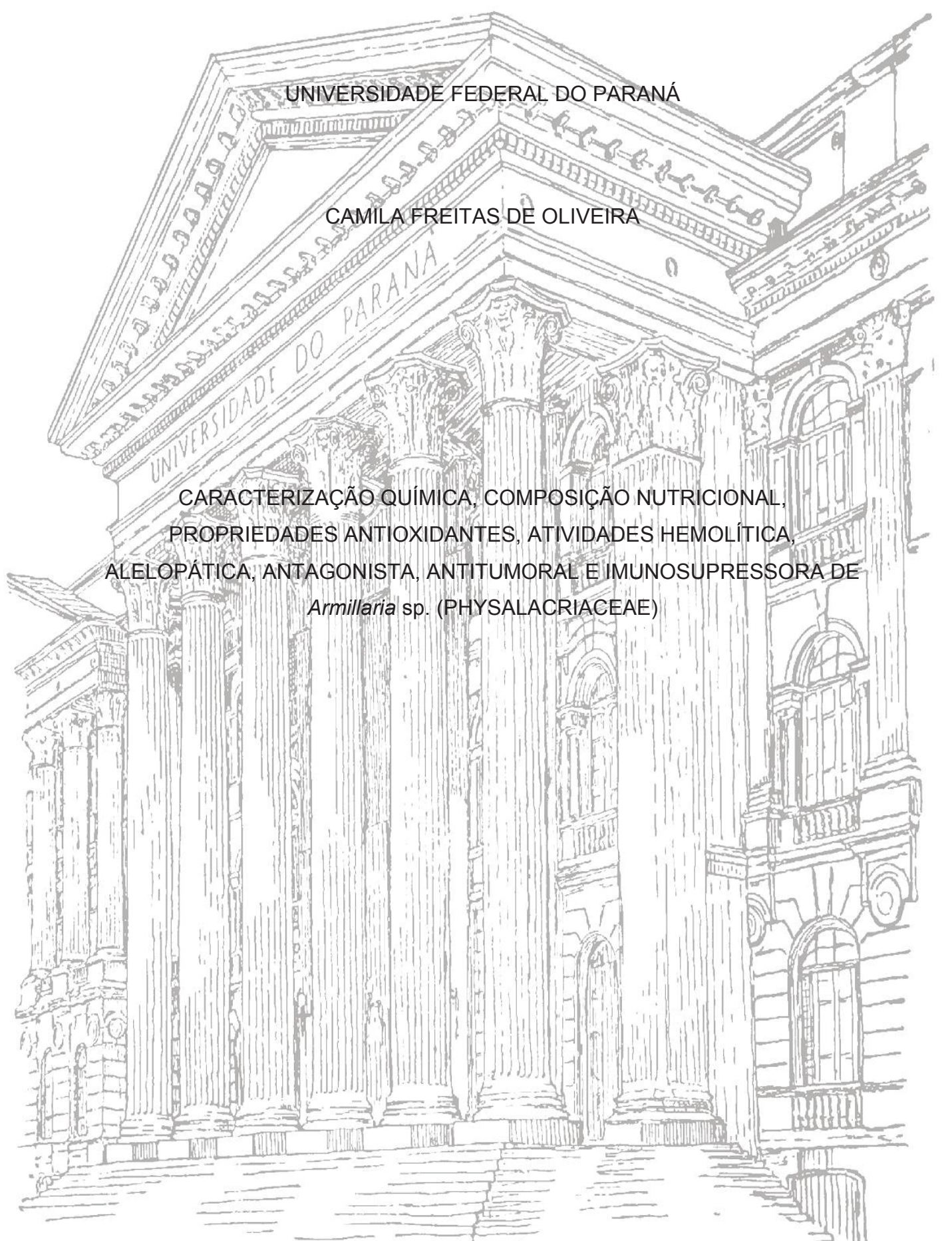




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES HEMOLÍTICA,
ALELOPÁTICA, ANTAGONISTA, ANTITUMORAL E IMUNOSUPRESSORA DE
Armillaria sp. (PHYSALACRIACEAE)

CURITIBA

2019

CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL,
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES HEMOLÍTICA,
ALELOPÁTICA, ANTAGONISTA, ANTITUMORAL E IMUNOSUPRESSORA DE
Armillaria sp. (PHYSALACRIACEAE)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como pré-requisito para o título de Doutora.

Orientadora: Prof.^a Dra Marilis Dallarmi Miguel

Coorientores: Prof. Dr. Celso Garcia Auer
Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2019

Oliveira, Camila Freitas de

Caracterização química, composição nutricional, propriedades antioxidantes, atividades hemolítica, alelopática, antagonista, antitumoral e imunossupressora de *Armillaria* sp. (Physalacriaceae) [recurso eletrônico] / Camila Freitas de Oliveira – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dalarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

1. Quitina. 2. Polissacarídeos. 3. Ácidos graxos. 4. Ácido benzoico. I. Miguel, Marilis Dalarmi. II. Auer, Celso Garcia. III. Miguel, Obdulio Gomes. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADES HEMOLÍTICA, ALELOPÁTICA, ANTAGONISTA, ANTITUMORAL E IMUNOSUPRESSORA DE *Armillaria sp* (PHYSALACRIACEAE)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

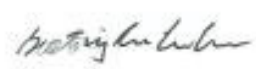
CURITIBA, 29 de Março de 2019.


MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora


RANIERI CAMPOS
Avaliador Externo (UFAM)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UFPR)


SANDRO JOSÉ RIBEIRO BONATTO
Avaliador Externo (IPPP)


BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA
Avaliador Externo (UFPR)

Aos meus pais, Maria Lúcia e Dirceu e ao meu esposo, Paulo Ricardo

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre guiar meu caminho, abençoando e iluminando minha formação.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Dirceu, pelo amor incondicional, ensinamentos e todo incentivo que foi fundamental para a formação do meu caráter.

Ao meu marido, Paulo Ricardo, que sempre esteve ao meu lado durante todo esse trajeto, sendo meu pilar nas horas difíceis. Obrigada por sua compreensão, carinho e incentivo.

Aos meus irmãos, Daniel e Fernanda, melhor presente que Deus poderia ter me dado. Obrigado por serem meus companheiros e fazerem parte da minha vida.

Aos meus avôs maternos, pelas orações, e aos avôs paternos pelas interseções.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por me proporcionarem essa oportunidade.

Aos meus orientadores, Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel, Dr. Celso Garcia Auer e Dr. Obdulio Gomes Miguel, agradeço de todo coração os seus ensinamentos, carinho, confiança, dedicação, amizade e os conselhos que irei levar para vida toda.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por repassarem seus conhecimentos. Em especial a Dr^a. Josiane de Fátima Gaspari Dias, Dr^a. Sandra W. Zanin e Dr. Vitor Kerber pela amizade e ensinamentos.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da UFPR pela realização do RMN, CG-MS e Raio-x, que auxiliaram na determinação da composição química.

Ao Instituto Pequeno Príncipe, aos alunos e funcionários em especial aos professores Dr. Sandro Bonatto e Dr. Lauro M. de Souza por disponibilizarem os laboratórios e auxiliarem na realização dos ensaios antitumorais e investigação da composição química do óleo.

Aos técnicos Paulo, Maria da Graça, Mauricio e Jair por toda a ajuda.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e doutorado que levarei além da vida. Fernando Betim, minha dupla, a quem tenho maior carinho e admiração, por toda sua ajuda e amizade. Angela Maria Souza, pelo companheirismo, amizade e auxílio na realização das análises. Susan Weber, pelas tardes de descontração, pela sua amizade e companheirismo. As minhas amigas Katlin Rech e Paula Moura, que fizeram parte desse projeto, por todo o carinho, amizade e compreensão e auxílio nas análises.

As amigas Cristiane, da Silva Paula e Beatriz Hirota, por toda a ajuda durante o doutorado e pelo carinho sendo exemplo a ser seguido.

A minha amiga Vanessa Barbosa Bobek, que me incentivou a entrar no mestrado e esteve ao meu lado durante todos esses anos, como amiga e companheira de pesquisa.

A minha amiga Hellen Abreu por toda ajuda na identificação do polissacarídeo.

Aos meus colegas André Gollo e Yohans Martines pela ajuda na análise antitumoral e imunomodulatória.

Ao grupo de pesquisa GPPN-UFPR, por toda ajuda e contribuição nesta pesquisa.

RESUMO

Armillaria é um fungo fitopatogênico que ataca diversas plantas principalmente as lenhosas. Espécies desse gênero são utilizadas na alimentação e produção de medicamentos. Este estudo teve como objetivo investigar a composição química e avaliar as atividades biológicas e antioxidante dos extratos de micélio e caldo de cultivo de uma espécie de *Armillaria*. O micélio foi cultivado em caldo batata dextrose por 35 dias a 20 °C no escuro. O micélio foi liofilizado, o caldo de cultivo concentrado em estufa, e submetidos a extração por Soxhlet separadamente. Verificou-se a composição nutricionais do micélio. Os extratos foram submetidos a análise química preliminar. O extrato hexânico (EH) analisado por ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas. Cristal isolado do extrato acetato de etila do micélio (EAEM) foi analisado por cristalografia de Raio X. A fração polissacarídica (P1) foi extraída do micélio e caracterizada por ressonância magnética nuclear, cromatografia e análises colorimétricas. Os extratos foram submetidos a ensaios de doseamento de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteou; atividades antioxidantes pelos métodos de DPPH, fosfomolibdênio, Azul da Prússia e TBARS; avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*; atividade hemolítica; alelopática; e antimicrobiana. Os extratos e P1 foram submetidos a atividade antitumoral e imunomoduladora. Os micélios de fungos fitopatogênicos foram submetidos a análise antagonista. O micélio de *Armillaria* sp. apresentou: umidade 18,9%; proteína 6,1%; lipídeos 3,2%; carboidratos 55,5%; fibras brutas 16,3%; teor de quitina 7,6%. Os extratos apresentam compostos fenólicos, esteroides e terpenos. No EH foi identificado ácido benzoico, ácido láurico e ácido palmítico e no EAEM D-Treitol. No P1 foi identificado a fucogalactana, com presença de galactose (44,1%), glicose (30,7%), manose (17,5%), fucose (8,1%) e apresentou compostos fenólicos (47,1 mg.EAG.g⁻¹) e carboidratos (90,38%). O extrato acetato de etila do caldo de cultivo (EAEC) apresentou maior concentração de compostos fenólicos (132,2 mg.EAG.g⁻¹). Os extratos apresentaram redução do complexo fosfomolibdênio, atividade oxirredutora e redução da peroxidação lipídica, mas a redutora de radical livre foi observada somente no EAEC. Não foi observada toxicidade frente a *A. salina*. A atividade hemolítica foi observada no extrato bruto (EB) (500 µg.mL⁻¹) e EH (200, 500 e 1000 µg.mL⁻¹). No ensaio alelopático o EB estimulou a germinação das sementes de *L. sativa* e o EAEC estimulou a germinação das sementes de *A. cepa*. O crescimento da radícula e do hipocótilo foi influenciado em diferentes tratamentos. Observou-se atividade antimicrobiana do EB (250 µg.mL⁻¹) frente *Candida parapsilosis*, EH (150 µg.mL⁻¹) e extrato clorofórmico (250 µg.mL⁻¹) contra *Enterococcus faecalis* e EAEC (500 µg.mL⁻¹) contra *Escherichia coli*. Todos os extratos apresentaram atividade antitumoral contra células da linhagem H295R. A maioria dos extratos apresentaram ação imunossupressora, porém o efeito imunoestimulante foi observado pela P1 e EC. Os fungos apresentaram diferentes índices antagonistas, com destaque para o *Diplodia pinea* e *Botrytis cinerea*. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a caracterização do gênero *Armillaria*.

Palavras chaves: Quitina. Polissacarídeos. Ácido graxo. Ácido benzoico.

ABSTRACT

Armillaria is a phytopathogenic fungus that attacks several plants, mainly the woody plants. Species of this genus are used as food and production of medicines. This study aimed to investigate the chemical composition and to evaluate the biological and antioxidant activities of the mycelium and culture medium extracts from one *Armillaria* species. The mycelium was cultivated in potato dextrose medium for 35 days at 20 °C in the dark. The mycelium was lyophilized, and the culture medium concentrated in incubator, and submitted to extraction in Soxhlet separately. It was found the nutritional composition of the mycelium. The extracts were submitted to preliminary chemical analysis. The hexane extract (EH) evaluated using nuclear magnetic resonance and gas chromatography coupled to mass spectrometry. Isolated crystal of the ethyl acetate extract of the mycelium (EAEM) was evaluated by X-ray crystallography. The polysaccharidic fraction (P1) was extracted of the mycelium and characterized using nuclear magnetic resonance, chromatography and colorimetric analyses. The extracts were submitted to total phenol assays by Folin Ciocalteou method; antioxidant activities by the DPPH, phosphomolibdemium, Prussian Blue and TBARS methods; evaluation of the toxicity front *Artemia salina*; hemolytic activity; allelopathic; and antimicrobial. The extracts and P1 were submitted to the antitumoral and immunomodulatory activity. The mycelium of these phytopathogenic fungi were submitted to antagonist analysis. The mycelium from *Armillaria* sp. showed: moisture 18.9%; protein 6.1%; lipids 3.2%; carbohydrates 55.5%; crude fibers 16.3%; chitin content 7.6%. The extracts showed phenolic compounds, steroids and terpenes. In the EH was identified the benzoic acid, lauric acid and palmitic acid and in the EAEM D-Treitol. In the P1 was identified the fucogalactane, with the presence of galactose (44.1%), glyucose (30.7%), mannose (17.5%), fucose (8.1%) and showed phenolic compounds (47,1 mg.EAG.g⁻¹) and carbohydrates (90.38%). The ethyl acetate extract of the culture medium (EAEC) showed large concentration of phenolic compounds (132,2 mg.EAG.g⁻¹). The extracts showed reduction of the complex phosphomolibdemium, oxireduct activity and reduction of the lipid peroxidation but the reduction activity was observed only in the EAEC. It was not observed toxicity front *A. salina*. The hemolytic activity was observed in the brute extract (EB) (500 µg mL⁻¹) and EH (200, 500, and 1000 µg mL⁻¹). In the allelopathic assay the EB stimulated the germination of *L. sativa* seeds and the EAEC stimulated the germination of the *A. cepa* seeds. The growth of radicle and the hypocotyl was influenced in different treatments. It was observed antimicrobial activity of the EB (250 µg mL⁻¹) front *Candida parapsilosis*, EH (150 µg mL⁻¹) and chloroform extract (250 µg mL⁻¹) against *Enterococcus faecalis* and EAEC (500 µg mL⁻¹) against *Escherichia coli*. All the extracts showed antitumor activity against cells of the H295R lineage. Most of the extracts showed immunosuppressor action, however the immunostimulant effect was observed by the P1 and EC. The fungi showed different antagonist index, with spotlight for the *Diplodia pinea* and *Botrytis cinerea*. The results obtained in this study can contributed for the characterization of the *Armillaria* genus.

Keywords: Chitin. Polysaccharides. Fat acid. Benzoic Acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COGUMELOS DE <i>Armillaria</i> EM ÁRVORE DE <i>Pinus</i>	27
FIGURA 2 - ESTRUTURAS QUÍMICAS ISOLADAS DO GÊNERO <i>Armillaria</i> ...	28
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DAS ATIVIDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS REALIZADAS COM MICÉLIO E CALDO DE CULTURA DE <i>Armillaria</i> sp.....	39
FIGURA 4 - CRESCIMENTO DO MICÉLIO DE <i>Armillaria</i> sp. CULTIVADO EM BATATA DEXTROSE.....	40
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROVENIENTES DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.....	46
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA.....	53
FIGURA 7 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DA QUITINA EXTRAÍDA DO MICÉLIO DE <i>Armillaria</i> sp.	75
FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO.....	78
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50,32 MHz, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO.....	78
FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO HEXANO DE <i>Armillaria</i> sp. ..	80
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSAS DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO EXTRATO HEXANO DE <i>Armillaria</i> sp.	81
FIGURA 12 - ARRANJO DOS ÁTOMOS DO D-TREITOL COM 30% DA PROBABILIDADE DA DENSIDADE DE ELETRÔNICA.....	82
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO LIGANDO AS MOLÉCULAS DE D-TREITOL E ÁGUA AO LONGO DO EIXO C	83
FIGURA 14 - HPSEC-MALLS FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp.	85
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100,6 MHz, D_2O , 70 °C) DA FRAÇÃO P1.....	86
FIGURA 16 - MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC-DEPT (400,1 MHz, D_2O , 70 °C) DA FRAÇÃO P1.....	87

FIGURA 17 – CRESCIMENTO (%) DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE <i>L. sativa</i> E <i>A. cepa</i> SUBMETIDOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp. PELO ENSAIO ALELOPÁTICO	104
FIGURA 18 - CONTROLES UTILIZADOS PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE A LINHAGEM H295R	112
FIGURA 19 - ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp. FRENTE A LINHAGEM H295R PELO METODO DE LIVE/DEAD	113
FIGURA 20 - MORFOLOGIA DE COLÔNIAS MICELIAIS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	118
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE OS FUNGOS	119

LISTAS DE QUADROS

QUADRO 1- COMPOSTOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIES DE <i>Pinus</i>	29
QUADRO 2 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE <i>Pinus</i>	30
QUADRO 3 - DADOS CRISTALOGRAFICOS DO CRISTAL ARMI200	51
QUADRO 4 - REAÇÕES COMPETITIVAS ENTRE MICÉLIO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE <i>Pinus</i>	118

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DIÂMETRO DOS HALOS FORMADOS A PARTIR DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE.....	96
GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>) SUBMETIDA AOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp.	99
GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE CEBOLA (<i>Allium cepa</i>) SUBMETIDA AOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp.....	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FUNGOS ISOLADOS DE <i>Pinus</i> EMPREGADOS NO ENSAIO DE ANTAGONISMO	38
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA OS EXTRATOS	48
TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MINIMA	64
TABELA 4 - ANÁLISE PROXIMAL DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MICÉLIO DE <i>Armillaria</i> sp.....	72
TABELA 5 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.....	76
TABELA 6 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.....	77
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (200,13 MHz, 50,32 MHz, PPM, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO .	79
TABELA 8 - PROPRIEDADES BIOLÓGICAS ENCONTRADAS NOS ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO HEXANO	82
TABELA 9 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO, DISTÂNCIAS EM ÂNGSTROMS E ÂNGULOS EM GRAUS [°]	83
TABELA 10 - DOSAGENS COLORIMÉRICAS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp.	88
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTATOS DE <i>Armillaria</i> sp. OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE ÁCIDO GÁLICO	89
TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO A VITAMINA C E A RUTINA DOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp.	91
TABELA 13 - PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA) DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.....	92
TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp. PELO MÉTODO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	93

TABELA 15 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp. FRENTE <i>Artemia salina</i>	94
TABELA 16 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE <i>Armillaria</i> sp. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	95
TABELA 17 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	98
TABELA 18 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DAS SEMENTES DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	100
TABELA 19 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO (cm) DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>) SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	102
TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE CEBOLA (<i>Allium cepa</i>) SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	103
TABELA 21 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E DO CALDO DE <i>Armillaria</i> sp.	107
TABELA 22 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS H295R E CACO-2 PELO MÉTODO MTT APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp.	109
TABELA 23 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS H295R PELO MÉTODO LIVE DEAD APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp.	114
TABELA 24 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE <i>Armillaria</i> sp. SOBRE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW264.7	115

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorbância
AAR	Atividade Antioxidante Relativa
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de cultura Americana)
BD	Batata dextrose
BDA	Ágar batata dextrose
BHT	Butil hidróxidotolueno
CAC	Carcinoma adrenocortical
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ Cl ₃	Clorofórmio delterado
CG	Cromatografia gasosa
CI _{50%}	Concentração Inibitória 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL _{50%}	Concentração letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH•	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EAEM	Extrato acetato de etila do micélio
EAEC	Extrato acetato de etila do caldo
EB	Extrato Bruto
EC	Extrato hexânico
EH	Extrato clorofórmico
EHA	Extrato hidroalcoólico
EMEOH	Extrato metanólico
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i> (Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier)
He	Hélio
IVG	Índice de velocidade de germinação
MAO	Monoamina Oxidase Periférica
MDA	Malonaldeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
PBS	Tampão fosfato-salino

pH	Potencial Hidrogeniônico
QSP	Quantidade Suficiente Para
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO	23
3.1 FUNGOS	23
3.1.1 Composição nutricional	24
3.1.2 Polissacarídeos	25
3.2 GÊNERO <i>Armillaria</i>	26
3.3 O GÊNERO <i>Pinus</i>	28
3.4 APLICAÇÕES DOS PRODUTOS NATURAIS EM ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS	30
3.4.1 Atividade antioxidante	30
3.4.2 Avaliação da toxicidade.....	31
3.4.4 Atividade antimicrobiana	36
3.4.5 Atividade antagonista em cultura dupla.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL FUNGICO E FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	38
4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE <i>Armillaria</i> sp.	39
4.3 LIOFILIZAÇÃO DO MATERIAL FÚNGICO	40
4.4 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	40
4.4.1 Umidade por dessecação.....	41
4.4.2 Cinzas totais.....	41
4.4.3 Proteína.....	41
4.4.4 Teor de lipídios.....	42

4.4.5 Fibra bruta	43
4.4.6 Determinação de Carboidratos	44
4.4.7 Valor Energético total	44
4.4.8 Análise de quitina	44
4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	45
4.5.1 Extratos do micélio	46
4.5.2 Extrato do caldo de cultivo	47
4.6 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	47
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUENTES QUÍMICOS	48
4.7.1 Extrato hexano (EH) do micélio	48
4.7.2 Extrato acetato de etila do micélio (EAEM)	49
4.8 ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO	52
4.8.1 Deslipidificação do micélio fúngico	52
4.8.2 Obtenção da fração polissacarídica	52
4.8.3 Caracterização estrutural dos polissacarídeos	53
4.8.4 Análises físico-químicas da fração polissacarídica	55
4.9 ANÁLISE REALIZADA PARA OS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	57
4.9.1 Detecção de compostos fenólicos totais	57
4.9.2 Avaliação da atividade antioxidante	57
4.9.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor (Azul da Prússia)	59
4.9.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de TBARS	59
4.9.3 Avaliação da toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	60
4.9.4 Avaliação da atividade hemolítica	61
4.9.5 Avaliação da atividade alelopática	62
4.9.6 Avaliação da atividade antimicrobiana	63

4.9.7 Avaliação da atividade antitumoral	65
4.9.7.1 Ensaio de Viabilidade celular pelo método colorimétrico (MTT)	65
4.9.8 Atividade imunomodulatória	66
4.10 ATIVIDADE ANTAGONISTA ENTRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A <i>Pinus</i>	70
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	72
5.1.1 Análise de quitina	74
5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E DO CALDO DE CULTIVO	76
5.3 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	76
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUÍNTES QUÍMICOS	77
5.4.1 Extrato hexano (EH) do micélio	77
5.4.2 Extrato acetato de etila do micélio (EAEM)	82
5.5.1 Obtenção da fração polissacarídica	85
5.5.2 Caracterização estrutural dos polissacarídeos	85
5.5.3 Análises físico-químicas da fração polissacarídica	88
5.6 ANÁLISE REALIZADA PARA OS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE <i>Armillaria</i> sp.	88
5.6.1 Detecção de compostos fenólicos totais	88
5.6.2 Avaliação da atividade antioxidante por diferentes métodos	90
5.6.3 Avaliação da toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	94
5.6.4 Avaliação da atividade hemolítica	94
5.6.4 Avaliação da atividade alelopática	97
5.6.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	106
5.6.6 Avaliação da atividade antitumoral	108

5.6.7 Atividade imunomodulatória	114
5.7 ATIVIDADE ANTAGONISTA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A <i>Pinus</i>	117
6 CONCLUSÕES.....	122
7 RECOMENDAÇÕES FINAIS.....	124
REFERÊNCIAS.....	125
ANEXO I.....	155
ANEXO II.....	158

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos de origem natural representam um número expressivo no mercado farmacêutico, e entre 1981 a 2014. Aproximadamente 65% dos medicamentos de uso clínico eram oriundos de produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os produtos naturais geralmente são definidos como moléculas bioativas de baixo peso molecular, produzidos pela via metabólica secundária dos seres vivos como plantas, organismos marinhos e alguns micro-organismos (bactérias e fungos).

Os fungos apresentam, em seu metabolismo secundário, a capacidade de produzir diversas macro e micromoléculas. As mais conhecidas são as micotoxinas, substâncias químico-tóxicas, responsáveis pela contaminação de alimentos, entretanto os fungos também produzem moléculas farmacológicas com fins terapêuticos como as penicilinas, cefalosporinas e papulacandinas (atividade antimicrobiana) e as mevinolinas (ação hipocolesterolêmica) (KELLER et al., 2005; CAMPO; CARVALHO, 2007; BHAT et al., 2010). Outras substâncias isoladas de fungos apresentaram também atividade antiparasitária e imunossupressora (FLORES et al., 2008; BHAT et al., 2010).

Os estudos referentes a fungos fitopatogênicos são escassos, porém apresentam interesse científico, devido a sua extensa aplicabilidade. Algumas espécies de fungos do gênero *Armillaria*, foram estudadas em relação a sua composição química, nutricional, e atividades biológicas. Esses estudos têm demonstrado promissoras atividades antioxidantes, antitumorais, hipoglicêmicas e antimicrobianas (OOI; LIU, 2000; POUCHERET et al., 2006; ALVES et al., 2013; CHEN et al., 2015).

Dentre os principais interesses em pesquisas com fungos está a produção de polissacarídeos, devido a sua diversidade estrutural. Esses biopolímeros podem apresentar inúmeras atividades biológicas tais como antitumoral, imunomoduladora, antiviral, anti-inflamatória e hipoglicêmica (SILVA et al., 2006; TIAN et al., 2017).

A composição nutricional dos fungos é outra característica que merece destaque, uma vez que são reconhecidos como fonte de proteínas, carboidratos

e minerais com baixo teor de gordura. Tal característica torna os fungos alimentos potenciais no controle de diabetes e doenças cardiovasculares (WANG et al., 2014; LIU et al., 2016).

Moléculas bioativas derivadas de produtos naturais apresentam interesse no mercado farmacêutico. Entre 1995 a 2017 foram depositadas 1.977 patentes referentes a fitoterápicos no Instituto Nacional da Propriedade industrial (INPI) (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2017). Dados do banco IMS Health demonstram que em 2014 os fitoterápicos renderam ao mercado farmacêutico brasileiro faturamento de 1,1 bilhão de reais (CFF, 2016).

Portanto, visto que algumas espécies de *Armillaria* ainda não foram exploradas quanto à sua análise nutricional, composição química, atividades biológicas e antioxidantes, pode-se observar a importância da pesquisa com esse gênero em busca de novas substâncias que apresentem atividades farmacológicas, o que justifica a atual pesquisa.

Este estudo faz parte do projeto de concedido pelo edital CAPES/Embrapa número 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”.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as propriedades nutricionais, químicas, biológicas, antioxidantes e toxicológicas a partir do micélio e caldo de cultivo de *Armillaria* sp., e avaliar a atividade antagonista frente a fungos fitopatogênicos de *Pinus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a composição nutricionais do micélio de *Armillaria* sp. liofilizado;
- Realizar a extração de micélio liofilizado e do caldo de cultivo de *Armillaria* sp.;
- Realizar triagem química por meio de Cromatografia em Camada Delgada dos extratos;
- Isolar e identificar as substâncias presentes nos extratos;
- Fracionar, isolar e caracterizar a fração polissacarídica do micélio em diferentes condições;
- Realizar as dosagens colorimétricas dos polissacarídeos obtidos do micélio;
- Investigar a presença de substâncias fenólicas e avaliar a atividades antioxidantes dos extratos;
- Avaliar a toxicidade dos extratos frente a *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade hemolítica, alelopática e antimicrobiana dos extratos;
- Avaliar a atividade antitumoral dos extratos e fração polissacarídica;
- Avaliar a atividade imunomodulatória em macrófagos dos extratos e fração polissacarídica;
- Avaliar a atividade antagonista entre fungos fitopatogênicos (*Armillaria* sp., *Bjerkandera adusta*, *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea*, *Rhizoctonia* sp.).

3 REVISÃO

3.1 FUNGOS

Os fungos representam o segundo maior grupo de seres vivos, perdendo somente para os insetos. Uma diversidade dos metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos, como: terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, citocalasinas, eniatinas, isocumarinas, benzopironas e tetralonas, estimulou pesquisas na área agrícola para utilização como inseticidas, fungicidas e herbicidas (PINTO et al., 2002; SCHULZ et al., 2002).

Eles podem estar associados a plantas de diversas formas: endofíticos, fitopatogênicos e epifíticos. Os fungos endofíticos são encontrados no interior das plantas, e habitam suas partes aéreas, caules e raízes sem causar danos ao hospedeiro. Os fitopatogênicos podem causar doenças, e os epifíticos vivem no interior ou superfície da planta e são considerados patógenos latentes (AZEVEDO, 1988).

Alguns fungos fitopatogênicos podem causar diferentes doenças em *Pinus* como: deterioração de sementes, tombamento de mudas, podridão de raiz, queima e mancha de acículas, morte da árvore, entre outras (AUER; SANTOS, 2016). Pode-se citar como exemplos de fungos fitopatogênicos os pertencentes aos gêneros *Armillaria*, *Cylindrocladium*, *Diplodia*, *Dothistroma*, *Fusarium*, *Pythium* e *Rhizoctonia* (MIYAUCHI, 2012).

Os fungos são utilizados na alimentação principalmente por serem ricos em proteínas, fibras e carboidratos e apresentarem baixo teor de lipídeos, podem ser usados como alimento funcional e na substituição de carne. Os principais tipos de fibras produzidos pelos fungos são a quitina e os β -glucanos (SADLER, 2003).

As principais moléculas bioativas presentes em fungos são os polissacarídeos e proteoglicanos. Esses metabólitos caracterizam-se por apresentarem atividade antitumoral e promovem o aumento das funções do sistema imunológico (SMITH et al, 2002). Entre os metabólitos secundários originários de fungos, pode-se ressaltar as seguintes classes: policetídeos, terpenos, esteroides, alcaloides e compostos fenólicos (SADLER, 2003;

KELLER et al., 2005; KIM et al., 2008; DONG et al., 2012; WANG et al., 2014) (KELLER et al., 2005; WANG et al., 2014).

Sabe-se que a maior descoberta da ciência foi realizada por Alexander Fleming em 1928, que ao estudar o *Penicillium chrysogenum* Thom (= *Penicillium notatum*) identificou a penicilina, foi o primeiro antibiótico natural produzido em alta escala na década de 40 (KOROLKOVAS; BURKHALTER, 1988). Outros antibióticos betalactâmicos são derivados de fungos como, por exemplo, as cefalosporinas (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Foi isolado de fungos medicamentos redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina e imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina (CRAGG; NEWMAN, 2005; GREVE et al., 2010).

Os fungos também são conhecidos por produzirem substâncias tóxicas ao organismo como aflatoxinas, polipeptídeos, hepatopeptídeos e amatoxinas, as quais são capazes de causar vômitos, diarreia, dores abdominais e insuficiência renal (SADLER, 2003).

3.1.1 Composição nutricional

Os fungos são fontes naturais de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais, com baixo teor de gordura. Muitos são considerados alimentos nutracêuticos e funcionais, pois além de apresentarem vários nutrientes e suplementos alimentares, também apresentam diversos benefícios à saúde para a prevenção de doenças (RATHEE et al., 2012; WANG et al., 2014).

O teor de proteínas desses micro-organismos geralmente é alto, porém são deficientes em aminoácidos, desse grupo os mais relatados são treonina, valina, lisina, leucina, isoleucina e o triptofano. As vitaminas mais encontradas são: a riboflavina, niacina e os folatos. A concentração de carboidratos dos fungos pode chegar a 70%, o que demonstra o alto teor de oligossacarídeos e poucos açúcares solúveis totais. As fibras brutas fazem parte do grupo de carboidratos, apresentam baixa digestibilidade e seu teor pode variar entre 4-40%. Os ácidos graxos são encontrados em baixo teor (2-8%), em que os mais significativos são ácido oleico, linoleico e palmítico (RATHEE et al., 2012; WANG et al., 2014).

Devido a valiosa fonte de nutrientes e ao sabor agradável, os micro-organismos, principalmente na forma de cogumelos, são utilizados mundialmente na alimentação. Como exemplos, pode-se citar o lingzhi (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.), shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), e yiner (*Tremella fuciformis* Berk) (ZHANG et al., 2010; WANG et al., 2014).

3.1.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos representam uma classe de metabólitos, com ampla distribuição na natureza. São presentes em plantas, bactérias, fungos, algas e animais, e são extremamente importantes para a área médica. Estes polímeros apresentam alto peso molecular e caracterizam-se pela ligação glicosídica entre moléculas de monossacarídeo. Esta ocorre entre a hidroxila hemiacetálica em C – 1, com qualquer hidroxila da outra molécula de monossacarídeo, e elimina uma molécula de água (SIMÕES et al., 2017).

Os metabólitos bioativos são amplamente encontrados em fungos e podem ser isolados do micélio, corpo frutífero e do esclerócio. Diversas atividades foram reportadas em relação aos polissacarídeos, entre elas cabe destacar às atividades antitumoral, hepatoprotetora, hipocolesterolemia, hipoglicêmica, imunomoduladora, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antitrombótica. Alguns polissacarídeos derivados de fungos são comercializados atualmente para o tratamento de neoplasias, que são: sizofilano, lentinano, grifolano (complexo polissacarídeo-peptídeo) e PSK (complexo polissacarídeo-proteína) (ZHANG et al., 2007).

Os polissacarídeos podem ser classificados como homoglicanos, os quais são provenientes da condensação de moléculas do mesmo monossacarídeo, heteroglicanos que são formados pela condensação de tipos diferentes de monossacarídeo e polissacarídeo-proteína, em que os polissacarídeos estão ligados a proteína (ZHANG et al., 2007; SIMÕES et al., 2017).

Em relação ao gênero *Armillaria* foram descritos polissacarídeos para as espécies *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm, com ação neuroprotetora, antitumoral e antioxidante (WU et al., 2012; AN et al., 2017); *Armillaria ostoyae*

(Romagn.) Herink e *Armillaria cepistipes* Velen, com atividade antioxidante (SIU, 2015).

3.2 GÊNERO *Armillaria*

O gênero *Armillaria* pertence ao reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Agaricomycota, ordem Agaricales e família Physalacriaceae. Foram registradas aproximadamente 200 espécies desse gênero em diversas regiões do mundo (MYCOBANK, 2018). As espécies de *Armillaria* são comuns em regiões temperadas, tropicais e subtropicais. Na América do Sul os fungos desse gênero são bastante comuns, porém apresentam poucos estudos, o que dificulta a identificação de espécies desse gênero (WINGFIELD et al., 2003).

As espécies do gênero *Armillaria* são fitopatogênicas e podem atacar principalmente plantas lenhosas (frutíferas, coníferas, ornamentais e arbustivas), e podem causar podridão de raiz ou armilarirose. Uma das principais plantas hospedeiras são do gênero *Pinus*, em que ataca principalmente as raízes e o tronco (WINGFIELD et al., 2003). Pode infectar o floema e o câmbio e causar a separação entre a casca e o lenho o que levar a morte do hospedeiro (GOMES et al., 2007).

Este gênero está distribuído nos cinco continentes. Na Europa as espécies de predominância são *A. mellea* e *A. ostoyae* (PINTOS et al., 2013). No Brasil o primeiro registro foi em 1962, em que a espécie *A. mellea* foi relatada por atacar as raízes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* (AUER et al., 2004). A armilarirose já foi constatada em *Pinus*, Araucária e Eucaliptos, nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Essa doença já foi observada nas espécies *P. elliotti* var. *elliotti*, *Pinus taeda* L. e *Pinus patula* Schltdl & Cham (AUER; SANTOS, 2016).

Os fungos do gênero *Armillaria*, são encontrados na forma de cogumelos comestíveis (Figura 1) e podem apresentar propriedades medicinais. A espécie *A. mellea*, por exemplo, é comumente utilizada na medicina chinesa. Pesquisas relatam a presença de sesquiterpenos, ácidos orgânicos, esteroides, nucleosídeos e polissacarídeos nesta espécie. Também foram reveladas diversas atividades farmacológicas, utilizada principalmente para tratamento de

vertigens, dormência nos membros, insônia, convulsão infantil entre outras. Devido essas características, a espécie é utilizada na fabricação de medicamentos na China (ZHENG et al., 2009; KOBORI et al., 2014).

FIGURA 1 - COGUMELOS DE *Armillaria* EM ÁRVORE DE *Pinus*



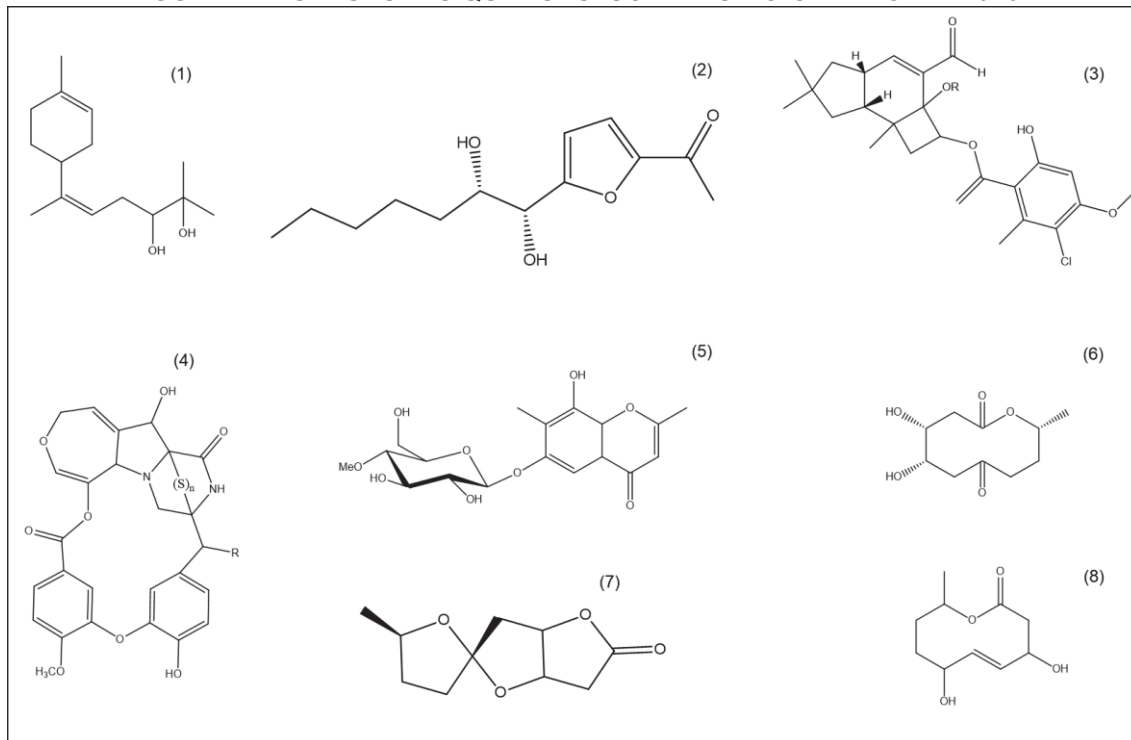
Fonte: Auer et al., (2004).

Em relação aos compostos químicos foram isolados de *A. mellea* o armillariol A e C. Tais compostos apresentaram atividade antimicrobiana sob *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae* (ODURO et al., 1976), além de outros compostos como a armillaridina e 4-O-metilarmillaridina que inibiram o crescimento da linhagem de células leucêmicas (K-562) (BOHNERT et al., 2011) e adenocarcinoma (MCF-7) (MISIEK et al., 2009).

Outra espécie que merece destaque é *Armillaria tabescens* (Scop.) Emel, a partir da qual foi possível identificar diversos metabólitos secundários, como: a emestrina, emestrina-F, estrestrina-G, 6-O-(4-O-metil- β -D-glucopiranosil)-8-hidroxi-2,7-dimetil-4H-benzopiran-4-ona, cefalosporolide-J, cefalosporolida-E, decarestrictina-C2, ergosterol e brassicasterol (HERATH et al., 2013).

As estruturas químicas de algumas substâncias isoladas das espécies de *Armillaria* estão representadas na Figura 2.

FIGURA 2 - ESTRUTURAS QUÍMICAS ISOLADAS DO GÊNERO *Armillaria*



Nota: **(1):** Armillariol A, **(2):** Armillariol C, **(3):** R= H, Armillaridina, R= CH₃, 4-O-metilarmillaridina, **(4)** n= 2, R=OH, Emestrina; n= 2, R= H, Emestrina-F; n= 1, R= OH, Estrestrina-G, **(5):** 6-O- (4-O-metil-β-D-glucopiranosil) -8-hidroxi-2,7-dimetil-4H-benzopiran-4-ona, **(6):** Cefalosporolida-J, **(7):** Cefalosporolida-E, **(8):** Decarestrictina-C₂

Fonte: O autor (2019)

3.3 O GÊNERO *Pinus*

A morfologia do gênero *Pinus*, juntamente com sua reprodução e utilização pelo homem, foi descrita pela primeira vez por Theophrastus entre 370 a 285 a.C (MIROV, 1967). A principal característica desse gênero é a madeira de cor clara, com fibra longa (COELHO; KWASNIEWS, 2008).

Pinus caribaea, espécie oriunda da América Central é a mais cultivada no mundo, principalmente nas regiões tropicais (SHIMIZU; SEBBEN, 2008). *Pinus* é cultivado no Brasil há mais de um século, inicialmente as espécies *Pinus elliotti* e *Pinus taeda*, oriundas dos Estados Unidos, foram as mais difundidas (AGUIAR et al., 2013).

Em 2013 cerca de 20,65% da área de floresta plantada no Brasil era composta por espécies do gênero *Pinus*, o que ocupava 1,57 milhões de hectares, a madeira era empregada na principalmente na produção de papel e celulose. A produção de madeira de *Pinus* no país em 2013 foi de 42 milhões de metros cúbicos e a de resina foi de 73,46 toneladas. Portanto os dois juntos representaram a renda bruta de aproximadamente R\$ 2,8 bilhões (MOREIRA et al., 2015).

Em alguns estudos preliminares com extratos de *Pinus* foi observada a presença de compostos secundários das mais variadas classes, esses compostos estão descritos no QUADRO 1.

QUADRO 1- METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIES DE *Pinus*

ESPÉCIE	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	REFERÊNCIA
<i>P. caribaea</i> var. <i>caribea</i>	Alcaloides Flavonoides Terpenos Esteroides Taninos Saponinas	CORRALES et al., 2004; NARANJO et al., 2009;
<i>P. tropicalis</i>	Alcaloides Flavonoides Terpenos Esteroides Taninos Cumarinas Saponinas Antocianidinas	CORRALES et al., 2004;
<i>P. taeda</i>	Taninos	MARCHINI, 2015;
<i>P. pinaster</i>	Taninos Aldeídos	GARCÍA et al., 2014;

Fonte: O autor (2019)

Os óleos essenciais de *Pinus* apresentam uma composição bastante diversificada, e foram objetos de estudo com o intuito de analisar suas atividades biológicas como demonstrado no QUADRO 2.

QUADRO 2 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE *Pinus*

ATIVIDADE BIOLÓGICA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
LARVICIDA	<i>Pinus kesiya</i>	GOVINDARAJAN et al., 2016;
ANTIMICROBIANA	<i>Pinus caribaeae</i> <i>Pinus koraiensis</i> <i>Pinus koraiensis</i> <i>Pinus densiflora</i>	HONG et al., 2004; LEE et al., 2008; SONIBARE; OLAKUNLE, 2008;
ANTIOXIDANTE	<i>Pinus mugo</i>	GRASSMANN et al., 2003;

Fonte: O autor (2019)

3.4 APLICAÇÕES DOS PRODUTOS NATURAIS EM ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS

Os produtos naturais apresentam uma rota metabólica complexa, que podem resultar em substâncias que apresentam atividades biológicas essenciais para a medicina moderna. Pesquisas realizadas com o extrato de plantas, animais e micro-organismos podem levar a descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico (CHINTOJU et al., 2015).

Dentre as atividades realizadas com extratos de produtos naturais, cabe ressaltar as atividades: antimicrobiana, toxicológica e antioxidantes; as quais visam avaliar os possíveis efeitos biológicos das amostras e sua segurança. Estas atividades são de extrema importância para verificar se o produto natural apresenta substâncias bioativas, as quais não devem ser nocivas à saúde ou ao ambiente (VEIGA et al., 2005; JUNIOR et al., 2006; BEDNARCZUK et al., 2010).

3.4.1 Atividade antioxidante

Os radicais livres são conhecidos por causarem diversos danos celulares, por atacar a membrana plasmática, proteínas, enzimas e o DNA, que pode resultar em doenças inflamatórias, arteriosclerose, câncer, *diabetes mellitus*, distúrbios neurodegenerativos, lesão hepática, inflamação, danos na pele, doenças coronarianas, artrite e envelhecimento. As substâncias antioxidantes são capazes de doar elétrons aos radicais livres, neutralizar e prevenir o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; GÜLÇİN, 2006; MOON et al., 2006).

Para a prevenção da formação desses radicais livres em alimentos estão disponíveis no mercado antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), e naturais com destaque para a vitamina C, vitamina E e β -caroteno. Uma classe de metabólitos naturais que merece destaque é a dos compostos fenólicos, que agem como redutores de oxigênio singlete e atuam na inibição da oxidação lipídica e na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Para se avaliar a atividade antioxidante dos extratos pode-se utilizar diversas metodologias, entre elas cabe ressaltar a redução do radical DPPH, a redução de fosfomolibdênio, a oxirredução do íon férrico (Azul da Prússia) e detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Na metodologia proposta por Mensor et al. (2001) avalia-se a capacidade das substâncias testadas em reduzir o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH^{*}) para difenil-picril-hidrazina, em que a solução sofre mudança de coloração de púrpura para amarela, e é avaliada em espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) visível a capacidade antioxidante.

No ensaio de redução do complexo de fosfomolibdênio observa-se a capacidade das amostras em reduzir o molibdênio (VI) para molibdênio (V). Essa técnica pode avaliar substâncias lipofílicas e hidrofílicas (PRIETO et al., 1999).

A metodologia denominada como Azul da Prússia tem como base química a redução dos grupos hidroxifenólicos, em que íons Fe^{+3} são reduzidos a Fe^{+2} , os quais formam complexo com ferrocianeto e com coloração azul (SILVA et al., 2010).

Na análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), avalia-se a inibição da formação do malondialdeído (MDA) pelas amostras. O MDA é formado pela peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O produto dessa reação apresenta uma coloração rosa e pode ser analisado em espectrofotômetro (DAWN-LINSLEY et al., 2005).

3.4.2 Avaliação da toxicidade

Avaliação da toxicidade é empregada para verificar a segurança na utilização dos extratos. Diversas são as metodologias empregadas, entre elas

estão: as atividades frente *Artemia salina* Leach, eritrócitos, sementes (alelopatia) e células tumorais. A possível ação tóxica, das amostras dependem do tempo, frequência e via de administração das mesmas (FILHO; DUARTE, 2007; BEDNARCZUK et al., 2010).

3.4.2.1 Ensaio de toxicidade frente *Artemia salina*

O ensaio empregado está entre os mais utilizados na toxicologia preliminar. É considerado um ensaio de letalidade que permite avaliar a toxicidade geral das amostras em estudo. Esta análise é considerada como um método rápido, seguro e acessível, essencial para avaliar a toxicidade de amostras que apresentam atividade biológica (ARAÚJO et al., 2010; FERREIRA et al., 2017).

Por meio desse método pode-se determinar a concentração de amostra capaz de matar 50% dos náuplios de *Artemia salina* Leach (CL₅₀%). A atividade toxica frente *A. salina* já foi relacionada a atividade antitumoral e contra *Trypanossoma cruzi* (MCLAUGHLIN et al., 1998; ALVES et al., 2000; ARAÚJO et al., 2010).

3.4.2.2 Ensaio de toxicidade em eritrócitos

Essa análise é considerada um teste de toxicidade preliminar, que pode ser utilizado para avaliar as amostras que são capazes de causar danos ou alterações fisiológicas nas células. A metodologia mais empregada é a que analisa a citotoxicidade em eritrócitos, e é capaz de avaliar o grau de hemólise provocada pela amostra, após ser incubada com suspensão de eritrócitos padronizada (DESOTI et al., 2011; MORENO et al., 2018).

A hemólise se caracteriza pela ruptura da membrana dos eritrócitos e consequentemente a liberação de hemoglobina. Esta pode causar diversos danos ao fígado, rins e coração (CARVALHO et al., 2007; BEDNARCZUK et al., 2010).

Diversos metabólitos secundários derivados de compostos naturais são conhecidos por apresentarem atividade hemolítica, entre eles cabe ressaltar as

saponinas, os compostos fenólicos e taninos. Os compostos fenólicos e os taninos promovem a hemólise pela oxidação da hemoglobina, enquanto que as saponinas possuem a capacidade de formar complexos com proteínas, fosfolipídios e esteroides da membrana (CAVALHEIRO et al., 2009; FERREIRA et al., 2017).

3.4.2.3 Atividade Alelopática

A alelopatia avalia a influência de substâncias oriundas de plantas e de fungos sobre outras plantas, que pode apresentar efeitos benéficos ou danosos. Esses efeitos podem ocorrer devido as biomoléculas conhecidas como aleloquímicos. Essas substâncias provêm do metabolismo secundário e são uma alternativa para a produção de herbicidas, inseticidas e nematicidas (FILHO; DUARTE, 2007; MACIEL et al., 2017).

Os principais bioensaios em alelopatia são os de germinação e crescimento. No teste de germinação é observado se as amostras são capazes de inibir ou estimular a germinação das sementes após o contato com a amostra avaliada. No teste decrescimento observa-se o desenvolvimento das plântulas em relação ao tamanho da radícula e hipocótilo comparados com o padrão. Caso haja diferença estatística pode-se considerar que as amostras influenciam no seu desenvolvimento (SOUZA FILHO et al., 2009; FIORENZA et al., 2016; MACIEL et al., 2017). Devido a sensibilidade as espécies mais utilizadas neste ensaio são a *Lactuca sativa* L. (alface) e *Lycopersicum esculentum* Mill (tomate) (FERREIRA; AQUILA, 2000).

3.4.2.4 Ensaio antitumoral

Mundialmente cerca de 7,5 milhões de mortes que ocorrem por ano estão atribuídas a casos de câncer. Além disso transições demográficas e epidemiológicas sinalizam um aumento dessa incidência nos próximos anos. No Brasil estima-se que ocorra o aumento de 600 mil casos de câncer por ano (BRASIL, 2018).

A procura de novos quimioterápicos é essencial para o tratamento desses pacientes. Observa-se que os produtos naturais representam uma fonte para a prospecção de novos compostos com atividade antitumoral, uma vez que 74% dos quimioterápicos advém de produtos naturais ou derivados destes (COSTA et al., 2018) .

Diversas são as metodologias empregadas para avaliar a atividade antitumoral, dentre elas têm-se o ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), o qual baseia-se na avaliação do dano que as amostras podem provocar no metabolismo celular de glicídios, mediante atividade de desidrogenases. O MTT é reduzido na presença dos produtos da reação NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina), o que forma um precipitado púrpura, que dissolve na presença de DMSO, então essa reação pode ser quantificada por espectrofotômetro (MACIEL et al., 2002; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Outro método quantitativo utilizado para avaliar a viabilidade celular é o Live/Dead®. Essa metodologia consiste em se utilizar marcadores que emitem fluorescência e permite medir a atividade intracelular das esterases (calceína) e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio) por meio de microscópio de fluorescência. As células vivas apresentam coloração verde, indicativo da presença de calceína, enquanto que as células mortas apresentam coloração vermelha devido a presença de homodímero de etídio (PIAIA, 2014).

O carcinoma adrenocortical (CAC), apresenta alta incidência na região Sul e Sudeste do Brasil, com prevalência em crianças. É considerada uma neoplasia rara e com mau prognóstico, a qual causa 0,2% dos óbitos relacionados ao câncer.

O tratamento de escolha costuma ser a ressecção cirúrgica para os estágios I e II da doença e ressecção cirúrgica concomitante ao uso de mitotano para os estágios III e IV da doença. Porém, o fármaco de escolha (mitotano) apresenta citotoxicidade direta sobre a mitocôndria de células adrenocorticais, normais ou neoplásicas. Muitos pacientes morrem precocemente durante o tratamento devido a toxicidade desse composto químico, e ainda apresenta uma resposta em menos de 50% dos tumores, devido esse mal prognóstico é

essencial a pesquisa por novas substâncias antitumorais para essa linhagem neoplásica (LUTON et al., 1990; MOREIRA; POW-SANG, 2002; ALMEIDA et al., 2010; MARTIN et al., 2016).

O câncer colorretal (CCR) é considerado a quarta neoplasia mais frequente no Brasil, mais comum a partir dos 40 anos, é o tipo de câncer que mais mata no ocidente, ocasiona cerca de 500 mil óbitos por ano. A morte raramente ocorre devido ao crescimento local do tumor, mas sim devido a metástases principalmente nos nódulos linfáticos, fígado, pulmões e peritônio. Pode ser ocasionado devido a pré-disposição genética, doenças intestinais pré-existentes e fatores externos (alimentação inadequada, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo e obesidade) (BENSON, 2007; JEMAL et al., 2007). Os tratamentos mais comuns são ressecção cirúrgica e tratamento com quimioterápicos (5-fluorouracilo, leucovorina, ácido folínico, o irinotecano e oxaliplatina) (BARREIRA; BARBOSA, 2012).

3.4.3 Atividade imunomoduladora

O sistema imunológico é extremamente complexo e composto por uma série de células e moléculas responsáveis pela defesa do organismo. Pode ser classificado como sistema imune inato ou adaptativo. O sistema imune inato utiliza um mecanismo natural que os indivíduos saudáveis possuem, que bloqueia ou elimina patógenos por meio de mecanismos celulares e bioquímicos, os quais já existiam antes da infecção (ANDRADE et al., 2016)

Como principais mediadores do sistema imune inato têm-se as citocinas, os macrófagos, monócitos, proteínas de fase aguda, moléculas do sistema complemento e neutrófilos. O sistema imune adaptativo, por sua vez, é estimulado por agentes infecciosos, caracterizando-se pela especificidade ao patógeno. A resposta desse sistema é caracterizada por reações específicas contra antígenos, a qual é desencadeada principalmente por linfócitos B e T (JANTAN et al., 2015).

Os macrófagos possuem diversos receptores de superfície, mediadores intracelulares e moléculas secretoras que auxiliam no reconhecimento, fagocitose e destruição de diversos patógenos invasores (ex: vírus, bactérias,

fungos e parasitas) e atuam também na regulação de outras células com atividade imunológica, como por exemplo na apresentação de antígeno aos linfócitos (BRÜNE et al., 2013).

Os macrófagos classicamente ativos (M1) são responsáveis pela resposta imune tipo 1, estimulam a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, com aumento da fagocitose e aumento na apresentação de antígenos. Os macrófagos alternativamente ativos (M2) são responsáveis pela resposta imune tipo 2 e atuam na infecção parasitária, alergias e asma (ZHANG; WANG, 2014).

As células possuem a capacidade de regular as respostas imunes, através da indução, ampliação ou inibição das respostas imunológicas. As substâncias imunomoduladoras modificam o sistema imune, podem atuar como estimulante ou inibidores, um mesmo imunomodulador pode atuar no estímulo de algumas células e supressão de outras. Diversas drogas de origem natural apresentam ação imunomoduladora (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

3.4.4 Atividade antimicrobiana

As doenças causadas por micro-organismos estão cada vez mais severas, devido à resistência desenvolvida por fungos e bactérias, frente aos antimicrobianos comerciais. A resistência aos antibióticos e antifúngicos ocorre devido a seleção natural, em que os micro-organismos resistentes tornam-se os principais patógenos em doenças, e também por sua habilidade em se adaptar e desenvolver resistência aos fármacos, principalmente pelo uso indiscriminado desses medicamentos (SANTOS, 2004; CASTRO et al., 2006).

Essa resistência microbiana é um dos principais problemas de saúde pública do mundo, e por esta razão a busca por novas moléculas derivadas de produtos naturais se faz necessária. Sabe-se que plantas e fungos apresentam um metabolismo complexo e podem produzir metabólitos com ação frente a esses micro-organismos (OSTROSKY et al., 2008; ALVES et al., 2013).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos. Entre os mais difundidos estão a difusão em ágar e os métodos de macro e microdiluição. O teste de microdiluição foi adaptado para

avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras testadas (OSTROSKY et al., 2008).

O método da concentração inibitória mínima é possível verificar a menor concentração de amostra que apresenta atividade contra o micro-organismo em teste. Essa análise apresenta reprodutibilidade, sensibilidade e baixo custo, e cabe ressaltar ainda que se utiliza pouca quantidade de amostra ao comparar com outras técnicas descritas na literatura (OSTROSKY et al., 2008).

3.4.5 Atividade antagonista em cultura dupla

A atividade antagonista em cultura dupla é um teste preliminar que visa caracterizar o fungo bio-ecologicamente e selecionar culturas para atividades biológicas e fisiológicas (BADALYAN et al., 2002). A atividade antagonista entre espécies apresenta vários mecanismos, os três principais são: parasitismo; competição por nutrientes; e antibiose (ALABOUVETTE et al., 2006).

O parasitismo ocorre devido a interação do fungo antagônico com as hifas de seu hospedeiro, o qual causa a degradação celular por ação de enzimas. A competição por nutrientes é observada somente no estágio inicial da colonização, visto que o fungo cresce rapidamente e esgota os substratos, principalmente carboidratos, o que inibe o crescimento de outro fungo. A antibiose está relacionada a produção de metabólitos secundários, os quais são tóxicos para outros micro-organismos, caracteriza-se no ensaio *in vitro* pela formação de uma zona de inibição entre as culturas, uma vez que o metabólito difunde no ágar e inibe o crescimento de seu concorrente (SCHOEMAN et al., 1999; ALABOUVETTE et al., 2006; OWNLEY; WINDHAM, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL FUNGICO E FLUXOGRAMA DE TRABALHO

Os isolados fúngicos utilizados neste estudo pertencem à Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, os quais estavam preservadas em tubos com meio BDA sob óleo mineral, mantidos em refrigerador a 4 °C. Foram utilizadas as espécies: *Armillaria* sp., *Bjerkandera adusta*, *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea* e *Rhizoctonia* sp. isoladas de *Pinus*. Previamente caracterizado pelo pesquisador doutor Celso Garcia Auer da Embrapa Florestas. A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número de cadastro AF14687 conforme anexo I. Esses materiais foram herborizados (fungo em material vegetal) e depositados no herbário de UNOP, conforme a Tabela 1.

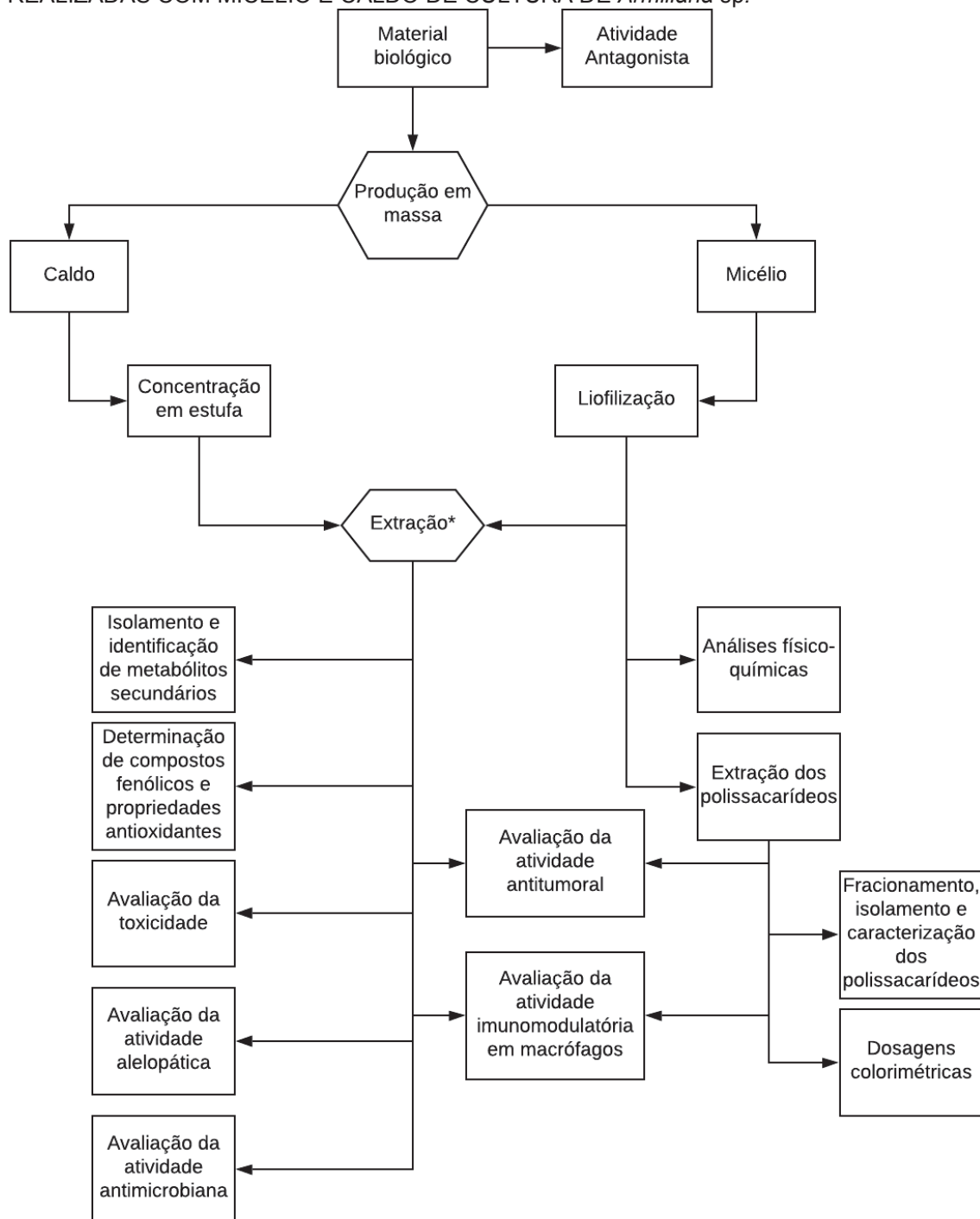
TABELA 1 - FUNGOS ISOLADOS DE *Pinus* EMPREGADOS NO ENSAIO DE ANTAGONISMO

Espécie	Hospedeiro	Parte da planta	Origem	Nº UNOP
<i>Armillaria</i> sp.	<i>Pinus taeda</i> L.	Caule	Pirai do Sul-PR	4240
<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Pinus taeda</i> L.	Raízes	Jaguariaíva - PR	4244
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pinus taeda</i> L.	Muda Jovem	Guarapuava - PR	4241
<i>Diplodia pinea</i>	<i>Pinus taeda</i> L.	Ponteira	São José do Ouro - RS	4242
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> x <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	Estacas mortas	Itapeva - SP	4243

Fonte: O autor (2019)

A espécie *Armillaria* sp. foi utilizada para análise química, nutricional, biológica, toxicológica e antagonista enquanto que as outras espécies foram utilizadas somente para avaliar sua atividade antagonista. O estudo foi realizado de acordo com o fluxograma de atividades que pode ser visualizado na Figura 3 e as metodologias utilizadas estão descritas a seguir.

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS DAS ATIVIDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS REALIZADAS COM MICÉLIO E CALDO DE CULTURA DE *Armillaria* sp.



Fonte: O autor (2019)

4.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE *Armillaria* sp.

O micélio de *Armillaria* sp., conservado em óleo mineral, foi transferido para placas de Petri com meio BDA, que foram incubadas em câmara BOD a 20

°C, por aproximadamente 30 dias no escuro. Após esse crescimento, dois discos de micélio-ágar de 5 mm foram retirados das placas e transferidos para frascos de vidro com 100 mL de meio líquido Batata Dextrose (BD – Kasvi®) e incubados em câmara BOD, a 20 °C, por aproximadamente 35 dias no escuro (MOURA, 2017). O crescimento do micélio em caldo de cultivo pode ser observado na Figura 4.

FIGURA 4 - CRESCIMENTO DO MICÉLIO DE *Armillaria* sp. CULTIVADO EM BATATA DEXTROSE



Fonte: O autor (2019)

4.3 LIOFILIZAÇÃO DO MATERIAL FÚNGICO

Após o período de cultivo do fungo em meio líquido BD, o micélio foi separado do caldo de cultivo por filtração a vácuo, em papel de filtro Whatman® nº 1. Na sequência o micélio foi congelado em freezer (-8 ± 2 °C) e posteriormente liofilizado em aparelho Bench Top Pro sp- Scientific (-78 °C). O caldo de cultivo foi levado para concentração em estufa a 40 °C até peso constante.

4.4 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

As análises bromatológicas foram realizadas em triplicata, com o micélio liofilizado, as metodologias estão descritas a seguir.

4.4.1 Umidade por dessecação

A determinação da umidade foi realizada com o micélio liofilizado. Foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) adaptado. Pesou-se 1 g do material em cadinhos de porcelana previamente tarados e levados a estufa a 100 °C por 3 h. Após esse período foram retirados da estufa e deixados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Estes foram então pesados e levados novamente para estufa, resfriados e pesados até massa constante. Para o cálculo do teor de umidade foi empregada a seguinte equação (1):

$$\%U = \frac{(P_u - P_s)}{P_A} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

- %U = Umidade
- P_u = massa (g) da amostra
- P_a = massa (g) da amostra + cadinho antes da dessecação
- P_s = massa (g) do cadinho + amostra após a dessecação.

4.4.2 Cinzas totais

A metodologia utilizada para a determinação de cinzas totais foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) adaptado, pesou-se 1 g de micélio liofilizado em cadinho previamente tarado (calcinação, resfriados e pesados) e levados a incineração a 600 °C até a eliminação do carbono. Após, foram deixados em dessecador até resfriar e então pesados. Para calcular a porcentagem de cinzas da amostra foi empregada a seguinte equação (2):

$$\%C = \frac{N \times 100}{P} \quad (2)$$

Em que:

- %C = Porcentagem de cinzas
- N = massa (g) de cinzas
- P = massa (g) da amostra

4.4.3 Proteína

A determinação de proteína foi realizada pela metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995), em que o experimento consistiu

em três etapas: digestão; destilação; e titulação. Na primeira etapa, 2 g de amostra, foram levadas a digestão com ácido sulfúrico e catalisador de CuSO_4 e K_2SO_4 (1:5 v/v) para a formação de sulfato amoniacal. Na segunda etapa, ocorreu a destilação por arraste de vapor de amônia, a qual foi recebida em frasco de Erlenmeyer com ácido bórico a 4%, formando um complexo de coloração verde. Na terceira etapa, a amônia destilada da amostra foi titulada com ácido sulfúrico 0,02 M até apresentar mudança de coloração, de verde para um complexo cor-de-rosa. Para a determinação de proteínas foi realizada a seguinte equação (3):

Em que:	$\%P = \frac{(V \times 0,14)}{P} \quad (3)$
%P = porcentagem de proteína V = volume (mL) de ácido sulfúrico gasto na titulação P = massa (g) amostra F = fator de conversão (4,38)	

Utilizando-se o fator de conversão para proteínas de 4,38, que exclui assim o nitrogênio-não-proteico proveniente da quitina presente na parede celular fúngica (SALES-CAMPOS et al., 2011).

4.4.4 Teor de lipídios

O teor de lipídios foi determinado pelo método de extração direta em Soxhlet descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1995), em que se pesou em papel filtro aproximadamente 5 g da amostra liofilizada. A mesma foi transferida para um cartucho e levado ao Soxhlet acoplado a um balão de fundo chato previamente tarado a 105 °C, ao qual foi adicionado éter etílico PA. O sistema foi mantido sob aquecimento em banho maria para extração contínua por 8 h. Após esta etapa o balão foi levado a estufa a 105 °C por cerca de 1 hora, e então resfriado em dessecador a temperatura ambiente e pesado. Repetiu-se a secagem em estufa por 30 min até massa constante. Para avaliar o teor de lipídios da amostra realizou-se a seguinte equação (4):

Em que:	$\%L = \frac{N \times 100}{P}$	(4)
%L = porcentagem de lipídios N = massa (g) de lipídio P = massa (g) da amostra		

4.4.5 Fibra bruta

Para quantificar a fibra bruta foi necessário empregar ácidos e bases fortes. A extração ácida foi empregada para a remoção de amido, açúcares, parte da pectina e hemicelulose dos alimentos. A extração básica, entretanto, remove proteínas, pectinas, hemicelulose remanescente e parte da lignina (MERTENS, 1992).

A determinação da fração de fibra bruta foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (1970), em que 2 g da amostra liofilizada foram submetidas à digestão ácida com 200 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1,25% por 30 min. Após este período o conteúdo foi filtrado e lavado, em cadinho de Gooch, com água destilada fervente. O resíduo foi então submetido a digestão básica com 200 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,25% por 30 min e filtrado em cadinho de Gooch tarado e levado a estufa a 60 °C para secar. Os cadinhos de Gooch foram deixados em dessecador e após resfriados foram pesados. Os cadinhos de Gooch com o resíduo orgânico foram levados a mufla a 500 °C até a formação de cinzas.

Posteriormente os cadinhos de Gooch foram transferidos para dessecador para esfriar e pesados. Para determinar o teor de fibra bruta da amostra realizou-se a seguinte equação (5):

Em que:	$\%F = \frac{(Pr - Pc)}{P} \times 100$	(5)
%F = porcentagem de fibra bruta, Pr = massa (g) do resíduo Pc = massa (g) de cinzas obtidas P = massa (g) da amostra		

4.4.6 Determinação de Carboidratos

A determinação de carboidratos presentes na amostra foi realizada por análise proximal (AOAC, 2002), conforme a equação (6) a seguir:

$\%CT = (100\%) - (\%U + \%L + \%P + \%F + \%C)$		(6)
Em que:	%CT= Teor de carboidrato %U = teor de umidade em porcentagem presente na amostra liofilizada %L = teor de lipídeos em porcentagem presente na amostra liofilizada %P = teor de proteínas em porcentagem presente na amostra liofilizada %F = teor de fibras brutas em porcentagem presentes na amostra liofilizada %C = teor de cinzas totais em porcentagem presentes na amostra liofilizada	

4.4.7 Valor Energético total

O valor energético foi estimado conforme Liu et al. (2016), conforme a seguinte equação (7):

$VET \text{ (kJ)} = 17 \times (\text{g total C} + \text{g total P}) + 37 \times (\text{g total L})$		(7)
Em que:	VET = valor energético total P = massa total (g) de proteína C = massa total (g) de carboidratos L = massa total (g) de lipídios	

4.4.8 Análise de quitina

O teor de quitina foi determinado conforme a metodologia de Álvarez et al. (2014). Para essa análise, pesou-se aproximadamente 3 g da amostra liofilizada em um copo de béquer de 250 mL, adicionou-se 75 mL de água destilada, esse conteúdo foi sonificado por 40 min e posteriormente centrifugada a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um béquer de 250 mL, no qual foi adicionado 75 mL de etanol PA, deixado em repouso por 24 h. Após repouso, foi realizada a desproteínização, utilizando-se NaOH 4 M na proporção de 1:20 (*m/v*), em banho maria a 100 °C por 2 h. Após esse tempo a amostra foi filtrada essa etapa foi repetida por 3 vezes. A suspensão foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com água destilada até atingir pH neutro. O precipitado foi filtrado e transferido

para um béquer. Então adicionado 75 mL de solução de permanganato de potássio 10 g.L⁻¹ ao ensaio deixado em repouso por 1 hora e filtrado em funil de Büchner com papel filtro. O precipitado retido no papel foi transferido para um béquer, tratado com solução de ácido oxálico (10 g.L⁻¹) durante 1 hora e centrifugado a 3500 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água destilada até atingir pH neutro. O precipitado foi transferido para placa de Petri previamente tarada e levado a estufa até obter massa constante. Para determinar o teor de quitina da amostra realizou-se a seguinte equação (8):

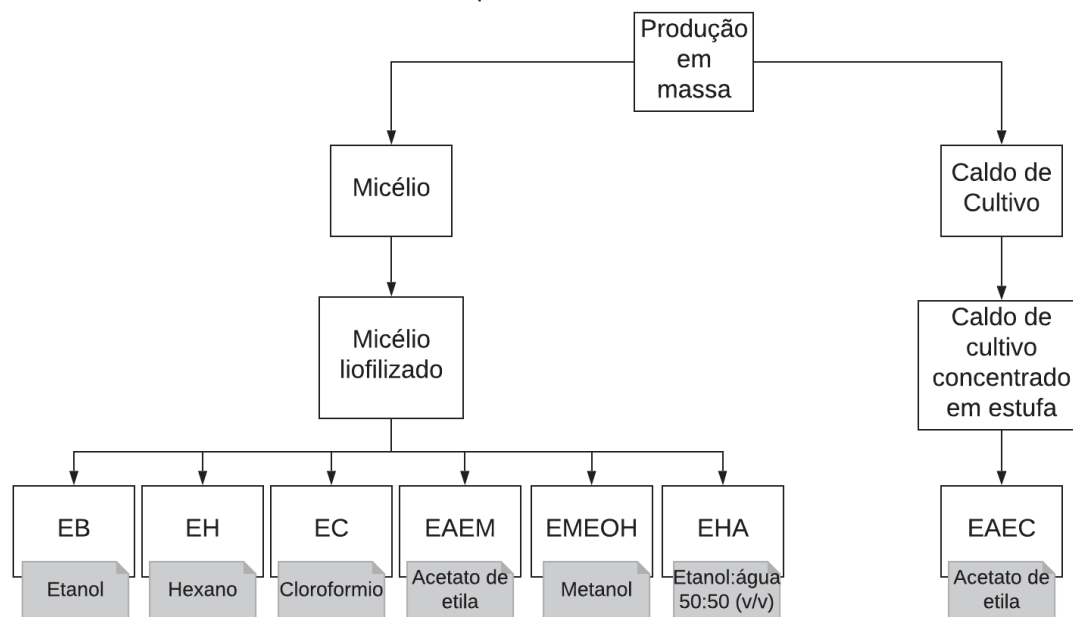
Em que:	$\%Q = \frac{(Ps - Pu)}{Pa} \times 100 \quad (8)$
%Q = Teor de quitina Ps = massa (g) amostra final + placa de Petri Ps = massa (g) placa de Petri Pa massa(g) da amostra inicial	

A amostra obtida foi analisada por espectroscopia de na região da infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para caracterizar a estrutura molecular da quitina isolada. Os espectros foram registrados em espectrofotômetro Nicolet® IS® 10 FT-IR. As amostras foram previamente dessecadas em estufa a 100 °C por uma hora e mantidas em dessecador até o momento da análise. Os principais sinais observados foram comparados com os dados descritos na literatura para a quitina.

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A obtenção dos extratos foi realizada conforme o fluxograma que pode ser visualizado na Figura 5.

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROVENIENTES DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.



Extratos do micélio: extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEIOH), extrato hidroalcoólico (EHA), fração polissacarídica (P1). Extrato do caldo de cultivo: extrato acetato de etila do caldo de cultivo (EAEC).

Fonte: O autor (2019)

4.5.1 Extratos do micélio

Para a obtenção do extrato bruto (EB), 60 g de micélio liofilizado e triturado em liquidificador foram extraídas em aparelho de Soxhlet por 72 h, utilizando-se 3 L de etanol 96 °GL como solvente extrator. O extrato bruto obtido foi filtrado, pesado, concentrado em banho maria à 40 °C e armazenado em frascos de vidro.

O micélio liofilizado (60 g) também foi submetido a extração em Soxhlet com solventes de diferentes polaridades na seguinte ordem: *n*-hexano, cloroformio, acetato de etila, metanol e etanol: água (50:50 v/v), obtendo-se assim os extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), acetato de etila do micélio (EAEM), metanólico (EMEIOH) e hidroalcoólico (EHA). Os extratos foram concentrados em banho maria a 40 °C e armazenados em frascos de vidro. O rendimento dos extratos foi calculado conforme a seguinte equação (9):

$$\%R = \frac{Pe \times 100}{Pm} \quad (9)$$

Em que:

%R = Porcentagem de rendimento

Pe = massa (g) do extrato

Pm = massa (g) de micélio fúngico liofilizado.

Durante a extração com o solvente acetato de etila ocorreu a precipitação de cristais, denominados Armi200.

4.5.2 Extrato do caldo de cultivo

A extração ocorreu a partir do caldo de cultivo concentrado em estufa a 50 °C e ressuspendido em água destilada. Este foi submetido a extração líquido/líquido com acetato de etila PA, por 72 h, em aparelho de Soxhlet modificado para obter o extrato acetato de etila do caldo (EAEC). O rendimento foi calculado conforme a seguinte equação (10):

$$\%R = \frac{Pe \times 100}{Pcc} \quad (10)$$

Em que:

%R = Porcentagem de rendimento

Pe = massa (g) do extrato

Pcc = massa (g) do caldo de cultivo concentrado

4.6 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para a realização do ensaio de cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 UV₂₅₄, da marca Whatman®, de dimensões 20 por 20 cm. Foram aplicados de 5 a 10 µL de cada amostra nas placas com auxílio de microseringas. As análises de CCD foram realizadas conforme a Tabela 2. As placas cromatográficas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores. A análise foi realizada em triplicata para todos os extratos obtidos do micélio e caldo de cultivo.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REALIZADA PARA OS EXTRATOS

CONSTITUINTE QUÍMICO	FASE MÓVEL/ PROPORÇÃO	REVELADOR	METODOLOGIA
ESTEROIDES TERPENOS	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido sulfúrico (1:1)	(WAGNER, 1996)
COMPOSTOS FENÓLICOS TANINOS	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (flavonoide) Cloreto férrico 1% (tanino)	(WAGNER, 1996)
ALCALOIDE	Clorofórmio:metanol (95:5) universo amônio	Dragendorff	(VALENTE et al., 2006)

Nota: Difenolboriloxietilamino a 1% em metanol (Reativo de NEU); tetraiodeto bismuto de potássio (Dragendorff)

Fonte: OLIVEIRA et al. (2014)

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUINTE QUÍMICOS

4.7.1 Extrato hexano (EH) do micélio

4.7.1.1 Análise do extrato hexano (EH) do micélio por RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

As análises de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para a amostra EH foram realizadas no Centro de RMN da UFPR a temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$). A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado (CDCl_3) com 0,1% (v/v) de tetrametilsilano (TMS), em espectrômetro Bruker® DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda quadrinuclear de observação direta (^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P) de 5 mm.

Os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do TMS, como referência interna em 0,00 ppm. Os dados obtidos foram comparados com os dados de literatura.

4.7.1.2 Análise de ácido graxo do extrato hexano por CG-MS

Para realizar a análise do extrato hexano por CG-MS, foi necessário realizar a derivatização por esterificação do extrato hexano. Para isso, 1 mg de amostra foi pesada em tubo de vidro e adicionado 1 mL de Metanol-HCl 3 N, o qual foi aquecido a 80 °C durante 1,5 h. Após aquecimento, foi acrescentado 0,5 mL de H₂O e 1 mL de hexano. Foi retirada a fase hexânica e armazenado em freezer até o momento da análise em CG-MS.

A análise por CG-MS foi realizada em equipamento CG2010 Plus (GC) acoplado a um analisador de massas triplo quadripolo, TQ8040 (Shimadzu), equipado com um amostrador automático AO5000. A cromatografia foi desenvolvida em coluna capilar SH-RTX MS (30 m por 0,25 mm x μ m) com hélio 5,0 a um caudal de 1 mL.min⁻¹, como gás transportador. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura inicial da estufa de CG foi de 100 °C, mantida durante 3 min e depois aquecida a 250 °C a 3 °C.min⁻¹. A temperatura da linha de transferência foi de 300 °C e a fonte de íons MS foi de 250 °C. O espectrômetro de massas foi utilizado em modo de varredura total (TIC) em uma faixa de massa de m/z 40-400, obtido por ionização de elétrons a 70 eV. A identificação do extrato hexano foi baseada na comparação com Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich), auxiliado pela biblioteca espectral de massa NIST14.

4.7.2 Extrato acetato de etila do micélio (EAEM)

4.7.2.1 Cristais Armi200 obtidos do extrato acetato de etila do micélio (EAEM)

A análise de difração de Raios-X foi realizada no Laboratório de Difractometria de Raios-X de Monocristal, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em difratômetro Bruker D8 Venture equipado com detector Photon 100 CMOS, com radiação gerada por microfonte de Cu-K α μ S com monocromador de espelhos Gobbel. Os cristais prismáticos incolores da amostra (Armi200) mediram cerca de 0,19 x 0,06 x 0,06 mm, foram montados em suporte tipo MicroMeshTM e fixados com óleo mineral.

Para verificar a intensidade, os dados foram medidos com varreduras finas em ω e ϕ . O número total de reflexões gravadas para $\theta_{\max} = 67,7^\circ$, foi 9376, dos quais 597 foram medidas únicas ($R_{\text{int}} = 0,036$); 576 foram "observadas" com o parâmetro $I > 2\sigma$. O programa APEX3 foi utilizado para processar os dados coletados, o programa SHELXS para determinação da estrutura pelo método "*dual-space*" e o programa SHELXL para o refinamento pelo método de mínimos quadrados de matriz completa, em F^2 's. Os átomos (exceto os de hidrogênio) foram refinados por parâmetros térmicos anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio ligados aos de carbono e oxigênio foram incluídos em posições ideais e seus valores de U_{iso} foram ajustados para rodar nos valores de U_{eq} dos átomos-mãe de carbono/ oxigênio.

Os átomos de hidrogênio da molécula de água foram localizados em um mapa de diferenças e refinados livremente. Após o refinamento foram obtidos os valores de $wR_2 = 0,078$ e $R_1 = 0,032$ (2B) para todas as 597 ponderações, para $w = [\sigma^2(F_o^2) + (0,0373P)^2 + 0,0984P]^{-1}$ em que $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$; e para os dados "observados" apenas, $R_1 = 0,031$. No mapa da densidade eletrônica final, o pico mais intenso (ca 0,15 e $\text{\AA}^{-3}$) foi próximo ao átomo de O (3). Fatores de dispersão para átomos neutros foram retirados da referência Crystallography (1992). Os dados cristalográficos da amostra Armi200 foram listados no QUADRO 3.

QUADRO 3 - DADOS CRISTALOGRAFICOS DO CRISTAL ARMI200

Fórmula Elementar	C ₄ H ₁₀ O ₄	
Massa Molecular por Unidade de Z	122,12	
Sistema Cristalino, Grupo Espacial	Trigonal, P 3 ₁ 2 1	
Dimensões da Cella Unitária	a = 10,1506(5) Å	α = 90 °
	b = 10,1506(5) Å	β = 90 °
	c = 4,8829(3) Å	γ = 120 °
Volume	435.70(5) Å ³	
Z; densidade calculada	3.1,396 Mg/m ³	
F (000)	198	
Coeficiente de Absorção	1,089 mm ⁻¹	
Temperatura	303(2) K	
Parâmetros do Difratorômetro:		
Varredura de θ para coleta dos dados	5,031 para 74,717 °	
Varredura limite dos índices	-12 ≤ h ≤ 12, -12 ≤ k ≤ 12, -5 ≤ l ≤ 5	
Completeza para θ = 67,679 °	99,7%	
Correção de absorção	Semi-empírico para equivalentes	
Transmissão max. e min.	0,7542 e 0,6994	
Reflexões coletadas (abstenções não incluídas)	9376	
Nº de reflexões únicas	597 [R _(int) para equivalentes = 0.036]	
Nº de reflexões observadas (I > 2σI)	576	
Estrutura determinada pelo:	Métodos diretos, em SHELXS	
Método de refinamento:	Matriz completa de mínimos quadrados em F ² , em SHELXL	
Dados / restrições / parâmetros	597 [R _{int} para equivalentes = 0,040]/0/ 39	
Ajuste (GOOF) em F2	1,058	
Índices R finais (I>2σI)	R ₁ = 0,031, wR ₂ = 0,076	
Índices R (todos os dados)	R ₁ = 0,032, wR ₂ = 0,078	
Reflexões ponderadas:	w = [σ ² (Fo ²) + (0,0373P) ² +0,0984P] ⁻¹	
	em que P = (Fo ² +2Fc ²)/3	
Parâmetro de estrutura absoluta	-0,04(8)	
Maiores diferenças de pico e abissais	0,15 e -0,13 e.Å ⁻³	
Localização do maior pico de diferença	0,76 distante de C(3)	

Fonte: O autor (2019)

4.8 ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO

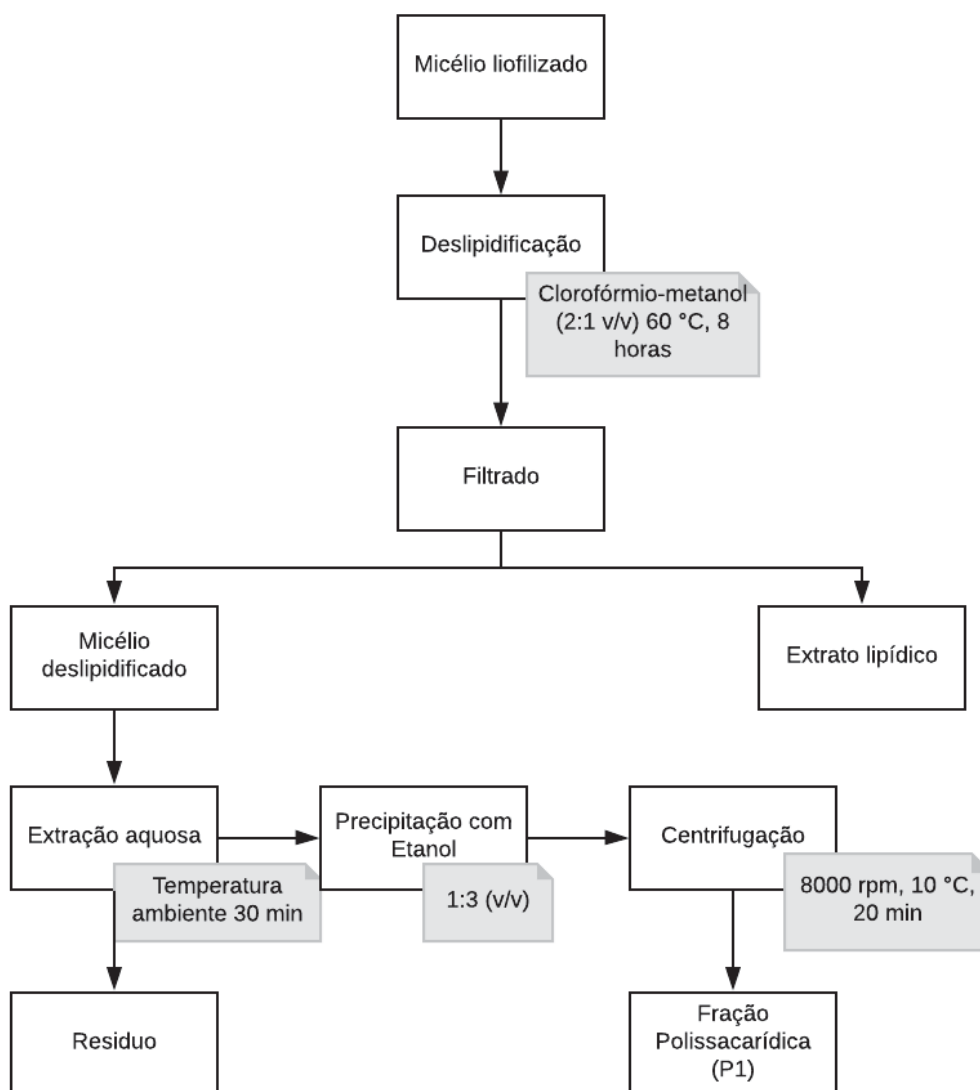
4.8.1 Deslipidificação do micélio fúngico

Para a obtenção da fração polissacarídica, o micélio fúngico liofilizado foi deslipidificado, utilizando-se uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), em Soxhlet (Figura 6).

4.8.2 Obtenção da fração polissacarídica

O material seco e deslipidificado foi submetido à extração aquosa sob agitação mecânica, utilizando-se 900 mL de água destilada durante 30 min. A extração foi realizada três vezes consecutivas e após este procedimento, o material foi filtrado em sistema a vácuo. O extrato foi concentrado em rotaevaporador, precipitado com etanol (3:1 v/v) e então centrifugado a 8000 rpm a 10 °C por 20 min. O precipitado foi ressuspendido em quantidade suficiente de água Milli-Q e liofilizado. A extração ocorreu conforme detalhado na Figura 6.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA



Fonte: O autor (2019)

4.8.3 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

A caracterização estrutural dos polissacarídeos foi realizada por meio de metodologias e experimentos que fornecem dados que indicam: composição monossacarídica; homogeneidade; tipo de ligação; massa molecular; grau de ramificação entre outros. Desta forma foi possível determinar a estrutura fina destes polímeros. A seguir estão descritas as metodologias baseadas em métodos químicos e espectrométricos.

4.8.3.1 Determinação da composição monossacarídica por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

A fração polissacarídica (1 mg de material liofilizado) foi hidrolisada com ácido trifluoracético (TFA) 2 M, a 100 °C durante 2 h. Em seguida foi realizada a evaporação do ácido e o hidrolisado foi dissolvido em água purificada (100 µL) e mantida à temperatura ambiente por 10 a 15 min em tubos de vidro. Foi adicionado NaBH₄ para atingir pH de 8,0-9,0, e a solução mantida sob refrigeração por 12 h (SASSAKI et al., 2008). Para neutralizar o excesso de NaBH₄ foi adicionado ácido acético (30 µL), removido pela adição de metanol (×2) sob fluxo de N₂ em um exaustor. O produto reduzido foi seco e a acetilação do Me-alditóis foram realizados em piridina-AC₂O (200 µL; 1:1, v/v), durante 30 min a 100 °C.

O alditol resultante dos acetatos foi analisado por cromatografia gasosa (CG) - espectrometria de massa (MS). As análises qualitativas e quantitativas do alditol acetatos foi realizada em cromatógrafo a gás Varian (modelo 3300) ligado a um espectrômetro de massas R-12 modelo Finnigan Ion-Trap 81027, com He₂ como gás de arraste, equipado com uma coluna capilar (30 mm x 0,25 mm d.i.) da DB-225, mantida a 50 °C durante a injeção e, em seguida, programada para atingir a temperatura constante de aproximadamente 220 °C (40 °C.min⁻¹). Os açúcares foram identificados pelos seus típicos tempos de retenção e perfis de impacto de elétrons (SASSAKI et al., 2005)

4.8.3.2 Determinação da homogeneidade por Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALL/RI)

As análises de homogeneidade, foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC), com colunas conectadas em série de gel permeação Ultrahydrogel 200, 500, 250 e 120 com limites de exclusão de 7.10⁶, 4.10⁵, 8.10⁴ e 5.10³ g.mol⁻¹, respectivamente. O dispositivo é acoplado em série ao detector de espalhamento de luz laser, comprimento de onda de 632 nm, multiângulos, 18 ângulos (MALLS) e ao detector de índice de refração (RI) (modelo 2410, Waters). Para análise e processamento dos

resultados foi utilizado o *software* ASTRA (versão 450, Wayatt Technology). Como eluente foi utilizada a solução de nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e 200 ppm de azida de sódio (NaN_3) em uma taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$, controlada por bomba peristáltica Waters 515. Para a análise da homogeneidade, 1 mg de cada fração foi solubilizada, durante 12 h, em 1 mL da solução de NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e NaN_3 200 ppm. Em seguida para a remoção da parte insolúvel, o material foi filtrado, sob pressão positiva, em membrana de acetato de celulose com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro.

4.8.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear monodimensional (^1H) e bidimensional ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC)

A fração polissacarídica foi solubilizada em aproximadamente $600 \mu\text{L}$ de água deuterada (D_2O) e, posteriormente, transferida para tubo de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN unidimensional de ^1H e o bidimensional HSQC foram obtidos no Centro de RMN da UFPR em espectrômetro Bruker® AVANCE III 400, operando à 9,4 Tesla e observando-se os núcleos de ^1H e ^{13}C à 400,1 e 100,6 MHz, respectivamente. As análises foram conduzidas a 70°C , com 30 mg de polissacarídeos solubilizados em D_2O . Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) baseados no padrão interno acetona (δ 30,2/ 2,22 ^{13}C e ^1H , respectivamente). Para o processamento dos espectros foi utilizado o *software* Topspin 3.1 - Bruker®.

4.8.4 Análises físico-químicas da fração polissacarídica

4.8.4.1 Dosagens colorimétricas

A fração polissacarídica obtida foi analisada quanto ao teor de carboidratos totais, proteína total, compostos fenólicos e composição monossacarídica. Estas análises consistem em cálculos de percentagem em relação as curvas analíticas, confeccionadas com padrões correspondentes para cada experimento. As amostras foram solubilizadas em água destilada em concentrações específicas para cada experimento.

4.8.4.1.1 Carboidratos totais

A dosagem dos teores de carboidratos totais foi realizada conforme Dubois et al. (1956) e adaptada por Fox e Robyt (1991). Esse procedimento determina quantitativamente os açúcares simples e seus derivados metilados, oligossacarídeos e polissacarídeos, por meio de análises espectroscópica. Para se calcular a percentagem de carboidratos totais de cada amostra foi construída uma curva de D-Glucose (Merck®, Darmstadt-DE®) nas concentrações de 4, 8, 16, 24, 30 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a realização do teste 40 μL das amostras (1 mg.mL^{-1}) foram transferidos para tubos de Eppendorfs juntamente com 40 μL da solução de fenol a 5% (*m/v*). A solução foi homogeneizada e posteriormente, foram adicionados 200 μL de ácido sulfúrico concentrado. Os Eppendorfs foram homogeneizados e incubados a 100 °C por 10 min. Após foram resfriados em banho de gelo e analisados em espectrofotômetro em 490 nm. A análise foi realizada em triplicata.

4.8.4.1.2 Doseamento dos compostos fenólicos da fração polissacarídica (P1)

Para esta análise foi utilizado o método colorimétrico descrito conforme Singleton et al. (1999) com modificações. A fração polissacarídica foi diluída em metanol PA para obter a concentração de 1 mg.mL^{-1} . O preparo deste ensaio consistiu em duas etapas, primeiro 200 μL das amostras foram misturadas com 3,2 mL de água e 200 μL de reagente Folin-Ciocalteu, após agitados foram deixados em repouso por 10 min. Na segunda etapa, após o repouso, foram adicionados 400 μL de carbonato de cálcio (Na_2CO_3) 10%. As amostras foram deixadas em contato com o Na_2CO_3 por 30 min, a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 760 nm. Como controle foi construída uma curva padrão analítica de ácido gálico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.9 ANÁLISE REALIZADA PARA OS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

Os ensaios descritos a seguir foram realizados para os extratos do micélio: extrato bruto (EB), extrato hexano (EH), extrato clorofórmio (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEON), extrato hidroalcoólico (EHA) e do caldo de cultivo: extrato acetato de etila do caldo de cultivo (EAEC).

4.9.1 Detecção de compostos fenólicos totais

Para a determinação das substâncias fenólicas dos extratos do micélio e do caldo de cultivo foi realizada a mesma metodologia descrita para os polissacarídeos (item 4.8.4.1.3). As amostras foram diluídas em metanol PA para obter a concentração de 1 mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 200 µL das amostras foram misturadas com 3,2 mL de água e 200 µL de reagente Folin-Ciocalteu®, agitados e deixados em repouso por 10 min. Após repouso, 400 µL de carbonato de cálcio (Na₂CO₃) 10% foram adicionados a reação. Após 30 min foi observado a absorbância em espectrofotômetro a 760 nm. Como controle foi construída uma curva padrão analítica de ácido gálico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 µg.mL⁻¹. As determinações foram realizadas em triplicata (SINGLETON et al., 1999).

4.9.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.9.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

Esse ensaio foi realizado para os extratos do micélio e caldo de cultivo de acordo com Mensor et al. (2001). Uma solução de DPPH• foi preparada no momento do ensaio a 0,03 mmol.mL⁻¹ em metanol PA, cada amostra foi dissolvida em metanol PA com concentrações que variam entre 5 a 200 µg.mL⁻¹. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de cada amostra diluída e 1 mL da solução de DPPH•. O controle foi preparado com 2,5 mL de metanol com 1

mL de solução de DPPH• e como padrão foi utilizado a vitamina C. Estas foram deixadas em repouso por 30 min em temperatura ambiente. Após, a leitura das absorbâncias foi realizada em 518 nm. Todas as amostras foram feitas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida conforme equação (11) a seguir:

$\%AA = \frac{(Abs_{(a)} - Abs_{(b)}) \times 100}{(Abs_{(p)} - Abs_{(b)})}$ Em que: - AA% = Atividade antioxidante - Abs_(a) = Absorção da amostra - Abs_(p) = Absorção do padrão (vitamina C, Rutina) - Abs_(b) = Absorção do branco.	(11)
--	-------------

Os valores de IC_{50%} foram calculados no gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra da fração e a ordenada foi a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, em que $y = ax + b$, serve de base para a determinação do valor de IC_{50%}.

4.9.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do complexo fosfomolibdênio

Para esta análise foram utilizadas soluções metanólicas com concentração final de 200 µg.mL⁻¹. Destas, 0,3 mL foram adicionados à 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho termostatizado a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, foi observado a absorção das amostras em 695 nm, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, com 0,3 mL de metanol com 3 mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à vitamina C (200 µg.mL⁻¹). Como padrão além da vitamina C, foi utilizado a rutina (200 µg.mL⁻¹) usada como padrão, e cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00 (PRIETO et al., 1999). Os resultados dos extratos do micélio e do caldo de cultivo foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) das amostras em relação à vitamina C, conforme a equação (12):

$$\%AAR = \frac{(Abs_{(a)} - Abs_{(b)}) \times 100}{(Abs_{(p)} - Abs_{(b)})} \quad (12)$$

Em que:

AAR% = Atividade antioxidante relativa
 $Abs_{(a)}$ = Absorção da amostra
 $Abs_{(v)}$ = Absorção do padrão (vitamina C)
 $Abs_{(b)}$ = Absorção do branco

4.9.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor (Azul da Prússia)

Neste teste os extratos do micélio e do caldo de cultivo foram avaliados nas concentrações de 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram transferidos para tubos de ensaio de 25 mL, e adicionados tampão fosfato de potássio a 0,2 M (pH 7,0) e ferricianeto de potássio a 1%. A mistura foi incubada a 45 °C por 20 min, e em seguida o ácido tricloroacético a 10% foi adicionado aos tubos de ensaio. Cerca de 2,5 mL foram transferidos para tubos de ensaio de 5,0 mL, e adicionados 1,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 1,0% (*m/v*). A determinação da absorbância foi realizada a 700 nm (YEN; CHEN, 1995). Os resultados expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C, conforme a equação (13):

$$\%AAR = \frac{(Abs_{(a)} - Abs_{(b)}) \times 100}{(Abs_{(p)} - Abs_{(b)})} \quad (13)$$

Em que:

AAR% = Atividade antioxidante relativa
 $Abs_{(a)}$ = Absorção da amostra
 $Abs_{(p)}$ = Absorção do padrão (vitamina C)
 $Abs_{(b)}$ = Absorção do branco

4.9.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de TBARS

O ensaio de TBARS foi realizado conforme a metodologia de Moraes et al. (2006) com modificações para os extratos do micélio e do caldo de cultivo. Cerca de 3 mg das amostras e padrão Butil hidroxitolueno (BHT), foram diluídos em 1,0 mL de etanol PA. O volume de 0,5 mL de solução de gema do ovo homogeneizada a 5% (*m/v*) e 0,1 mL de cada amostra e controle foram adicionados aos tubos de ensaio. Cada um dos tubos de ensaio, em seguida,

recebeu 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis (2 amidinopropano) dicloridrato - ABAP (0,035%).

Foram adicionados 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico – TBA (0,4% m/v) em solução de sulfato de dodecil de sódio – SDS (0,55% m/v) e 400 µL de água destilada. O material assim preparado foi submetido ao banho termostatizado (95 °C) durante 1 h. Após resfriamento, cada tubo recebeu 1,5 mL de n-butanol e foi centrifugado durante 3 min a 3.000 rpm, com posterior determinação espectrofotométrica dos sobrenadantes a 532 nm. As análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição na peroxidação lipídica foi calculada de acordo com a equação (14):

Em que:	$\%PI = \frac{(Abs_{(a)} - Abs_{(b)}) \times 100}{(Abs_{(p)} - Abs_{(b)})}$	(14)
%PI = Porcentagem de Redução da Peroxidação lipídica Abs_(a) = Absorção da amostra Abs_(v) = Absorção do padrão (BHT) Abs_(b) = Absorção do branco		

4.9.3 Avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*

A água do mar artificial foi preparada com 38 g de NaCl em 1.000 mL de água destilada, pH ajustado para 9,0 com Na₂CO₃ para evitar o risco de morte das larvas durante a incubação, mantendo-o na faixa de 7,5-9,0 (LEWAN et al., 1992).

Os ovos de *A. salina* foram colocados na água do mar artificial (200 mg de ovos/400 mL de água) para eclodir por 48 h sob aeração contínua e expostos à luz diurna e temperatura controlada (27-30 °C). Os extratos do micélio e do caldo de cultivo foram testados nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg.mL⁻¹, diluídas em metanol PA e colocadas em frascos adequados para a realização do teste.

O solvente foi evaporado em estufa a 40 °C, 24 h antes do teste. Como controle positivo utilizou-se dodecil sulfato de sódio (SDS), nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo foi utilizado o metanol PA. Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *A. salina* foram transferidos para os frascos que continham as amostras e controles. Após 24 h, realizou-se a

contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Os testes foram realizados em triplicata. Os dados foram analisados empregando-se o método estatístico "Probitos" além de, determinados os valores de CL_{50%} e 95% de intervalos de confiança. Os extratos foram considerados ativos com valores de CL_{50%} menor que 1000 ppm (MEYER et al., 1982).

4.9.4 Avaliação da atividade hemolítica

4.9.4.1 Atividade hemolítica em suspensão de hemácias

Este método foi realizado segundo Banerjee et al. (2008), com adaptações, utilizando-se sangue de carneiro adquirido da empresa Newprov®. No momento dos ensaios o sangue de carneiro foi levemente homogeneizado e 5 mL foram transferidos para um tubo de ensaio levado a centrifugação durante 5 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o restante lavado com tampão fosfato-salino (PBS) gelado e centrifugado por 5 min a 3000 rpm. Em seguida a papa de eritrócitos foi diluída com PBS para obter uma diluição de 2%.

Para a realização da prova de hemólise foram utilizados extratos do micélio e do caldo de cultivo nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg.mL⁻¹. As amostras foram diluídas com 10% de metanol PA e PBS. Como controle negativo utilizou-se PBS, controle positivo água destilada e Triton (1% v/v). No branco foi utilizado metanol no lugar da amostra. Foram misturados 200 µL das amostras e controles juntamente com 200 µL de solução de eritrócitos a 2% em tubos de Eppendorf.

Os tubos de Eppendorf foram homogeneizados manualmente sobre leve agitação e incubados durante 3 h em estufa a temperatura de 37 °C. Após, levados a centrifugação em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf a 3000 rpm durante 5 min.

O sobrenadante foi colocado em placa de Elisa de 96 poços, as determinações foram realizadas em espectrofotômetro Multiscan FC da empresa Thermo Scientific® na faixa de 540 nm. Para avaliar o índice da atividade (IA%) foi utilizado a seguinte equação:

Em que:	$\%IA = \frac{(Abs_{(a)} - Abs_{(b)}) \times 100}{(Abs_{(p)} - Abs_{(n)})} \quad (15)$
IA% = Índice de atividade hemolítica Abs_(a) = Absorção da amostra Abs_(p) = Absorção do controle positivo (água) Abs_(b) = Absorção do branco Abs_(n) = Absorção controle negativo	

4.9.4.2 Atividade hemolítica em placa de ágar sangue

Em discos de papel filtro Whatman® (nº 1) com aproximadamente 7 mm de diâmetro foram aplicados 20 µL dos extratos do micélio e caldo de cultivo a serem testados, na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ em PBS. Após secagem os discos foram colocados em placas de ágar sangue e incubados por 24 h a 35 °C em estufa. Verificou-se a existência de halo de hemólise ao redor do disco de papel. Como controle positivo foram utilizadas soluções de saponina e Triton 1000 µg.mL⁻¹. Discos impregnados com os solventes utilizados no preparo das amostras também foram submetidos ao teste para descartar a influência destes (KALEGARI et al., 2011). Essa análise foi realizada em triplicata.

4.9.5 Avaliação da atividade alelopática

4.9.5.1 Bioensaios de germinação e crescimento

Nestes ensaios, os extratos do micélio e do caldo de cultivo foram diluídos em metanol PA para obter as concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg.mL⁻¹. As soluções foram então colocadas em placa gerbox com papel filtro Whatman® (nº1).

As placas foram deixadas por 24 h dentro do fluxo laminar para evaporação do solvente. Após a evaporação foram adicionados 6 mL de água (destilada e autoclavada) e cinco sementes de *L. sativa* ou *A. cepa* por quadrante.

As gerbox foram incubadas em câmara BOD a 25 °C, com umidade controlada (± 80%) e com fotoperíodo desligado. As análises foram realizadas em quadriplicata. Como controle negativo foram utilizados água e metanol. Este

ensaio avaliou a germinação e o crescimento das sementes (MACÍAS et al., 2000; CHON et al., 2005)

Para a análise de germinação, foram realizadas contagens diárias durante 7 dias para *L. sativa* e por 14 dias para *A. cepa*. A velocidade da germinação (IVG) foi calculada segundo a metodologia descrita por Labouriau (1983), conforme equação (16):

$IVG = (G_1 / N_1) + (G_2 / N_2) + (G_3 / N_3) \dots + (G_n / N_n).$	(16)
Em que: IVG = velocidade de germinação G: número de plântulas germinadas por dia N: número de dias.	

Para os bioensaios de crescimento foram utilizadas as metodologias descritas por Barnes et al. (1987) e Macías et al. (2000). Após a germinação foram realizadas as medições dos hipocótilos e das radículas. A atividade foi expressa em porcentagem de inibição/estímulo de acordo Maguire (1962), conforme a equação (17):

$\%A = \frac{(Mt - Mc) \times 100}{Mc}$	(17)
Em que: %A= porcentagem da atividade Mt = medida de alongamento dos tratamentos Mc = medida de alongamento do controle	

4.9.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.9.6.1 Micro-organismos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana empregou-se o método de concentração inibitória mínima (CIM). Foi analisado a atividade dos extratos frente a 7 cepas de bactérias (4 Gram-positivas e 3 Gram-negativas) e 3 cepas fúngicas.

As bactérias Gram-negativas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25913), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e as Gram-positivas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Klebsiella pneumoniae (ATCC 700603). Em relação as cepas de fungos leveduriformes foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

4.9.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo

Os extratos do micélio e do caldo de cultivo foram dissolvidos em solução de DMSO:etanol:água ultrapurificada (2:10:88 v/v/v) e preparados por diluição seriada em 100 µL de caldo Muller-Hilton (MSB – Merck, Darmstadt, Alemanha) nas concentrações finais que variaram entre 7,81 a 1000 µg.mL⁻¹. Como controle da atividade inibitória dos diluentes (etanol e DMSO) foram empregadas soluções de etanol (10%) e DMSO (2%) incubados sob as mesmas condições dos extratos.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em placas de cultura com 96 poços pelo método de microdiluição em caldo e uma suspensão de micro-organismos preparada a uma densidade de 10⁸ UFC.mL⁻¹ em caldo Muller-Hilton foi incubada por 24 h a 37 °C para bactérias. Para fungos foi utilizado o caldo Sabouraud (Difco, Toronto, Canada) com um período de incubação de 72 h a 25 °C. Após a incubação das placas foram adicionados 20 µL de solução aquosa de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% e as microplacas foram incubadas novamente por três h a 35 °C. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a formação de cor (CLSI, 2015). A atividade dos extratos foi classificada de acordo com Santos et al., (2008) (Tabela 3).

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

CIM (µg.µL ⁻¹)	ATIVIDADE INIBITÓRIA
Até 100	BOA
100 – 500	MODERADA
500 - 1000	FRACA
> 1000	INATIVA

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., (2008).

4.9.7 Avaliação da atividade antitumoral

4.9.7.1 Ensaio de Viabilidade celular pelo método colorimétrico (MTT)

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados para o extrato bruto (EB), extrato hexano (EH) e extrato acetato de etila do micélio (EAEM) pertencentes ao micélio, além do extrato acetato de etila do caule do caule (EAEC) e fração polissacarídica (P1).

4.9.7.1.1 Ensaio com células de carcinoma adrenocortical (H295R) e adenocarcinoma colorretal (CACO-2)

O ensaio de MTT foi realizado conforme Mosmann (1983). As células de carcinoma adrenocortical (H295R) e adenocarcinoma colorretal (CACO-2) foram adicionadas em placas de 96 poços em uma concentração de $8 \cdot 10^5$ células por poço, as quais foram deixadas por 24 h para aderirem ao fundo dos mesmos. Após 24 h foram adicionados 180 μL de meio de cultura completo com 95% de meio Dulbecco's Modified Eagle's® (Sigma), 5% de Soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ estreptomicina e 20 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicilina) e 20 μL de amostra nas concentrações finais de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As células foram deixadas em contato com a amostra por 24 h. Então o meio foi retirado e adicionado 100 μL de MTT e incubados por 3 h.

Após esse período o MTT foi retirado e adicionado a placa DMSO, homogeneizado e determinado a absorbância em espectrofotômetro em 595 nm. A análise foi realizada em triplicata e por três dias distintos. Para avaliar a viabilidade das células foi utilizado a seguinte equação (18):

$$\%V = \frac{(\text{Abs}_{(a)} - \text{Abs}_{(b)}) \times 100}{(\text{Abs}_{(p)} - \text{Abs}_{(b)})} \quad (18)$$

Em que:

$\%V$ = Porcentagem de viabilidade celular

$\text{Abs}_{(a)}$ = Absorção da amostra

$\text{Abs}_{(p)}$ = Absorção do padrão (Células sem tratamento)

$\text{Abs}_{(b)}$ = Absorção do branco

4.9.7.1.2 Ensaio de Viabilidade/Citotoxicidade *Live/Dead*

As células foram semeadas previamente em placa de 96 poços na concentração de 8.10^5 células.mL⁻¹. Após 24 h foram adicionados 180 µL de meio de cultura completo com 95% de meio Dulbecco's Modified Eagle's® (Sigma), 5% de Soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10 U.mL⁻¹ estreptomicina e 20 U.mL⁻¹ penicilina) e 20 µL de amostra nas concentrações finais de 10, 100 e 1000 µg.mL⁻¹ e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 h.

Após o período de incubação foi adicionado 2,583 µL de meio de cultivo para que a concentração final no poço fosse de 2 µg.mL⁻¹ para o marcador de núcleo Hoeschst 33342 (Invitrogen) e para os marcadores do kit de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® (Invitrogen) a concentração de calceína fosse 0,3 µM e homodímero de etídio fosse 0,6 µM. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 30 min até leitura em microscópio de alto conteúdo In Cell Analyzer 2000. A análise foi realizada em triplicata.

As imagens foram adquiridas em objetiva com aumento de 10x (Nikon 10x/0,45 Plan apo CFI/60), colhidas aleatoriamente em quatro pontos, sem haver sobreposição das mesmas. Foram utilizados os canais DAPI com tempo de exposição de 650ms, FITC (350 ms) e TexasRed (650 ms) para as imagens de fluorescência.

Após aquisição das imagens, estas foram analisadas pelo software In Cell Analyzer Workstation v.3,7,3 (Ge Healthcare). Do total de células presentes em cada campo, as células que apresentaram fluorescência para o marcador homodímero de etídio, no canal TexasRed, foram consideradas mortas já as que tiveram fluorescência para o marcador calceína, no canal FITC, foram consideradas vivas. Devido essas características foi possível estipular a porcentagem de células vivas ou mortas após contato com extrato.

4.9.8 Atividade imunomodulatória

A atividade macrofágica foi avaliada quanto à capacidade de adesão e fagocitose, volume de lisossomos e produção de íons (ânion superóxido,

hidrogênio peróxido) e óxido nítrico com macrófagos da linhagem RAW264.7. Empregou-se 100 μL da solução de macrófagos com 1×10^6 células. mL^{-1} em DMEN (Sigma) suplementado com soro fetal bovino (10%) e 1% de antibiótico (10 U. mL^{-1} estreptomicina e 20 U. mL^{-1} penicilina), plaqueadas em placas de 96 poços.

Após 24 h foram adicionados os extratos do micélio (EB, EH, EC, EAEM), do caldo (EAEC) e a fração polissacarídica (P1) nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, diluídas em água com 10% de DMSO e filtradas. Os extratos e a fração polissacarídica ficaram em contato com os macrófagos por 24 h até a realização das análises descritas a seguir. Todas as análises imunomodulatórias foram realizadas em triplicata e por três dias distintos, para controle de todas as análises foi realizado branco, no qual foram incubadas somente as células com o meio sem nenhum tratamento.

4.9.8.1 Avaliação da capacidade fagocítica

A capacidade fagocítica foi analisada conforme método de Pipe et al. (1995), adaptado por Bonatto et al. (2004). Neste ensaio o reativo Zymosan ativa os receptores do tipo TOLL dos macrófagos e ocorre a internalização de partículas do reagente do corante, o qual apresenta diferentes valores de absorção que depende da presença do corante. As células aderidas à placas, foram adicionados 10 μL de Zymosan corado vermelho-neutro (10^8 partículas. mL^{-1}) em cada poço, inclusive no branco e a placa foi incubada a 37 °C por 30 min. Após incubação os macrófagos foram fixados com 100 μL de Baker formol-cálcio (formaldeído a 4%, cloreto de sódio a 2% e acetato de cálcio a 1%) e então incubados por 30 min a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de solução de extração (ácido acético glacial 96%/água MiliQ 1:93 v/v). Após 30 min de incubação a 37 °C foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A capacidade fagocítica foi expressa em absorbância (por 1×10^6 células. mL^{-1}).

4.9.8.2 Avaliação da capacidade de adesão dos macrófagos

A capacidade de adesão dos macrófagos foi avaliada conforme descrito por Rosen e Gordon (1987) com modificações. As células aderidas à placa, inclusive o branco, foram fixadas com 150 µL metanol 50% durante 10 min. Então o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de solução de Giemsa 0,2%, as placas foram incubadas a 37 °C por 40 min.

Os poços foram lavados cuidadosamente com 200 µL de PBS (3 vezes) e posteriormente foram adicionados 200 µL de metanol 50%, a placa foi incubada a 37 °C por 30 min. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. A capacidade da adesão foi expressa em absorbância (por 1×10^6 células.mL⁻¹).

4.9.8.3 Ensaio de retenção lisossomal

Para avaliar a retenção lisossomal dos macrófagos foi realizada a análise descrita por Pipe et al. (1995) adaptada por Bonatto et al. (2004), neste ensaio ocorre a absorção do corante catiônico (vermelho neutro), o qual concentra-se no interior dos macrófagos. Nos poços com células previamente incubadas com as amostras e no branco foi adicionado 20 µL de vermelho neutro a 2%, e então as placas foram incubadas por 30 min a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de solução de extração (ácido acético glacial 96%:água MiliQ 1:93 v/v). A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 595 nm e a retenção lisossomal foi expressa como absorbância (por 1×10^6 células.mL⁻¹).

4.9.8.4 Ensaio de produção de ânion Superóxido (O₂^{•-})

Esta análise foi realizada conforme Choi et al. (2006), na qual a produção de ânion peróxido foi estimada pelo nitro azul tetrazólio (NBT- Sigma). Nos poços com macrófagos previamente incubados com as amostras e no branco foram adicionados 100 µL de solução de NBT 0,25% (NBT:Zimbazam:PBS; 0,026:0,05:10 m/m/v) e incubados a 37 °C por 30 min.

O sobrenadante foi descartado novamente e os macrófagos foram fixados com 100 μL de metanol 50% e incubados por 10 min a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado com 120 μL de KOH (2M) e 140 μL de DMSO. A placa foi incubada novamente por 30 min a 37 °C e realizada a determinação da absorbância em espectrofotômetro em 595 nm. Os resultados foram expressos como absorbância (por 1×10^6 células.mL⁻¹).

4.9.8.5 Ensaio de produção de peróxido de hidrogênio

Essa análise foi realizada conforme Pick e Keisari (1980), a qual baseia-se na peroxidase de rábano silvestre, que observa-se a conversão de vermelho fenol em um composto colorido por H₂O₂. Nos poços com macrófagos previamente incubados com as amostras e no branco, foram adicionados 100 μL de solução de vermelho fenol, incubados por 30 min a 37 °C. Após foram adicionados 10 μL de NaOH (1M), exceto no branco, e a absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como absorbância (por 1×10^6 células.mL⁻¹).

4.9.8.6 Ensaio de produção de óxido nítrico

O teor de óxido nítrico foi medido no sobrenadante das células cultivadas com base no método descrito por DING et al. (1998). Foram transferidos 50 μL do sobrenadante para outra placa e adicionados 50 μL do reagente de Griess (0,1% de N-[1- Naphthyl] Ethylenediamida: 1% de Sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% 1:1 v/v). A mistura foi incubada por 10 min a 37 °C. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 550 nm e a concentração de nitrito foi determinada por meio de curva padrão de nitrito de sódio.

4.10 ATIVIDADE ANTAGONISTA ENTRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A *Pinus*

O antagonismo entre os fungos foi avaliado em ensaio de pareamento de cultura em placa de Petri (90 mm de diâmetro) que continha aproximadamente 20 mL de meio BDA (Kasvi®). Em cada placa, dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro de cada fungo foram colocados na superfície do ágar a uma distância de 5 mm da parede da placa. Logo após a inoculação, as placas foram seladas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a 20 °C durante 35 dias, no escuro. Todos os fungos foram pareados entre si, obtendo-se 10 pares para análise. Esta análise foi realizada em triplicata e foram examinados um total de 30 pares. Como controle, incubou-se os fungos isoladamente sob as mesmas condições (BADALYAN et al., 2002).

A capacidade antagonista foi determinada conforme Badalyan et al., (2002) usando-se a escala de classificação para os três tipos de reações (A, B, C) e 4 Subtipos (CA1, CB1, CA2 E CB2). Os tipos A e B são descritos por sua capacidade de inibição mútua de crescimento, nos quais nenhum dos organismos consegue sobrepor o outro, seja no contato micelial (A) ou a distância (B). O tipo C, é descrito como uma forma de sobrecrecimento sem inibição inicial (um dos organismos consegue sobrepor o outro). Os subtipos intermediários são: CA1 parcial e CA2 completo, com inibição de crescimento após contato micelial; CB1 parcial e CB2 completo, e que há inibição inicial a distância. O seguinte valor foi atribuído para cada tipo de reação: A = 1; B = 2; C = 3; CA1 = 3,5; CB1 = 4; CA2 = 4,5; CB2 = 5. O índice de antagonismo (AI) de cada espécie foi calculado conforme a seguinte equação (17):

$$AI = A (nX1) + B (nX2) + C (nX3) + CA1(nX3,5) + CB1(nX4) + CA2(nX4.5) + CB2(nX5) \quad (19)$$

Em que:

AI = índice de inibição;
n = número de ocorrências;

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral e imunomoduladora os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três repetições de cada experimento. O valor de $p < 0,05$ foi usado para denotar diferenças significativas entre os valores médios determinados pela análise de variância com a assistência do software “IBM SPSS Statistics versão 20.0”. Os resultados foram comparados por meio de análise de variância unidirecional e multivariada (ANOVA), seguida pelos testes de múltiplas faixas de Duncan. O método de Probitos foi utilizado para determinar os valores de dose letal ($DL_{50\%}$ e $DL_{90\%}$), bem como os correspondentes intervalos de confiança de 95% e valores de qui-quadrado para os ensaios com *A. salina*, foi utilizado o IBM SPSS Statistics versão 20.0.

Os dados obtidos na avaliação alelopática foram submetidos para análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do Software Sisvar®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

Os conteúdos determinados, em ordem decrescente foram: carboidratos totais, fibras brutas, proteína bruta, lipídeos e cinzas (Tabela 4).

TABELA 4 - ANÁLISE PROXIMAL DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MICÉLIO DE *Armillaria* sp.

Análise	Concentração em 100g de micélio liofilizado
Umidade (g)	18,9 ± 0,4
Proteínas (g)*	6,1 ± 0,079
Lipídeos (g)	3,2 ± 0,05
Carboidratos (g)	55,5 ± 0,73
Fibras brutas (g)	16,3 ± 0,58
Cinzas (g)	1,9 ± 0,09
Valor energético (KJ)	1165,5

* Utilizou-se o fator de conversão de proteínas 4,38 (SALES-CAMPOS et al., 2011)
Fonte: O autor (2019)

O teor de umidade do micélio liofilizado de *Armillaria* sp. (18,9%) foi considerado baixo, uma vez que os fungos (micélio ou cogumelos) são conhecidos pelo alto teor de umidade, já que podem chegar a até 90% (WANG et al., 2014). A liofilização é uma alternativa de conservação das propriedades fúngicas em longo prazo, pois preservam o material de contaminações, uma vez que retira a água livre da amostra e impede a propagação de micro-organismos (TAN et al., 2007).

Os resultados corroboram com relatos na literatura que demonstram que os carboidratos, proteínas e fibras brutas são os compostos predominantes em fungos, enquanto que o teor de lipídeos é baixo (KALAČ, 2013).

Poucos estudos foram encontrados na literatura em relação as propriedades nutricionais de micélio fúngico produzido em caldo de cultivo. A discussão dos resultados foi baseada em fungos de modo geral e incluiu cogumelos comestíveis.

Em relação ao teor de proteínas, *Armillaria* sp. apresentou valores de 6,1%, valor inferior ao encontrado por KALAČ (2013) para fungos comestíveis

(12,0 - 28,7%). Em relação ao gênero, o valor também foi inferior aos descritos para *A. tabescens* (22,9%) e *A. mellea* (24,47%) (OUZOUNI et al., 2009). A síntese de proteínas por fungo pode ser afetada devido às condições de cultivo como: temperatura, caldo e tempo de cultivo (KAREN ZEN et al., 2014).

O teor de lipídios encontrado nesta pesquisa (3,2%), está de acordo com o descrito por Ouzouni et al. (2009) para o gênero, que encontrou valores de 2,5% para *Armillaria tabescens* e 2,1% para *A. mellea*, visto que os fungos podem apresentar teor de lipídeos de até 5% (BREENE, 1990; MATTILA et al., 2001).

O teor de carboidratos (55,5%) coincide com o encontrado na literatura para outras espécies de fungos (aproximadamente 60%) (MATTILA et al., 2001), outras espécies de *Armillaria* apresentaram teor de carboidratos próximos como a *A. mellea* e *A. tabescens* apresentaram respectivamente 70% e 66,9% (OUZOUNI et al., 2009; WANG; ZHANG, 2010).

O teor de fibras encontrado foi igual a 16,35%, o qual está em conformidade com o descrito por Wang et al. (2014) para fungos alimentares (5 - 40%), porém nenhum estudo demonstrou o teor de fibras em outras espécies de *Armillaria*. As fibras brutas são um grupo de carboidratos que não são digeríveis pelo organismo. Estes compostos podem melhorar as funções do trato gastrointestinal e diminuir os níveis de colesterol e glicose no sangue (WANG et al., 2014).

Na análise de cinzas totais foi observado baixo valor (1,95 %) ao comparar com dados da literatura, que descrevem que o teor de cinzas totais em fungos pode variar de 5,27 a 10,5% (LI et al., 2014). Este baixo valor pode ser atribuído à pequena quantidade de matéria inorgânica na espécie estudada, uma vez que essa análise visa estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis por processo de incineração (CIRIO et al., 2003).

O valor energético para fungos comestíveis apresenta uma ampla faixa de variação entre 86,4 a 1722,1 kJ a cada 100 g de amostra (SOUSA et al., 2007; KALAČ, 2009; WANG et al., 2013; LIU et al., 2016). Para o micélio liofilizado de *Armillaria sp.*, foi observado um valor de 1165,5 kJ (278,5 Kcal) a cada 100 g de amostra, o que demonstrou que esse fungo apresenta potencial valor energético.

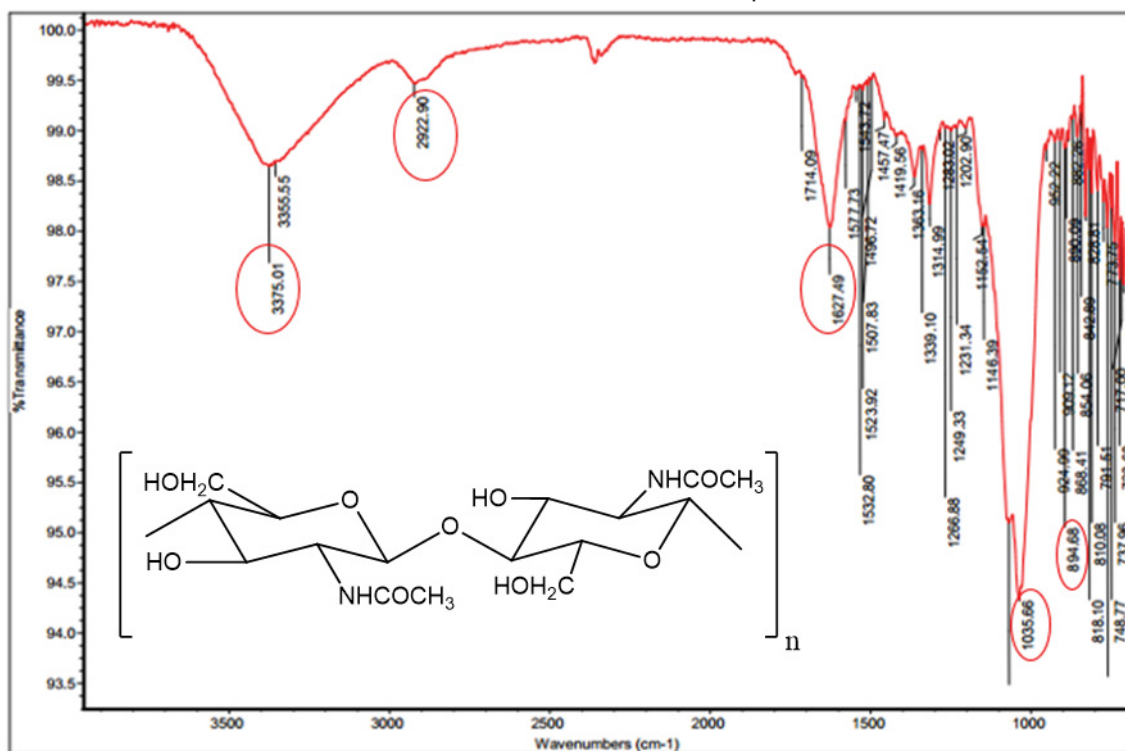
5.1.1 Análise de quitina

O teor de quitina obtido na amostra liofilizada de *Armillaria* sp. foi de 7,6%, estudo realizado com *A. mellea* encontrou valor igual a 11,1% de quitina para essa espécie (MARIO et al., 2008), que é considerado um valor superior ao encontrado neste trabalho. Comparado com outros basidiomicetos, observa-se que o gênero *Armillaria* apresentam valor de quitina dentro da faixa descrita na literatura (0,82 - 21,8%) (TSUJI et al., 1969; NITSCHKE et al., 2011).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica bastante utilizada para determinação e caracterização de quitina e quitosana (BRUGNEROTTO et al., 2001). A partir da análise do espectro (Figura 7) pode-se observar as seguintes bandas características: a presença na região de 3400 cm^{-1} de uma banda larga e intensa, característica das vibrações de estiramento axial do grupo hidroxila presente na quitina, a qual está sobreposta a banda de estiramento de N-H; os sinais presentes na região de 2900 cm^{-1} são relacionados ao estiramento C-H; outras quatro bandas características, observadas, estão entre 1700 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} ; a banda em 1627 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação axial de C=O, denominada amida I, presente na quitina; observa-se ainda uma banda em 1577 cm^{-1} , denominada como amida II, devido a mistura de dois modos vibracionais, N-H no plano e estiramento C-H.

Atribui-se a banda na região de 1380 cm^{-1} à deformação angular simétrica do grupo CH_3 . A banda presente em 1314 cm^{-1} é atribuída às ligações C-N e C-H. As bandas observadas entre as regiões de $890\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ correspondem a deformação da amida III (BRUGNEROTTO et al., 2001; KUMIRSKA et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

FIGURA 7 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DA QUITINA EXTRAÍDA DO MICÉLIO DE *Armillaria* sp.



Nota: 3375 cm^{-1} vibração de estiramento axial OH; 2922 cm^{-1} estiramento C-H; 1627 cm^{-1} deformação C=O; 1035 e 894 cm^{-1} deformação da amida III.

Fonte: O autor (2019).

A quitina apresenta uma importante aplicação na área farmacêutica, que é utilizada na produção de medicamentos e vacinas, e também em dispositivos de liberação controlada de fármacos, na indústria alimentícia e cosmética (CAMPANA-FILHO et al., 2007) .

A produção mundial de quitina provém essencialmente de exoesqueleto de crustáceos (camarão, siri e lagosta) (BESSA-JUNIOR; GONÇALVES, 2013), porém o isolamento industrial dessa fonte tem algumas desvantagens, como poluição ambiental e disponibilidade sazonal.

Devido a presença de carbonato de cálcio, proteínas, lipídeos e pigmentos, a purificação da quitina a partir deste material necessita de um tratamento agressivo com HCl e NaOH, o qual pode provocar mudanças no produto final, e causar alterações químicas como a desacetilação e despolarização da quitina, além de poluição ambiental com a liberação dos resíduos deste tratamento (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991; MARIO et al., 2008).

Torna-se assim importante a busca de novas fontes de quitina, como por exemplo, espécies fúngicas, dentre elas espécies de *Armillaria*.

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E DO CALDO DE CULTIVO

Pode-se observar que o extrato com maior rendimento foi o EMEOH (Tabela 5), isso se deve a afinidade dos compostos presentes na amostra pelo solvente (HAYOUNI et al., 2007). A presença de compostos com caráter mais polar, que apresentam elevada solubilidade em metanol podem ser os responsáveis por esse maior rendimento.

TABELA 5 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	RENDIMENTO (%)
MICÉLIO	
EB	10,9
EH	2,7
EC	0,39
EAEM	3,5
EME OH	25,4
EHA	15,2
CALDO DE CULTIVO	
EAEC	7,05

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM) extrato hidroalcoólico (EHA), extrato metanólico (EME OH) e extrato do caldo de cultivo (EAEC).

FONTE: O autor (2019).

Na extração utilizou como solvente acetato de etila no micélio (EAEM) ocorreu a precipitação de cristais (Armi200), com rendimento de 2,2% (*m/m*) em relação a massa liofilizada. Esses cristais foram separados e identificados por cristalografia de raios-X.

5.3 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise química preliminar por CCD (Tabela 6), demonstrou a presença de compostos fenólicos, esteroides e terpenos. Cabe salientar que os terpenos são comuns nesse gênero, pois foram observados em *A. mellea* (LI et al., 2016),

A. tabescens (DONNELLY et al., 1997), *Armillaria novae-zelandiae* (G. Stev.) Boesew., (CREMIN et al., 2000) e *Armillaria luteovirens* (Alb. & Schwein.) Sacc., (BAI; BAO, 2012) A presença de compostos fenólicos foi observada em *A. mellea* (LUNG; CHANG, 2011) e *A. luteovirens* (BAI; BAO, 2012).

TABELA 6 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	ESTEROIDES TERPENOS	TANINO	COMPOSTOS FENÓLICOS	ALCALOIDE
MICÉLIO				
EB	+	-	+	-
EH	+	-	-	-
EC	-	-	+	-
EAEM	-	-	+	-
EMEOH	-	-	+	-
EHA	-	-	+	-
CALDO DE CULTIVO				
EAEC	-	-	+	-

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), Positivo (+); negativo (-)

Fonte: O autor (2019)

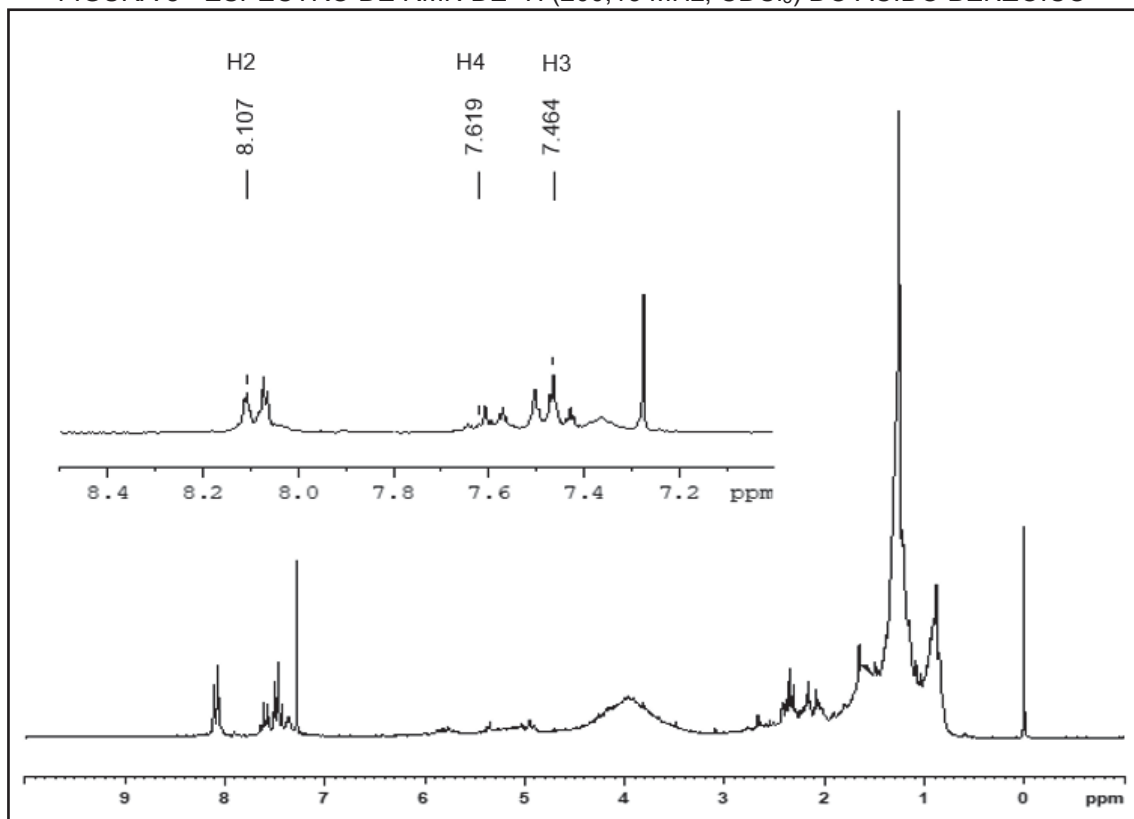
Apesar de ser observado a presença de alcaloides em *Armillaria* sp, este metabólito foi descrito para de *A. mellea* (WANG, Y. et al., 2013; MUSZYŃSKA et al., 2014) e *A. luteovirens* (BAI; BAO, 2012). A presença de taninos não foi observada para o gênero.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONTITUÍNTES QUÍMICOS

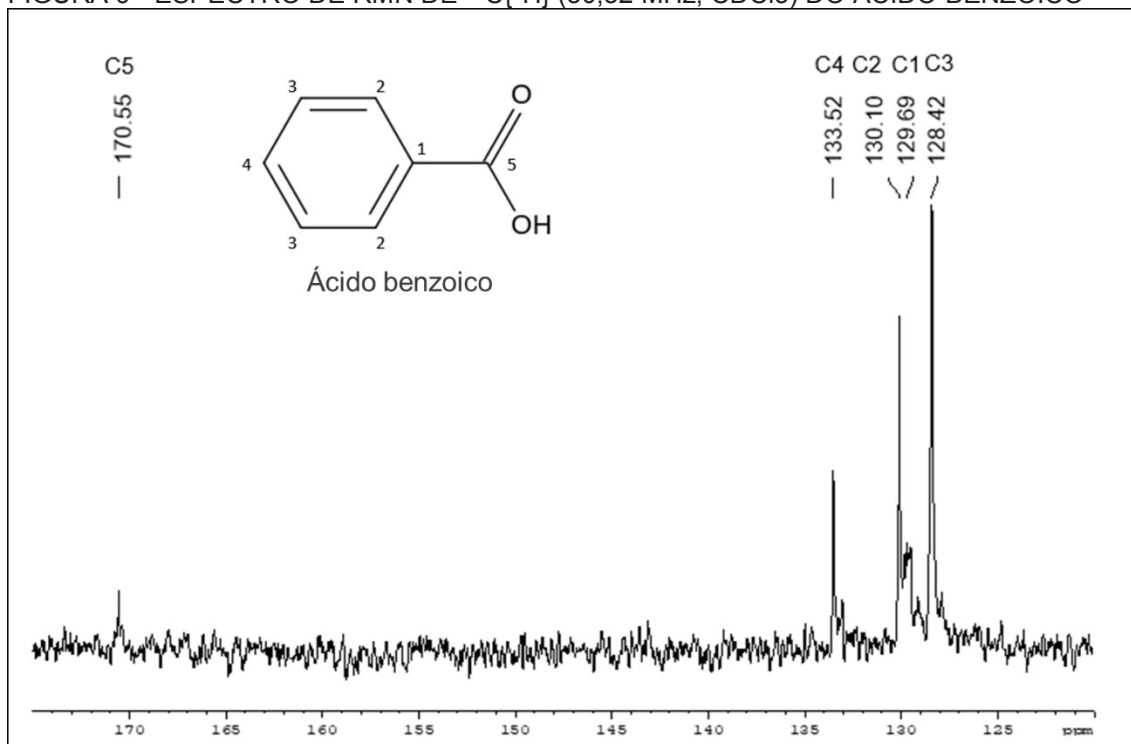
5.4.1 Extrato hexano (EH) do micélio

5.4.1.1 Análise do extrato hexano (EH) do micélio por RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 8) e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 9) do extrato hexânico (EH) do micélio fúngico demonstraram a substância denominada ácido benzoico (Figura 9), os dados obtidos foram comparados com os descritos na literatura (Tabela 7).

FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO

Fonte: O autor (2019).

FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50,32 MHz, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO

Fonte: O autor (2019).

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H E $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (200,13 MHz, 50,32 MHz, PPM, CDCl_3) DO ÁCIDO BENZOICO

POSIÇÃO	δ_{h}		δ_{c}	
	<i>Armillaria</i> sp.	CORDEIRO et al., (2015)*	<i>Armillaria</i> sp.	CORDEIRO et al., (2015) *
C-1	-	-	129,69	128,98
CH - 2	8,10	8,13	130,10	129,26
CH - 3	7,46	7,50	128,42	128,47
CH - 4	7,61	7,62	133,52	133,76
COOH	-	-	170,5	171,33

*CORDEIRO et al., (2015). Ambos em CDCl_3 (clorofórmio deuterado). Valores em ppm relativos ao sinal do TMS como padrão.

No espectro de ^1H (Figura 8) pode-se observar a presença de três multipletos com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos em δ 8,17 (H-2 e H-6), δ 7,1464 (H-3 e H-5) e δ 7,619 (H-4) os quais foram atribuídos devido a estrutura simétrica. No espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 9) observou-se 5 sinais dos quais pode-se destacar um sinal referente ao grupamento carbonila com deslocamento químico característico de função ácido carboxílico (C-7) em δ 170,55. Os outros sinais em δ 129,7 (C-1), 130,1 (C-2 e C-6), 128,4 (C-3 e C-5) e 133,5 (C-4), referentes a presença de um carbono quaternário (C-1) e carbonos metínicos (CH), estão localizados no anel aromático.

Os fungos apresentam a capacidade de produzir ácido benzoico, este composto foi observado em *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm., *Resinicium bicolor* (Alb. & Schwein.) Parmasto (HYNES et al., 2007), *A. ostoyae* (ISIDOROV et al., 2008) e *Armillaria* sp. (HADIBARATA; KRISTANTI, 2012).

O ácido benzoico faz parte da classe de ácidos carboxílicos, essa substância apresenta interesse industrial, e é aplicado principalmente como conservante de alimentos, cosméticos e medicamentos. Atua como bacteriostático e fungistático que inibe o crescimento de alguns micro-organismos (OLIVEIRA; REIS, 2017).

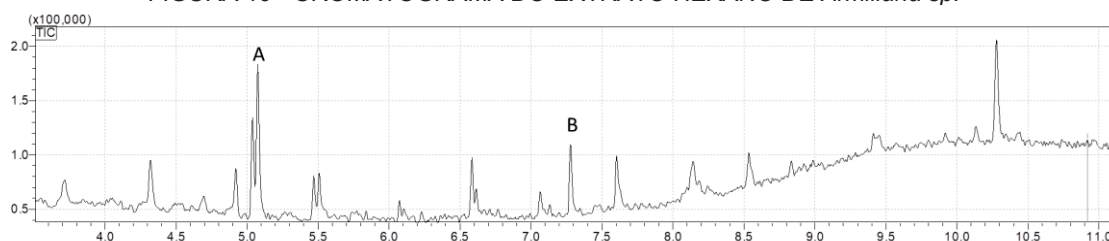
Além da atividade antimicrobiana, estudos demonstram que o ácido benzoico pode apresentar toxicidade a peixes e invertebrados (ZHAO et al., 1998; KAMAYA et al., 2005). Barratt (1996) relatou ainda que a atividade

antimicrobiana e a toxicidade deste composto dependem do pH do meio aquoso, pois seu estado ionizado reduz a ação na membrana.

5.4.1.2 Análise de ácido graxo do extrato hexano (EH) do micélio por CG-MS

Os compostos foram identificados por similaridade com os espectros de massa da biblioteca Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich), juntamente com a biblioteca espectral de massa NIST14. Por meio dessa comparação foi possível sugerir a presença de três ácidos graxos: ácido láurico (pico A) e palmítico (pico B) (Figura 10).

FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO HEXANO DE *Armillaria sp.*

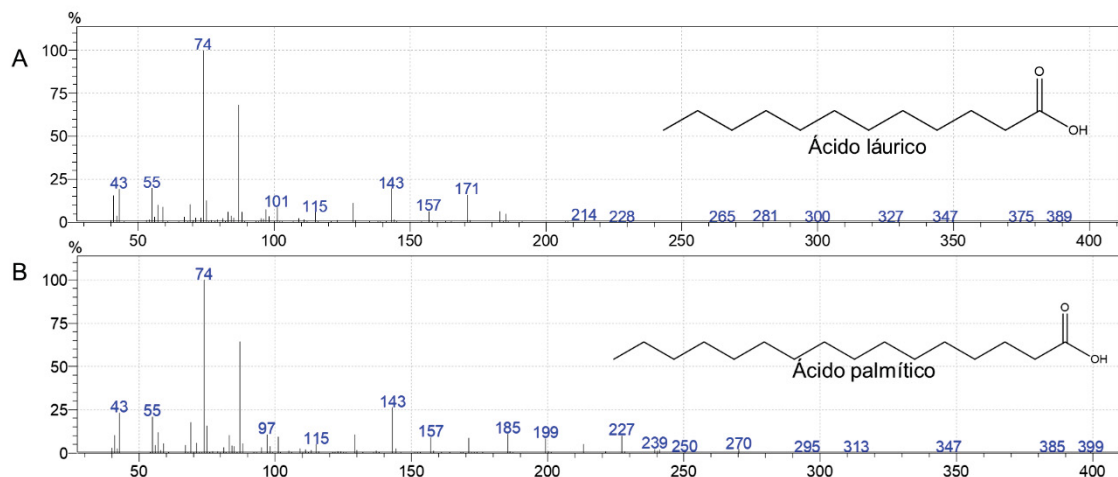


Nota: Análise por cromatógrafo a gás equipamento CG2010 Plus (GC) acoplado a um analisador de massas triplo quadrupolo, TQ8040 (Shimadzu), equipado com um amostrador automático AO5000. **A:** Ácido láurico (C12:0); **B:** Ácido Palmítico (16:0). *As possíveis estruturas destes compostos foram avaliadas por análise de CG/MS e comparação com os espectros de massa das bibliotecas Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich) e NIST14.

Fonte: O autor (2019).

O espectro do éster metílico do ácido láurico (Figura 11A) apresentou íon molecular m/z 214 e o éster metílico do ácido palmítico (Figura 11B) íon molecular m/z 270. O pico base de m/z 74 o qual corresponde ao íon $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ devido ao rearranjo de McLafferty característico da quebra da ligação β em relação ao grupo $\text{C}=\text{O}$ e o pico m/z 87 corresponde aos íons $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$ são comuns nos três compostos. Outros fragmentos de quebra que podem ser encontrados nesses espectros são oriundos de quebras sucessivas das ligações C-C (m/z 43, 85 e 99) ou fragmentos com oxigênio (m/z 73, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213) os quais apresentam intervalo de 14 unidades de massas (CH_2), normalmente encontrados em hidrocarbonetos e ácidos graxos (PARK et al., 2003; SILVERSTEIN et al., 2007; LEANDRO, 2011).

FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSAS DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO EXTRATO HEXANO DE *Armillaria sp.*



Nota: **A:** Espectro CG-MS do ácido láurico, **B:** Espectro CG-MS ácido palmítico.

Fonte: O autor (2019)

Os ácidos graxos encontrados em fungos são provenientes de lipídeos neutros de vesículas de armazenamento e fosfolipídios de organelas ligadas às membranas celulares. Esses compostos geralmente apresentam de 12 a 24 carbonos. A composição pode ser influenciada pela idade fisiológica da cultura, temperatura de cultivo e substrato de crescimento, devido essas razões os ácidos graxos presentes em fungos podem apresentar diferentes composições devido ao estado fisiológico do fungo ou da cultura (GRAHAM et al., 1995; STAHL; KLUG, 1996; DIMOU et al., 2002; LARKIN; GROVES, 2003; BRONDZ et al., 2004; COX et al., 2006).

O ácido láurico e o palmítico foram relatados no micélio de *Armillaria gallica*, *A. tabescens* (COX et al., 2006), *A. mellea* (YILMAZ et al., 2006), *A. borealis* (BRONDZ et al., 2004) e *A. luteovirens* (JING et al., 2012). Os ácidos graxos são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas (Tabela 8).

TABELA 8 - PROPRIEDADES BIOLÓGICAS ENCONTRADAS NOS ÁCIDOS GRAXOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO HEXANO

ÁCIDO GRAXO	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	REFERÊNCIAS
Ácido láurico (C12:0)	Antibacteriana; antifúngica; antiviral; antiprotozoária; citotoxicidade; antioxidante; inibidor enzimático (COX-I e COX-II); antitumoral;	NISHIKAWA et al., 1958; HENRY et al., 2002; ZHENG et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008; DESBOIS; SMITH, 2010; OLIVEIRA, et al., 2014;
Ácido palmítico (C16:0)	Antibacteriana; antifúngica; antioxidante; antitumoral; alelopática;	TSUZUKI et al., 1987; HENRY et al., 2002; LIU et al., 2008; DESBOIS; SMITH, 2010; NAGATA et al., 2015

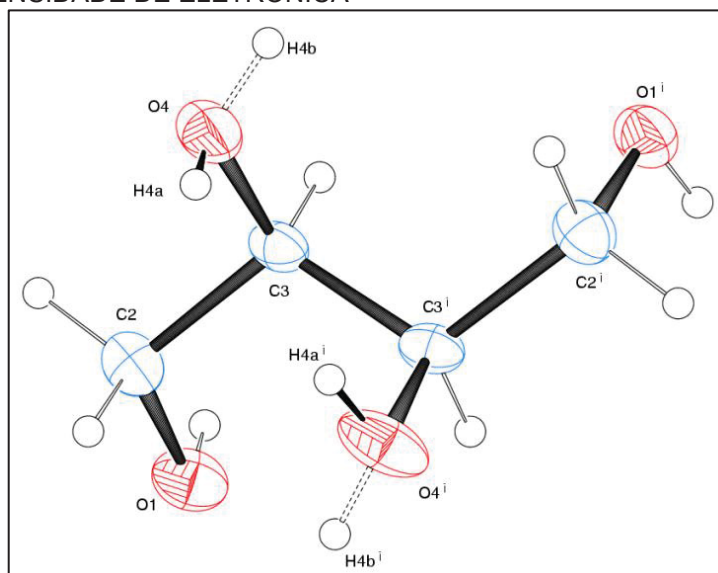
Fonte: O autor (2019)

5.4.2 Extrato acetato de etila do micélio (EAEM)

5.4.2.1 Cristais Armi200 obtidos do extrato acetato de etila do micélio (EAEM)

Os cristais precipitados durante a extração com acetato de etila (Armi200) consistem em um sistema cristalino trigonal $P3_121$ com dimensões de cela unitárias de $a = b = 10,1506(5) \text{ \AA}$, $c = 4.8829(3) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$, de acordo com o banco de dados essa substância é denominada D-Treitol (Figura 12).

FIGURA 12 - ARRANJO DOS ÁTOMOS DO D-TREITOL COM 30% DA PROBABILIDADE DA DENSIDADE DE ELETRÔNICA

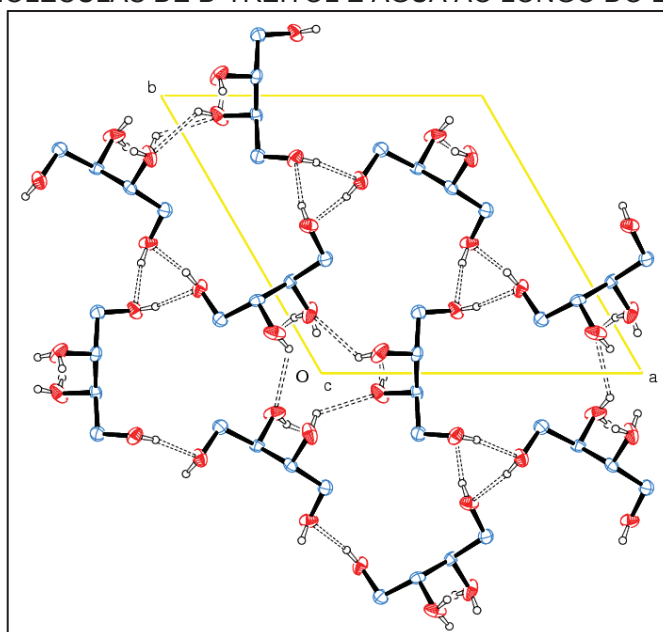


Nota: Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: i) $x-y, -y, -z + 2/3$
 Fonte: O autor (2019)

A difração de Raios-X é considerada a técnica mais adequada para a determinação de substâncias em fase cristalina. Essa técnica se baseia na focalização de um feixe de Raios-X na amostra cristalina o que causou o fenômeno de difração (ALBERS et al., 2002). A estrutura cristalina de D-Treitól (2R, 3R, 4-tetrahidroxibutano) foi publicada por Jeffrey e Huang (1992).

A molécula de D-Treitól apresenta várias ligações de hidrogênio intermoleculares para estabilizar sua estrutura. Na Figura 13 pode-se observar a disposição dos átomos que envolvem as ligações de hidrogênio das moléculas de D-Treitól, bem como a geometria dessas ligações está descrita na Tabela 9.

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO LIGANDO AS MOLÉCULAS DE D-TREITOL E ÁGUA AO LONGO DO EIXO C



Nota: As ligações de hidrogênios estão representadas por linhas tracejadas
Fonte: O autor (2019)

TABELA 9 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO, DISTÂNCIAS EM ÂNGSTROMS E ÂNGULOS EM GRAUS [°]

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1)...O(1)#2	0,82	1,90	2,713(2)	170,4
O(4)-H(4A)...O(4)#3	0,82	2,15	2,716(4)	126,4
O(4)-H(4B)...O(4)#4	0,82	1,87	2,671(3)	163,5

Nota: Transformações de simetria para gerar átomos equivalentes
Fonte: O autor (2019)

#2 -y+1, x-y, z+1/3
#3 y, x, -z+
#4 x-y, -y, -z+5/3

Os polióis são carboidratos de baixa massa molecular, formados a partir da redução dos grupos aldeído ou cetona presentes no açúcar (GE et al., 2013). Nesta classe estão presentes o glicerol, eritritol, ribitol, arabinitol, manitol, sorbitol, glalacitol entre outros (GORIN et al., 1993). Autores relatam que os polióis produzidos pelos fungos podem apresentar inúmeras funções, dentre elas destacam-se a de reserva de energia, fonte de carbono e substâncias osmorreguladoras (MOREIRA, 2009; NOBRE, 1990).

Esses metabólitos apresentam baixo valor calórico ($2,4 \text{ Kcal.g}^{-1}$) e baixa ou nenhuma ação insulínica, devido a sua lenta absorção intestinal. Portanto é recomendado o seu consumo por diabéticos, porém deve ser limitado devido a irritações intestinais que podem causar ação laxante (GOMES, C. R. et al., 2007; RICHTER; CAETANO, 2007; GREMBECKA, 2015).

O D-Treitol é um diastereoisômero do eritritol, que juntamente com o sorbitol apresentou atividade crioprotetora. Esses polióis protegem o besouro de sofrer congelamento a -60°C (WALTERS et al., 2009). Alguns estudos demonstram a capacidade que os fungos e alguns insetos possuem em produzir D-Treitol a partir da glicose (BIRKINSHAW et al., 1947; KLIS et al., 2015). Sua presença foi descrita em *A. mellea* (BIRKINSHAW et al., 1947), *Claviceps purpúrea* (Fr.) Tul. (VINING; TABER, 1964), *Allomyces arbusculus* Butler, *Chaetomium elatum* Kunze, Deutsche Schwämme (PFYFFER; RAST, 1980) e *Ascotricha* sp. (XU et al., 2017).

Em relação ao rendimento do D-Treitol, pode-se observar distinção entre a espécie de *Armillaria* estudada (2,22%) e a *A. mellea* (13%) (BIRKINSHAW et al., 1947). Esta diferença que pode estar ligada às condições de cultivo (caldo, temperatura e tempo), ao método de extração utilizado e as características genéticas da espécie (DAVIES, 2006; FRISVAD et al., 2008; BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011).

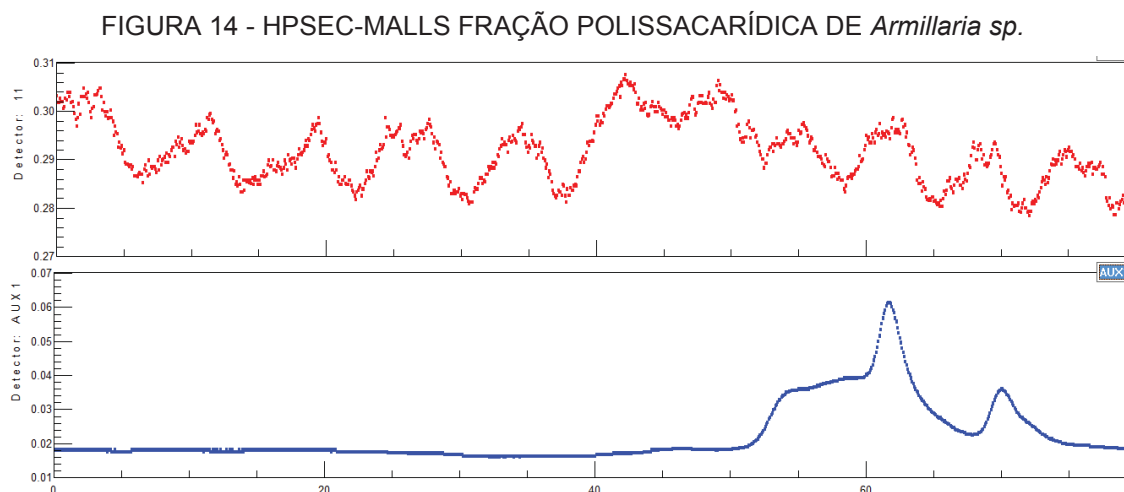
5.5 ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO

5.5.1 Obtenção da fração polissacarídica

O micélio liofilizado e triturado de *Armillaria* sp. (30 g) após ser deslipidificado apresentou um material resultante de 23,076 g. Após extração, precipitação e liofilização do precipitado obteve-se um rendimento de 1,75% o qual foi denominada de fração polissacarídica (P1).

5.5.2 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

A composição monossacarídica apresentou 44,14% de galactose, 30,70% de glucose, 17,5% de manose e 8,1% de fucose. Análise do cromatograma de HPSEC-MALLS (Figura 14) indicou que se trata de uma mistura heterogênea, com picos eluídos em diferentes tempos (~62 e ~70 min), possivelmente devido a presença de mais de um tipo de polissacarídeo, com diferentes pesos moleculares.

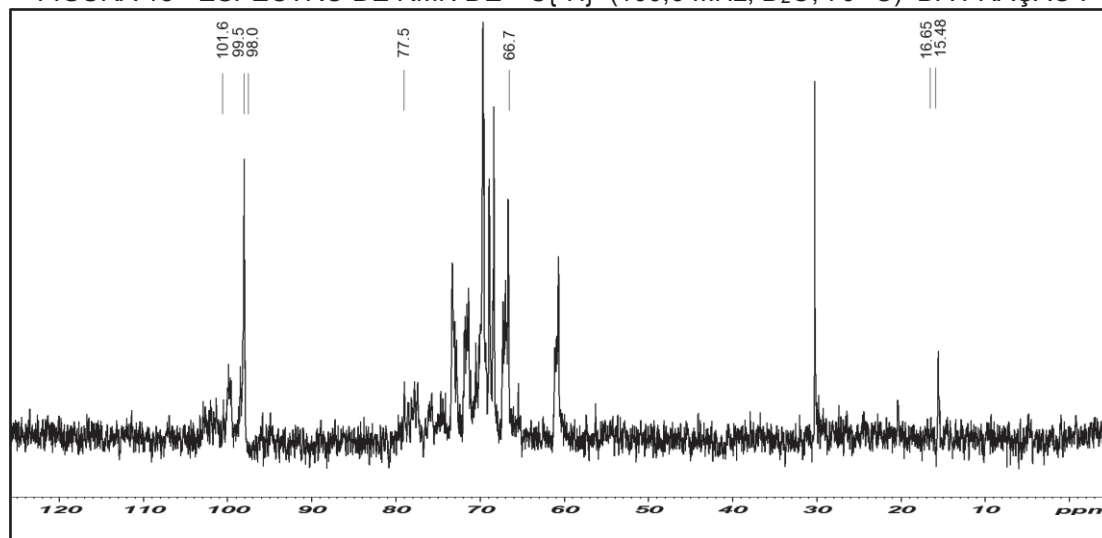


Fonte: O autor (2019).

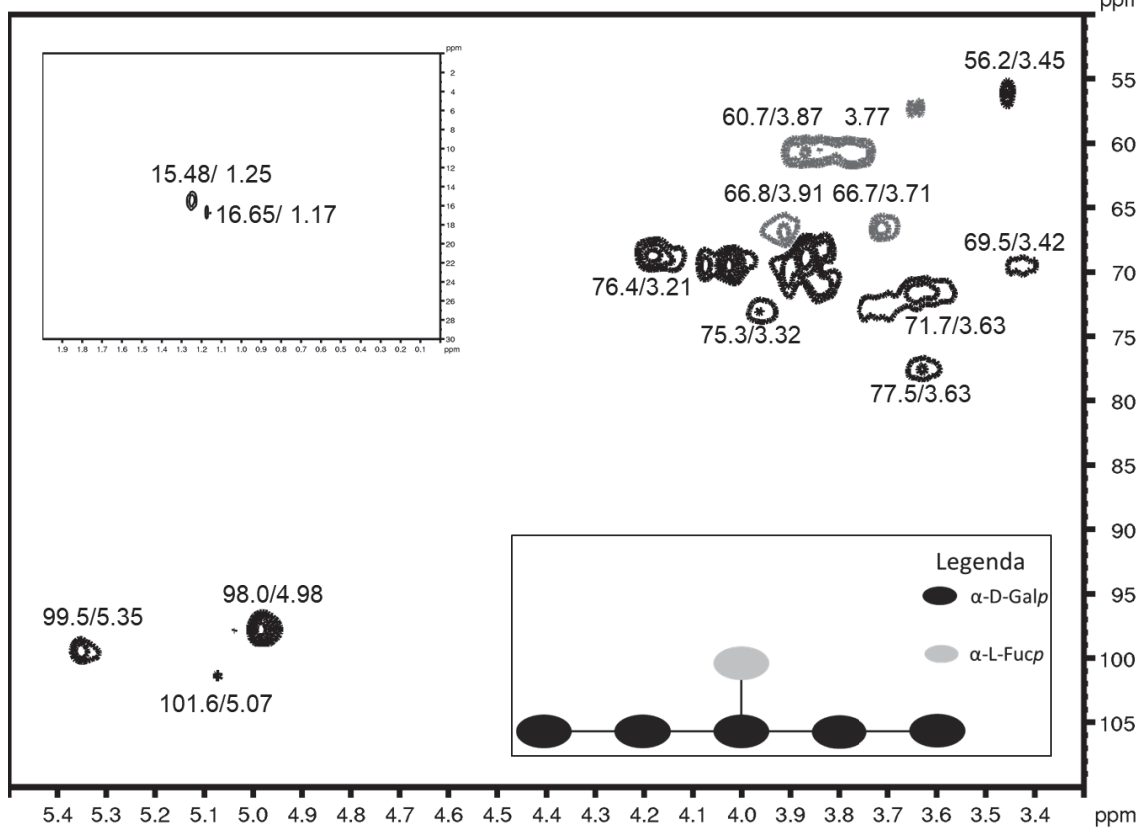
O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (Figura 15) apresentou na região anomérica os sinais em δ 99,5 e 98,0, os quais são referentes a α -D-Galp (SILVEIRA et al., 2015) e em δ 101,6 o qual pode corresponder a α -D-Manp (KOMURA, 2009) ou a α -D-Fucp (RUTHES et al., 2012). O sinal em δ 77,5 indica

a presença de uma possível substituição em O-2 de unidades 2,6 $\rightarrow$) -D-Galp- (1 $\rightarrow$; os sinais invertidos no HPSEC-DEPT δ 66,7/3,91 e δ 66,7/3,71 ppm confirmam a substituição em O-6 (KOMURA et al., 2010; RUTHES et al., 2012, 2013). Os sinais em δ 15,48/1,25 e δ 16,65/1,17 confirmam a presença do CH₃ da fucose (KOMURA et al., 2010) (Figura 16). A análise de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ indica a presença de uma fucogalactana com cadeia principal composta por D-Galp ligada -(1 $\rightarrow$ 6), substituída na posição O-2 por terminais não redutores de L-Fucp.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100,6 MHz, D₂O, 70 °C) DA FRAÇÃO P1



Fonte: O autor (2019).

FIGURA 16 - MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC-DEPT (400,1 MHz, D₂O, 70 °C) DA FRAÇÃO P1.

Fonte: O autor (2019)

As fucogalactanas são heteropolissacarídeos formados por mais de um tipo de açúcar. O interesse por essa classe de polissacarídeos tem aumentado, principalmente devido a suas propriedades biológicas (anti-inflamatória, antinociceptiva, antissepsia, antitumoral e imunomodulatória) (MIZUNO et al., 2000; RUTHES et al., 2016). As fucogalactanas foram descritas em diversos basidiomicetos como: *Polyporus ovinus* (Schaeff) (AXELSSON; BJÖRNDAL, 1969), *Fomes annosus* (Fr.) Cooke (AXELSSON et al., 1971), *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (USUI et al., 1981), *Agaricus brasiliensis* Fr., *Agaricus bisporus* var. *hortensis* (KOMURA et al., 2010), *Lactarius rufus* (Scop.) Fr. e *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach (RUTHES et al., 2012).

5.5.3 Análises físico-químicas da fração polissacarídica

5.5.3.1 Dosagens colorimétricas

As dosagens colorimétricas da fração polissacarídica (P1) obtida a partir de *Armillaria* sp., demonstraram a presença de compostos fenólicos e carboidratos (Tabela 10).

TABELA 10 – DOSAGENS COLORIMÉRICAS DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	COMPOSTOS FENÓLICOS (mg.EAG.g ⁻¹)	CARBOIDRATOS (%)
P1	47,18	90,38

Nota: Fração polissacarídica (P1)

Fonte: O autor (2019)

A fração polissacarídica apresentou concentração média a alta de compostos fenólicos (CHEW et al., 2011). Os polissacarídeos são capazes de se ligar aos compostos fenólicos por esterificação. A maioria dos polissacarídeos extraídos de fungos apresentam esses compostos em sua constituição (FRY, 2004; KLAUS et al., 2011). A coloração castanha da fração polissacarídica extraída de *Armillaria* sp., também está correlacionada com a concentração de compostos fenólicos. Essa coloração ocorre devido a oxidação dos compostos fenólicos presentes na fração durante a extração (KOZARSKI et al., 2012). O teor de carboidratos presente na espécie de *Armillaria* estudada (90,38%) está próximo ao encontrado para *A. mellea* (94%) (SUN et al., 2009).

5.6 ANÁLISE REALIZADA PARA OS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

5.6.1 Detecção de compostos fenólicos totais

Os resultados obtidos a partir da curva analítica de ácido gálico, demonstraram diferentes concentrações de compostos fenólicos, a depender do

extrato testado (Tabela 11). Segundo Chew et al. (2011), concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG.g⁻¹ são consideradas altas e de 30-50 mg.EAG.g⁻¹ classificadas como média a alta. De acordo com esta classificação, pode-se dizer que o EAEC (132,2 mg.EAG.g⁻¹) e EB (54,9 mg.EAG.g⁻¹) apresentaram alta concentração de fenóis, enquanto que os outros se enquadram na faixa média a alta. A variação dos compostos fenólicos nos extratos está correlacionada com a afinidade desses metabólitos pelo solvente (CHISTÉ et al., 2014).

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp. OBTIDOS A PARTIR DA CURVA DE ÁCIDO GÁLICO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (mg EAG. g ⁻¹ DA AMOSTRA) ± DP
MICÉLIO	
EB	54,9 ± 0,006 ^b
EH	32,9 ± 0,02 ^e
EC	46,0 ± 0,007 ^c
EAEM	34,4 ± 0,001 ^f
EME OH	31,4 ± 0,02 ^e
EHA	41,7 ± 0,004 ^d
CALDO DE CULTIVO	
EAEC	132,2 ± 0,004 ^a

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EME OH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP); Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.

Fonte: O autor (2019)

Os resultados observados estão em acordo com o perfil químico realizado por CCD (item 5.3). O conteúdo fenólico pode estar correlacionado com a atividade antioxidante, uma vez que esses compostos são considerados os principais contribuintes com atividade antioxidante dos fungos comestíveis (GUO et al., 2012).

Os compostos fenólicos podem apresentar diversas atividades biológicas como: antibacteriano; antiparasitário; anti-inflamatório; antioxidante; antitumoral; antiviral; vasodilatador; e hepatoprotetor (DORNAS et al., 2009).

São representados por um extenso grupo de metabólitos secundários, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, ligninas, lignanas e estilbenos, substâncias que possuem a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*, devido a sua estrutura química redutora (SOUSA et al., 2007; BOONSONG et al., 2016).

5.6.2 Avaliação da atividade antioxidante por diferentes métodos

5.6.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

A atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH foi observada somente para EAEC. Os outros extratos testados apresentaram valor superior a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para avaliar o resultado desta análise foi calculado o valor da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ($\text{IC}_{50\%}$). Pode-se observar que o $\text{IC}_{50\%}$ do EAEC foi de $287,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, da vitamina C $4,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e da rutina $6,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A capacidade dos extratos em combater o radical livre DPPH depende de sua composição química, e dentre os metabólitos secundários com maior capacidade redutora estão os compostos fenólicos. Sua estrutura química possui a capacidade de neutralizar ou sequestrar esses radicais livres (DEWICK, 2002; SOUSA et al., 2007; DORNAS et al., 2009; ZUBAIR et al., 2017). As interações dos antioxidantes frente ao radical DPPH• dependem do número de grupos hidroxílicos e da conformação estrutural da molécula, porém o mecanismo de ação é extremamente complexo (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A capacidade redutora do DPPH é característica dos basidiomicetos (LUNG; CHANG, 2011; BOONSONG et al., 2016; ISLAM et al., 2016; LI et al., 2017). A atividade também foi descrita para a espécie *A. mellea*, porém foi observada maior atividade no extrato do micélio do que no extrato do caldo de cultivo (LUNG; CHANG, 2011). O que diferencia da espécie de *Armillaria* em estudo, a qual apresentou melhora atividade no EAEC. Esse resultado pode estar correlacionado com a concentração de compostos fenólicos mais elevada no EAEC em relação aos outros extratos, enquanto que no teste realizado por Lung e Chang (2011) verificou-se maior concentração de compostos fenólicos nos extratos do micélio.

5.6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do complexo fosfomolibdênio

Pode-se observar que a atividade promissora do EC (48,81%) seguido pelo EAEC (41,46%) (Tabela 12). A atividade antioxidante avaliada por este método pode estar relacionada com a mistura complexa de metabólitos secundários observados nos extratos, que pode indicar um sinergismo entre esses metabólitos (BALESTRIN et al., 2008).

A presença de compostos fenólicos nos extratos (EC e EAEC), demonstrado pelo perfil químicos por CCD, pode ser o responsável pela atividade antioxidante observada nestas amostras (BORA et al., 2005; SIMÕES et al., 2017). Atividade redutora sobre o complexo de fosfomolibdênio foi descrita para outros basidiomicetos (OKORO, 2012; PRABU; KUMUTHAKALAVALLI, 2016), porém não foram encontrados trabalhos que relatassem essa atividade para o gênero *Armillaria*.

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO A VITAMINA C E A RUTINA DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	ATIVIDADE REDUTORA DO COMPLEXO DE FOSFOMOLIBDÊNIO EM RELAÇÃO A VITAMINA C (%) $\pm$ DP
MICÉLIO	
EB	29,78 $\pm$ 1,75 ^f
EH	22,38 $\pm$ 0,08 ^g
EC	48,81 $\pm$ 1,77 ^c
EAEM	16,01 $\pm$ 0,08 ^h
EMEOH	24,48 $\pm$ 0,09 ^g
EHA	15,38 $\pm$ 0,51 ^h
CALDO DE CULTIVO	
EAEC	41,46 $\pm$ 4,6 ^d
CONTROLE	
VITAMINA C	100,00 ^a
RUTINA	66,67 $\pm$ 1,62 ^b

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.

Fonte: O autor (2019)

5.6.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor (Azul da Prússia)

Pode-se verificar que todos os extratos na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram atividade significativa, ao comparar com a vitamina C. As atividades demonstraram-se dependente da concentração, porém concentrações mais baixas ainda apresentaram significativo poder redutor (Tabela 13).

Esses resultados confirmam a potencial ação oxirredutora do EB, EC, EHA e EAEC os quais apresentaram concentração de compostos fenólicos de média a alta pelo método de Folin-Ciocalteu. O poder redutor pode estar correlacionado a compostos fenólicos de baixo peso molecular (VANDERHAESEN et al., 2006). Esses compostos fenólicos podem agir na quebra da cadeia de radicais livres, pela doação do átomo de hidrogênio ou evitar a formação dos peróxidos (LOGANAYAKI et al., 2013).

TABELA 13 - PODER REDUTOR (AZUL DA PRÚSSIA) DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	PODER REDUTOR		
	62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
MICÉLIO			
EB	56,24 ^{ef}	63,80 ^{de}	83,42 ^{bc}
EH	57,84 ^{ef}	64,40 ^f	81,87 ^b
EC	61,48 ^e	43,80 ^f	83,84 ^b
EAEM	64,64 ^{de}	67,20 ^{bcde}	83,24 ^{bc}
EMEOH	62,08 ^e	65,18 ^{de}	81,69 ^{bc}
EHA	62,08 ^e	63,45 ^e	80,44 ^{bcd}
CALDO DE CULTIVO			
EAEC	64,76 ^{de}	66,91 ^{cde}	80,32 ^{bcd}
CONTROLE			
VITAMINA C	100 ^a	100 ^a	100 ^a

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.

Fonte: O autor (2019)

5.6.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de TBARS

Observou-se que os extratos EH, EC, EMEOH e EHA apresentaram maior atividade que o padrão BHT. O extrato EAEC apresentou atividade semelhante ao padrão enquanto que o EAEM apresentou menor atividade (Tabela 14).

TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp. PELO MÉTODO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR TBARS % AA TBARS EM RELAÇÃO AO BHT (%) $\pm$ DP
MICÉLIO	
EB	46,61 $\pm$ 0,35 ^d
EH	83,95 $\pm$ 1,12 ^a
EC	79,12 $\pm$ 4,13 ^{ab}
EAEM	38,30 $\pm$ 2,31 ^d
EMEOH	82,33 $\pm$ 1,72 ^a
EHA	71,90 $\pm$ 2,21 ^{bc}
CALDO DE CULTIVO	
EAEC	29,04 $\pm$ 2,08 ^e
CONTROLE	
BHT	67,22 $\pm$ 0,88 ^c

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.

Fonte: O autor (2019)

A atividade observada nos extratos EH e EC deve-se à característica lipofílica, a qual permite melhor interação com a matriz lipídica. Cabe salientar que o EH apresenta em sua composição ácido palmítico e benzoico que são conhecidos por sua atividade antioxidante moderada (ZHANG et al., 2003; SALAS-PÉREZ et al., 2016). Nos extratos EHA e EMEOH a atividade pode ser justificada devido a presença de compostos fenólicos, comprovada pelo perfil químico (CCD), os quais podem apresentar inibição da peroxidação lipídica (SANTI et al., 2014; MERINO et al., 2015).

A atividade antioxidante dos metabólitos dos fungos pelo método de TBARS, pode estar correlacionado com o efeito hepatoprotetor (SOARES et al., 2013), pois várias substâncias químicas podem ocasionar acúmulo de espécies de hidrogênio em hepatócitos. Esse acúmulo é a principal causa do estresse

oxidativo (ALÍA et al., 2003) e portanto, esses extratos teriam então a vantagem de evitar o acúmulo desses superóxidos no fígado.

5.6.3 Avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*

Os extratos de *Armillaria* sp., não apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina*, pois segundo Meyer et al. (1982) as mostras com CL_{50%} superior a 1000 µg.mL⁻¹ não são considerados tóxicos frente ao microcrustáceo. Apesar de serem observadas mortes em algumas amostras do experimento, estas não foram estatisticamente significativas, quando comparadas com a substância padrão utilizada (SDS) (Tabela 15).

TABELA 15 – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp. FRENTE *Artemia salina*

AMOSTRA	MORTALIDADE				CL _{50%}	IC de 95%
	10 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹	µg.mL ⁻¹	µg.mL ⁻¹
MICÉLIO						
EB	0	0	2	2	> 1000	-
EH	3	4	1	3	> 1000	-
EC	0	0	0	1	> 1000	-
EAEM	0	0	2	6	> 1000	-
EMEHO	4	5	6	7	> 1000	-
EHA	0	1	2	3	> 1000	-
CALDO DE CULTIVO						
EAEC	2	2	2	7	> 1000	-
CONTROLE						
SDS	10	18	20	22	54,9	6-157,8

NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEHO), extrato hidroalcoólico (EHA), extrato do caldo de cultivo (EAEC), Sulfato de quinidina (SDS). Concentração letal (CL_{50%}). Intervalo de confiança (IC).

Fonte: O autor (2019)

5.6.4 Avaliação da atividade hemolítica

5.6.4.1 Atividade hemolítica em suspensão de hemácias

Os estudos de atividade hemolítica dos EC, EAE, e EHA demonstraram ação dose-dependente, enquanto que EB, EH, EMEHO, e EAEC não demonstraram essa atividade (Tabela 16). São considerados extratos

hemolíticos, as amostras capazes de causar rompimento das hemácias em pelo menos 50% dos eritrócitos quando comparados com o padrão (JÚNIOR et al., 2010). Em relação aos extratos de *Armillaria* sp. testados são considerados hemolíticos o EB (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), EH (200, 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), EC (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e EAEM (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A hemólise ocorre devido a danos ocasionados a membrana celular dos eritrócitos, os quais podem envolver o transporte de íons específicos, modificação da estrutura da camada lipídica ou efeitos tóxicos que impedem o controle do volume celular (LIMA; SOTO-BLANCO, 2010).

A atividade hemolítica dos EB, EH e EC pode estar relacionada a lipofilicidade dos constituintes químicos presentes nessas amostras (ácidos graxos, esteroides e triterpenos), os quais podem interagir com a membrana dos eritrócitos, tornando-a permeável e ocasionar hemólise. Os constituintes não lipofílicos presentes no EB e EAEM podem ocasionar hemólise por interagir com as proteínas da membrana (BAKKALI et al., 2008).

TABELA 16 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

AMOSTRA	ATIVIDADE HEMOLITICA (%) EM RELAÇÃO A ÁGUA $\pm$ DP			
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
MICÉLIO				
EB	13,71 $\pm$ 0,06 ^{ij}	26,87 $\pm$ 0,10 ^h	61,97 $\pm$ 0,08 ^{de}	43,67 $\pm$ 0,03 ^g
EH	10,26 $\pm$ 0,01 ^{jk}	83,46 $\pm$ 0,09 ^c	88,33 $\pm$ 0,02 ^b	63,88 $\pm$ 0,06 ^d
EC	1,97 $\pm$ 0,01 ^m	2,14 $\pm$ 0,01 ^m	16,88 $\pm$ 0,01 ⁱ	58,92 $\pm$ 0,04 ^{ef}
EAEM	3,80 $\pm$ 0,01 ^m	3,93 $\pm$ 0,06 ^m	4,01 $\pm$ 0,003 ^m	57,65 $\pm$ 0,06 ^f
EMEHOH	3,14 $\pm$ 0,005 ^m	3,96 $\pm$ 0,008 ^m	3,88 $\pm$ 0,01 ^m	4,11 $\pm$ 0,004 ^m
EHA	4,11 $\pm$ 0,004 ^m	4,67 $\pm$ 0,001 ^{lm}	4,72 $\pm$ 0,01 ^{lm}	5,44 $\pm$ 0,006 ^{lm}
CALDO DE CULTIVO				
EAEC	5,01 $\pm$ 0,02 ^{lm}	8,840 $\pm$ 08 ^{kl}	4,83 $\pm$ 0,01 ^{lm}	3,05 $\pm$ 0,005 ^m
CONTROLE				
H₂O	100 ^a			
Triton (1%)	96,91 $\pm$ 0,03 ^a			

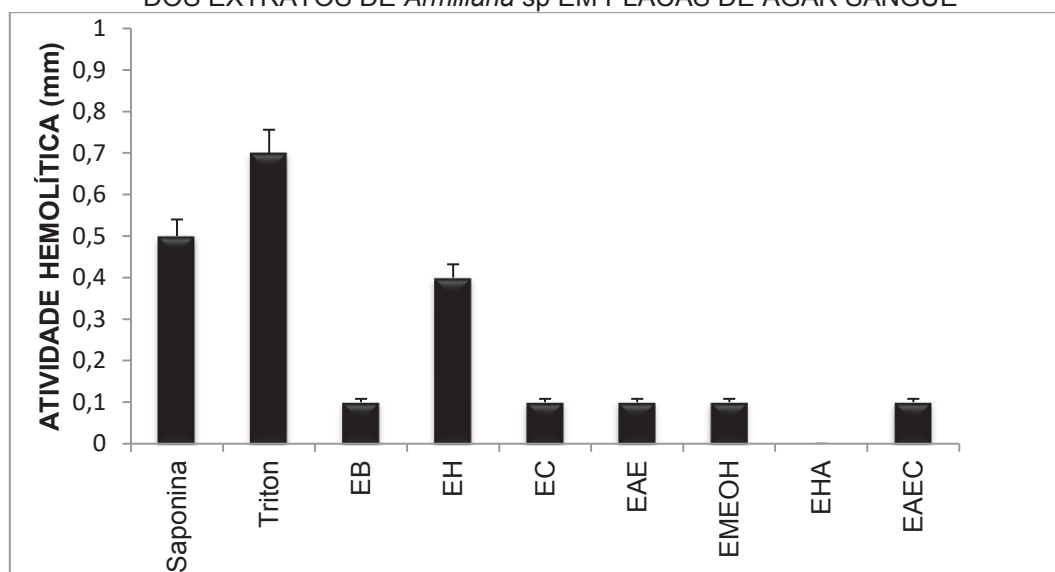
NOTA Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEHOH), extrato hidroalcoólico (EHA), extrato do caldo de cultivo (EAEC), Controle positivo: água (100% de hemólise) e Triton (96,91% de hemólise comparado com água), desvio padrão (DP). Médias seguidas peça mesma letra não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2019).

5.6.4.2 Atividade hemolítica em placa de ágar-sangue

No ensaio de hemólise em meio sólido os extratos de *Armillaria* sp. testados na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Gráfico 1), somente o EH apresentou atividade hemolítica, pois o halo dos outros extratos se apresenta compatível com o halo do solvente.

GRÁFICO 1 - DIÂMETRO DOS HALOS FORMADOS A PARTIR DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE



NOTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC). Amostras dissolvidas em PBS. Valores representam % de hemólise em média das amostras $\pm$ desvio padrão.

FONTE: O autor (2019)

Ao comparar-se os resultados obtidos para esta análise, com os da hemólise em suspensão de eritrócitos, observou-se que os resultados são distintos. Acredita-se que o EH foi o único que apresentou componentes lipídicos (ácidos graxos, esteroides e triterpenos) capazes de interagir com a membrana dos eritrócitos em meio sólido (LIMA; SOTO-BLANCO, 2010).

A análise hemolítica é considerada um indicador de citotoxicidade geral e bio-atividade, recomendada pela Organização Mundial de Saúde como um método de triagem para avaliação de agentes tóxicos (KUBLIK et al., 1996; SANTIAGO, 2015).

5.6.4 Avaliação da atividade alelopática

5.6.4.1 Bioensaios de germinação e crescimento

As análises dos efeitos alelopáticos dos extratos do micélio e caldo de cultivo da espécie de *Armillaria* estudada indicam que houve interferência no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *L. sativa* na presença do EB na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em relação a porcentagem de germinação foi possível observar que o EB (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e EAEM (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foram os únicos capazes de influenciar significativamente ($p < 0,05$), e estimular a germinação de 83,5%, 66,9%, 63,6% e 59,5% respectivamente (Tabela 17; Gráfico 2).

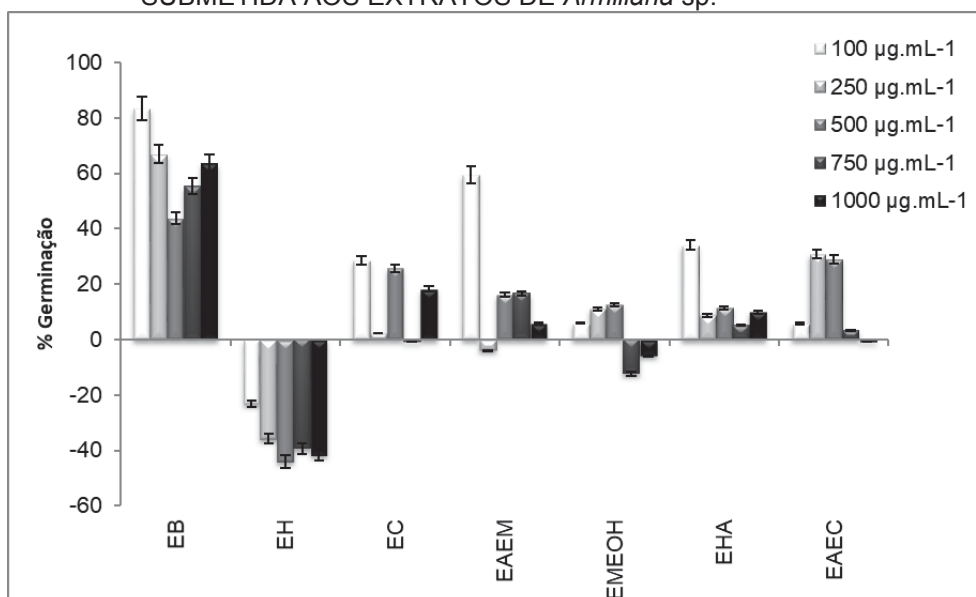
TABELA 17 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	Alface (<i>Lactuca sativa</i>)				
	ÍNDICE DA VELOCIDADE DE GEMINAÇÃO (IVG)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	4,6 ± 0,2 ^b	4,2 ± 0,7 ^{ab}	3,6 ± 0,9 ^a	3,9 ± 0,7 ^a	4,1 ± 0,8 ^{ab}
EH	1,9 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,5 ^a
EC	3,2 ± 0,6 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	3,2 ± 0,9 ^a	2,5 ± 1 ^a	3,0 ± 0,8 ^a
EAEM	4,0 ± 0,3 ^{ab}	2,4 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,6 ^a	2,9 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,4 ^a
EMEOH	2,7 ± 0,7 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,3 ^a	2,2 ± 0,7 ^a	2,4 ± 0,2 ^a
EHA	3,4 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,6 ^a	2,8 ± 0,7 ^a	2,6 ± 0,9 ^a	2,8 ± 0,5 ^a
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	2,6 ± 0,5 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	3,2 ± 0,6 ^a	2,6 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,7 ^a
CONTROLE					
BRANCO	2,5 ± 0,7 ^a				
	%GERMINAÇÃO				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	183,5 ± 5,03 ^b	166,9 ± 3,4 ^b	143,8 ± 3,6 ^a	155,4 ± 4,75 ^b	163,6 ± 3,85 ^b
EH	76,9 ± 2,56 ^a	64,3 ± 1,36 ^a	55,9 ± 3,68 ^a	60,5 ± 1,15 ^a	58,3 ± 1,36 ^a
EC	128,4 ± 4,97 ^a	102,5 ± 1,44 ^a	125,6 ± 2,65 ^a	99,3 ± 4,36 ^a	118,0 ± 1,25 ^a
EAEM	159,5 ± 1,35 ^b	95,9 ± 2,45 ^a	116,0 ± 3,06 ^a	116,5 ± 3,56 ^a	105,8 ± 3,87 ^a
EMEOH	105,8 ± 1,23 ^a	111,1 ± 1,14 ^a	112,7 ± 2,58 ^a	87,6 ± 2,3 ^a	94,0 ± 4,0 ^a
EHA	134,2 ± 1,34 ^a	108,6 ± 2,3 ^a	111,4 ± 0,35 ^a	105,3 ± 3,29 ^a	109,7 ± 2,57 ^a
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	104,5 ± 2,46 ^a	129,3 ± 2,69 ^a	127,3 ± 2,22 ^a	102,0 ± 1,89 ^a	97,8 ± 3,58 ^a
CONTROLE					
BRANCO	100 ^a				

NOTA: Média ± desvio padrão, índice de velocidade de germinação (IVG), extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Fonte: O autor (2019)

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE ALFACE (*Lactuca sativa*) SUBMETIDA AOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp.



Nota: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC). Dados expressos em percentual em relação a germinação do controle.

Fonte: O autor (2019)

Os extratos não apresentaram influência no IVG das sementes de *A. cepa* (cebola) quando comparadas com o padrão (Tabela 18), porém o EAEC na concentração de 100 µg.mL⁻¹ demonstrou aumento na porcentagem de germinação (84,2%) dessas sementes (Gráfico 3).

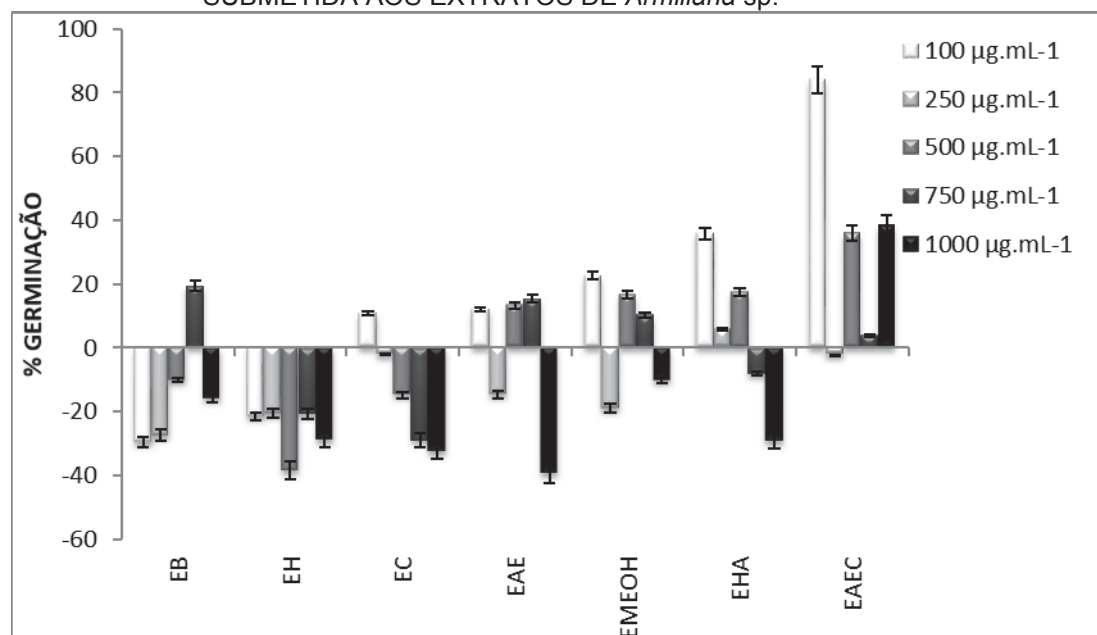
TABELA 18 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DAS SEMENTES DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	Cebola (<i>Allium cepa</i>)				
	ÍNDICE DA VELOCIDADE DE GEMINAÇÃO (IVG)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	0,58 ± 0,01 ^a	0,59 ± 0,03 ^a	0,74 ± 0,04 ^a	0,98 ± 0,08 ^a	0,69 ± 0,05 ^a
EH	0,64 ± 0,08 ^a	0,65 ± 0,04 ^a	0,50 ± 0,05 ^a	0,65 ± 0,09 ^a	0,58 ± 0,1 ^a
EC	0,91 ± 0,08 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	0,69 ± 0,07 ^a	0,58 ± 0,03 ^a	0,55 ± 0,04 ^a
EAEM	0,92 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,03 ^a	0,93 ± 0,06 ^a	0,94 ± 0,09 ^a	0,50 ± 0,1 ^a
EME OH	1,0 ± 0,14 ^a	0,66 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,02 ^a	0,73 ± 0,09 ^a
EHA	1,11 ± 0,02 ^a	0,86 ± 0,03 ^a	0,96 ± 0,09 ^a	0,75 ± 0,07 ^a	0,58 ± 0,1 ^a
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	1,5 ± 0,2 ^a	0,80 ± 0,02 ^a	1,1 ± 0,03 ^a	0,85 ± 0,04 ^a	1,1 ± 0,02 ^a
CONTROLE					
BRANCO	0,82 ± 0,1 ^a				
	%Germinação				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	70,4 ± 1,25 ^a	72,6 ± 1,07 ^a	89,8 ± 3,03 ^a	119,4 ± 1,43 ^a	84,0 ± 0,27 ^a
EH	78,4 ± 2,63 ^a	79,3 ± 1,59 ^a	61,6 ± 2,94 ^a	79,4 ± 0,38 ^a	71,1 ± 3,38 ^a
EC	110,9 ± 1,99 ^a	97,9 ± 2,75 ^a	85,1 ± 1,38 ^a	71,0 ± 2,07 ^a	67,7 ± 2,78 ^a
EAEM	112,0 ± 4,38 ^a	85,3 ± 2,98 ^a	113,3 ± 3,34 ^a	115,3 ± 1,33 ^a	60,8 ± 2,31 ^a
EME OH	122,6 ± 3,65 ^a	81,0 ± 1,98 ^a	116,7 ± 2,35 ^a	110,3 ± 3,87 ^a	89,8 ± 1,18 ^a
EHA	135,8 ± 1,98 ^a	105,8 ± 1,65 ^a	117,6 ± 2,87 ^a	91,89 ± 3,69 ^a	70,7 ± 1,76 ^a
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	184,2 ± 2,98 ^b	97,6 ± 2,36 ^a	135,9 ± 3,5 ^a	103,8 ± 2,48 ^a	138,5 ± 2,78 ^a
CONTROLE					
BRANCO	100 ^a				

NOTA: Média ± desvio padrão, índice de velocidade de germinação (IVG), extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EME OH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey

Fonte: O autor (2019)

GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO (%G) DE CEBOLA (*Allium cepa*) SUBMETIDA AOS EXTRATOS DE *Armillaria* sp.



Nota: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC). Dados expressos em percentual em relação a germinação do controle.

Fonte: O autor (2019)

O efeito estimulante ou inibitório dos compostos alelopáticos pode estar correlacionado com a concentração desses metabólitos, uma vez que em pequenas concentrações podem apresentar efeitos estimulantes, e altas concentrações podem apresentar ação inibitória (GATTI et al., 2004; GOLDFARB et al., 2009).

O efeito estimulante resulta de uma interferência isolada ou coletiva nos processos fisiológicos. Alguns compostos são considerados bio-estimulantes, sem características nutricionais, que proporcionam proteção vegetal e resistência a interferências externas (RUSSO; BERLYN, 1990). Vale ressaltar, que alguns metabólitos secundários podem atuar como hormônio estimulante (OLIVEIRA et al., 2014). Os produtos naturais com efeito estimulante apresentam interesse na área agrícola, pois podem auxiliar no reflorestamento de espécies em extinção e também aumentar a produtividade agrícola e a produção florestal, além de serem menos agressivos ao meio ambiente quando comparados com aleloquímicos sintéticos (IGANCI et al., 2006; STEFFEN et al., 2010; COELHO et al., 2011).

A inibição da porcentagem de germinação também pode estar relacionada com a presença de metabólitos secundários que podem interferir no desenvolvimento das plântulas, como triterpenos presentes no EB e EH, que podem lesionar os tecidos das plantas e os compostos fenólicos presente em todos os extratos (com exceção do EH), os quais interferem na divisão celular, síntese orgânica e no metabolismo de respiração celular (OLIVEIRA, A. K. M. et al., 2014).

O efeito alelopático dos extratos do micélio e caldo de cultivo de *Armillaria* sp. também pode ser observado no crescimento da radícula e hipocótilo das plântulas de *L. sativa* (Tabela 19) e *A. cepa* (Tabela 20).

TABELA 19 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO (cm) DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE ALFACE (*Lactuca sativa*) SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

AMOSTRA	Crescimento radícula (cm)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	8,8 ± 1,9 ^b	8,0 ± 1,22 ^b	7,0 ± 0,93 ^b	5,8 ± 1,65a ^b	7,3 ± 1,43 ^b
EH	9,4 ± 1,53 ^b	5,4 ± 0,74 ^{ab}	4,0 ± 0,47 ^a	3,3 ± 0,40 ^a	3,9 ± 0,09 ^a
EC	7,6 ± 1,4 ^b	9,0 ± 1,61 ^b	8,3 ± 0,25 ^b	7,5 ± 1,58 ^b	6,6 ± 1,15 ^b
EAEM	6,8 ± 1,1 ^b	10,3 ± 0,98 ^b	13,1 ± 1,21 ^c	9,5 ± 1,9 ^b	14,8 ± 1,89 ^c
EMEOH	6,8 ± 1,09 ^b	8,9 ± 1,89 ^b	15,1 ± 0,9 ^c	10,4 ± 1,21 ^b	14,0 ± 1,10 ^c
EHA	12,1 ± 0,63 ^b	7,7 ± 0,41 ^b	11,7 ± 0,81 ^b	10,1 ± 1,38 ^b	11,3 ± 1,47 ^b
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	7,4 ± 0,46 ^b	8,7 ± 1,12 ^b	9,2 ± 1,4 ^b	6,9 ± 0,6 ^b	6,2 ± 1,01 ^b
CONTROLE					
BRANCO	9,3 ± 1,28 ^b				
	Crescimento hipocótilo (cm)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	10,6 ± 1,9 ^b	14,1 ± 1,6 ^b	12,8 ± 1,3 ^b	13,4 ± 1,52 ^b	11,2 ± 1,56 ^b
EH	10,7 ± 0,59 ^b	9,0 ± 1,83 ^b	7,8 ± 1,46 ^a	7,1 ± 1,19 ^a	6,0 ± 0,96 ^a
EC	12,4 ± 1,17 ^b	13,1 ± 1,47 ^b	13,8 ± 0,84 ^b	12,3 ± 1,04 ^b	11,2 ± 1,74 ^b
EAEM	10,3 ± 1,13 ^b	14,5 ± 0,38 ^b	17,0 ± 1,19 ^c	11,7 ± 1,09 ^b	17,0 ± 1,04 ^c
EMEOH	10,9 ± 1,14 ^b	13,8 ± 1,49 ^b	16,2 ± 0,83 ^b	14,5 ± 0,34 ^b	15,8 ± 1,47 ^b
EHA	16,6 ± 0,85 ^b	15,2 ± 1,38 ^b	15,6 ± 1,17 ^b	15,5 ± 1,6 ^b	16,9 ± 1,3 ^b
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	12,4 ± 1,52 ^b	13,6 ± 1,74 ^b	12,3 ± 1,19 ^b	9,5 ± 1,19 ^b	12,1 ± 1,25 ^b
CONTROLE					
BRANCO	13,6 ± 0,65 ^b				

NOTA: Média ± Desvio padrão. Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas peça mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Fonte: O autor (2019).

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DE CEBOLA (*Allium cepa*) SUBMETIDAS AOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp.

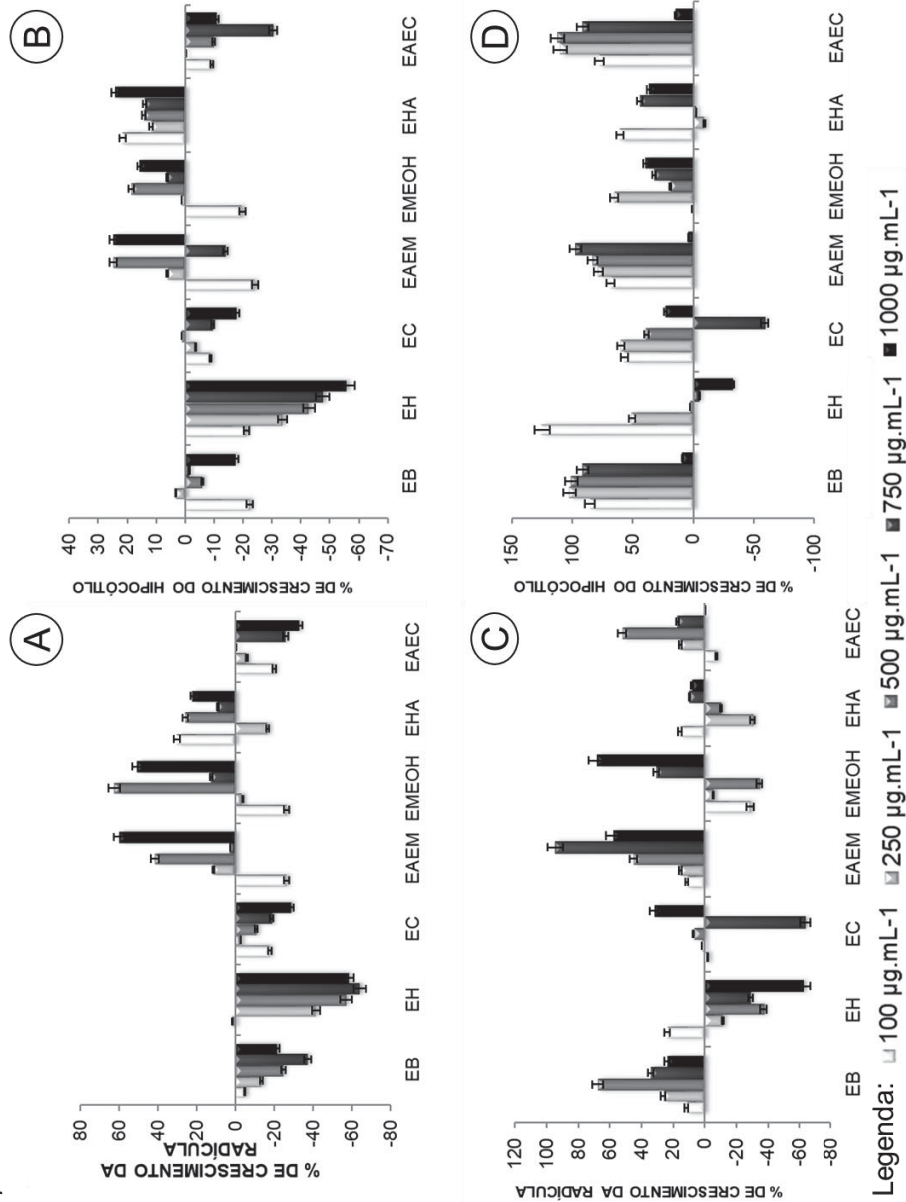
AMOSTRA	Crescimento radícula (cm)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	11,4 ± 1,15 ^b	12,9 ± 0,45 ^b	17,2 ± 0,75 ^c	13,7 ± 1,1 ^b	10,4 ± 0,9 ^b
EH	12,7 ± 1,18 ^b	9,1 ± 1,25 ^b	6,4 ± 0,6 ^b	7,3 ± 0,04 ^b	3,9 ± 0,45 ^a
EC	10,0 ± 1,3 ^b	10,4 ± 0,89 ^b	11,0 ± 0,25 ^b	3,7 ± 1,58 ^a	13,5 ± 1,15 ^b
EAEM	11,4 ± 1,1 ^b	11,8 ± 0,98 ^b	14,9 ± 1,08 ^b	19,9 ± 1,15 ^c	16,2 ± 1,65 ^c
EMEOH	7,3 ± 0,3 ^b	9,7 ± 0,78 ^b	6,7 ± 1,89 ^b	13,4 ± 1,32 ^b	17,2 ± 1,13 ^c
EHA	11,8 ± 0,36 ^b	7,1 ± 0,04 ^b	9,2 ± 0,75 ^b	11,2 ± 1,45 ^b	11,1 ± 1,74 ^b
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	9,5 ± 0,38 ^b	11,8 ± 1,14 ^b	15,6 ± 1,18 ^b	12,0 ± 1,6 ^b	10,2 ± 1,1 ^b
CONTROLE					
BRANCO	10,25 ± 1,10 ^b				
	Crescimento hipocótilo (cm)				
	100 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	750 µg.mL ⁻¹	1000 µg.mL ⁻¹
MICÉLIO					
EB	32,8 ± 0,95 ^c	35,7 ± 1,25 ^c	35,5 ± 2,5 ^c	33,9 ± 3,35 ^c	19,3 ± 2,5 ^b
EH	39,8 ± 1,25 ^c	26,6 ± 1,14 ^{bc}	18,2 ± 1,36 ^b	16,8 ± 1,89 ^b	11,9 ± 1,78 ^b
EC	27,8 ± 1,89 ^c	28,2 ± 1,15 ^c	24,5 ± 1,54 ^b	7,2 ± 1,4 ^a	21,7 ± 1,25 ^b
EAEM	29,8 ± 1,02 ^c	31,5 ± 2,36 ^c	32,4 ± 1,1 ^c	34,9 ± 2,02 ^c	18,4 ± 0,35 ^b
EMEOH	17,8 ± 1,54 ^b	29,2 ± 1,2 ^c	21,0 ± 1,35 ^b	23,4 ± 1,47 ^b	24,6 ± 1,87 ^b
EHA	28,4 ± 1,45 ^c	16,0 ± 1,65 ^b	17,2 ± 1,02 ^b	25,5 ± 1,75 ^{bc}	24,1 ± 1,05 ^b
CALDO DE CULTIVO					
EAEC	31,4 ± 0,87 ^c	37,1 ± 2,68 ^c	37,5 ± 3,05 ^c	33,9 ± 1,02 ^c	20,3 ± 1,75 ^b
CONTROLE					
BRANCO	17,7 ± 2,2 ^b				

NOTA: Média ± Desvio padrão. Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC), desvio padrão (DP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Fonte: O autor (2019)

Alguns extratos de *Armillaria* sp. apresentaram efeito estimulante e inibitório sobre o hipocótilo e a radícula tanto de *L. sativa* quanto de *A. cepa* (Figura 17).

FIGURA 17 – CRESCIMENTO (%) DA RADÍCULA E HIPOCÓTILO DE *L. sativa* E *A. cepa* SUBMETIDOS EXTRATOS DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DE *Armillaria* sp. PELO ENSAIO ALEOPÁTICO



Nota: **A:** % de crescimento da radícula da espécie *L. sativa*, **B:** % de crescimento do hipocótilo da espécie *L. sativa*, **C:** % de crescimento da radícula da espécie *A. cepa*, **D:** % de crescimento do hipocótilo da espécie *A. cepa*, Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEOH), extrato hidroalcoólico (EHA) e extrato do caldo de cultivo (EAEC). Dados expressos em percentual em relação a germinação do controle

Fonte: O autor (2019)

Em relação ao efeito estimulante da radícula de *L. sativa* os extratos com valores significativos ($<0,05$) foram EAEM 500 (41,4%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (59,1%) e EMEOH 500 (62,4%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (50,5%). A atividade inibitória da radícula de *L. sativa* foi observada somente no EH nas concentrações de 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com inibição de 57, 64 e 58,1% respectivamente. A atividade estimulante do hipocótilo de *L. sativa* ocorreu somente no EAEM nas concentrações de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (24,9%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (24,9%), visto que sua atividade inibitória do hipocótilo foi observada somente no EH nas concentrações de 500 (42,9%), 750 (47,6%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (55,7%).

O estímulo do crescimento das radículas de *A. cepa* foi observado em EH 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (67,8%), EAEM 750 (94,6%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (58,0%) e EMEOH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (68,3%). A inibição das mesmas ocorreu em contato com EH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (61,9%) e EC 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (63,4%). O estímulo do hipocótilo das plântulas de cebola, foram os que apresentaram maior diferença quando comparadas com o padrão, com indução do crescimento de até 125,1% (EH 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A inibição do hipocótilo foi estatisticamente diferente do controle somente para o EC 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no qual foi observada uma diminuição no crescimento de 59,3%.

Os extratos afetaram consideravelmente o crescimento tanto da radícula quanto do hipocótilo. Deve-se observar que a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas é caracterizado primeiramente pela emissão da radícula e posteriormente do hipocótilo (MANFRON et al., 1992). Devido a esses dados, quando o crescimento inicial é afetado ocorre a redução no crescimento da radícula e o hipocótilo é afetado pelos extratos após alguns dias de contato (BORELLA et al., 2012).

A inibição da radícula e do hipocótilo é bem descrita na literatura, e está relacionada a diversos metabólitos secundários (MALHEIROS; PERES, 2001), principalmente os compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (SILVA, et al., 2010; SANTOS et al., 2011). As alterações na radícula são mais comuns que no hipocótilo, isso ocorre porque a radícula fica mais tempo em contato com os extratos, uma vez que ela se desenvolve próxima ao papel de filtro (CHUNG et al., 2001).

O EH apresentou efeito inibitório sob a radícula e o hipocótilo das duas sementes avaliadas, a qual pode estar correlacionada com a presença de ácidos graxos e terpenos (MELOS et al., 2007; NETO et al., 2014), os quais foram observados no perfil químico (terpenos) e pela técnica de CG-MS (ácidos graxos). A atividade alelopática do ácido palmítico foi observado por Tsuzuki et al., (1987). Outro metabólito encontrado no EH que pode apresentar efeito aleloquímico é o ácido benzoico (SILVA, et al., 2010).

A alteração da radícula pode modificar a capacidade de enraizamento da planta (OLIVEIRA et al., 2012) A redução do crescimento do hipocótilo pode causar prejuízos no desenvolvimento da planta, pois diminui a capacidade da plântula para emergir e superar a resistência do solo (COSTA et al., 1999).

Os aleloquímicos podem interferir no metabolismo das plantas de várias maneiras capazes de atuar na respiração celular, fotossíntese, transporte da membrana e atividade das enzimas (EINHELLIG, 1994; SPIASSI et al., 2015). Alguns fungos foram relatados com atividade alelopática promissora, entre eles estão: *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum* e *Diplodia maydis* (EINHELLIG, 1994; FILHO; DUARTE, 2007).

O uso de herbicidas pode ocasionar diversos riscos ao meio ambiente, devido a sua alta toxicidade. Ao relacionar a análise alelopática com o ensaio de ecotoxicidade frente *A. salina* observa-se que os extratos testados não apresentaram toxicidade a esse microcrustáceo, o que demonstra baixo risco no uso ambiental (LIMA, et al., 2011)

5.6.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Segundo a classificação utilizada por Santos et al. (2008) o EH e EC apresentaram atividade moderada contra a bactéria *E. faecalis* (125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), assim como o EB frente a *Candida parapsilosis* (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o EAEC frente a cepa de *Escherichia coli* (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 21).

Esses resultados podem estar relacionados com a presença de triterpenos, esteroides (EB e EH) e compostos fenólicos (EB, EC e EAEC) observados no perfil químico por CCD, os quais apresentam atividade

antimicrobiana comprovada em diversos estudos (TALEB-CONTINI et al., 2003; TIWARI et al., 2009; LIMA et al., 2011; SOUZA et al., 2014).

TABELA 21 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS DO MICÉLIO E DO CALDO DE *Armillaria sp.*

AMOSTRA	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) CONTRA DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS									
	<i>S. a</i> *	<i>S. e</i> *	<i>S. t</i> *	<i>E. f</i> *	<i>P. a</i> **	<i>E. c</i> **	<i>K. p</i> **	<i>C. a</i> ***	<i>C. k</i> ***	<i>C. p</i> ***
	MICÉLIO									
EB	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250
EH	>1000	>1000	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EC	>1000	>1000	>1000	250	>1000	1000	>1000	1000	1000	>1000
EAEM	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EMEHOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EHA	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
CALDO DE CULTIVO										
EAEC	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	500	>1000	>1000	>1000	>1000

OTA: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato metanólico (EMEHOH), extrato hidroalcoólico (EHA), extrato do caldo de cultivo (EAEC), *Staphylococcus aureus* (*S. a*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. e*), *Salmonella typhimurium* (*S. t*), *Enterococcus faecalis* (*E. f*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a*), *Escherichia coli* (*E. c*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. p*), *Candida albicans* (*C. a*), *Candida krusei* (*C. k*), *Candida parapsilosis* (*C. p*). Concentração inibitória mínima (CIM). * Bactérias Gram-negativas.

Bactérias Gram-positivas. *Fungos

Fonte: O autor (2019)

O mecanismo antimicrobiano dos triterpenos ainda não está completamente elucidado, mas provavelmente esteja ligado com a ruptura da membrana plasmática, o que ocasiona a morte celular do micro-organismo (SALEEM et al., 2010). Em relação a atividade dos compostos fenólicos o mecanismo de ação depende da classe de compostos. Os flavonoides podem agir na inibição dos ácidos nucleicos e interferir no metabolismo energético dos micro-organismos ou atuar na membrana citoplasmática (KUREK et al., 2011; HENDRA et al., 2011; FOWLER et al., 2011). Os flavonóis, em sua maioria, são capazes de suprimir a virulência microbiana, inibir a formação de biofilme, reduzir a ligação ao hospedeiro e neutralizar toxinas de algumas cepas (DAGLIA, 2012).

A atividade antimicrobiana do EH pode ainda ser justificada devido à presença do ácido benzoico o qual consegue difundir pela membrana bacteriana, e diminuir o pH interno do micro-organismo, o que ocasiona estresse celular, e modifica a pressão osmótica interna e causa a morte das células (KUNG et al., 2003; LUCKSTADT; MELLOR, 2010). Foi observada a atividade inibitória do

ácido benzoico frente a diversos micro-organismos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aureuginosa*, *Klebsiella* sp, *Corynebacterium* sp e *C. albicans* (EKLUND, 1985; UZOH et al., 2016).

Outros metabólitos que podem atuar na atividade antimicrobiana do EH são os ácidos graxos, os quais foram identificados por CG-MS. Acredita-se que pequenas concentrações de ácidos graxos podem inibir a atividade enzimática das bactérias KABARA, 2008; DESCHEPPER, BRUGGEMAN, 2010. A atividade antimicrobiana do ácido láurico (*Streptococcus* sp., *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Candida* sp.,) e do ácido palmítico (*Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. e *P. aeruginosa*) foram observadas (KABARA et al., 1972; ZHENG et al., 2005).

Algumas espécies de *Armillaria* apresentam atividade antimicrobiana. *A. tabescens* apresentou ação significativa contra *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *E. coli* e *Mycobacterium intracellulare* (HERATH et al., 2013). Em relação a *A. mellea*, foi relatada atividade frente a *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris* e *S. typhi* (MONA et al., 2014; KOSTIĆ et al., 2017).

5.6.6 Avaliação da atividade antitumoral

5.6.6.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico (MTT)

A análise antitumoral foi realizada com o EB, EH, EC, EAEM e EAEC e com a fração polissacarídica. A análise não foi realizada com os extratos EMEOH e EHA, devido à alta concentração de açúcar, uma vez que classe de substâncias podem interferir nos resultados. Os extratos e a fração polissacarídica apresentaram atividade significativa frente a linhagem celular H295R (Tabela 22).

TABELA 22 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS H295R E CACO-2 PELO MÉTODO MTT APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Armillaria sp.*

AMOSTRA	VIABILIDADE CELULAR (%) COMPARADA COM O CONTROLE DE SOLVENTE $\pm$ DP		
	CONCENTRAÇÃO	H295R	CACO-2
MICÉLIO			
EB	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	72,7 $\pm$ 5,9 ^c	90,6 $\pm$ 1,1 ^{bc}
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	63,4 $\pm$ 3,32 ^{bc}	100,4 $\pm$ 2,21 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	56,3 $\pm$ 1,85 ^{bc}	130,2 $\pm$ 1,29 ^d
EH	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	46,6 $\pm$ 6,51 ^b	96,1 $\pm$ 0,81 ^{bc}
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	57,1 $\pm$ 2,01 ^{bc}	95,9 $\pm$ 3,83 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,8 $\pm$ 2,76 ^a	72,8 $\pm$ 2,42 ^b
EC	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	54,8 $\pm$ 2,06 ^{bc}	107,1 $\pm$ 2,10 ^{bc}
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	57,9 $\pm$ 4,91 ^{bc}	102,97 $\pm$ 2,28 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	21,7 $\pm$ 2,07 ^a	75,9 $\pm$ 1,49 ^b
EAE	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	71,4 $\pm$ 5,64 ^c	101,5 $\pm$ 2,25 ^{bc}
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	68,8 $\pm$ 2,43 ^{bc}	107,0 $\pm$ 2,66 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	71,5 $\pm$ 5,6 ^c	92,6 $\pm$ 4,14 ^{bc}
CALDO DE CULTIVO			
EAEC	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	65,1 $\pm$ 2,43 ^{bc}	88,1 $\pm$ 0,81 ^b
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	67,4 $\pm$ 2,67 ^{bc}	105,3 $\pm$ 3,39 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	62,4 $\pm$ 5,40 ^{bc}	97,8 $\pm$ 2,58 ^{bc}
FRAÇÃO POLISSACARÍDICA			
P1	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	71,6 $\pm$ 1,86 ^c	97,0 $\pm$ 2,13 ^{bc}
	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	69,1 $\pm$ 1,54 ^{bc}	101,3 $\pm$ 1,15 ^{bc}
	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	65,9 $\pm$ 5,22 ^{bc}	84,4 $\pm$ 3,23 ^b
CONTROLE			
MIT	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	19,2 $\pm$ 0,33 ^a	29,5 $\pm$ 2,36 ^a
BRANCO	-	100 ^c	100 ^c

Nota: Controle branco (CB), extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato do caldo de cultivo (EAEC) e fração polissacarídica (P1), Mitotano (MIT) desvio padrão (DP). *Branco composto por água + 10% DMSO estéril. Médias seguidas peça mesma letra não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2019)

Os extratos provenientes de *Armillaria sp.* que apresentaram maior efetividade frente a linhagem H295R, foram EH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (viabilidade 15,8%) e EC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (viabilidade 21,7%), atividade que não apresentou diferença estatística ao comparar com a do mitotano (viabilidade 19,2%). O EB também apresentou atividade significativa nesta linhagem, pois a viabilidade variou entre 56,3 a 72,7%, de modo dose dependente. A atividade do EH e EB pode estar relacionada a presença de ácidos graxos (ácido láurico e palmítico) sugerida por

CG-MS, os quais já foram descritos como antitumorais (NISHIKAWA et al., 1958; NAGATA et al., 2015), porém avaliados em outras linhagens celulares (carcinoma ascítico de Ehrlich e mieloma múltiplo.) A presença de esteroides e triterpenos nos extratos EH, como sugerido por CCD (item 5.3), podem apresentar impacto na viabilidade celular de diversas células tumorais (PATOCKA, 2003; INÁCIO, 2012).

O mecanismo antitumoral dos ácidos graxos ainda não está completamente elucidado, porém acredita-se que eles são capazes de superativar os sensores moleculares, de modo que os sinais intercelulares excedem o limiar e induzem a apoptose (NAGATA et al., 2015).

Numerosos esteroides têm sido descritos referente a atividade antitumoral, acredita-se que essa atividade esteja ligada a inibição da aromatase, esses inibidores bloqueiam a conversão de andrógeno a estrógeno o qual pode induzir a produção de células tumorais (DAMIANI; DAMIANI, 2007; INÁCIO, 2012). Os triterpenos parecem atuar na inibição de enzimas do DNA o que ocasiona apoptose celular (VECHIA et al., 2009).

Os EB, EC e EAEM apresentaram compostos fenólicos em perfil químico por CCD, esta característica está correlacionada com o teste de Folin-Ciocalteu, esses compostos são conhecidos pela atividade antitumoral, podem atuar na adesão celular, migração e angiogênese das células (ANDROUTSOPOULOS et al., 2010; WENG; YEN, 2012). Os compostos fenólicos também são conhecidos por prevenir danos ao DNA, pelo combate aos radicais livres e diminuição do risco de iniciação do câncer (SCHROETER et al., 2002; CAMARGO et al., 2014).

A fração polissacarídica (P1) apresentou atividade antitumoral significativa em relação a linhagem H29R5, a viabilidade variou entre 65,9 a 71,6% conforme concentração de amostra utilizada. Essa atividade pode estar correlacionada a fucogalactana presente na fração polissacarídica. A atividade antitumoral da fucogalactana foi descrita em alguns trabalhos (BISCAIA; MIZUNO et al., 2000; MILHORINIA et al., 2018). Biscaia (2012) relatou que a fucogalactana pode induzir a o processo de apoptose, foi relatado por Milhorinia et al., (2018) que esse composto pode inibir a migração celular e a metástase tumoral. Não foram encontrados relatos na literatura da atividade da fucogalactana na linhagem H295R.

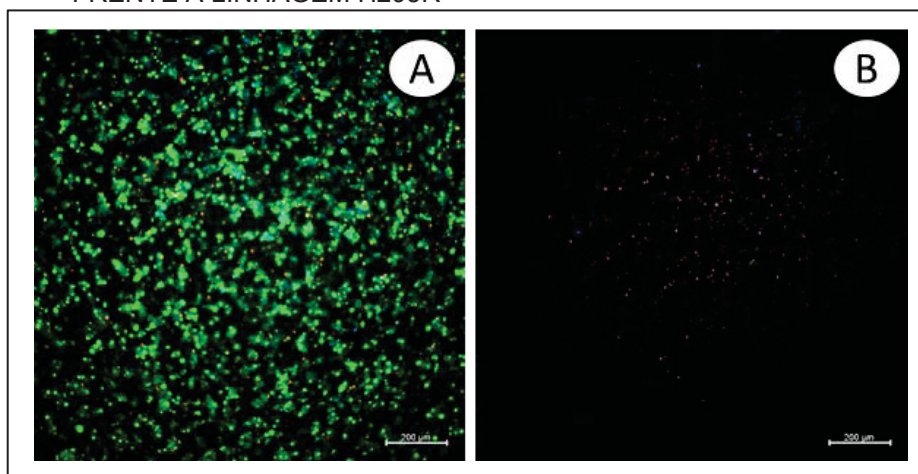
Os agentes antitumorais não apresentam seletividade para células tumorais e causam danos a células saudáveis. A procura por compostos específicos a células antitumorais apresenta grande apressamento na área médica. Esses compostos não tóxicos incluem polissacarídeos, ácidos graxos, esteroides, triterpenos, compostos fenólicos entre outros metabólitos de origem natural, podem ser usados também para aumentar a eficácia de drogas convencionais usadas na quimioterapia (COSTA-LOTUFO et al., 2010; ZONG et al., 2012; KOCYIGIT et al., 2016; PAVLOVA; THOMPSON, 2016; KALYANARAMAN, 2017).

Neste trabalho observou-se seletividade dos extratos sob as células H295R quando comparadas com as células CACO-2, no entanto o mitotano, quimioterápico padrão para células H295R, não apresentou seletividade reduziu a viabilidade também para CACO-2.

5.6.5.2 Ensaio de Viabilidade/Citotoxicidade *Live/Dead*

Os extratos de *Armillaria* sp. apresentaram melhor atividade frente a linhagem H295R pelo método de MTT e devido esse resultado, os mesmos foram avaliados contra a linhagem H295R pelo método de *Live/Dead*. As imagens obtidas em microscópio Nikon 10x/0,45 Plan apo CFI/60, demonstraram fluorescência verde para células vivas e vermelha células mortas. Na Figura 18, observa-se os controles positivo (mitotano) e o branco (10% de DMSO em H₂O).

FIGURA 18 - CONTROLES UTILIZADOS PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE A LINHAGEM H295R

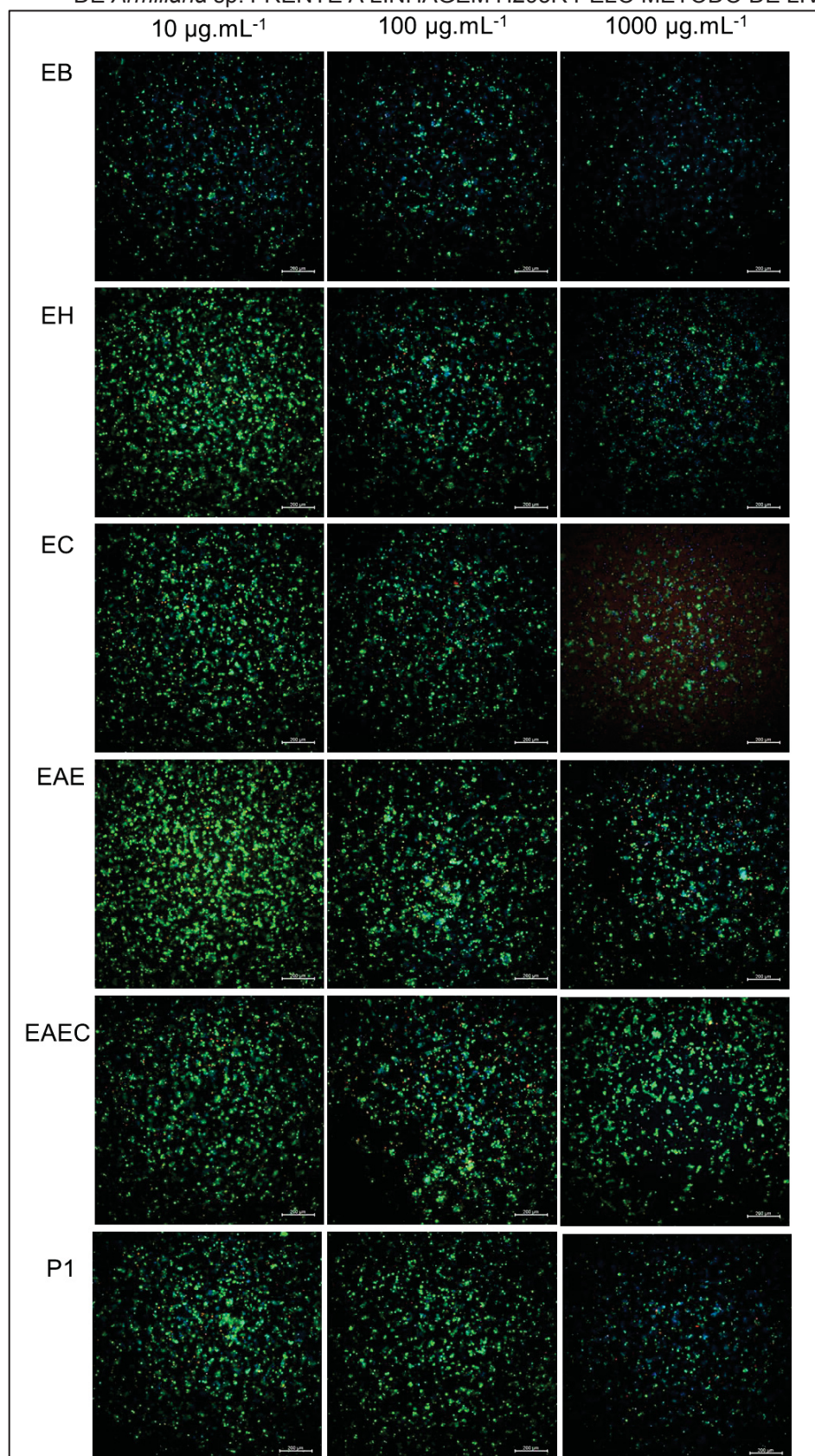


Nota: A: Branco (10% de DMSO em H₂O) B: Mitotano (100 µg.mL⁻¹)

Fonte: O autor (2019)

Os resultados obtidos pela metodologia de *Live/dead* (Figura 19 e Tabela 23) correlacionaram com a atividade observada pelo método de MTT, em que os extratos que apresentaram maior atividade são o EB, EH e EC na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, o que demonstra que as duas análises são reprodutivas. No entanto pode-se observar que o EB e EC na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ foram os que apresentaram melhor atividade no método de *Live/dead*, com viabilidade de 3,5 e 6,6%, respectivamente, o que demonstra resultado semelhante estatisticamente ao mitotano (1,2%). No MTT os extratos que mostraram essa característica foram o EH (1000 µg.mL⁻¹) e EC (1000 µg.mL⁻¹). Acredita-se que essa diferença ocorra pois o método de MTT avalia a atividade mitocondrial enquanto que o *live/dead* a integridade da membrana celular (MACIEL et al., 2002; PIAIA, 2014).

FIGURA 19 - ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Armillaria* sp. FRENTE A LINHAGEM H295R PELO METODO DE LIVE/DEAD



Nota: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAE), extrato do caldo de cultivo (EAEC) e fração polissacarídica (P1).
 Fonte: O autor (2019)

TABELA 23 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS H295R PELO MÉTODO *LIVE DEAD* APÓS CONTATO COM OS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Armillaria sp.*

		VIABILIDADE CELULAR (%) LINHAGEM H295R COMPARADA COM O CONTROLE DE SOLVENTE ± DP
MICÉLIO		
EB	10 µg.mL ⁻¹	90,5 ± 0,95 ^a
	100 µg.mL ⁻¹	73,9 ± 1,57 ^{cd}
	1000 µg.mL ⁻¹	3,5 ± 0,43 ^g
EH	10 µg.mL ⁻¹	86,2 ± 2,02 ^{ab}
	100 µg.mL ⁻¹	88,4 ± 1,78 ^a
	1000 µg.mL ⁻¹	31,9 ± 1,6 ^f
EC	10 µg.mL ⁻¹	88,6 ± 2,21 ^a
	100 µg.mL ⁻¹	80,1 ± 3,68 ^{bc}
	1000 µg.mL ⁻¹	6,6 ± 0,9 ^g
EAEM	10 µg.mL ⁻¹	90,6 ± 2,45 ^a
	100 µg.mL ⁻¹	85,6 ± 7,3 ^{ab}
	1000 µg.mL ⁻¹	43,3 ± 2,5 ^e
CALDO DE CULTIVO		
EAEC	10 µg.mL ⁻¹	87,3 ± 4,06 ^{ab}
	100 µg.mL ⁻¹	87,1 ± 3,66 ^{ab}
	1000 µg.mL ⁻¹	29,2 ± 2,97 ^f
FRAÇÃO POLISSACARÍDICA		
P1	10 µg.mL ⁻¹	91,7 ± 0,83 ^a
	100 µg.mL ⁻¹	89,7 ± 1,15 ^a
	1000 µg.mL ⁻¹	68,4 ± 2,75 ^d
CONTROLE		
MIT	100 µg.mL ⁻¹	1,2 ± 0,07 ^g
BRANCO	-	95,1 ± 1,37 ^a

Nota: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato do caldo de cultivo (EAEC) e fração polissacarídica (P1), Mitotano (MIT), desvio padrão (DP). *Branco composto por água + 10% DMSO estéril. Médias seguidas peça mesma letra não diferem estatisticamente.

Fonte: O autor (2019)

5.6.7 Atividade imunomodulatória

Os extratos foram avaliados pelas alterações na morfologia dos macrófagos (capacidade fagocítica, capacidade de adesão e retenção lisossomal) e alteração na sua atividade metabólica (ânion peróxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) (Tabela 24).

TABELA 24 - ATIVIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Armillaria sp.* SOBRE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7

AMOSTRA	ATIVIDADE IMUNOMODULADORA (ABSORBÂNCIA) ± DP						
	Concentração	Capacidade fagocítica	Capacidade de adesão	Retenção lisossomal	Ânion Superóxido (O ₂ ⁻)	Peróxido de hidrogênio	Óxido nítrico
MICÉLIO							
EB	10 µg.mL ⁻¹	0,60 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,04 ^{abcd}	0,25±0,01 ^a	0,48 ± 0,07 ^{cde}	0,77 ± 0,05 ^{ab}	5,44 ± 0,4 ^c
	100 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,04 ^a	0,46 ± 0,08 ^{abcd}	0,26 ± 0,01 ^a	0,59 ± 0,04 ^{bcd}	0,73 ± 0,02 ^{ab}	4,81 ± 0,15 ^c
	1000 µg.mL ⁻¹	0,62 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,05 ^{abcd}	0,23 ± 0,02 ^a	0,62 ± 0,02 ^{bc}	0,74 ± 0,02 ^{ab}	4,01 ± 0,09 ^d
EH	10 µg.mL ⁻¹	0,60 ± 0,04 ^a	0,41 ± 0,04 ^{abcd}	0,27 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,06 ^{bc}	0,74 ± 0,03 ^{ab}	4,93 ± 0,23 ^c
	100 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,05 ^a	0,379 ± 0,04 ^{bcd}	0,25 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,05 ^{cde}	0,78 ± 0,09 ^{ab}	3,17 ± 0,07 ^d
	1000 µg.mL ⁻¹	0,48 ± 0,09 ^b	0,36 ± 0,06 ^{cd}	0,18 ± 0,03 ^b	0,26 ± 0,03 ^{de}	0,73 ± 0,06 ^{ab}	3,52 ± 0,06 ^d
EC	10 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,04 ^a	0,45 ± 0,07 ^{abcd}	0,27 ± 0,01 ^a	0,75 ± 0,06 ^{bc}	0,74 ± 0,03 ^{ab}	3,74 ± 0,26 ^d
	100 µg.mL ⁻¹	0,66 ± 0,04 ^a	0,395 ± 0,02 ^{bcd}	0,27 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,06 ^{bc}	0,71 ± 0,02 ^b	3,33 ± 0,07 ^d
	1000 µg.mL ⁻¹	0,34 ± 0,05 ^c	0,28 ± 0,08 ^d	0,14 ± 0,02 ^c	0,21 ± 0,07 ^e	0,70 ± 0,08 ^b	8,05 ± 0,9 ^b
EAEM	10 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,03 ^a	0,40 ± 0,17 ^{abcd}	0,27 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,04 ^{abc}	0,76 ± 0,05 ^{ab}	5,16 ± 0,3 ^c
	100 µg.mL ⁻¹	0,65 ± 0,04 ^a	0,40 ± 0,02 ^{abcd}	0,27 ± 0,02 ^a	0,81 ± 0,06 ^{abc}	0,72 ± 0,01 ^{ab}	5,79 ± 0,08 ^c
	1000 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,08 ^a	0,37 ± 0,03 ^{bcd}	0,22 ± 0,03 ^a	0,70 ± 0,04 ^{bc}	0,76 ± 0,08 ^{ab}	5,37 ± 0,04 ^c
CALDO DE CULTIVO							
EAEC	10 µg.mL ⁻¹	0,65 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,03 ^{abcd}	0,27 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,03 ^{abc}	0,78 ± 0,05 ^{ab}	5,26 ± 0,26 ^c
	100 µg.mL ⁻¹	0,65 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,04 ^{abcd}	0,27 ± 0,02 ^a	0,76 ± 0,04 ^{abc}	0,75 ± 0,03 ^{ab}	4,38 ± 0,49 ^{cd}
	1000 µg.mL ⁻¹	0,63 ± 0,07 ^a	0,6 ± 0,04 ^{ab}	0,24 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,03 ^{cd}	0,82 ± 0,09 ^a	3,5 ± 0,11 ^d
FRAÇÃO POLISSACARÍDICA							
P1	10 µg.mL ⁻¹	0,62 ± 0,03 ^a	0,58 ± 0,05 ^{ab}	0,26±0,01 ^a	0,81 ± 0,05 ^{abc}	0,76 ± 0,05 ^{ab}	6,49 ± 0,41 ^c
	100 µg.mL ⁻¹	0,65 ± 0,05 ^a	0,52 ± 0,03 ^{abc}	0,24 ± 0,02 ^a	0,95 ± 0,05 ^{ab}	0,77 ± 0,04 ^{ab}	8,71 ± 0,24 ^{ab}
	1000 µg.mL ⁻¹	0,61 ± 0,07 ^a	0,46 ± 0,03 ^{abcd}	0,25 ± 0,02 ^a	1,1 ± 0,05 ^a	0,82 ± 0,07 ^a	9,99 ± 0,81 ^a
CONTROLE							
BRANCO	-	0,58 ± 0,04 ^a	0,62 ± 0,04 ^a	0,26 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,03 ^{bc}	0,74 ± 0,01 ^{ab}	5,36 ± 0,3 ^c

Nota: Extrato bruto (EB), extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato acetato de etila do micélio (EAEM), extrato do caldo de cultivo (EAEC) e fração polissacarídica (P1), Mitotano (MIT), desvio padrão (DP). *Branco composto por água + 10% DMSO estéril Médias seguidas peça mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan.
Fonte: O autor (2019)

Algumas amostras diminuíram significativamente a atividade imunomodulatória dos macrófagos. A capacidade fagocítica foi inibida pelos extratos EH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (17,24%) e EC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (41,38%), a sua capacidade de adesão apresentou inibição pelos EH 100 (38,87%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (41,93%), EC 100 (36,29%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (54,83%), e EAE 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (40,32%). A retenção lisossomal foi reduzida na presença dos EH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (30,76%) e EC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (46,15%). A produção de ânion superóxido foi inibida pelos EH 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (62,31%) e EC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (69,56%). A inibição da produção de óxido nítrico também foi observada nos extratos EB 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (25,18%), EH 100 e (40,85%) 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (34,32%), EC 10 (30,22%) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (37,87%), e EAEC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (34,70%).

A fração polissacarídica (P1) estimulou a produção de ânion superóxido na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (59,4%) e óxido nítrico nas concentrações de 100 (62,5%) e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (86,4%). A estimulação do óxido nítrico foi observada também no EC 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (50,2%). A produção de peróxido de hidrogênio não foi alterada significativamente por nenhuma das amostras.

A imunossupressão é desejável no tratamento de doenças autoimunes, inflamatórias e crônicas (ROSA et al., 2014). Os macrófagos são células que participam diretamente da inflamação local, estudos demonstram que a inibição ou estimulação da fagocitose, capacidade de adesão, retenção lisossomal, ânion peróxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico alteram as respostas inflamatórias. As substâncias que atuam na inibição desses fatores podem atuar como anti-inflamatórias (CHAYEN; BITENSKY, 1971; ROSEN; GORDON, 1987; CHAIRUANGKITTI et al., 2013; WANG et al., 2017; LIU et al., 2018).

Os fungos representam uma fonte potencial de metabólitos com atividade anti-inflamatória (ELSAYED et al., 2014), essa atividade foi observada em alguns de seus metabólitos secundários, tais como: esteroides (RUSSO et al., 2010; KUO et al., 2011; MA et al., 2013), triterpenos (DUDHGAONKAR et al., 2009; MA et al., 2013), diterpenos (XU et al., 2013), ácidos graxos (ZHANG et al., 2003) e compostos fenólicos (NUKATA et al., 2002; QUANG et al., 2006; MORO et al., 2012). Essa atividade foi descrita para diversos extratos de *A. mellea* (GENG et al., 2014).

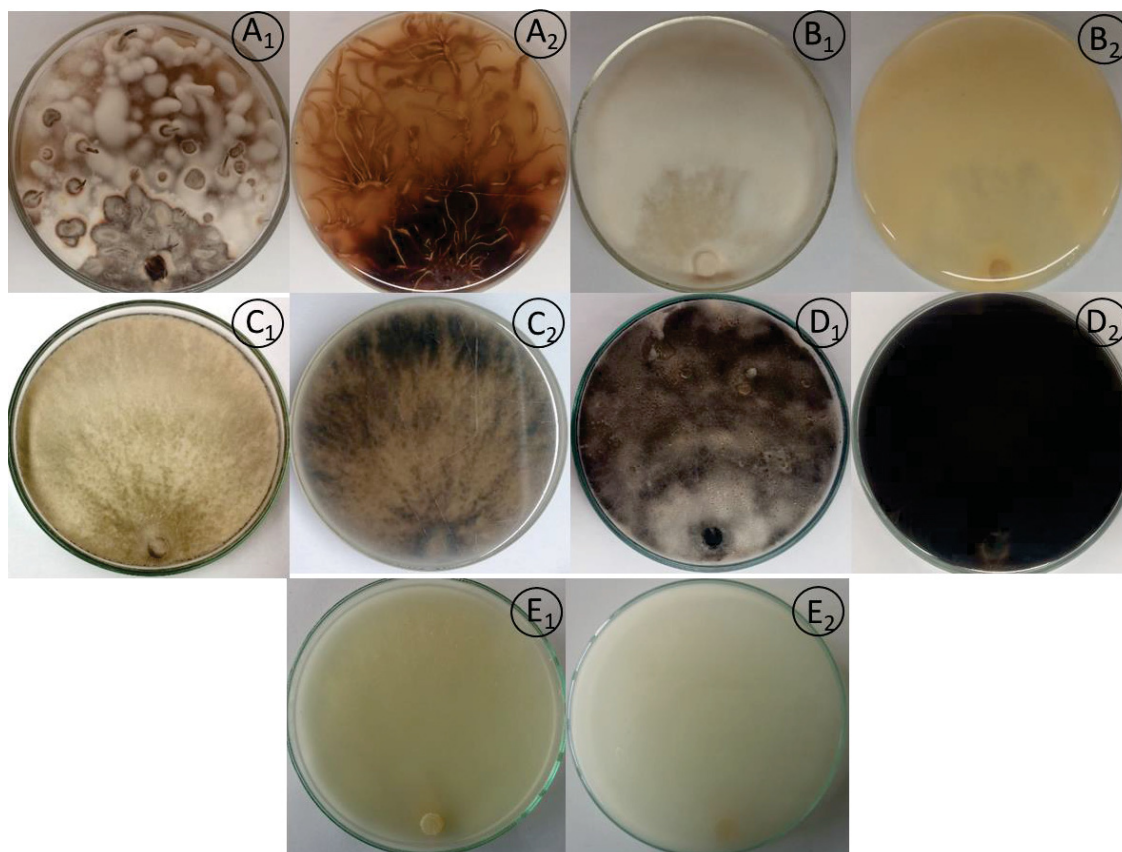
A estimulação do sistema imune pela estimulação dos macrófagos pode ser útil tanto no tratamento e prevenção de infecções como na inibição do crescimento de tumores (NASCIMENTO et al., 1998, 2002). A imunoestimulação foi observada pela fração polissacarídica (P1) e pelo EC ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), uma análise que merece destaque é o estímulo da produção de óxido nítrico (NO), o qual atua como mediador pró-inflamatório (DE LA HOZ, et al., 2010). A estimulação de ânion superóxido tem demonstrado importante papel na defesa do organismo no combate de patógenos, principalmente intestinais (FRANÇA et al., 2012).

A imunoestimulação observada na fração polissacarídica provavelmente está correlacionada com a presença da fucogalactana. Mizuno et al., (2000) também observam a estimulação do NO por fucogalactana extraída de basidiomicetos. Os autores observaram ainda que a estimulação de NO pode contribuir para a atividade antitumoral.

5.7 ATIVIDADE ANTAGONISTA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A *Pinus*

As interações entre os fungos no ensaio de pareamento de culturas em meio BDA foram observadas em diferentes graus quando comparadas com os controles (Figura 20). A atividade antagonista variou conforme a espécie que o fungo foi pareado. Foi possível observar dois tipos de interações competitivas (B e C) e dois subtipos (C_{A2} e C_{B2}) (Quadro 4; na Figura 21).

FIGURA 20 - MORFOLOGIA DE COLÔNIAS MICELIAIS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS



NOTA: **A:** Cultura de *Armillaria* sp.; **B:** Cultura de *Bjerkandera adusta*; **C:** Cultura de *Botrytis cinerea*; **D:** Cultura de *Diplodia pinea*; **E:** Cultura de *Rhizoctonia* sp.; **1:** verso da placa; **2:** reverso da placa.

Fonte: O autor (2019).

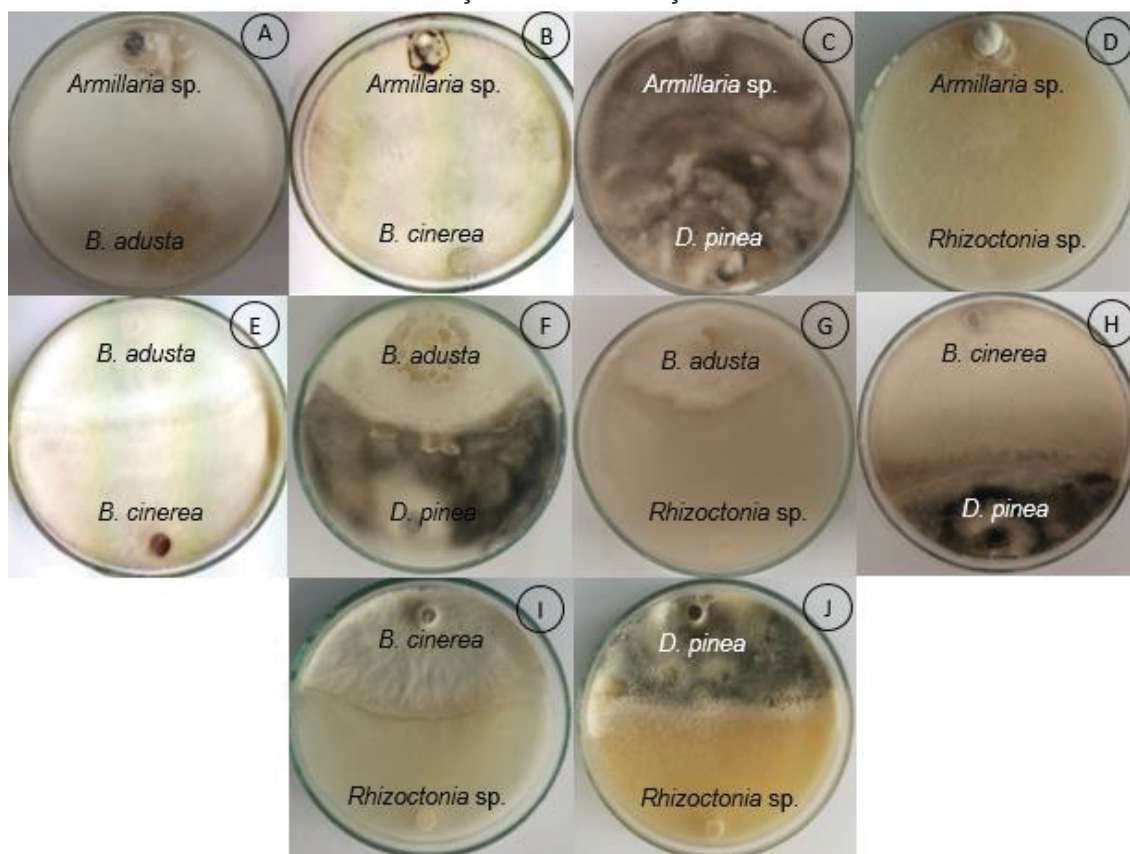
QUADRO 4 - REAÇÕES COMPETITIVAS ENTRE MICÉLIO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE *Pinus*

Espécie	<i>Armillaria</i> sp.	<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Diplodia pinea</i>
<i>Rhizoctonia</i> sp.	C	C _{B2}	B	C _{A2}
<i>Diplodia pinea</i>	C	C _{B2}	B	
<i>Botrytis cinerea</i>	C	C _{A2}		
<i>Bjerkandera adusta</i>	C			

Nota: **A:** Inibição com contato micelial; **B:** Inibição a longa distância; **C:** Crescimento excessivo sem inibição inicial; **CA2:** Substituição completa após contato inicial; **CB2:** Substituição completa após inibição inicial à distância.

Fonte: O autor (2019).

FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE OS FUNGOS



Nota: (1) **A; B; C; D:** Sobrecrecimento sem inibição inicial classificado como tipo C dos fungos *Bjerkandera* sp., *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea* e *Rhizoctonia* sp. sobre *Armillaria* sp.; **E:** Inibição do tipo CA₂, em que o *Botrytis cinerea* apresenta um sobrecrecimento frente ao *Bjerkandera* sp.; **F:** Bloqueio do tipo CB₂, em que o *Diplodia pinea* apresenta um sobrecrecimento frente ao *Bjerkandera* sp.; **G:** Bloqueio do tipo CB₂, em que o *Rhizoctonia* sp. apresenta um sobrecrecimento frente ao *Bjerkandera* sp.; **H:** Bloqueio do tipo B entre *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*; **I:** Inibição do tipo B entre *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia* sp.; **J:** Inibição do tipo CA₂ em que o *Diplodia pinea* apresenta um sobrecrecimento sobre *Rhizoctonia* sp.;

Fonte: O autor (2019).

Com base nos valores de AI, Badalyan et al. (2002) classificaram fungos antagonistas em três grupos: grupo I com valores de AI superiores a 15, ativos; grupo II com valores de AI entre 10 e 15, moderadamente ativos; e grupo III com valores de AI menores que 10, pouco ativos.

De acordo com essa classificação pode-se observar que os fungos *D. pinea*, *B.s cinerea* e *Rhizoctonia* sp. apresentam atividade moderada, com índice antagonista (AI) de 14,5, 11,5 e 10 respectivamente. As espécies *B. adusta* (AI = 3) e *Armillaria* sp (AI = 0) apresentam fraca atividade. Os isolados que apresentaram atividades mais significativas foram as espécies *Diplodia pinea* e

Botrytis cinerea, enquanto que o fungo *Armillaria* sp., conhecido pela sua patogenicidade em *Pinus*, foi inibido por todos os fungos contra o qual foi testado.

O índice antagonista (AI) geralmente é constante para cada espécie de fungo, pode ser usado para caracterização bio-ecológica na seleção dos fungos com atividades fisiológicas e biológicas (BADALYAN et al., 2002). Os fungos apresentam atividade antagônica por vários mecanismos. Os três principais são: competição por nutrientes, parasitismo, e antibiose (ALABOUVETTE et al., 2006).

A competição por nutrientes, principalmente carboidratos, é recorrente entre as interações antagônicas, no entanto, eles podem ser observados apenas no estágio inicial de colonização. A capacidade de um fungo crescer rapidamente e esgotar os nutrientes do substrato é uma estratégia vital para sua colonização, pois assim outro patógeno não pode proliferar devido ao esgotamento do carbono disponível (SCHOEMAN et al., 1999). No parasitismo ocorre a interações das hifas, em que as hifas dos fungos antagônicos envolvem as hifas dos fungos hospedeiros e causam a degradação da parede celular por enzimas (ALABOUVETTE et al., 2006). A antibiose está correlacionada com a produção de metabólitos secundários que apresentam toxicidade a outros microrganismos. A produção de compostos com atividade antagonista foi claramente observada em culturas duplas, especialmente quando tem-se a presença de uma zona de inibição; o crescimento diminui ou cessa à medida que esses metabólitos se difundem no ágar (SCHOEMAN et al., 1999; OWNLEY; WINDHAM, 2007).

Acredita-se que todos os fungos apresentaram atividade antagonista por competição de nutrientes frente à *Armillaria* sp. uma vez que inibiu o crescimento inicial dessa espécie. A inibição do tipo B observada entre *B. cinerea* x *D. pinea* e *B. cinerea* x *Rhizoctonia* sp pode ser devida a produção de metabólitos secundários que inibiram o crescimento desses fungos, o que apresenta uma zona de inibição, porém não se pode saber qual dos fungos produziu o metabólito secundário.

Alguns metabólitos secundários são conhecidos devido a sua ação antifúngica, como por exemplo os compostos fenólicos podem inibir o crescimento de outras cepas fúngicas e têm sido usados sinergicamente com vários antibióticos contra micro-organismos resistentes (DAGLIA, 2012). Os

terpenoides são conhecidos por agir na membrana celular fúngica e também por destruir as mitocôndrias (FREIESLEBEN; JÄGER, 2014). Por último os alcaloides têm atividade antifúngica significativa contra algumas espécies de fungos (SRIVASTAVA et al., 1994; SINGH et al., 2000, 2007).

Quanto aos subtipos CA2 e CB2 observados *B. cinerea* x *B. adusta*, *D. pinea* x *B. adusta*, *Rhizoctonia* sp. x *B. adusta*, e *D. pinea* x *Rhizoctonia* sp., essa atividade pode ser relacionada ao parasitismo, uma vez que o fungo antagonista se sobrepõe ao outro fungo e conseguiu inibir seu crescimento (ALABOUVETTE et al., 2006).

Embora os fungos testados sejam fitopatogênicos, eles podem ser utilizados como fonte natural para a identificação e desenvolvimento de novos antifúngicos, como foi descrito para outros fungos fitopatogênicos (VICENTE et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

A composição nutricional do micélio liofilizado apresentou valores de umidade, proteína, lipídeos, carboidratos, fibras brutas e quitina dentro dos parâmetros estabelecidos para este tipo de matriz pela literatura, em que se observa baixo teor de lipídeos, e altos teores de proteínas, fibras brutas, carboidratos e valor energético total.

No *screening* por CCD foi possível observar a presença de esteroides e terpenos no EB e EH, e de compostos fenólicos nos EB, EC, EAE, EMEOH, EHA e EAEC.

No EH foi possível detectar a presença de ácido benzoico por RMN e de ácidos graxos (ácido láurico e palmítico) por CG-MS. Isolou-se do EAEM o poliol D-Treitol, o qual foi identificado por cristalografia de Raios-X. A caracterização da fração polissacarídica (P1) demonstrou a presença de fucogalactana (RMN), com composição monossacarídica de 44,1% de galactose, 30,7% de glucose, 17,5% de manose e 8,1% de fucose (CG-MS). A dosagem colorimétrica dessa fração apresentou 47,2 mg.EAG.g⁻¹, 32,5% de proteínas e 90,4% de carboidratos.

Em relação ao teor de fenóis totais dos extratos de *Armillaria* sp. o EAEC foi a amostra que apresentou maior concentração, dessa classe de compostos, seguido pelo EB, EC e EHA. Esses resultados corroboram com os encontrados na CCD, no qual também foi observado a presença de compostos fenólicos.

Em relação a atividade antioxidante, no método de DPPH, pode-se observar inibição da formação de radical livre somente para o EAEC, o que correlaciona com o teor de fenóis totais, no qual este extrato apresentou maior concentração. O resultado obtido pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio foi promissora para os EC e EAEC. Em relação ao poder redutor pelo azul da Prússia foi possível observar resultados promissores para todos os extratos. Pelo teste de TBARS os resultados mais significativos foram observados no EH, EC e EMEOH, os quais apresentaram atividade estatisticamente maior que o padrão BHT.

Os extratos não apresentaram atividade de toxicidade frente à *Artemia salina*, uma vez que não apresentaram resultados de CL_{50%} inferiores a 1000 µg.mL⁻¹. Com relação a atividade hemolítica, foi observada hemólise em suspensão de eritrócitos superior a 50% no EB (500 µg.mL⁻¹), EH (200, 500 e 1000 µg.mL⁻¹), EC (1000 µg.mL⁻¹) e EAEM (1000 µg.mL⁻¹). A hemólise em placa foi observada somente para o EH.

No bioensaio de alelopatia foi possível verificar que o EB em todas as concentrações testadas e o EAEM na concentração de 100 µg.mL⁻¹ estimularam significativamente a germinação das sementes de *Lactuca sativa*. O mesmo resultado foi observado no EAEC (100 µg.mL⁻¹) frente a *Allium cepa*. Os extratos de modo geral foram capazes de interferir no crescimento da radícula e do hipocótilo e podem atuar como inibidor ou estimulador do crescimento.

No ensaio da atividade antimicrobiana foi observada atividade significativa dos EB, EH, EC e EAEC frente a *Candida parapsilosis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

A viabilidade celular pelo método de MTT das células H295R foi reduzida por todos os extratos testados em diferentes concentrações, com destaque para o EH e EC os quais apresentaram atividade comparável com o quimioterápico padrão (mitotano). Os extratos não apresentaram atividade significativa frente a linhagem CACO-2.

Durante a avaliação da viabilidade celular pelo método *live/dead* observamos que os extratos que mais apresentaram atividade significativa (<0,05) foram os extratos EB, EH e EC, com destaque para o EB e EH na concentração de 1000 µg.mL⁻¹, os quais apresentaram atividade comparada com o mitotano.

Os extratos (EB, EH, EC, EAEM e EAEC) apresentaram atividade de imunossupressão dos macrófagos (RAW 264.7) em diferentes análises e concentrações. A estimulação da produção de óxido nítrico ocorreu em contato com a fração polissacarídica e com o EC 1000 µg.mL⁻¹ o que caracteriza imunoestimulação.

A atividade antagonista foi observada para os fungos fitopatogênicos de *Pinus*, com destaque para o *Diplodia pinea*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia* sp que apresentaram índice antagonista de 14,5, 11,5 e 10 respectivamente

7 RECOMENDAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a espécie do gênero *Armillaria* apresenta importante característica nutricional, assim como, seus extratos e fração polissacarídica podem influenciar as atividades biológicas. Deve-se destacar o extrato hexânico da espécie que apresentou atividade significativa em praticamente todas as análises, o que demonstra a importância para novas pesquisas com este extrato, principalmente o que diz respeito a identificação de mais metabólitos que justifiquem essas atividades.

Durante a pesquisa constatou-se na literatura que existem diversas espécies no gênero *Armillaria*, porém tem-se uma escassez de estudos com esses fungos e faz-se necessário pesquisas que contribuam para a caracterização química e biológica desse gênero. Diante dos resultados observados neste trabalho para os extratos obtidos do micélio e do caldo de cultivo de *Armillaria* sp., é possível observar a capacidade inexplorada para os fungos fitopatogênicos em geral. Cabe salientar que esta pesquisa pode incentivar outros pesquisadores a estudar este gênero na busca por novas substâncias, que apresentem atividades biológicas e possam ter interesse na área científica.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. V.; SOUZA, V. A.; SHIMIZU, J. Y. Espécies de pínus mais plantadas no Brasil. **Embrapa Florestas**, 2ª Ed. 2013. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3715&p_r_p_-996514994_topicold=3229 acessado em 05 de julho de 2016.
- ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological Control of plant diseases: the european situation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 3, p. 329–341, 2006.
- ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction). **Cerâmica**, v. 48, p. 34–37, 2002.
- ALÍA, M.; HORCAJO, C.; BRAVO, L.; GOYA, L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 9, p. 1251–1267, 2003.
- ALMEIDA, M. Q.; SOARES, I. C.; RIBEIRO, T. C.; et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1458–1462, 2010.
- ÁLVAREZ, S. P. O.; CADAVID, D. A. R.; SIERRA, D. M. E.; et al. Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. **BioMed Research Internationa**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; et al. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346–357, 2013.
- ALVES, T. M. DE A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.
- AN, S.; LU, W.; ZHANG, Y.; YUAN, Q.; WANG, D. Pharmacological Basis for use of *Armillaria mellea* polysaccharides in alzheimer's disease : antiapoptosis and antioxidation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- ANDRADE, V. A. DE; ARAÚJO-JORGE, T. C. DE; COUTINHO-SILVA, R.

Concepções discentes sobre imunologia e sistema imune humano. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 21, n. 3, p. 1–22, 2016.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; PAPAKYRIAKOU, A.; VOURLOUMIS, D.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 9–20, 2010.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205–209, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington, Va.: Assoc., 1970.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2002.

AUER, C. G.; GOMES, N. S. B.; JÚNIOR, A. G. A Armilarirose em *Pinus* no Brasil. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 1517–5030, p. 1–5, 2004.

AUER, C. G.; SANTOS, A. F. DOS. Doenças dos pinheiros. **Manual de Fitopatologia**. 5ª ed. Ouro Fino: Ed. Agronomica Ceres LTDA., v. 2., p.595–602, 2016.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H. Polysaccharides elaborated by *Polyporus ovinus* (Schaeff). 1. Structure of a fucogalactan from the water extracts of the fruit bodies. **Acta chemica Scandinavica**, v. 23, n. 5, p. 1815–1817, 1969.

AXELSSON, K.; BJÖRNDAL, H.; SVENSSON, S.; HAMMARSTRÖM, S. Polysaccharides Elaborated by *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. II. Neutral Polysaccharides from the Fruit Bodies. Isolation and Purification of a Fucoxylomannan by Precipitation with the H-Agglutinin from Eel-Serum. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 25, p. 3645–3650, 1971.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. *Ecologia Microbiana*. p.117–137, Jaguariúna: **Embrapa**, 1988.

BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, n. 3, p. 220–225, 2002.

BAI, S.; BAO, J. Qualitative Analysis on Active Ingredients of *Armillaria luteovirens*. **Northern Horticulture**, , n. 3, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL’STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribution to the phytochemical study of *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) with approach in antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 230–235, 2008.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 2, p. 134–139, 2008.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R.; BURKE, B. A.; AASEN, A. J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1385–1390, 1987.

BARRATT, M. D. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols: Principal components and neural network analysis of extended datasets. **Toxicology in Vitro**, v. 10, n. 1, p. 85–94, 1996.

BARREIRA, R.; BARBOSA, E. Treatment of advanced colorectal cancer with synchronous liver metastases. **Revista Portuguesa de Coloproctologia**, p. 17–30, 2012.

BEDNARCZUK, V.; VERDAM, M. C.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43–50, 2010.

BENSON, A. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal câncer. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 6, p. 5–18, 2007.

BESSA-JUNIOR, A. P.; GONÇALVES, A. A. Economic and productive analysis of chitosan extracted from shrimp exoskeleton. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 2013.

BHAT, R.; RAI, R. V; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 9, n. 1, p. 57–81, 2010.

BIRKINSHAW, J. H.; STICKINGS, C. E.; TESSIER, P. Biochemistry of the Wood-rotting fungi. **Biochemical Journal**, v. 42, p. 329–332, 1947.

BISCAIA, S. M. P. Avaliação da atividade biológica “ in vitro ” de polissacarídeos obtidos dos gêneros *Pleurotus* , *Lentinus* e *Agaricus*. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOHNERT, M.; MIETHBAUER, S.; DAHSE, H.-M.; et al., In vitro cytotoxicity of melleolide antibiotics: Structural and mechanistic aspects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 2003–2006, 2011.

BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; et al., Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, v. 231, n. 1, p. 56–62, 2004.

BOONSONG, S.; KLAYPRADIT, W.; WILAI PUN, P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 2, p. 89–97, 2016.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. DE. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (presl.) hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 6–15, 2005.

BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.; et al., Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 415–420, 2012.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira 5ª edição**. 2010.

BRASIL, M. DA S. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. 2018.

BRENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 883–894, 1990.

BRONDZ, I.; HØILAND, K.; EKEBERG, D. Multivariate analysis of fatty acids in

spores of higher basidiomycetes: a new method for chemotaxonomical classification of fungi. **Journal of Chromatography B**, v. 800, n. 1, p. 303–307, 2004.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; et al., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BRÜNE, B.; DEHNE, N.; GROSSMANN, N.; et al., Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 6, p. 595–637, 2013. Mary Ann Liebert, Inc.

CAMARGO, A. DE; D'ARCE, M.; BIASOTO, A.; SHAHIDI, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and dna strand breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, 2014.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. DE; CURTI, E.; et al. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–430, 2007.

CARVALHO, E. B.; BORGES, É. L.; CARLOS, L. M. B.; et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 29, n. 2, p. 149–152, 2007.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; et al. Mecanismos de resistência da candida sp wwa antifúngicos. **infarma**, v. 18, p. 30–35, 2006.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 B, p. 586–591, 2009.

CFF. Conselho Federal de Farmácia disponível em <http://www.cff.org.br/noticia.php?id=3806&titulo=Anvisa+cria+guia+para+prescri%C3%A7%C3%A3o+de+fototer%C3%A1picos>. acessado em 03 de março de 2019

CHAIRUANGKITTI, P.; LAWANPRASERT, S.; ROYTRAKUL, S.; et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 330–338, 2013.

CHAYEN, J.; BITENSKY, L. Lysosomal enzymes and inflammation. **Ann. rheum. Dis.**, v. 30, p. 522–536, 1971.

CHEN, C.; SHAO, Y.; TAO, Y.; WEN, H. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1263–1269, 2015. Elsevier Ltd.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, p. 12, 2011. England.

CHINTOJU, N.; KONDURU, P.; KATHULA, R. L.; REMELLA, R. Importance of natural products in the modern history. **Research and Reviews: Journal of Hospital and Clinical Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 5–10, 2015.

CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. TOLEDO; MERCADANTE, A. Z. Efficiency of different solvents on the extraction of bioactive compounds from the amazonian fruit *Caryocar villosum* and the effect on its antioxidant and colour properties. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 364–372, 2014.

CHOI, S. H.; KIM, W. J.; YOUNG-NAM, C.; CHAEKYUN, K. A. Quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, 2006.

CHON, S.-U.; JANG, H.-G.; KIM, D.-K.; et al. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 3, p. 309–317, 2005.

CHUNG, I. M.; AHN, J. K.; YUN, S. J. Assessment of allelopathic potential of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) on rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Crop Protection**, v. 20, n. 10, p. 921–928, 2001.

CIRIO, G. M.; DONI FILHO, L.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, GOMES, O.; ZANIN, S. M. W. Interrelation between agricultural and physics parameters of quality control of *Maytenus ilicifolia*, Mart. ex. Reiss (espinheira-santa) as farmaceutical industry insume. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 67–76, 2003.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 2015.

COELHO, M. DE F. B.; MAIA, S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. Atividade alelopática de extrato de sementes de Juazeiro. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 108–111, 2011.

COELHO, M. H.; KWASNIEWS, C. M. Spectos econômicos do reflorestamento de pinus na pequena propriedade rural: um estudo de caso. **4º Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais**, 2008.

CORDEIRO, A. R.; SIMIONI, R. E.; WISNIEWSKI JR, A.; NUNES, D. S. Composição química de duas variedades de própolis dos Campos Gerais do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 21–27, 2015.

CORRALES, H. G.; VENTO, N. M.; ALCAREZ, R. Q.; et al. Caracterización de los extractos obtenidos a partir del follaje de *Pinus caribaea* morelet var. *caribaea* barret y golfari, y *Pinus tropicalis* Morelet Lic. **Revista Forestal Baracoa**, v. 23, n. 2, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

COSTA, A. C.; MARIA, K.; THALLITA, E.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana do *Pleurotus ostreatus* isolados de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. **Rev Pre Infec e Saúde**, v.4 p. 1–8, 2018.

COSTA, J. A.; PIRES, J. L. F.; THOMAS, A. L.; ALBERTON, M. Comprimento e índice de expansão radial do hipocótilo de cultivares de soja. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, p. 609–612, 1999.

COX, K. D.; SCHERM, H.; RILEY, M. B. Characterization of *Armillaria* spp. from peach orchards in the southeastern United States using fatty acid methyl ester profiling. **Mycological Research**, v. 110, n. 4, p. 414–422, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity : A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

CREMIN, P.; GUIRY, P. J.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K.; DONNELLY, D. M. X. A liquid chromatography–thermospray ionisation–mass spectrometry guided isolation of a new sesquiterpene aryl ester from *Armillaria novae-zelandiae*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, , n. 15, p. 2325–2329, 2000. The Royal Society of Chemistry.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Pharmacological management of children with short stature : the role of aromatase inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 172–177, 2007.

DAVIES, J. Are antibiotics naturally antibiotics? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p. 496–499, 2006.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F. J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T. B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 141, n. 2, p. 219–222, 2005.

DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do paraná. **Arq. Ci nc. Saúde**, v. 15, n. 1, p. 3–13, 2011.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**. 2 ed ED. John Willey & sons, LTD. 2002.

DIMOU, D. M.; GEORGALA, A.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. **Mycological Research**, v. 106, n. 8, p. 925–929, 2002.

DING, Y.; MA, K.; TSUI, Z. C. Induction of nitric oxide production by ganglioside GM3 in murine peritoneal macrophages activated for tumor cytotoxicity. **In Vivo**, v. 12, p. 357 – 361, 1998.

DONG, J.; ZHANG, M.; LU, L.; SUN, L.; XU, M. Nitric oxide fumigation stimulates flavonoid and phenolic accumulation and enhances antioxidant activity of mushroom. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1220–1225, 2012.

DONNELLY, D. M. X.; KONISHI, T.; DUNNE, O.; CREMIN, P. Sesquiterpene aryl esters from *Armillaria tabescens*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1473–1478, 1997.

DORNAS, W.; T. OLIVEIRA, T.; G. RODRIGUES-DAS-DORES, R.; F. SANTOS, A.; J NAGEM, T. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 241–249, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. DOS; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno / ácido linol ico e método de seqüestros de radicais DPPH  . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F.

Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUDHGAONKAR, S.; THYAGARAJAN, A.; SLIVA, D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 11, p. 1272–1280, 2009.

EINHELLIG, F. A. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. **Allelopathy**, ACS Symposium Series. v. 582, p.7–96, 1994.

EKLUND, T. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p. 159–167, 1985.

ELSAYED, E. A.; ENSHASY, H. EL; WADAAN, M. A. M.; AZIZ, R. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 805841, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alellopathy: an emerging topic in ecophysiology. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, p. 175–204, 2000.

FERREIRA, M. D. DE S.; BATISTA, E. K. F.; FARIAS, I. DOS S.; et al. Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos do fruto de *Buchenavia* sp. **Artigo Original**, v. 1, n. 2, p. 17–22, 2017.

FILHO, A. P. S. S.; DUARTE, M. L. R. Atividade alelopática do filtrado de cultura produzido por *Fusarium solani*. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 227–230, 2007.

FINNEY, D. J. Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FIORENZA, M.; DOTTO, D. B.; BOLIGON, A. A.; et al., Análise fitoquímica e atividade alelopática de extratos de *Eragrostis plana* Nees (capim-annoni). **Iheringia, Série Botânica**, v. 71, n. 2, p. 193–200, 201

FLORES, N.; JIMÉNEZ, I. A.; GIMÉNEZ, A.; et al. Benzoic Acid derivatives from piper species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1538–1543, 2008.

FOWLER, Z. L.; SHAH, K.; PANEPINTO, J. C.; JACOBS, A.; KOFFAS, M. A. G. Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25681, 2011.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 93–96, 1991.

FRANÇA, E. DE; VASCONCELLOS, A. G. Patentes de fitoterápicos no Brasil: uma análise do andamento dos pedidos no período de 1995-2017. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 329–359, 2017.

FRANÇA, E. L.; FAGUNDES, D. L. G.; LEÃO, L. D.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Efeito do composto “mais vida” na ativação de macrófagos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2012.

FREIESLEBEN, S. H.; JÄGER, A. K. Medicinal & aromatic plants correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms - a review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 2, p. 1–6, 2014.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FRY, S. C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1, p. 97–111, 2004.

GARCÍA, D. E.; GLASSER, W. G.; PIZZI, A.; LACOSTE, C.; LABORIE, M.-P. Polyphenolic resins prepared with maritime pine bark tannin and bulky-aldehydes. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 84–93, 2014.

GATTI, A. B.; CRISTINA, S.; GUALTIERI, J.; PEREZ, D. A.; SALGUEIRO, I. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O . Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L . **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 459–472, 2004.

GE, S.; WANG, H.; WANG, Z.-F.; et al. Sensitive measurement of polyols in urine by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection using on-column complexation with borate. **Journal of Chromatography B**, v. 915–916, p. 39–45, 2013.

GENG, Y.; ZHU, S.; LU, Z.; et al. Anti-inflammatory activity of mycelial extracts from medicinal mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 4, p. 319–325, 2014.

GOLDFARB, M.; WANDERLEY, L.; WANDERLEY, N. Allelopathy: relations in the agrosystems. **Tecnologia e Ciência agropecuária**, v. 31, n. 1, p. 23–28, 2009.

GOMES, C. R.; VISSOTTO, F. Z.; FADINI, A. L.; FARIA, E. V. DE; LUIZ, A. M. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates diet em sacarose e light em calorias. **Ciência e**

Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 3, p. 614–623, 2007.

GOMES, N. S. B.; AUER, C. G.; JÚNIOR, A. G. Crescimento in vitro de isolados de *Armillaria* sp. Obtidos de *Pinus elliotti* var. *elliotti* sob várias temperaturas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 187–189, 2007.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 85–90, 2016.

GRAHAM, J. H.; HODGE, N. C.; MORTON, J. B. Fatty Acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 58 LP-64, 1995.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; VOLLMANN, R.; ELSTNER, E. F. Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7576–7582, 2003.

GREMBECKA, M. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 1, p. 1–14, 2015.

GREVE, H.; E. MOHAMED, I.; PONTIUS, A.; et al. Fungal metabolites: Structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v.9, p. 537-545, 2010.

GÜLÇİN, İ. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. **Amino Acids**, v. 32, n. 3, p. 431, 2006.

GUO, Y.-J.; DENG, G.-F.; XU, X.-R.; et al. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. **Food & Function**, v. 3, n. 11, p. 1195–1205, 2012.

HADIBARATA, T.; KRISTANTI, R. A. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 314–318, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGET, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease Barry. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1–14, 1984.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDİ, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1126–1134, 2007.

HENDRA, R.; AHMAD, S.; SUKARI, A.; SHUKOR, M. Y.; OSKOEIAN, E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3422–3431, 2011.

HENRY, G. E.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2231–2234, 2002.

HERATH, H. M. T. B.; JACOB, M.; WILSON, A. D.; ABBAS, H. K.; NANAYAKKARA, N. P. D. New compounds and secondary metabolites from bioactive extracts of the fungus *Armillaria tabescens*. **Natural product research**, v. 27, n. 17, p. 1562–1568, 2013.

HONG, E.-J.; NA, K.-J.; CHOI, I.-G.; CHOI, K.-C.; JEUNG, E.-B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 863–866, 2004.

HYNES, J.; MÜLLER, C. T.; JONES, T. H.; BODDY, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 1, p. 43–57, 2007.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arq. Inst. Biol**, v. 73, n. 1, p. 79–82, 2006.

INÁCIO, J. P. F. Esteróides antitumorais : a funcionalização seletiva do anel D de esteróides da série pregnano no desenvolvimento de potenciais agentes anticancerígenos, **Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior**, 2012.

ISIDOROV, V. A.; LECH, P.; ŻÓŁCIAK, A.; RUSAK, M.; SZCZEPANIAK, L. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. **Trees**, v. 22, n. 4, p. 531, 2008.

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

JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. August, p. 1–18, 2015.

JEFFREY, G. A.; HUANG, D. The crystal structure of D-threitol at K and 198 K.

Carbohydrate Research, v. 223, p. 11–18, 1992.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; et al. Cancer statistics, 2007. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n. 1, p. 43–66, 2007.

JING, N.; SHI, J.; LI, G.; SUN, Z.; YOU, J. Determination of fatty acids from mushrooms using high performance liquid chromatography with fluorescence detection and online mass spectrometry. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 155–163, 2012.

JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

JÚNIOR, H. M. DOS S.; OLIVEIRA, D. F.; CARVALHO, D. A.; et al., Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231–238, 2010.

KABARA, J. J.; SWIECZKOWSKI, D. M.; CONLEY, A. J.; TRUANT, J. P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23–28, 1972.

KALAČ, 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.

KALAČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 9–16, 2009.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G.; et al., Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635–642, 2011.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. **Redox Biology**, v. 12, p. 833–842, 2017.

KAMAYA, Y.; FUKAYA, Y.; SUZUKI, K. Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 59, n. 2, p. 255–261, 2005.

KAREN ZEN, C.; PELC DA SILVA, K.; REINEHR, C.; BERTOLIN, T.; COLLA, L. Indução da síntese de lipídios e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, p. 40, 2014.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p.

937–947, 2005.

KIM, M.-Y.; SEGUIN, P.; AHN, J.-K.; et al. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7265–7270, 2008.

KLAUS, A.; KOZARSKI, M.; NIKSIC, M.; et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2005–2011, 2011.

KLIS, F. VAN DER; GOOTJES, L.; HAVEREN, J. VAN; ES, D. S. VAN; BITTER, J. H. Selective terminal C–C scission of C5-carbohydrates. **Green Chemistry**, v. 17, p. 3900–3909, 2015.

KOBORI, H.; SEKIYA, A.; SUZUKI, T.; et al. Bioactive sesquiterpene aryl esters from the culture broth of *Armillaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 163–167, 2014.

KOCYIGIT, A.; KOYUNCU, I.; DIKILITAS, M.; BAHADORI, F.; TURKKAN, B. Cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of naringenin-oxime relative to naringenin on normal and cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 872–880, 2016.

KOMURA, D. L. *Pleurotus ostreatus* variedade florida: Caracterização estrutural de polissacarídeos do micélio e exopolissacarídeos. 79 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; et al. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6192–6199, 2010.

KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 1988.

KOSTIĆ, M.; SMILJKOVIĆ, M.; PETROVIĆ, J.; et al. Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. **Food & Function**, v. 8, n. 9, p. 3239–3249, 2017.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKŠIĆ, M.; et al. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1, p. 144–153, 2012.

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

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; et al., Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1567–1636, 2010.

KUNG, J. L. .; STOKES, M. R. .; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) silage. **Silage Science and Technology**, p. 305–360, 2003.

KUO, C.-F.; HSIEH, C.-H.; LIN, W.-Y. Proteomic response of LAP-activated RAW 264.7 macrophages to the anti-inflammatory property of fungal ergosterol. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 207–212, 2011.

KUREK, A.; GRUDNIAK, A. M.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; WOLSKA, K. I. New antibacterial therapeutics and strategies. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 3–12, 2011.

LA HOZ, C. L. R. DE; CASTRO, F. R.; SANTOS, L. M. B.; LANGONE, F. Distribution of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in the peripheral nervous system of lewis rats during ascending paresis and spontaneous recovery from experimental autoimmune neuritis. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 1, p. 56–66, 2010.

LARKIN, R. P.; GROVES, C. L. Identification and characterization of isolates of *Phytophthora infestans* Using Fatty Acid Methyl Ester (FAME) profiles. **Plant Disease**, v. 87, n. 10, p. 1233–1243, 2003.

LEANDRO, L. M. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* (FABACEAE) **Dissertação, Universidade Federal do Amazonas**, 2011.

LEE, J.-H.; YANG, H.-Y.; LEE, H.-S.; HONG, S.-K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 497–502, 2008.

LEWAN, L. .; ANDERSSON, M.; MORALES, P. G. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternatives to Laboratory Animals ATLA**, v. 20, p. 297–301, 1992.

LI, H.; ZHANG, Z.; LI, M.; LI, X.; SUN, Z. Yield, size, nutritional value, and antioxidant activity of oyster mushrooms grown on perilla stalks. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 347–354, 2017.

LI, W.; GU, Z.; YANG, Y.; et al. Non-volatile taste components of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 143, p. 427–431, 2014.

LI, Z.; WANG, Y.; JIANG, B.; et al. Structure, cytotoxic activity and mechanism of protoilludane sesquiterpene aryl esters from the mycelium of *Armillaria mellea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 119–127, 2016.

LIMA, C. P. DE; CUNICO, M. M.; TREVISAN, R. R.; et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* Leach dos extratos do fruto de *Euterpe edulis* Martius. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 331–336, 2011.

LIMA, É. R. DE; MOREIRA, L. S.; FACUNDO, V. A.; SILVA-JARDIM, I.; TELES, C. B. G. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. **SABER CIENTÍFICO**, v. 3, n. 1, p. 53–69, 2011.

LIMA, M. C. J. DE S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 320–324, 2010.

LIU, R.-T.; ZHANG, M.; YANG, C.-L.; et al. Enhanced glycolysis contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 51, 2018.

LIU, S.; RUAN, W.; LI, J.; et al., Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 93–102, 2008.

LIU, Y.; CHEN, D.; YOU, Y.; et al. Nutritional composition of boletus mushrooms from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 83–91, 2016.

LOGANAYAKI, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 687–695, 2013.

LUCKSTADT, C.; MELLOR, S. Holoanalysis – the acid test in pig diets. **Krafftutter Feed Magazine**, v. 1–2, p. 18–21, 2010.

LUNG, M.-Y.; CHANG, Y.-C. Antioxidant properties of the edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011.

LUTON, J.-P.; CERDAS, S.; BILLAUD, L.; et al. Clinical features of adrenocortical

carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 17, p. 1195–1201, 1990.

MA, L.; CHEN, H.; DONG, P.; LU, X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 503–508, 2013.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512–2521, 2000.

MACIEL, J. C.; SANTOS, J. B. DOS; REIS, R. F. DOS; FERREIRA, E. A.; PEREIRA, G. A. M. Interferência de plantas daninhas no crescimento da cultura do trigo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 23–29, 2017.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; Echevarria, A. plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, p. 176–177, 1962.

MALHEIROS, A. .; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre as espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos**, p. 505–506, 2001.

MANFRON, P. A.; GARCIA, D. C.; ANDRIOLO, J. L. Morphological and physiological aspects of onion. **Ciencia rural**, v. 22, n. 1, p. 101–107, 1992.

MARCHINI, H. R. Extração dos taninos da espécie *Pinus taeda* no município de Curitiba – SC e sua avaliação para aplicação industrial como adesivo modificado. **Dissertação mestrado Universidade Tecnológica do Parana, Pato Branco Paraná**, 2015.

MARIO, D. F.; RAPANÀ, P.; TOMATI, U.; GALLI, E. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 8–12, 2008.

MARTIN, M. M.; YAMAGUCHI, A. A.; RIBEIRO, P. S.; FIGUEIREDO, B. C.; BONATTO, S. J. R. Ação de derivados do ácido betulínico em células do tumor de córtex adrenal. **Revista Médica da UFPR**, v. 3, n. 2, p. 64–69, 2016.

MATTILA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343–2348, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E.; The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, n. 2, p. 513–524, 1998.

MELOS, J. L. R.; SILVA, L. B.; PERES, M. T. L. P.; et al. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* humb. & bonpl. ex. willd (PTERIDACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 292–297, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITAO, G. G.; et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001. England.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S.; et al. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1031–1040, 2015.

MERTENS, D. R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. **Simpósio Internacional de Ruminantes, Lavras. Anais. Lavras: Universidade Federal de Lavras**, p. 188–211., 1992.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILHORINIA, S. DA S.; SMIDERLEA, F. R.; BISCAIAB, S. M. P.; et al. Fucogalactan from the giant mushroom *Macrocybe titans* inhibits melanoma cells migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. February, p. 50–56, 2018.

MIROV, N. T. **The genus Pinus**. New York: Ronald Press Co, 1967.

MISIEK, M.; WILLIAMS, J.; SCHMICH, K.; et al. Structure and cytotoxicity of arnamial and related fungal sesquiterpene aryl esters. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1888–1891, 2009.

MIYAUCHI, M. Y. H. M. Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia*. **Tese - Microbiologia Agrícola Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, p. 105, 2012.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; et al. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 113–121, 2000.

MONA, S.; THARISINI, D. P.; SEKARENTHIRAN, S. C.; PERUMAL, K. A study on bioactive fluorescent compounds from selected mushrooms and its

antimicrobial activity. **Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products**. 2014.

MOON, B.-S.; RYOO, I.-J.; YUN, B.-S.; et al. Glyscavins A, B and C, New phenolic glycoside antioxidants produced by a fungus *Mycelia sterilia* F020054. **The Journal Of Antibiotics**, v. 59, p. 735, 2006.

MORAIS, S. M. DE; JUNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M. Antioxidant activity of essential oils from northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907–910, 2006.

MOREIRA, J. M. M. Á. P.; OLIVEIRA, E. B.; LIEBSCH, D.; MIKICH, S. B. **Avaliação econômica do cultivo de *Pinus* sp. para um Sistema de Produção Modal nos estados do Paraná e Santa Catarina**. 2015.

MOREIRA, S. G.; POW-SANG, J. M. Evaluation and management of adrenal masses. **Cancer Control**, v. 9, n. 4, p. 326–334, 2002.

MORENO, A. D. H.; POSSEBON, L.; SANT'ANA, M.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11–12, 2018.

MORO, C.; PALACIOS, I.; LOZANO, M.; et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 350–355, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA, P. F. Caracterização e otimização dos métodos de cultivo dos fungos *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extrato de *Diplodia pinea*. **Dissertação de mestrado (Ciências Farmaceuticas) - Universidade Federal do Paraná**, 2017.

MUSZYŃSKA, B.; KOMENDACKI, P.; KAŁA, K.; OPOKA, W.; ROJOWSKI, J. L-Tryptophan and its derivatives in edible mushrooms species. **Medicina Internacia Revuo - International Medicine Review**, v. 26, n. 103, p. 82–84, 2014.

MYCOBANK. MYCOBANK DATABASE. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=56092&Fields=All> acessado em 03 de junho de 2016.

NAGATA, Y.; ISHIZAKI, I.; WAKI, M.; et al. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma

activity. **Leukemia Research**, v. 39, n. 6, p. 638–645, 2015.

NARANJO, J. D. L. P.; GUIAMET, P. S.; GÓMEZ DE SARAVIA, S. G. Evaluación fitoquímica de extractos naturales de *Eucalyptus citriodora* y *Pinus caribaea* con actividad biocida. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 8, n. 5, p. 445–448, 2009.

NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in *Paracoccidioidomycosis*: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4593–4600, 2002.

NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO-DIAS, F.; RUSSO, M. Cytotoxic activity of BCG-activated macrophages against L929 tumor cells is nitric oxide-dependent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 12, p. 1593–1596, 1998.

NETO, M. V. L.; SANTANA, F. S.; MALHEIROS, R. S. P.; MACHADO, L. L.; MAPELI, A. M. Avaliação alelopática de extratos etanólicos de *Copaifera sabulicola* sobre o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*, *Lycopersicum esculentum* e *Zea mays*. **Biotemas**, v. 27, n. 3, p. 23–32, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Natural Product**, v. 79, p. 629–661, 2016.

NISHIKAWA, Y.; OKABE, M.; YOSHIMOTO, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters, II. antitumoral activity of saturated fatty acids and their ester derivatives against Ehrlich Ascites carcinoma. **Chem. Pharm. Bull**, v. 24, p. 387–393, 1958.

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.

NUKATA, M.; HASHIMOTO, T.; YAMAMOTO, I.; et al. Neogrifolin derivatives possessing anti-oxidative activity from the mushroom *Albatrellus ovinus*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 731–737, 2002.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE, A. K. R. DE M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 23–32, 2003.

ODURO, K. A.; MUNNECKE, D. E.; SIMS, J. J.; KEEN, N. T. Isolation of antibiotics produced in culture by *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 66, n. 2, p. 195–199, 1976.

OKORO, I. O. Antioxidant activities and phenolic contents of three mushroom species, *Lentinus squarrosulus* Mont., *Volvariella esculenta* (Masee) Singer and *Pleurocybella porrigens* (Pers .) Singer. **International Journal of Nutrition and Metabolism Vol.**, v. 4, n. 5, p. 72–76, 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; PEREIRA, K. C. L.; MULLER, J. A. I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 41–47, 2014.

OLIVEIRA, C. F. DE; OLIVEIRA, F. F. DE; OLIVEIRA, V. B. DE; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Parâmetros de controle de qualidade de *Psychotria fraxistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE): umidade, cinzas e prospecção fitoquímica. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 4, p. 17–23, 2014.

OLIVEIRA, L. S. DE; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; et al. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* Rooting of mini-cuttings and micro-cuttings of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 507–516, 2012.

OLIVEIRA, M. A. DE; BEZERRA, P. R. P.; NÓBREGA, P. F.; et al. Avaliação da toxicidade do óleo de *Cocos nucifera* L. frente a *Artemia salina* Leach. de uma amostra natural e outra industrializada na Cidade de Sousa-PB. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 291–304, 2014.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. R. Ácido benzóico (CAS 65-85-0). **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, 2017

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide- protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 715–729, 2000.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; et al. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OUZOUNI, P. K.; PETRIDIS, D.; KOLLER, W.-D.; RIGANAKOS, K. A. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1575–1580, 2009.

OWNLEY, B. H.; WINDHAM, M. T. **Biological control of plant pathogens. In: Trigiano RN, Windham MT, Windham AS(eds) Plant pathology concepts and laboratory exercises**, 2nd edn. CRC Press, New York. 2007.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia, **Mensagem Doce**, v. 67, 2003

PATOCKA, J. **Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification**. 2003.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 2016.

PFYFFER, G. E.; RAST, D. M. The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols. **Experimental Mycology**, v. 4, n. 2, p. 160–170, 1980.

PIAIA, L. Incorporação de Aloe vera em membranas de celulose bacteriana afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, **Dissertação de mestrado, UFSC**, 2014.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1, p. 161–170, 1980.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.

PINTOS, V. C.; AGUÍN, C. O.; MANSILLA, S. P.; et al. No diagnóstico de especies de *Armillaria* y *Phytophthora* en suelo como estrategia de conservación de árboles singulares en Galicia Title. **6º Congreso Forestal Español**. p.2–9, 2013.

PIPE, R.; COLES, J.; FARLEY, S. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol**, v. 4, p. 93–100, 1995.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311–333, 2006.

PRABU, M.; KUMUTHAKALAVALLI, R. Antioxidant activity of oyster mushroom (*Pleurotus florida* [mont.] singer) and milky mushroom (*Calocybe indica* p and c). **Int J Curr Pharm Res**, v. 8, n. 3, p. 48–51, 2016.

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.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; ARAKAWA, Y.; et al. Grifolin derivatives from *Albatrellus caeruleoporus*, new inhibitors of nitric oxide production in RAW 264.7 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 164–168, 2006.

RATHEE, S.; RATHEE, D.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; RATHEE, P. Mushrooms as therapeutic agents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 459–474, 2012.

RICHTER, M.; CAETANO, S. Ingredientes usados na indústria de chocolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 357–369, 2007.

ROSA, R. L. DA; NARDI, G. M.; JANUÁRIO, A. G. DE F.; et al. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of., v. 50, 2014.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, n. 6, p. 1685–1701, 1987.

RUSSO, A.; CARDILE, V.; PIOVANO, M.; et al. Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3, p. 352–358, 2010.

RUSSO, R.; BERLYN, G. **The Use of Organic Biostimulants to Help Low Input Sustainable Agriculture**. 1990.

RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; CÓRDOVA, M. M.; et al. *Lactarius rufus* (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 129–136, 2013.

RUTHES, A. C.; RATTMANN, Y. D.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1620–1627, 2012.

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 358–375, 2016.

SADLER, M. Nutritional properties of edible fungi. **News and views: Food industry nutritional**, v. 28, p. 305–308, 2003.

SALAS-PÉREZ, L.; GAUCÍN-DELGADO, J. M.; PRECIADO-RANGEL, P.; et al. Benzoic acid effect in the antioxidant capacity of wheat sprouts. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 17, p. 3397–3404, 2016.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 238–254, 2010.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L. M.; MINHONI, M. T. DE A.; ANDRADE, M. C. N. Physiochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 456–461, 2011.

SANTI, M. M.; SANCHES, F. S.; SILVA, J. F. M.; SANTOS, P. M. L. Phytochemical profile determination from extracts with antioxidant activity of the medicinal species of *Cordia verbenacea* DC. by HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256–261, 2014.

SANTIAGO, J. D. A. Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocratogênica e citogenotóxica. **Tese Universidade Federal de Lavras**, p. 222, 2015.

SANTOS, A. O. DOS; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. May, p. 277–281, 2008.

SANTOS, N. DE Q. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64–70, 2004.

SANTOS, S.; MORAES, M. L.; REZENDE, M. O. O.; SOUZA FILHO, A. P. . Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. **Ecl. Quím.**, v. 36, n. 2, p. 51–68, 2011.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC – MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731–739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V; et al. Application of acetate derivatives for gas chromatography – mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 215–222, 2008.

SCHOEMAN, M.; WEBBER, J.; DICKINSON, D. J. **The development of ideas in biological control applied to forest products**. 1999.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861–880, 2002.

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, 2001.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1527–1532, 1991.

SHIMIZU, J. Y.; SEBBEN, A. M. **Espécies de Pinus na silvicultura brasileira**. 2008.

SILVA, C. B.; CÂNDIDO, A. C. S.; SIMIONATTO, E.; et al. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 4, p. 413–420, 2010.

SILVA, M. D. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; et al. Caracterização química de glucanas fungicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85–92, 2006.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. DOS S.; KOBLITZ, M. G. B. Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTINI, F.; et al. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 90–96, 2015.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** . 7. ed. Rio de Janeiro. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia do Produto Natural ao Medicamento**. 2017.

SINGH, A. K.; PANDEY, M. B.; SINGH, U. P. Antifungal Activity of an Alkaloid Allosecurinine against Some Fungi. **Mycobiology**, v. 35, n. 2, p. 62–64, 2007.

SINGH, U. P.; SARMA, B. K.; MISHRA, P. K.; RAY, A. B. Antifungal activity of venenatine, an indole alkaloid isolated from *Alstonia venenata*. **Folia Microbiologica**, v. 45, n. 2, p. 173, 2000.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SIU, K. C. Isolation and structural characterization of mushroom polysaccharides in relationship with their antioxidant activities. **Tese doutorado, The Hong Kong Polytechnic University**. 2015.

SMITH, J. E.; ROWAN, N.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. **University of Strathclyde, Cancer Research UK**, p. 253, 2002.

SOARES, A. A.; SÁ-NAKANISHI, A. B. DE; BRACHT, A.; et al. Hepatoprotective effects of mushrooms. **Molecules**, v. 18, p. 7609–7630, 2013.

SONIBARE, O. O.; OLAKUNLE, K. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Pinus caribaea* from Nigeria. **Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 14, p. 2462–2464, 2008.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R. E; VIEIRA-JR., G. M.; et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, A. MARIA; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

SOUZA, F. M. DE; FERREIRA, R. DE M. S.; BARBOSA, R. C. Utilização da casca de camarão para produção de quitina. **Revista acadêmico - Científica**, v. 07, p. 1–11, 2015.

SOUZA FILHO, A. P. D. S.; VASCONCELOS, M. A. M. DE; ZOGHBI, M. D. G. B.; CUNHA, R. L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 389–395, 2009.

SPIASSI, A.; NÓBREGA, L. H. P.; ROSA, D. M.; et al. Allelopathic effects of pathogenic fungi on weed plants of soybean and corn crops. **Biosci. J.**, p. 1037–1048, 2015.

SRIVASTAVA, B. P.; SINGH, K. P.; SINGH, U.; PANDEY, V. B. Effect of some naturally occurring alkaloids on conidial germination of *Botrytis cinerea*. **Bioved**, v. 5, p. 69 – 72., 1994.

STAHL, P. D.; KLUG, M. J. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4136 LP-4146, 1996.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z.; STEFFEN, G. P. K. Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 30, n. 63, p. 199–206, 2010.

SUN, Y.; LIANG, H.; ZHANG, X.; TONG, H.; LIU, J. Structural elucidation and immunological activity of a polysaccharide from the fruiting body of *Armillaria mellea*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1860–1863, 2009.

TAKAC, M. J.-M.; TOPIC, D. V. FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives. **Acta Pharmaceutical**, v. 54, p. 177–191, 2004.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; OLIVEIRA, D. C. R. DE. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 403–408, 2003.

TAN, C.; VAN, I. C.; JA., S. Freeze-drying fungi using a shelf freeze-drier. **Methods in Molecular Biology**, v. 368, p.119–125, 2007.

TIAN, J.; HU, X.; LIU, D.; WU, H.; QU, L. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 160–167, 2017.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O' DONNELL, C. P.; et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

TSUJI, A.; KINOSHITA, T.; HOSHINO, M. Analytical chemical studies on amino sugars. ii. Determination of hexosamines using 3-Methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 7, p. 1505–1510, 1969.

TSUZUKI, E.; YAMAMOTO, Y.; SHIMIZU, T. Fatty acids in buckwheat are growth inhibitors. **Annals of Botany**, v. 60, n. 1, p. 69–70, 1987.

USUI, T.; IWASAKI, Y.; MIZUNO, T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *ganoderma applanatum* by employing a column of concan. **Carbohydrate Research**, v. 92, p. 103–114, 1981.

UZOH, C. V; UMEZURUIKE, K. C.; BRAIDE, W.; ORJI, C.; IHEUKWUMERE, I.

H. Biotechnology evaluation of antibacterial activities of some chemical food preservatives on food associated bacteria. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 35–38, 2016.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216–223, 2006.

VANDERHAESEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging - A critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357–381, 2006.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245–1252, 2009.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 1, p. 15–32, 2003.

VINING, L. C.; TABER, W. A. Analysis of the endogenous sugars and polyols of *Claviceps purpurea* (fr.) tul. by chromatography on ion exchange resins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 647–657, 1964.

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis. 2 ed Berlin: Springer.** 1996.

WALTERS, K. R.; PAN, Q.; SERIANNI, A. S.; DUMAN, J. G. Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant alaskan beetle, *Upis cerambyoides*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 16822–16831, 2009.

WANG, D. Z.; ZHANG, G. F. Determination and analysis of the four species of wild mushroom ingredients. **J. of Mudanjiang Normal University**, v. 3, p. 24–25, 2010.

WANG, E.; HUANG, Y.; DU, Q.; SUN, Y. Silver nanoparticle induced toxicity to human sperm by increasing ROS(reactive oxygen species) production and DNA damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 193–199, 2017.

WANG, H.; FU, Z.; HAN, C. The Medicinal Values of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 842619, 2013.

WANG, X. M.; ZHANG, J.; WU, L. H.; et al. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **Food Chemistry**, v. 151, p. 279–285, 2014.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, L.; et al. Four new alkaloids from the fermentation broth of *Armillaria mellea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, n. 2, p. 330–337, 2013.

WENG, C.-J.; YEN, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 1, p. 76–87, 2012.

WINGFIELD, B. D.; BLOOMER, P.; RIDLEY, G. S.; WINGFIELD, M. J. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria isolates* from South America and Indo-Malaysia. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 285–293, 2003.

WU, J.; ZHOU, J.; LANG, Y.; et al. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong in vitro anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 663–667, 2012.

XU, X.-M.; LI, D.-Y.; HUA, H.-M.; LI, Z.-L.; LIU, Q. Two new threitol orsellinates from a sea mud-derived fungus, *Ascotricha* sp. ZJ-M-5. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 7, p. 673–677, 2017.

XU, Z.; YAN, S.; BI, K.; et al. Isolation and identification of a new anti-inflammatory cyathane diterpenoid from the medicinal fungus *Cyathus hookeri* Berk. **Fitoterapia**, v. 86, p. 159–162, 2013.

YEN, G.; CHEN, H. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 27–32, 1995.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TÜRKEKUL, İ.; ELMASTAŞ, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 168–174, 2006.

ZHANG, D.; FRANKOWSKA, A.; JARZYNSKA, G.; et al. Metals of King Boletus (*Boletus edulis*) Bull.: Fr. collected at the same site over two years. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 22, p. 3050–3055, 2010.

ZHANG, L.; WANG, C.-C. Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 2, p. 138–152, 2014.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.

ZHANG, Y.; MILLS, G. L.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 386–390, 2003.

ZHAO, Y. H.; JI, G. D.; CRONIN, M. T. D.; DEARDEN, J. C. QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *carp*. **Science of The Total Environment**, v. 216, n. 3, p. 205–215, 1998.

ZHENG, C. J.; YOO, J.-S.; LEE, T.-G.; et al. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5157–5162, 2005.

ZHENG, P.; MENG, X.; YU, Z.; et al. Genetic and Phytochemical Analysis of *Armillaria mellea* by RAPD, ISSR, and HPLC. **Analytical Letters**, v. 42, n. 10, p. 1479–1494, 2009.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; RASHID, U.; et al. GC/MS profiling, in vitro antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1460–S1468, 2017.

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AF14687

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AF14687
 Usuário: Universidade Federal do Paraná
 CPF/CNPJ: 75.095.679/0001-49
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso:
☒ Pesquisa Científica ☒ Bioprospecção ☒ Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Suillus sp
 Armillaria sp
 Botrytis cinerea
 Diplodia pinea
 Bjerkandera adusta
 Rhizoctonia sp

Título da Atividade: Aspectos de cultivo e abordagem química de fungos patogênicos e micorrízicos de Pinus e sua aplicação nas áreas farmacêutica, veterinária e agrícola

Equipe

Marilis Dallarmi Miguel Universidade Federal do Paraná
 Celso Garcia Auer Embrapa Florestas

Obdúlio Gomes Miguel	Universidade Federal do Paraná
Beatriz Cristina K. Hirota	Universidade Federal do Paraná
Camila Freitas de Oliveira	Universidade Federal do Paraná
Cristiane Bezerra da Silva	Universidade Federal do Paraná
Cristiane da Silva Paula de Oliveira	Universidade Federal do Paraná
Katlin Suellen Rech	Universidade Federal do Paraná
Maisliam de Oliveira	Universidade Federal do Paraná
Paula Francislaine Moura	Universidade Federal do Paraná
Josiane de Fátima Gaspari Dias	Universidade Federal do Paraná
Sandra Maria Warumby Zanin	Universidade Federal do Paraná
Vitor Alberto Kerber	Universidade Federal do Paraná

Parceiras Nacionais
00.348.003/0089-52 / Embrapa florestas

Resultados Obtidos

Outros resultados

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: ARTIGO PUBLICADO "Biological activities by C

Identificação do meio onde foi divulgado: Apresentação de Banner EMBRAPA - Estudo H

Identificação do meio onde foi divulgado: Resumo EVINCE EMBRAPA - Avaliação de dife

Identificação do meio onde foi divulgado: Apresentação EVINCE EMBRAPA - Validação d

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido: INPI

Código do requerimento: BR 10 2016 029861 0

Número da patente: BR 10 2016 029861 0 A2

Órgão no qual foi requerido: INPI

Código do requerimento: BR 10 2016 029972 1

Número da patente: BR 10 2016 029972 1 A2

Órgão no qual foi requerido: INPI
Código do requerimento: BR 10 2016 029973 0
Número da patente: BR 10 2016 029973 0
Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação
Identificação do meio onde foi divulgado: X Simpósio de recursos genéticos para América
Identificação do meio onde foi divulgado: EVINCE EMBRAPA - Caracteres histoquímicos

Data do Cadastro: 24/10/2018 10:51:02
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:53 de 24/10/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SIS GEN

ANEXO II

Folia Microbiologica
<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00667-y>

ORIGINAL ARTICLE



Antagonistic activity of *Diplodia pinea* against phytopathogenic fungi

Camila Freitas de Oliveira¹ · Paula Francislaiane Moura¹ · Katlin Suellen Rech¹ · Cristiane da Silva Paula de Oliveira^{1,2} · Beatriz Cristina Konopatzki Hirota¹ · Maislan de Oliveira¹ · Cristiane Bezerra da Silva¹ · Angela Maria de Souza¹ · Josiane de Fátima Gaspari Dias¹ · Obdulio Gomes Miguel¹ · Celso Garcia Auer³ · Marilis Dallarmi Miguel¹

Received: 28 February 2018 / Accepted: 23 November 2018
 © Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2018

Abstract

The ability of *Diplodia pinea* to inhibit *Armillaria* sp., *Bjerkandera adusta*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizoctonia* sp. mycelium growth was analyzed using the double-culture method. Wild-type fungal strains were incubated in a biochemical oxygen demand incubator using potato agar dextrose medium at 24 ± 2 °C for 35 days in darkness. *D. pinea* significantly inhibited the growth of all fungi species tested (30.75 to 98.37% inhibition) and showed moderate antagonistic activity (antagonistic index, 14.5). Chemical analysis of *D. pinea* culture broth extracts revealed steroids, triterpenes, and phenolic compounds. Alkaloids were qualitatively detected in the mycelium crude extract. The presence of these compounds may be related to the antagonistic activity observed. The inhibition ability of *D. pinea* is due to competition with the tested fungi for substrate and space.