UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOSÉ ANTONIO DE SOUSA PEREIRA JUNIOR

ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Ganoderma parvulum* MURRILL (BASIDIOMYCOTA, POLYPORALES, GANODERMATACEAE)

RECIFE

2013

JOSÉ ANTONIO DE SOUSA PEREIRA JUNIOR

ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Ganoderma parvulum* MURRILL (BASIDIOMYCOTA, POLYPORALES, GANODERMATACEAE)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Bioativos e Naturais

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Janete Magali de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

RECIFE
2013

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

P436e Pereira Junior, José Antonio de Sousa.
Estudos farmacognósticos e atividade biológica de Ganoderma parvulum Murrill (basidiomycota, polyporales, ganodermataceae) / José Antonio de Sousa Pereira Junior. – Recife: O autor, 2013.
117 f: il. ; 30 cm.

Orientadora: Janete Magali de Araújo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui Referências e anexos.

1. Ganoderma. 2. Produtos com Ação Antimicrobiana. 3. Anatomia e histologia. 4. Química. 5. toxicidade. I. Araújo, Janete Magali de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-160)

JOSÉ ANTONIO DE SOUSA PEREIRA JUNIOR

ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Ganoderma parvulum* MURRILL (BASIDIOMYCOTA, POLYPORALES, GANODERMATACEAE)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 22 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA:

_____

Prof.ª Dr.ª Janete Magali de Araújo (Orientadora)
Centro de Ciências Biológicas da UFPE - Departamento de Antibióticos

_____

Prof.ª Dr.ª Maria Nelly Caetano Pisciottano (Membro interno)
Centro de Ciências da Saúde da UFPE- Departamento de Ciências Farmacêuticas

_____

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Membro interno)
Centro de Ciências Biológicas da UFPE - Departamento de Antibióticos

_____

Prof.ª Dr.ª Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus (Membro externo)
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP

_____

Prof.ª Dr.ª Glaucia Manoella de Souza Lima (Membro externo)
Centro de Ciências Biológicas da UFPE - Departamento de Antibióticos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor
Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor
Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde
Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde
Prof.ª Dr.ª Vânia Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas
Prof. Dr. Antônio Rodolfo De Faria

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas
Prof. Dr. Dalci José Brondani

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Prof. ª Dr.ª Ana Cristina Lima Leite

À Deus

Aos meus pais, Sr. José Antonio de Sousa Pereira
e Sra. Antonia Maria de Sousa Pereira;

`a minha esposa Ana Paula Machado Anselmo;

à minha filha Helena Machado de Sousa Pereira (luz da minha vida);

às minhas irmãs Ana Angélica, Emília Tereza e Mabel,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Haroudo Sátiro Xavier**, pela grande amizade, sabedoria e alegria transmitidas.

À Prof.ª Dr.ª **Janete Magali de Araújo** pela orientação e apoio.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (PPGCF): **Carlos Brasileiro**, **Eduardo Gonçalves**, **Gustavo Dimech**, convivência e momentos de descontração.

Às amigas **Isla Vanessa**, **Renata Patrícia**, **Grace** e **Zenaide** pela disponibilidade em ajudar e convivência maravilhosa.

Aos amigos **Rômulo Sampaio**, **Douglas Pereira** e **Guilherme Rodrigues** pela convivência respeitosa.

A todo pessoal do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em particular as colegas **Elis** e **Érika** pela grande ajuda oferecida.

Aos **Professores do PPGCF** pela atenção oferecida.

Ao Prof. Dr. **Alexandre José da Silva Góes**, um grande amigo, por não medir esforços em transmitir conhecimento e oferecer sua ajuda e conselhos.

Ao grande amigo **Gibson Gomes de Oliveira**, amigo de longas datas e de muitos caminhos percorridos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela ajuda financeira.

À **Companhia Pernambucana de Meio Ambiente** pelo acesso à Estação Ecológica de Caetés.

À gestora da Estação Ecológica de Caetés, a Sra. **Sandra Cavalcanti** e a **todos os funcionários** pelo acolhimento e amizade.

Aos membros da **Companhia Independente de Meio Ambiente,** pela segurança nas coletas, principalmente ao soldado **Benjamim**, que conhece a mata da ESEC-Caetés como ninguém e que sempre nos ajudou e transmitiu conhecimento.

Tomai meu jugo sobre vós e aprendei de mim,
que sou de coração humilde e manso!
(Mt. 11, 29)

RESUMO

O uso de cogumelos para fins medicinais é muito antigo, onde o basidiomiceto *Ganoderma lucidum* tem posição de destaque no Japão e na tradicional medicina chinesa, sendo relatadas atividades antitumorais, antivirais, antibacteriana, dentre outras. Várias espécies com superfície lacada são confundidas com *G. lucidum*, entre elas *Ganoderma parvulum* Murrill, uma espécie tropical que pode representar potencial econômico, respeitando-se a biodiversidade local. O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana, concentração inibitória mínima (CIM) e a atividade citotóxica dos extratos metanólico e em acetato de etila de *G. parvulum*, a atividade antibacteriana e a CIM do óleo essencial, bem como fornecer dados para caracterização da droga fúngica. Para os extratos estudados, tanto a atividade antibacteriana como citotóxica foram observadas apenas para o extrato em acetato de etila. A atividade antibacteriana foi considerada moderada frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*. A atividade citotóxica em dose única de 50 µg/ml de extrato foi de 71,94 ± 2,04% contra a linhagem de células HT-29 e 90,02 ± 2,17% contra a linhagem de células HEp-2. O óleo essencial teve atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), contudo bactérias gram-positivas foram mais susceptíveis ao óleo essencial. Quanto à prospecção micoquímica, os compostos majoritários foram representados pelos esteróides e terpenóides, apresentando também flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos. A composição do óleo essencial foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-MS), onde os principais compostos foram o ácido benzóico, o sesquiterpeno aristolona mono-oxigenado, o 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol e o N-(2-hidroxi-4-oxo-4H-quinazolina-3-il)-benzamida. A morfoanatomia foi considerada fundamental para a identificação de *G. parvulum*, onde características como o tamanho do basidioma, tamanho do basidiósporo, o sistema hifálico, a coloração do contexto e linhas de deposição de material resinoso, foram características essenciais para distinção de *G. parvulum*. O tamanho das partículas do pó indicou se tratar de um pó moderadamente espesso por simples agregação das partículas, o teor de cinzas totais foi de 1,67 ± 0,14% e a perda por dessecação foi de 13% ± 0,07, dentro dos níveis encontrados para o gênero. Na análise microscópica do pó, a observação de hifas esqueléticas e de esporos de parede dupla e truncados, característicos do gênero, foram importantes para a identificação da droga. Os dados sobre teor de cinzas, perda por dessecação, análise granulométrica e microscópica do pó são inéditos para *G. parvulum*, bem como as atividades biológicas dos extratos estudados e do óleo essencial.

Palavras-chave: *Ganoderma.* Antimicrobiano. Citotoxicidade. Morfologia. Química.

ABSTRACT

The use of mushrooms for medicinal purposes is very old, where the basidiomycete *Ganoderma lucidum* has prominent position in Japan and traditional Chinese medicine, being reported antitumor activity, antiviral, antibacterial , among others. Several species with lacquered surface are confused with *G. lucidum*, including *Ganoderma parvulum* Murrill, a tropical species that can represent economic potential. This study aimed to evaluate the antibacterial activity and cytotoxic activity of methanolic and ethyl acetate extracts of *G. parvulum*, the MIC and antibacterial activity of the essential oil, as well provide data for characterization of fungal drug. For the studied extracts, both cytotoxic and antibacterial activity were observed only for the extract in ethyl acetate. The antibacterial activity was considered moderate against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. The cytotoxic activity of a single dose of 50 mg/mL of extract was 71.94 ± 2.04% against the HT- 29 cell line and 90.02 ± 2.17 % against the HEp – 2 cell line . The essential oil has antimicrobial activity against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* , *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*) and gram -negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*), gram-positive bacteria however have been more susceptible to essential oil. As for prospecting micoquímica, the compounds were represented by steroids and terpenoids, flavonoids, cinnamic derivatives and phenylpropaneglycosides. The essential oil composition was analyzed by gas chromatography- mass spectroscopy (GC -MS), where the main compounds were benzoic acid, mono- oxygenated sesquiterpene aristolona , 2,6-bis (1,1- dimethylethyl) -4-methylphenol and N-(2 -hydroxy-4 -oxo-4H -quinazoline-3-yl) -benzamide . The morphoanatomy was considered fundamental for the identification of *G. parvulum* where characteristics as the size of basidiomata , basidiósporo size of the hiphal system, the color of the background and lines deposition of resinous material were essential for distinguishing characteristics of *G. parvulum* . The particle size of the powder showed it is a moderately thick powder by simple aggregation of particles, the total ash content was 1.67 % ± 0.14 and the loss on drying was 13% ± 0.07 within the levels found for the genre. On the microscopic dust, watching skeletal hyphae and spores double wall and truncated , characteristic of the genus, were important for the identification of the drug. Data on ash, loss on drying, particle size analysis and microscopic dust are new to *G. parvulum* as well as the biological activities of the studied extracts and essential oil.

Keywords: *Ganoderma*. Antimicrobial. Cytotoxicity. Morphology. Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	*Ganoderma lucidum*	29
Figura 2	*Ganoderma adspersum*	33
Figura 3	*Ganoderma applanatum*	33
Figura 4	*Ganoderma australe*	33
Figura 5	*Ganoderma capense*	34
Figura 6	*Ganoderma colossum*	34
Figura 7	*Ganoderma concinnum*	34
Figura 8	*Ganoderma formosanum*	35
Figura 9	*Ganoderma fornicatum*	35
Figura 10	*Ganoderma gibbosum*	35
Figura 11	*Ganoderma microsporum*	36
Figura 12	*Ganoderma pfeifferi*	36
Figura 13	*Ganoderma sinense*	36
Figura 14	*Ganoderma tsugae*	37
Figura 15	Ganomicina A (1) e ganomicina B (2)	37
Figura 16	Ácido ganodérico B	38
Figura 17	Ácido lucidênico N	39
Figura 18	5α-ergosta-7en-3β-ol	39
Figura 19	Padrão de glucanas encontradas em *Ganoderma*: β-D-Glc*p*-(1→3), com substituição em O-6 por unidades de β-D-Glc*p*-(1→6) a cada 3 a 30 unidades, dependendo da glucana	41
Figura 20	Ganoderma Alcalóide A e Ganoderma Alcalóide B, alcalóides pirrólicos Isolados de *G. capense*	42
Figura 21	Sinesina A	42
Figura 22	*Ganoderma parvulum* Murrill	43
Figura 23	Vista aérea da ESEC – Caetés	58
Figura 24	Cromatograma revelado para alcalóides	73
Figura 25	Cromatograma revelado para Monoterpenos, Diterpenos e sesquiterpenos	74

Figura 26	Cromatograma revelado para Esteróides e triterpenos visualizado sob luz UV (365nm)	74
Figura 27	Cromatograma revelado para Flavonóides	75
Figura 28	Cromatograma da partição em acetona-água 3:1 do extrato metanólica	76
Figura 29	Cromatograma da substância purificada por CCD preparativa	77
Figura 30	Os espectros de massa dos compostos encontrados no óleo essencial de Ganoderma parvulum Murrill	79
Figura 31	Morfologia de *G. parvulum* - SH: Superfícies himenial; AS: superfície abhimenial	80
Figura 32	Contexto homogêneo de *G. parvulum*	81
Figura 33	Basidiósporos ornamentado, de parede dupla, elipsóide, medindo menos que 10 µm	81
Figura 34	Hifas clavadas da crustahimenideme	82
Figura 35	Tipos de hifas contextuais de *G. parvulum* - A: hifa generativa evidenciando-se os grampos de conexão, B: Hifa esquelétea evidenciando-se uma bifurcação característica	83
Figura 36	Distribuição granulométrica do pó de *G. parvulum*	84
Figura 37	Elementos relevantes observados na análise microscópica do pó de *Ganoderma parvulum* Murrill.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ação de *Ganoderma* sobre diferentes sistemas orgânicos	30
Quadro 2	Exemplos de atividades biológicas de espécies de *Ganoderma*	31
Quadro 3	Alguns critérios gerais de toxicidade comuns para linhagens celulares em cultura	54
Quadro 4	Condições cromatográficas para o screening micoquímico	61
Quadro 5	Microrganismos ensaiados para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólico e em acetato de etila	66
Quadro 6	Microrganismos ensaiados para avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ganoderma parvulum*	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Screening Micoquímico por CCD dos extratos metanóico e em acetato de etila de *Ganoderma parvulum*	72
Tabela 2	Composição do oleo Essencial de *Ganoderma parvulum* por CG-EM	78
Tabela 3	Actividade antibacteriana e concentração inibitória mínima (CIM) do extracto de acetato de etilo de *G. parvulum* Murrill	86
Tabela 4	Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ganoderma parvulum*	88
Tabela 5	Porcentagem de inibição do crescimento das células (CI%) das duas linhagens de células tumorais testadas numa dose única (50 µg / mL) de extratos metanólico e em acetate de etila de *Ganoderma parvulum* Murrill	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

µL – Microlitro

AcOEt – Acetato de etila

AcOH – Ácido acético

AIDS – Imunodeficiência adquirida

$CHCl_3$ - Clorofórmio

CIM – Concentração inibitória mínima

cm – Centímetros

CPRH – Sigla da Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos

diâm. – Diâmetro

DNA – Ácido dexoxirribonucléico

EAcOEt – Extrato em acetato de etila de *Ganoderma parvulum*

EMeOH – Extrato metanólico de *Ganoderma parvulum*

ESEC-Caetés – Estação Ecológica de Caetés

h – Hora

HCOOH – Ácido fórmico

HeLa – Linhagem de células tumorais isoladas de tumor de cólon uterino

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

HL-60 – Células da leucemia promielótica humana

L – Litro

MeOH – Metanol

mL – Mililitro

mm – Milímetro

p/p – peso/peso

ºC - Graus Celsius

RNA – Ácido ribonucléico

UFC – Unidade formadora de colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UV – Radiação ultravioleta

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 JUSTIFICATIVA 23

3 OBJETIVOS 25

3.1 Geral 25

3.2 Específico 25

4. REVISÃO DA LITERATURA 28

4.1 Genero *Ganoderma* P. Karst 28

4.1.1 Classificação 28

4.1.2 Importância do Gênero *Ganoderma* 29

4.1.2.1 *Espécies Medicinais de Ganoderma e Atividade Biológica* 30

4.1.2.2 *Compostos Isolados de Fungos do Gênero Ganoderma* 37

4.1.3 *Ganoderma parvulum* 42

4.2 Óleos Essenciais 44

4.2.1 Obtenção de Óleos Essenciais 45

4.2.2 Composição dos Óleos Essenciais 46

4.2.3 Análise de Óleos Essenciais 47

4.2.4 Atividades Biológicas de Óleos Essenciais 48

4.3 Atividade Antimicrobiana 49

4.3.1 Estratégias para Obtenção de Produtos Naturais com Atividade Antimicrobiana 50

4.3.1.1 *Métodos de Difusão* 51

4.3.1.1 *Método de Diluição* 52

4.4 Atividade Citotóxica *In Vitro* 53

4.4.1 Principais Classes de Ensaios de Citotoxicidade 53

5 MATERIAL E MÉTODOS 57

5.1 Coleta, Preservação e Identificação de *Ganoderma parvulum* 57

5.1.1 Local das Coletas 57

5.1.2 Metodologia das Coletas 58

5.2 Preparação dos Extratos e Abordagem Micoquímica 59

5.2.1 Drogas, Reagentes, Materiais e Equipamentos 59
5.2.2 Preparação dos Extratos 61
5.2.3 Abordagem Micoquímica 61
5.2.4 Cromatografia em Coluna Aberta em Gel de Sílica do Extrato em Acetato de Etila 62
5.3 Extração e Caracterização do Óleo Essencial de *G. parvulum* 63
5.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG/EM) do Óleo Essencial de *G. parvulum* 63
5.4 Estudos Morfoanatômicos de *G. parvulum* 64
5.5 Estudos Físicos do Pó de *G. parvulum* 64
5.5.1 Perda por Dessecação 64
5.5.2 Cinzas Totais 65
5.5.3 Granulometria do Pó de *G. parvulum* 65
5.5.4 Análise Microscópica do Pó 65
5.6 Avaliação das Atividades Biológicas 66
5.6.1 Atividade Antibactriana dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila de *G. parvulum* 66
5.6.1.1 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila* 67
5.6.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana do Óleo Essencial de *G. parvulum* 68
5.6.2.1 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Óleo Essêncial* 69
5.7 Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila 70
5.8 Análise Estatística 70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 72
6.1 Abordagem Micoquímica de *Ganoderma parvulum* 72
6.1.1 Separação em Coluna de Gel de Sílica do Extrato em Acetato de Etila 76
6.2 Extração e Caracterização do Óleo Essencial de *Ganoderma*

parvulum 77
6.3 Estudos Morfoanatômicos de *G. parvulum* 80
6.4 Estudos Físicos do Pó de *G. Parvulum* 83
6.4.1 Perda por Dessecação 83
6.4.2 Cinzas Totais 84
6.4.3 Análise Granulométrica do Pó de *G. parvulum* 84
6.4.4 Análise Microscópica do Pó 85
6.5 Avaliação das Atividades Biológicas 86
6.5.1 Atividade Antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Metanólicos e em Acetato de Etila 86
6.5.2 Atividade Antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Óleo Essencial de *G. parvulum* 87
6.6 Atividade Citotóxica do Extrato Metanólico e em Acetato de Etila de *Ganoderma parvulum* 88
7 CONCLUSÕES 91
REFERÊNCIAS 93
Apêndice 1 – Artigo publicado 110

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Plantas, organismos marinhos e microrganismos produzem um grande arsenal estrutural de substâncias químicas, possuindo grande potencial biológico (PETSKO, 1996). Dentre os microrganismos, os fungos apresentam um potencial pouco explorado, pois, estima-se a existência de cerca de 1.500.000 espécies de fungos, sendo que pouco mais de 98.998 foram descritas, o que corresponde a 6,6% do total de espécies e dessas, apenas um número muito reduzido vem sendo cultivado e estudado. (HAWKSWORTH, 2001; KIRK et al., 2008)

Inicialmente, o interesse acerca dos fungos, deu-se pelos fungos macroscópicos, principalmente pelo aspecto etnomedicinal. Esses fungos apresentam estruturas macroscópicas e são tratados indistintamente por cogumelos. Uma das melhores definições para cogumelos é apresentada por Miles e Chang (1997), como sendo “um corpo de frutificação distinto, que pode ser hipógeo ou epígeo, grande o suficiente para ser visto a olho nú e ser pego com a mão”. Vários grupos de fungos formam cogumelos, principalmente Basidiomycetes e Ascomycetes, tendo vários representantes usados tradicionalmente na medicina de países asiáticos e, nas últimas décadas, no ocidente (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005).

Das propriedades apresentadas pelos fungos basidiomicetos, destacam-se: as alimentares e nutraceuticas (CHANG; BUSWELL, 1996; LIN; LIN, 1997; RUBEL, 2006; FAN et al., 2006), antitumorais (MIZUNO et al., 1990; GORO, 1992; RODRIGUES et al., 2003; RUBEL, 2006; POUCHERET; FONS; RAPIOR , 2006, FAN et al., 2006), antimicrobiana (IMITIAJ; LEE, 2007; POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006) celulolíticas (BUSWELL, et al., 1996; CORREIA et al., 1998; PEREIRA-JR; CORREIA; OLIVEIRA, 2001;), antiviral (FAN et al., 2006), potencial para controle de doenças de plantas causadas por microrganismos (KOBAYASHI; HIRAMATSU; AKATSUKA, 1997; DI PIERO; PASCHOLATI, 2004), dentre outras.

Há três décadas, as pesquisas sobre compostos ativos produzidos por cogumelos, em particular polissacarídeos ou peptidioglicanos com atividade antitumoral, eram concentradas em quatro espécies: *Lentinula edodes*, *Schizophylum communae*, *Grifola frondosa* e *Sclerotina scleotiorum*. Já nos primeiros anos do século XXI, já se

havia estudado no mínimo 651 espécies, em 182 gêneros de basidiomicetos contendo polissacarídeos com atividade antitumoral e imunoestimuladora (FAN et al., 2006). Além dos polissacarídeos, outros compostos vêm sendo estudados quanto à atividade antitumoral, como por exemplo: compostos triterpênicos (CHEN et al., 2007; RUBEL, 2006; SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002), lectinas (RUBEL, 2006;) e proteínas, como a Ling Zhi-8 (RUBEL, 2006).

A experiência no uso etnomedicinal de cogumelos, a necessidade ecológica para que os fungos produzam metabólitos secundários bioativos e as possibilidades de melhoria para a genética, análises químicas e farmacológicas, é suposto que os cogumelos tenham um grande potencial a ser investigado por bioprospecção (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005), sendo os fungos Polyporales considerados por muitos autores como uma das principais fontes de produtos naturais farmacologicamente ativos (ZJAWIONY, 2004).

Os cogumelos de macrofungos pertencentes ao gênero *Ganoderma* P. Karst. (Ganodermataceae, Polyporales), podem ser considerados os que apresentam registros mais antigos para uso medicinal, sendo usados por asiáticos, principalmente pelos chineses, há mais de 2000 anos (CHANG; BUSWELL, 1996). Wang et al. (2012) relatam a importância etnofarmacológica para o *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst., a espécie mais representativa do gênero, tais como: tratamento de hepatopatias crônicas, hipertensão, hiperglicemia e câncer. *G. lucidum* apresenta várias atividades comprovadas, tais como: antiinflamatória, antitumoral, anti HIV, antibacteriana, antiparasitária, regulação da pressão arterial, antidiabetes, imunomoduladora, tônico renal, função hepatoprotetora, tônico nervoso, dentre outras (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002).

A taxonomia de *G. lucidum* e espécies afins sempre foi controversa, principalmente as espécies que apresentam superfície lacada, sendo a espécie tipo originária da Europa, diferindo filogeneticamente, por características morfológicas e moleculares, de exemplares chineses e de outras localidades asiáticas (MONCALVO; WANG; HSEV., 1995; WANG et al., 2009), sendo que muitos trabalhos e patentes usaram outras espécies como sendo *G. lucidum* (MONCALVO, 2005; WASSER, 2010).

Dentre os fungos pertencentes ao complexo *G. lucidum, Ganoderma parvulum* Murrill é uma espécie neotropical (RYVARDEN, 2000), com registros para região Nordeste Brasileira nos Estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco (GIBERTONE, 2004). Independentemente das divergências taxonômicas, é importante observar que esse fungo, apresenta várias características fenotípicas semelhantes a *G. lucidum*, podendo apresentar potencial farmacológico, consequentemente econômico e como é uma espécie nativa da região, não interferirá na biodiversidade local.

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas a quantidade de trabalhos sobre a atividade biológica de fungos Polyporales vem crescendo no Brasil, porém as espécies nativas ainda são pouco estudadas para este fim e muito menos para a identificação de princípios ativos.

Segundo Gibertoni e Cavalcanti (2000), os fungos deste grupo são pouco estudados em relação à mata atlântica, mesmo sendo os principais decompositores na maioria dos ecossistemas florestais. Com base nisso, estudo de atividade biológica pode despertar um interesse maior nesses macromicetos e o potencial econômico de drogas fúngicas incrementará a necessidade de preservação dos ecossistemas florestais como fonte de recursos para humanidade.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a atividade biológica de extratos e do óleo essencial de *Ganoderma parvulum* Murrill, coletado num remanescente de mata da região metropolitana do Recife e realizou estudos farmacognósticos do mesmo, visando suprir a carência de trabalhos sobre a espécie, fornecendo dados importantes sobre sua atividade biológica, composição química e caracterização como droga fúngica.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O intuito principal deste trabalho foi colaborar na produção de dados acerca de *Ganoderma parvulum* Murrill, uma espécie pouco estudada, mesmo sendo pertencente ao gênero do cogumelo medicinal mais importante e mais estudado do mundo, que é *Ganoderma lucidum*.

3.1 Geral

O presente trabalho objetivou investigar a atividade biológica de extratos de *Ganoderma parvulum* Murril coletado em um remanescente de mata atlântica da região metropolitana do Recife, quanto à atividade citotóxica e atividade antimicrobiana, bem como avaliar a atividade antimicrobiana de seu óleo essencial e a realização de estudos farmacognósticos.

3.2 Específicos

- Investigar a atividade antibacteriana dos extratos e do óleo essencial frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas;

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos em acetato de etila, do extrato metanólico e do óleo essencial frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas.

- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos frente às linhages HEp-2 (carcinoma epidermóide da laringe humana) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano);

- Realizar a prospecção micoquímica dos extratos;

- Realizar a prospecção micoquímica do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-EM);

- Proceder estudos morfo-anatômicos de *Ganoderma parvulum*, bem como do pó obtido a partir do mesmo.

- Enumerar elementos para identificação da droga fúngica;

- Avaliar o teor de cinzas totais

- Relatar a perda por dessecação

- Determinar a granulometria do pó.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4 REVISÃO DA LITERATURA

Pela escassez de trabalhos sobre a espécie em estudo, principalmente sobre sua atividade biológica e aspectos farmacognósticos, foram realizados levantamentos na literatura sobre espécies afins, até mesmo para fins comparativos.

4.1 Gênero *Ganoderma* P. Karst.

Ganoderma P. Karst. é um gênero de distribuição cosmopolita, com muitas espécies tropicais e algumas restritas à regiões temperadas (TORRES-TORRES ; GUZMÁN-DÁVALOS, 2012). O gênero foi estabelecido por Karsten em, 1881, quando o mesmo realizou um rearranjo de fungos da família Polyporaceae da Finlândia, baseado no caráter lacado do píleo e do estipe, incluindo apenas *Polyporus lucidus* (MURRILL, 1902). Segundo o mesmo autor, Karsten, em 1889, caracterizou *Ganoderma lucidum*, a espécie tipo do gênero, tendo como características principais a ausência de cistídios, basidiósporos ovais ou elípticos, verrucosos e de coloração castanho-amarelado. Donk, em 1948, tomando como base as características do basidiósporo estabeleceu a família Ganodermataceae, tendo *Ganoderma* como gênero tipo (GOTTLIEB; WRIGTH, 1999; KIRK et al., 2008).

4.1.1 Classificação

Kirk et al. (2008) enquadram o gênero *Ganoderma* da seguinte forma:

Reino: Fungi
Filo: Basidiomycota
Subfilo:Agaricomycotina
Classe: Agaricomycetes
Ordem: Polyporales
Família: Ganodermataceae
Gênero: *Ganoderma*

4.1.2 Importância do Gênero *Ganoderma*

O gênero *Ganoderma* é representado por espécies que vêm sendo usadas devido a inúmeras aplicações, como por exemplo, propriedades medicinais, ecológicas, biotecnológicas, dentre outras.

No gênero *Ganoderma, G. lucidum* (Figura 1) é um cogumelo considerado medicinal, conhecido no Japão como “Rei-shi“ ou “Mannentake”, e na China como “Lingzhi”. Seus basidiomas têm sido usados na medicina tradicional chinesa há mais de 2.000 anos. Como exemplo, uso deste cogumelo como tônico e como agente antienvelhecimento, é descrito em detalhes no compêndio clássico da medicina tradicional chinesa Shen Nung Ben Cao Jin, datado de 206 a. C. à 8 d. C. (KASHIMOTO et al., 2010). Como não são considerados comestíveis, devido a sua textura e sabor, várias éspecies do gênero são usadas na forma de decoctos, concentrados, licores ou em pó, usados em tônicos, tinturas, chás, sopas e fórmulas à base de plantas (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002).

Figura 1 – *Ganoderma lucidum*. Fonte: <http://complementaryoncology.com>. Acesso em: 10 mar. 2013.

São causadores de podridão branca (são importantes degradadores de lignina e celulose), pois a lignina é utilizada pelo fungo como fonte de alimento, deixando a celulose de tonalidade branca. Por serem ligno-celulolíticos, podem ser saprófitas ou parasitas, onde, na medida em que a lignina é consumida, o fungo enfraquece a árvore e quando ocorre o surgimento dos basidiomas, todo o sistema vascular do hospedeiro encontra-se comprometido (RUSSOMANO et al., 2012).

4.1.2.1 *Espécies Medicinais de Ganoderma e Atividade Biológica*

O uso medicinal de espécies de *Ganoderma* é muito antigo e tão representativo na Ásia que são tratados como divinas. Um exemplo é o termo ling zhi, que tem registro datado do século XI d.C., para designar *G. lucidum* na China, onde o termo Ling, significa “divino” e zhi, “força da vida” (LARIYA; RAJ; MALVIYA, 2009). Segundo os mesmos autores, o uso de *Ganoderma* para atividades, em diferentes sistemas orgânicos (Quadro 1), vem sendo registrado há muito tempo e com o status de milagroso.

Quadro1- Ação de *Ganoderma* sobre diferentes sistemas orgânicos

Sistema	**Atividade de *Ganoderma***
Sistema nervoso central	Ação contra insônia, mal estar mental, neurastenia, amnésia, sequela de concussão cerebral, hemorragia.
Sistema sensorial	Ação contra Astigmatismo, presbiopia, catarata, glaucoma, hiperemia da retina, empiema, perda auditiva, otite média, dor de dente, estomatite, espinhas, manchas na pele, erupções cutâneas.
Sistema respiratório	Ação contra traqueobronquite, asma alérgica, pneumonia, tuberculose.
Sistema circulatório	Atua contra palpitações, hipertensão, hipotensão, anemia, infarto do miocárdio, arteriosclerose, sequela de hemorragia cerebral, insuficiência cardíaca.

Sistema	Atividade de *Ganoderma*
Sistema digestório	Atua contra falta de apetite, indigestão, diarréia, constipação, cólicas, gastrite, úlcera gástrica, hiperacidez gástrica, enterite, enterite ulcerativa, câncer do aparelho digestório.

Adaptado de Lariya; Raj; Malviya, (2009)

Com base na etnomicologia, espécies de *Ganoderma* vêm sendo estudadas buscando-se comprovar atividades biológicas relatadas e ratificar o valor medicinal das mesmas. Várias atividades biológicas já foram comprovadas para diferentes espécies, principalmente nas últimas três décadas (Quadro 2), inclusive gerando produtos comerciais (droga ou suplemento dietético), como exemplo, produtos manufaturados a partir de *G. lucidum* consumidos na Ásia, Europa e América do Norte (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002).

Quadro 2 - Exemplos de atividades biológicas de espécies de *Ganoderma*

Espécie	Atividade comprovada	Referência
G. adspersum (Figura 2)	citotóxica contra células cancerígenas	Sadava et al. (2009)
G. applanatum (Figura 3)	Antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, antitumoral, imunomodulador, anti-diabetes	Smania et al. (2003); Jung et al. (2005), Fan et al (2006); Poucheret et al (2006); Jeong et al. (2008); Ma et al (2011).
G. australe (Figra 4)	Citostática, citotóxica contra células cancerígenas,	Fan et al. (2006); Sadava et al. (2009);
G. capense (Figura 5)	citotóxica contra células cancerígenas, imunomodulador	Lin e Zhang (2004); Sadava et al. (2009).
G. colossum (Figura 6**)**	Anti-HIV	El Dine et al. (2009)
G. concinnum (Figura 7)	Citostática	Fan et al. (2006);

Espécie	Atividade comprovada	Referência
G. formosanum (Figura 8)	citotóxica contra células cancerígenas, estimulo à produção de macrófagos,	Sadava et al. (2009); Wang et al. (2012)
G. fornicatum (Figura 9)	citotóxica Contra células cancerígenas	Niu et al (2006); Sadava et al. (2009)
G. gibbosum (Figura 10)	citotóxica contra células cancerígenas	Sadava et al. (2009)
G. lucidum (Figura 1)	Antibacteriana, antiviral, anti-histamínico, anti-androgênica, anti-diabetes, antitumoral, antiinflamatória; citotóxica contra células cancerígenas, antioxidante, anti-fadiga, anti-HIV, imunomodulador, proteção contra efeitos indesejados da quimio e radioterapia, hepatoprotetor, antialérgico, antiangiogênico, anti-hérpético, antioxidante, antiulcerogênico,	Fan et al. (2006); Poucheret et al. (2006); Ko et al. (2007); Liu et al. (2009); Mohammed et al. (2009); Riahi et al. (2009), Sadava et al. (2009); Saltarelli et al. (2009); Sanodiya et al. (2009); Cheng et al. (2010); Wei et al. (2010).
G. microsporum (Figura11)	citotóxica contra células cancerígenas, indução de autofagia em células cacerígenas.	Sadava et al (2009); Hsin et al. (2011)
G. pfeifferi (Figura 12)	Antibacteriana, citotóxica contra células cancerígenas, antiviral	Niedermeyer et al. (2005); Fan et al (2006); Sadava et al. (2009).
G. sinense (Figura 13)	Anti-HIV, citotóxica Contra células cancerígenas	Sato et al. (2009); Liu et al. (2009)
G. tsugae (Figura 14)	Antiinflamatória, antioxidante	Tseng e Mau (2007), Ko et al. (2009).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – *Ganoderma adspersum.* Fonte: <http://mycologiemontgeron.free.fr>. Acesso em: 10 mar. 2013.

Figura 3 – *Ganoderma applanatum.* Fonte: <http://www.scmsfungi.org>. Acesso em: 15 de jul. 2013.

Figura 4 – *Ganoderma australe* Fonte:< http://eol.org/data_objects/23835789>. Acesso em: 15 jul. 2013.

Figura 5 – *Ganoderma capense.* Fonte: Brosle et al. (2010).

Figura 6 – *Ganoderma colossum.* Fonte: Elshafie et al. (2010).

Figura 7 – *Ganoderma concinnum.* Fonte: <http://sweetgum.nybg.org/webmedia.
php? irn122763> .Acesso em: 15 de jun 2013

Figura 8 – *G. formosanum* Fonte: Chang e Chen (1984)

Figura 9 – *Ganoderma fornicatum.* Fonte: < http://catalog.digitalarchives.tw/item/00/43/9b/74.html>. Acesso em: 13 jun. 2013.

Figura 10 – *Ganoderma gibbosum.* Fonte: <http://nishitan.jp/ryokuchi/2013/07/11253>. Acesso 20 jun. 2013

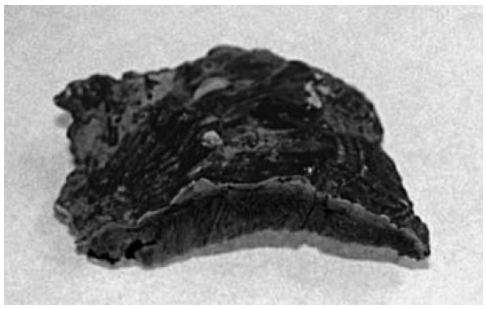


Figura 11 – *Ganoderma microsporum* **.** Fonte: Smith e Sivasithamparam (2003)

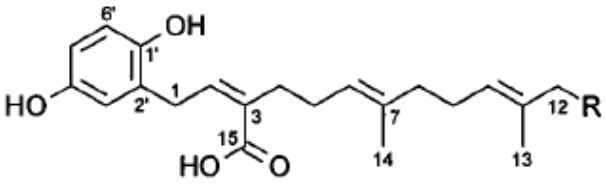
Figura 12 – *Ganoderma pfeifferi.* Fonte: <http://www.mycobank.org/ BioloMICS.aspx?nk= T&Targe tKey = 14682616000002126&R =ec=5579>. Acesso em: 20 jun. 2013

Figura 13 – *Ganoderma sinense.* Fonte: <http://mushroomobserver.org/ image/show_image/196004?obs=86569& =1PUez>. Acesso em: 20 jun. 2013

Figura 14 – *Ganoderma tsugae.* Fonte: <http://mushroomobserver.org/image/show_image/196004?=141199&q=1PUj9>. Acesso em: 20 jun. 2013

4.1.2.2 *Substâncias Purificadas a Partir de Fungos do Gênero Ganoderma*

Ganoderma são produtores prolíficos de novos micoquímicos, onde polissacarídeos e triterpenos são os compostos mais investigados, a partir de *G. lucidum* e espécies afins. No entanto, os esteróis, ácidos graxos , nucleotídeos, lectinas, proteínas e peptídeos também têm sido descritos (PATERSON, 2006; SANODIYA, 2009). Também foram isoladas moléculas menos comuns em *Ganoderma*, como por exemplo as ganomicinas A e B (Figura15), hidroquinonas farnesólicas isoladas de *G. pfeifferi* e *G. colossum*, que apresentam atividade antibacteriana e inibidora da protease do HIV-1 (MOTHANA et al., 2000; EL DINE, 2009). Essas moléculas não são comuns em fungos, sendo encontradas mais frequentemente em organismos marinhos (MOTHANA et al., 2000).



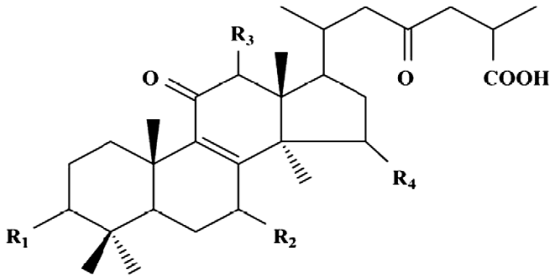
1: R = OH
2: R = H

Figura 15 - Ganomicina A (1) e ganomicina B (2). Fonte: Mothana et al. (2000)

As principais substâncias isoladas de fungos do gênero *Ganoderma* pertencem às seguintes classes de biomoléculas:

A) Triterpenos, Esteróides e Ácidos Graxos

Em relação aos terpenóides, tem-se dado ênfase ao estudo da atividade dos triterpenos e esteróides (PATERSON, 2006). Dentre os triterpenos, os lanostânicos representam os metabólitos secundários mais comuns em espécies de *Ganoderma*, onde somente em *G. lucidum* já foram isolados e identificados mais de 150 triterpenos (PATERSON, 2006; SATO et al., 2009; CHENG et al., 2010). Triterpenóides que foram isolados a partir de basidiomas são divididos em ácidos de *Ganoderma*, com um grupo carboxílico como cadeia lateral e álcoois de *Ganoderma*, com uma hidroxila como cadeia lateral (GAO et al., 2004). Dos Triterpenóides os ácidos ganodéricos são majoritários, perfazendo cerca de trinta compostos (CHEN, 2003) com atividade biológica comprovada, como o ácido ganodérico B (Figura 16), que apresenta atividade inibidora da protease do HIV-1, anti-hipertensiva e anti-histamínica (SMITH et al.,2002; PATERSON, 2006; SATO et al., 2009; LARIYA et al., 2009). Outro exemplo de triterpeno ácido é o ácido lucidênico N (Figura 17), isolado de *G. lucidum*, que tem atividade citotóxica contra células de linhagens tumorais humanas (WU; SHI; KUO, 2001). Dentre os esteróides, tem-se como exemplo o 5α-ergosta-7en-3β-ol (Figura 18), isolado do *G. applanatum* e do *G. annulare*, que tem atividade antimicrobiana frente a várias linhagens de bactérias gram-positivas e atividade antifúngica (SMÂNIA et al., 2003; ZJAWIONY, 2004).



R1= R2 = β-OH, R3= O

Figura 16 - Ácido ganodérico B. Fonte: Paterson (2006)

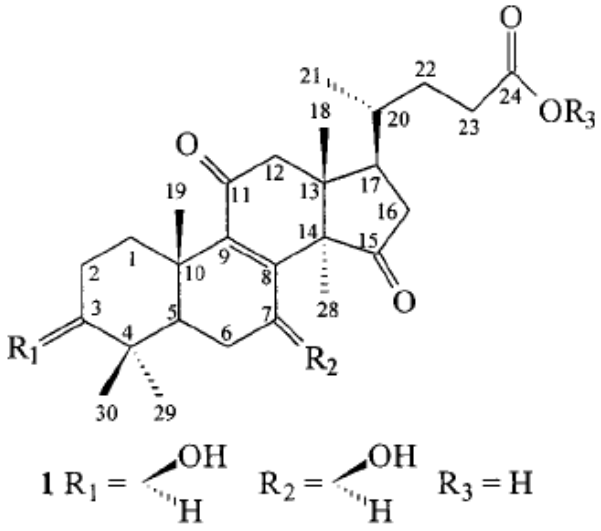


Figura 17 - Ácido lucidênico N. Fonte: Wu; Shi; Kuo (2001)

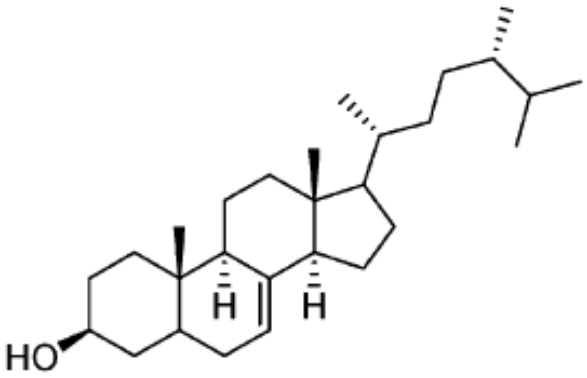


Figura 18 - 5α-ergosta-7en-3β-ol. Fonte: Smania et al. (2003)

Por serem lignocelulolíticos, teoricamente os fungos pertencentes ao gênero *Ganoderma*, são por excelência produtores de ácidos graxos insaturados. Isto é explicado por uma das vias de degradação da lignina, que utiliza a peroxidação de ácidos graxos insaturados, como é demonstrado por Enoki et al. (1999), que observaram a diminuição do ácido 9,12-octadienóico correlacionada com o aumento da concentração de hidroperóxido orgânico, no cultivo do fungo lignocelulolítico *Ceriporiopsis subvermispora*.

Os ácidos graxos mais comuns em *Ganoderma* são: ácido palmítico (ácido hexadecanóico), ácido esteárico (ácido octadecanóico), ácido oléico (ácido 9-octadecenóico) e o ácido linoléico (9,12-octadecadienóico), onde seus conteúdos não diferem significativamente entre *G. lucidum* e *G. sinense* (LV et al., 2012). Gao et al. (2011) isolaram, do extrato metanólico de esporos de *Ganoderma lucidum*, vários ácidos graxos saturados e insaturados: C14, C15, C-16, C-17, C-18, C-18 Δ^9, C-18 $\Delta^{6,9}$, C-19, C-19 Δ^9 e C-20. Destes, o ácido 9-nonadecenóico apresentou atividade antitumoral. Os ácidos graxos insaturados isolados de *G. lucidum*: ácido 9-Hexadecenóico, ácido 10-Heptadecenóico, ácido 9-octadecenóico e ácido 10-nonadecenóico, apresentaram maiores valores de inibição frente às células de leucemia promielocítica humana (HL-60), comparando-se com os valores apresentados pelos ácidos graxos saturados (FUKUZAWA et al., 2008).

B) Polissacarídeos, Peptídeoglicanos e Proteoglicanos

Polissacáridos como β-D-glucanas, heteropolissacarídeos e glicoproteínas foram isoladas e caracterizadas em diferentes espécies de *Ganoderma*, sendo considerados os principais agentes de atividade antitumoral e moduladores do sistema imunológico. β-D-glucanas (Figura 19) consistem de uma cadeia linear de β-(1→3)-D-glucopiranosil ligadas à grupos com diferentes graus de ramificação na posição C6 (SANODIYA et al., 2009). Os polissacarídeos que apresentam atividade antitumoral e imunomoduladora formam ligações β-(1→3) na cadeia central, com pontos de ramificação β-(1→6), onde o alto peso molecular torna a molécula de polissacarídeo mais eficiente (WASSER, 2002). Sone et al. (1985), isolaram polissacarídeos de *G. lucidum* que apresentavam uma cadeia central β-D-Glc*p*-(1→3), com substituição em C-6 por unidades β-D-Glc*p* ou pelo dissacarídeo 6-O- β-D-Glc*p*-β-D-Glc*p*, possuindo substituições em C-2 pelo dissacarídeo 4-O-β-D-Glc*p*-β-D-Glc*p.* Em países asiáticos, como China, Japão e Coréia, o uso de concentrados de polissacarídeos como nutracêutico vem crescendo, e com base em ensaios préclínicos, Gao et al.

(2003) realizaram um estudo para avaliar a atividade imunomoduladora de um extrato de polissacarídeos de *G. lucidum*, o Ganopoly®, em 34 pacientes com câncer em estágio avançado, concluíndo que o tratamento de 12 semanas, melhorou as respostas imunes pelos parâmetros avaliados. Nas duas últimas décadas, vários peptideoglicanos e proteoglicanos, vêm sendo avaliados quanto a atividade biológica. Yang et al (2006), concluíram que proteoglicanas isoladas de *G. lucidum* apresentaram atividade hepatoprotetora *in vivo* e *in vitro*. Uma outra atividade relacionada aos proteoglicanos de *G. lucidum* é a atividade antiherpética (LI et al, 2005).

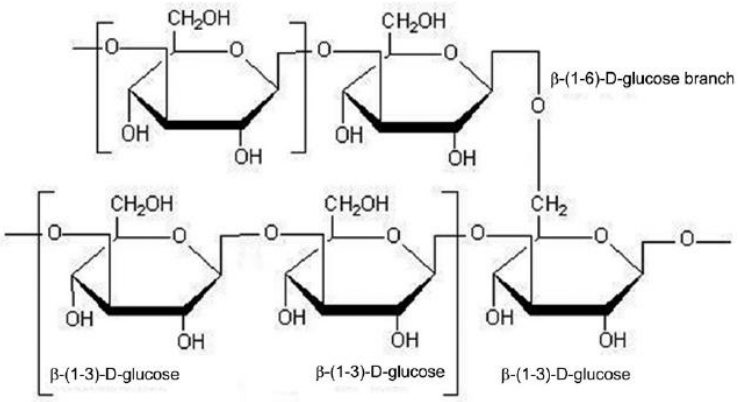


Figura 19 - Padrão de glucanas encontradas em *Ganoderma*: β-D-Glc*p*-(1→3), com substituição em O-6 por unidades de β-D-Glc*p*-(1→6) a cada 3 a 30 unidades, dependendo da glucana. Fonte: Rahar et al. (2011)

C) Alcalóides

Os primeiros alcalóides isolados de *Ganoderma* foram Ganoderma Alcalóide A (IA; 1-isopentil-2-formil-5-hidroximetilpirrol) e Ganoderma Alcalóide B (IB;1-feniletil-2-formil-5-hidroximetilpirrol) (Figura 20), isolados, em 1990, do micélio cultivado em batelada de *G. capense* (LIU et al., 2011). O isolamento e elucidação dos alcalóides IA e IB foram realizados por Yang e Yu (1990), que no mesmo trabalho demonstraram a obtenção dos dois alcalóides via síntese orgânica e a atividade antiinflamatória *in vivo*. Em 2010, foi isolado um novo alcalóide, Sinesina A (Figura 21) a partir de basidiomas de *G. sinense*, apresentando atividade protetora contra injúrias oxidativas em células endoteliais

de cordão umbilical humano (LIU et al., 2010). Posteriormente foram isolados quatro novos alcalóides, Sinesinas B, C, D e E a partir de basidiomas de *G. sinense*, porém não foram avaliados quanto à atividade biológica (LIU et al., 2011).

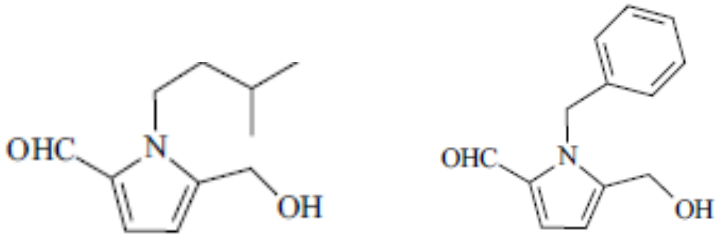


Figura 20 - Ganoderma Alcalóide A e Ganoderma Alcalóide B, alcalóides pirrólicos Isolados de *G. capense* Fonte: Yang e Yu (1990)

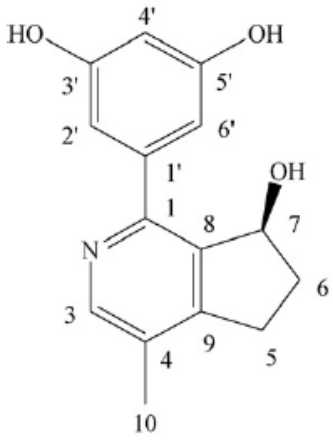


Figura 21 - Sinesina A Fonte: Liu *et al* (2010)

4.1.3 *Ganoderma parvulum*

O fungo objeto de estudo do presente trabalho, pertence à espécie *Ganoderma parvulum* Murrill (Figura 22**)**, que segundo Torres-Torres e Guzmán-Dávalos (2012), é uma espécie caracterizada por apresentar basidiomas pequenos e delgados, píleo revestido por uma crosta dura, faixas escuras de material resinoso contrastando com o contexto pálido, células da pileipele cilíndricas com granulações apicais e pequenas, basidiósporos com pilares livres. Muitos autores consideram a espécie como sinônimo de *Ganoderma stipitatum*,

porém, *G. parvulum* é prioritário em relação a *G. stipitatum* (TORRES-TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012).

Os trabalhos relacionados à composição e atividade biológica não são encontrados para *G. parvulum*, e raríssimos para *G. stipitatum*. Sharifi et al. (2012a), relatam na discussão do trabalho, que a fração enriquecida de sesquiterpenos de *G. stipitatum* apresentou atividade antibacteriana, porém esses dados não estão expostos em nenhuma parte dos resultados. Atividade antibacteriana é relatada para a fração rica em polissacarídeos de *G. stipitatum* (SHARIFI et al., 2012b). Arboleda et al. (2013) realizaram um ensaio para avaliar a eliminação do bisfenol A e do triclosano pelo sistema polienzimático de *G. stipitatum* (= *G. parvulum*). Os resultados foram promissores, chegando a valores de inibição superiores a 90%.

Além da pouca quantidade de trabalhos com *G. stipitatum*, outra preocupação tem que ser levada em conta: será que estes fungos considerados *G. stipitatum* realmente correspondem à espécie em questão? Muitos fungos considerados *G. stipitatum (= G. parvulum*), tratam-se de outras espécies, quando avaliados quanto ao tamanho do basidioma e dos basidiósporos. Um exemplo clássico é dado por Torres-Torres, Guzmán-Dávalos e Gugliotta (2012) que relatam o fato de Ryvarden (2004) citar *G. stipitatum* para Bolívia, Brasil, Costa Rica, Nicarágua, Peru, Suriname e Venezuela, mas muitos dos espécimes estudados apresentavam contexto marrom escuro e basidiósporos grandes, sendo na realidade outras espécies.

Figura 22 – *Ganoderma parvulum* Murrill. Fonte: acervo do autor.

4.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos e geralmente são menos densos que a água (BAKKALI et al., 2008). Os mesmos autores relatam que existe uma miscelânea de substâncias que os compõem, porém eles são caracterizados por dois ou três grandes componentes em concentrações bastante elevadas (20-70%) comparados com os outros componentes presentes em quantidades vestigiais. Economicamente são produtos naturais valiosos utilizados como matéria prima em muitas áreas, incluindo a indústria de perfumes, cosméticos, aromaterapia, fitoterapia, especiarias e nutrição (DAVID et al., 2012).

Tradicionalmente quando se fala em óleo essencial faz-se de imediato associação às plantas, porém muitos outros organismos são produtores. São definidos como compostos voláteis, naturais, com um forte odor, formados como metabólitos secundários (BAKKALI et al, 2008; GUIMARÃES; SOUSA; FERREIRA, 2010). Frequentemente apresentam composição diferente dependendo da natureza do organismo e da sazonalidade (BENDAOUD et al., 2009). Outro fator relacionado à composição é o estágio de maturidade do organismo, pois diferentes rotas e enzimas ativas em diferentes estágios de maturidade, resultam em diferentes composições de compostos voláteis (ZANG ; WU; LI, 2008).

O sucesso das plantas em produzirem óleos essenciais está relacionado com o modo de vida séssil, que termina por representar duas desvantagens principais: em primeiro lugar, as plantas não têm a opção de escapar de herbívoros, parasitas ou patógenos; em segundo, a interação com potenciais parceiros de acasalamento para a reprodução sexual em longas distâncias é muito difícil. Com os fungos não é diferente, pois, na natureza competem com diferentes microrganismos pelos mesmos substratos ou hábitats. No entanto, plantas e fungos desenvolveram estratégias eficazes para superar esses problemas, incluindo a incrível capacidade para produção de uma grande variedade de compostos orgânicos voláteis (STADNIK; BETTIOL; SAITO, 2003; JURGENS;

VILJOEN, 2010). Fungos produtores de odor ocorrem em todos os filos, mas o maior número concentra-se em Basidiomycota, principalmente nos basidiomas. Isto não é uma surpresa, pois fungos deste grupo possuem sistemas enzimáticos capazes de catabolizar substratos aromáticos (JONG; BIRMINGHAM,1993).

4.2.1 Obtenção de Óleos Essenciais

Para obtenção dos óleos essenciais existem várias técnicas, que levam em conta o tipo de material biológico, os órgãos, a quantidade produzida, para garantir a estabilidade do óleo. Hamid, Aiyelaagbe e Usman (2011), bem como Simões e Spitzer (2010) relatam as técnicas mais empregadas para obtenção de óleos essenciais, considerando as seguintes:

A) Hidrodestilação ou arraste por vapor de água: como os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, podem ser arrastados pelo vapor de água durante uma destilação. Quando em pequena escala o material acrescido de duas a três vezes o seu peso com água é aquecido, empregando-se o aparelho de Clenvenger. Após a obtenção, o óleo deve ser seco empregando-se sulfato de sódio anidro e armazenado a baixa temperatura, ao abrigo da luz e do ar.

B) Hidrodifusão: é um método em que o vapor a pressão atmosférica (<0-1 bar) atravessa o material a partir do topo da câmara de extração saturando o mesmo, resultando num óleo que retem o aroma original.

C) Enfloração (enfleurage): Este processo é aplicável às flores, que possuem baixo teor de óleo essencial de alto valor comercial. As pétalas são depositadas em bandejas a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura animal ou vegetal que irá adsorver o óleo essencial durante um período de tempo. Em seguida, as pétalas esgotadas são substituídas por novas até ocorrer a saturação da gordura, que é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura.

D) Extração com solventes orgânicos: Os óleos voláteis são extraídos com solventes apolares (éter etílico, éter de petróleo, benzeno, acetona, clorofórmio ou diclorometano) de acordo com o material, por exemplo, a extração a partir de folhas ou frutos podem ser realizadas com benzeno, com ou sem a adição de acetona ou éter, a temperatura ambiente ou na temperatura de ebulição, enquanto a extração a partir de flores é realizada com éter. Nesse processo, os solventes acabam extraindo outras substâncias apolares além dos óleos voláteis. O solvente é removido por evaporação sob pressão reduzida, sendo o material residual extraído com etanol absoluto, que é resfriado a baixas temperaturas para precipitação das ceras, sendo em seguida filtrado. O álcool, então é evaporado sob pressão reduzida e obtém-se o óleo essencial.

E) Extração por micro-ondas: Faz-se uso de micro-ondas para excitar as moléculas de água do material biológico, fazendo com que as células se rompam e liberem o óleo essencial. A técnica garante um bom rendimento e reduz o tempo de extração.

F) Extração por CO_2 super crítico: Nesta técnica o material é depositado num extrator onde ocorre a elevação da pressão e da temperatura, fazendo com que o dióxido de carbono atinja um quarto estado no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Quando a pressão é diminuída, o dióxido de carbono retorna para o estado gasoso, sem deixar nenhum resíduo.

4.2.2 Composição dos Óleos Essenciais

Os componentes dos óleos essenciais compreendem hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos cetonas, peróxidos, ésteres, fenóis, éteres, óxidos, lactonas, cumarinas, ácidos orgânicos (JONG; BIRMINGHAM,1993; BAKKALI et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2010). Os terpenos, que são formados a partir da condensação de unidades de cinco

carbonos, o isopreno (C5), são considerados como principais componentes, sendo os mesmos classificados em: monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), porém pode-se encontrar os hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e raramente tetraterpenos (C40) (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES; SPITZER, 2010). Os monoterpenos chegam a representar 90% da composição dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

4.2.3 Análise de Óleos Essenciais

Os objetivos de se analisar a composição de um óleo essencial, consistem em identificar e quantificar os seus constituintes, estabelecendo um padrão e possibilitando futuras avaliações para se detectar possíveis adulterações (HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011). A cromatografia gasosa (CG) é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos voláteis, pois apesar de sua precisão é um método considerado simples de usar (HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011; SIMÕES; SPITZER, 2010). O cromatógrafo vaporiza a amostra e em seguida separa e analisa os vários componentes, que produzem um pico espectral específico, com um também específico tempo de retenção, que é o tempo decorrido entre a injeção da amostra e a avaliação do pico (HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011).

Para se ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar o óleo por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM). Esse método além de separar os componentes, fornece um espectro de massas para cada pico, indicando a massa molecular e o padrão de fragmentação de cada um. O padrão de fragmentação pode ser comparado com os constantes na biblioteca de espectros de massas (SIMÕES; SPITZER, 2010).

4.2.4 Atividades Biológicas de Óleos Essenciais

São relatadas várias atividades biológicas e utilizações para óleos essenciais, desde aromaterapia, atividade antimicrobiana, antiviral até inseticida e moduladoras de apetite (BERNAS et al., 2006; HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011). A maior parte dessas atividades está relacionada aos mono e sequiterpenos, bem como fenilpropanóides (BAKKALI et al., 2008; ASTANI et al., 2011; HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011).

Uma das linhas de pesquisa investiga a atividade anticancerígena, analisando-se a atividade do óleo ou a de componentes isolados, como é o caso da atividade do geraniol como agente antiproliferativo contra células de câncer de cólon, por inibição da síntese de DNA. Óleos voláteis também interferem com as funções mitocondriais, adicionando efeitos pró-oxidantes (BAKKALI et al., 2008).

A ação antimicrobiana de óleos essenciais é bastante difundida, principalmente por registros atnofarmacológicos, pelo ouso como antisséptico e na preservação de alimentos (BAKKALI, 2008; HAMID; AIYELAAGBE; USMAN, 2011; DAVID et al., 2012). O óleo essencial de *Ganoderma japonico,* um fungo usado popularmente na China na forma de decócto para tratamento de infecções respiratória, inibiu *in vitro* o crescimento de isolados clínicos multirresistentes (LIU et al, 2009).

Além da sua atividade antibacteriana e antifúngica, os óleos essenciais também têm sido referidos por possuírem interessantes atividades antivirais, onde a atividade contra o vírus do herpes tipo I mostrou-se susceptível a sesquiterpenos e a fenilpropanóides, o que já é visto como futura alternativa aos medicamentos antivirais sintéticos (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER., 2011; HAMID et al., 2011).

As diferentes atividades biológicas dos óleos voláteis vêm atraindo interesse nas investigações químicas e farmacológicas para fins terapêuticos, o que, felizmente, levará a novas informações sobre aplicações e novas perspectiva sobre o uso potencial destes produtos naturais (DAVID et al., 2012).

4.3 Atividade Antimicrobiana

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). O conceito formal mais aceito por cientistas especializados define o antibiótico como uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. A definição formal exclui os compostos sintéticos, que, no entanto, juntamente com outros compostos naturais e seus derivados, são incluídos na categoria de “antimicrobianos”, que também pode ser subdividida segundo o tipo específico de microrganismo que deve ser inibido, como por exemplo antifúngicos, antibacterianos, entre outros (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER,1997).

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo a sua origem, efeito antimicrobiano, espectro de atividade e mecanismo de ação. Quanto à origem, os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Considerando-se o efeito dos antimicrobianos têm-se aqueles bacteriostáticos e aqueles bactericidas. De acordo com o seu espectro de ação os antimicrobianos são divididos em três categorias: amplo espectro, espectro intermediário e espectro reduzido. Por último, os antimicrobianos são classificados segundo o mecanismo de ação, sendo assim, eles agem inibindo a síntese da parede celular (os chamados β-lactâmicos), alterando a permeabilidade celular ou inibindo a síntese protéica (não β-lactâmicos) ou inibindo a síntese de DNA ou RNA (SILVA, 1999).

Nos últimos anos, a resistência de microorganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas (ROSA et al., 2003; NOVAIS et al., 2003; PACKER; LUZ, 2007). O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse tipo de estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância,

principalmente em um país como o Brasil, que oferece uma imensa biodiversidade (OSTROSKY et al., 2008)

4.3.1 Estratégias para Obtenção de Produtos Naturais com Atividade Antimicrobiana

O ponto de partida para a obtenção de produtos naturais, baseia-se na escolha de novas espécies produtoras por um dos seguintes caminhos (VERPOORTE, 1998; HARVEY, 2000; MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002):

i. Triagem de produtos naturais de fontes inexploradas, totalmente randômica, levando-se em conta apenas a disponibilidade, sem nenhum conhecimento prévio;
ii. Triagem filogenética ou quimiotaxonômica, correlacionando a presença de determinados grupos de biomoléculas numa família ou gênero;
iii. Abordagem etnofarmacológica, de acordo com o uso terapeutico por determinado grupo etnico, como por exemplo, Liu et al. (2009) observaram que em certas localidades na China, os moradores faziam uso de basidiomas de *G. japonicum* para o tratamento de infecções respiratórias e realizaram ensaios para avaliar essa atividade com o óleo essencial obtido a partir da biomassa micelial do fungo.
iv. Outro critério de seleção, que pode ser adotado para reduzir o número de organismos a ser triado, refere-se às observações ecológicas, como por exemplo, preparações inseticidas que são derivadas de plantas que não são atacadas por determinados insetos.

Após a obtenção do produto natural, faz-se necessário escolher um método adequado para avaliação da atividade antimicrobiana. Para isso são levados em conta aspectos como a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo (MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Os testes padrão para avaliação da atividade

antibacteriana estão classificados em métodos de diluição e difusão (NCUBE AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Testes de difusão incluem difusão em discos de papel, difusão em agar perfurado e bioautografia, enquanto os métodos de diluição incluem diluição em ágar, microdiluição em caldo e técnica de macrodiluição (OSTROSKY et al., 2008, NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

4.3.1.1 *Métodos de Difusão*

Os testes de difusão em ágar consistem em avaliar a susceptibilidade de microrganismos testados à concentrações de substâncias ou extratos potencialmente ativos, relacionando a zona de inibição com a concentração da substância ou dos extratos testados (OSTROSKY et al., 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

As variantes mais utilizadas do teste de difusão em ágar são:

A) Difusão em disco de papel: neste método, uma aliquota com concentração definida do extrato ou da substância a ser testada é transferida para um disco de papel de xarope esterilizado, com 6 mm de diâmetro. Após secar, o disco é transferido para superfície do meio de cultura já inoculado com o microrganismo numa concentração final de 10^8 U.F.C./mL. Em seguida, as placas ficam a temperatura ambiente na câmara de fluxo laminar ou refrigeradas a 4º C, por cerca de duas horas para que ocorra uma pré difusão e, então, a placa é íncubada em estufa a 37º C por 24 horas para bactérias (OSTROSKY et al., 2008, NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).
B) Difusão em poços: o princípio deste método é o mesmo da difusão em disco de papel, porém a substância testada ou o extrato é transferido diretamente para um poço de 6 mm de diâmetro perfurado na superfície do meio de cultura, sendo as placas incubadas a 37º C por 24 horas para

bactérias (OSTROSKY et al., 2008; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

C) Bioautografia: é uma variação do método de difusão em ágar, onde o analito é adsorvido em placas de cromatografia em camada delgada (CCD). A técnica é considerada de contato quando a placa de CCD, contendo os análitos, é posta em contato com o meio para que os mesmos sejam difundidos. Em seguida a placa é removida e o meio é incubado. A bioautografia por imersão consiste em cobrir a placa de CCD com o meio de cultura misturado ao inóculo, que após a solidificação do meio o material é incubado. Em qualquer uma das técnicas, os halos de inibição são evidenciados fazendo-se uso de colorações, como por exemplo sais de tetrazólio, como é o caso do brometo de tiazoil azul tetrazólio - MTT (NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

4.3.1.2 *Método de Diluição*

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al., 2008). O método de microdiluição é considerado potencialmente útil para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de grandes números de amostras. CIM, em microbiologia, é a menor concentração de agentes antimicrobianos que vai inibir o crescimento visível de microrganismos. Suas vantagens em relação às técnicas de difusão incluem a sensibilidade aumentada para pequenas quantidades de extrato, o que é importante se a substância ou extrato são escassos, como é o caso de muitos produtos naturais (OSTROSKY et al., 2008, NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

4.4 Atividade Citotóxica *In Vitro*

Citotoxicidade é capacidade de um composto para induzir a morte celular (EISENBRAND et al., 2002). Porém, para citotoxicidade *in vitro*, outros fatores além da morte celular podem ser levados em conta, tais como adesão celular, alterações morfológicas, alterações adversas a taxa de crescimento celular (NILES; MORAVEC; RISS, 2008; NILES; MORAVEC; RISS, 2009). Mesmo assim, métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, como por exemplo, o fato de poderem limitar o número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto (ROGERO et al., 2003). Sistemas *in vitro* são utilizados principalmente para fins de screening e para gerar perfis toxicológicos mais abrangentes. Eles têm, também, potencial para estudos de efeitos locais ou em tecidos alvo. Testes não animais, incluindo abordagens baseadas em análise computacional e em ensaios *in vitro*, fornecem ferramentas importantes para melhorar a extrapolação *in vitro* / *in vivo* em seres humanos (EISENBRAND et al., 2002).

4.4.1 Principais Classes de Ensaios de Citotoxicidade

Cerca de 20 métodos são usados para os ensaios de toxicidade, que são escolhidos dentre aqueles tradicionalmente utilizados em estudos de mecanismos referenciados em vários textos disponíveis na literatura sobre Toxicologia *in vitro*. A validade é geralmente estabelecida como resultado de uma utilização frequente em laboratório, seguido pela repetição e confirmação por outros. Finalmente, o método de avaliação, termina se estabelecendo mais como uma questão de conveniência para o laboratório, em particular se o ensaio pode ser facilmente encaixado na rotina das instalações do laboratório. Os métodos são necessariamente semelhantes: as células são expostas a diferentes concentrações da substância durante um período de tempo, após o qual o grau de inibição da viabilidade ou condição funcional é medida (BARILE, 1997;

EISENBRAND et al., 2002; NILES; MORAVEC; RISS, 2008; NILES; MORAVEC; RISS, 2009).

Barile (1997) faz um resumo dos principais critérios e dos métodos para avaliação da inibição ou injúria (Quadro 3), servindo de bases para a escolha de acordo com o mecanismo a ser avaliado.

Quadro 3 - Alguns critérios gerais de toxicidade comuns para linhagens celulares em cultura

Critério	**Método para determinação do grau de inibição ou injúria**
Morfologia celular	Análise histológica usando microscópio óptico; análise de ultra-estrutura por microscopia eletrônica de transmissão.
Crescimento celular	Contagem celular; freqüência mitótica usando-se análise cariotípica; síntese de ADN.
Divisão celular	Formação de clone.
Metabolismo celular	Cadeia glicolítica; incorporação de precursores marcados com isótopos como indicadores de macromoléculas sintetizadas; ensaios para proteínas específicas, hormônios e enzimas.
Coloração celular	Imunohistoquímica ou coloração citoquímica para proteínas, enzimas e carboidratos.
Membrana celular	Dispersão de marcadores isótopicos; dispersão de enzimas (lactato, desidrogenase-glucuronidase), formação de vesículas, a absorção de azul de tripan.
Mitocôndrias	Integridade mitocondrial, usando-se o ensaio do MTT.
Lisossomos	Método de coloração vital, usando-se o ensaio do vermelho neutro.
Ribossomos	Síntese de macromoléculas; indução ou inibição de enzimas

Fonte: Adaptado de Barile (1997)

O ensaio mais versátil é do MTT, onde o sal de tetrazólio, brometo de 3 -(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio (MTT), é ativamente absorvido nas células e reduzido numa reação mitocondrial dependente para se obter um produto formazano. O produto se acumula no interior da célula, uma vez que não pode passar através da membrana celular. Após adição de DMSO, isopropanol ou outro solvente apropriado, o produto é solubilizado e libertado sendo facilmente quantificado colorimetricamente. A capacidade das células para reduzirem o MTT

fornece uma indicação de integridade e atividade mitocondrial, que é interpretada como uma medida da viabilidade celular. O ensaio é adequado para uma variedade de linhagens celulares, sendo visualizados o crescimento exponencial em cultura e um relativamente elevado nível de atividade mitocondrial. Segundo protocolo usual, durante as duas horas finais de incubação com uma solução de MTT a 0,5% em meio de crescimento a 37º C, o meio mais MTT é então substituído por DMSO e agitado durante cinco minutos. As placas são lidas a 550 nm com um leitor de microplacas, contra uma referência não contendo células (BARILE, 1997; NILES; MORAVEC; RISS, 2008; NILES; MORAVEC; RISS, 2009).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

No desenvolvimento deste trabalho foram conduzidos experimentos para determinação da atividade antibacteriana dos extratos e do óleo essencial de *G. parvulum*, bem como, para avaliação da atividade citotóxica dos extratos. Foram realizados experimentos visando a caracterização farmacognóstica, analisando-se aspectos micoquímicos, físicos e características morfoanatômicas.

5.1 Coleta, Preservação e Identificação de *Ganoderma parvulum*

Os basidiomas foram coletados, preservados e identificados segundo a metodologia usual na taxonomia de fungos basidiomicetos.

5.1.1 Local das Coletas

As coletas foram realizadas numa área de remanescente de mata atlântica pertencente à Estação Ecológica de Caetés (ESEC-Caetés). Segundo Pernambuco (2006), a ESEC-Caetés (Fig. 23), localiza-se no Município do Paulista, integrante da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco, na região Nordeste do Brasil. Situa-se entre 7º55’15” e 7º56’30” de latitude Sul e 34º55’15” e 34º56’30” de longitude Oeste de Greenwich. Ocupa uma área de 157 hectares, correspondendo a 1,54% da área do município. Limita-se ao Sul com o Rio Paratibe; ao Leste com a antiga fábrica da Amorim Primo S.A.; ao Oeste com a Fazenda Seringal Velho e ao Norte com a PE-18, na divisa entre os municípios de Paulista e Abreu e Lima

Morfoclimaticamente, a ESEC-Caetés está sob o Domínio Tropical Atlântico, formada por planícies de inundação predominantemente meândricas e solos superpostos, fortíssima decomposição de rochas e intensa mamelonização. A região onde está localizada a ESEC – Caetés, sofre as mesmas influências climáticas e apresenta características semelhantes ao município do Recife,

localizado na região do Litoral, apresentando no decorrer do ano dois períodos de seis meses, um com frequentes e abundantes precipitações (de março a agosto) e outro de relativa estiagem (de setembro a fevereiro) (ANDRADE; SETTE, 1969; PERNAMBUCO, 2006).

Ainda segundo Pernambuco (2006), a vegetação caracteriza-se por ser uma formação exuberante, em que espécies arbóreas de porte mais elevado atingem alturas em torno dos 20 metros. O dossel reflete, na irregularidade com que se apresenta os sucessivos cortes dos indivíduos arbóreos de médio a alto porte. A rigor, não se pode destacar um estrato de emergentes, mesmo naqueles trechos em que a interferência humana se fez sentir com menor intensidade, estando a área classificada de acordo com o sistema adotado por Andrade Lima, entre as florestas megatérmicas pluviais perenifólias.

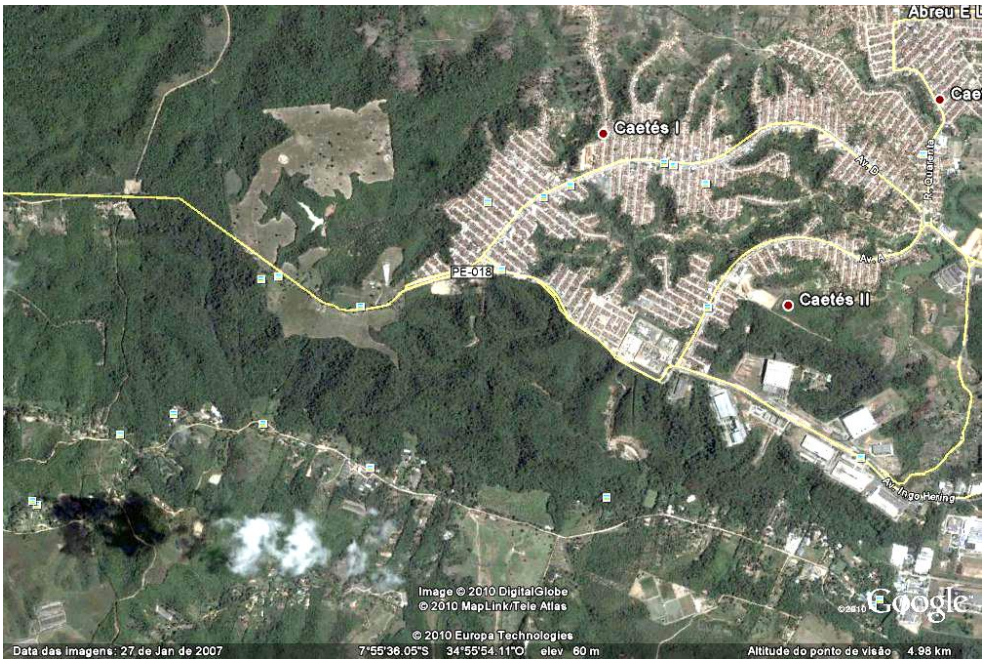


Figura 23 – Vista aérea da ESEC – Caetés Fonte: Google Earth, em 03/10/2010

5.1.2 Metodologia das Coletas

O procedimento de coleta seguiu o descrito por Gibertoni e Cavalcanti (2000) e Gibertoni (2004), onde, no campo, os espécimes foram coletados

manualmente com auxílio de faca e acondicionados em sacos de papel. No laboratório, foram feitas anotações relativas à cor das superfícies abhimenial e himenial, do contexto, dos tubos e da margem e anotações relativas à largura, altura e espessura do basidioma.

Os espécimes coletados apresentaram uma similaridade morfológica que levou a identificá-los como sendo *G. parvulum*. Para os estudos do presente trabalho visando a padronização dos resultados, foram usados espécimes coletados no mesmo dia e no mesmo ponto de coleta. Uma parte do material coletado foi preservada e herborizada segundo Fidalgo e Bononi (1989) e enviado para identificação no Herbário Padre Camille Torrand - URM do Departamento de Micologia da Universidade Federlal de Pernambuco, onde espécimes testemunhos estão depositados sob a numeração URM 83795, e o restante foi utilizado para obtenção dos extratos.

5.2 Preparação dos Extratos e Abordagem Micoquímica

Com base na literatura sobre estudos realizados no gênero, para a prospecção micoquímica e para avaliação das atividades biológicas, foram utilizados os extratos metanólicos e em acetato de etila.

5.2.1 Drogas, Reagentes, Materiais e Equipamentos

No presente trabalho foram usadas as seguintes drogas, reagentes, materiais e equipamentos:

- Acetato de etila P.A. (MERCK)
- Acetona P.A. (VETEC)
- Ácido acético P.A. (MERCK)
- Ácido clorídrico P.A. (MERCK)
- Ácido fórmico P.A. (MERCK)
- Ácido sulfúrico P.A. (MERCK)
- Anidrido acético P.A. (MERCK)

- Balança analítica Gehaka mod. BG 1000
- Benzeno P.A. (MERCK)
- Butanol P.A. (MERCK)
- Câmara de CO_2
- Câmara ultravioleta (250-365 nm) Crhomato Vue
- Câmera fotográfica Kodak mod. Easy Share Z915
- Clorofórmio P.A. (MERCK)
- Colunas cromatográficas
- Estufa bacteriológica Quimis
- Estufa Precision Thelco
- Éter P.A. (MERCK)
- Gel de sílica 70 – 230 Mesh (MERCK)
- Leitor de ELISA
- Meio AN (OXOID)
- Meio BHI (MERCK)
- Meio Muller Hinton (VETEC)
- Meio Sabouraud (DIFCO)
- Metanol P.A. (CINÉTICA)
- Moinho de facas
- Mufla
- N-Hexano P.A. (MERCK)
- Placas cromatográficas MERCK Art. 015533
- Propanol P.A. (MERCK)
- Rotaevaporador BUCHI
- Tamizador vibratório Ber Fel® modelo 2499
- Tolueno P.A. (MERCK)
- Vanilina P.A. (CARLO ERBA)
- Vidrarias de uso rotineiro
- β – Amirina P.A. (MERCK)
- β – Sitosterol P.A. (MERCK)

5.2.2 Preparação dos Extratos

Os basidiomas foram secos em estufa a 48 ± 2 ºC por 72 h e em seguida triturados em moinho de facas. Quinhentos gramas do pó foram submetidos à maceração a frio em 1500 mL de Metanol ou acetato de etila por 48 h, mantidos ao abrigo da luz e agitados 3 vezes a cada 24 h. Em seguida foi procedido a filtração e a solução obtida foi concentrada em pressão reduzida em rotaevaporador a 40 ºC e o resíduo obtido, após evaporação total do solvente, correspondendo ao extrato metanólico (rendimento de 3,12%) ou em acetato de etila (rendimento de 2,32%) de *G. parvulum.*

5.2.3 Abordagem Micoquímica

O perfil micoquímico de *G. parvulum* foi obtido por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), aplicando-se alíquotas de 10 µL dos extratos em placas cromatográficas de gel de sílica (Merck-Alemanha, art. 105554), empregando-se fases móveis e reagentes adequados à caracterização das classes de substâncias a serem estudadas (Quadro 4). Foram analisadas as presenças dos seguintes metabólitos secundários: alcalóides, terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides iridóides) polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides).

Quadro 4 - Condições cromatográficas para o screening micoquímico

METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOET- n-PrOH-H_2O (5,7:3,2:1,3 v/v)	Dragendorff	(WAGNER, 1996)
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	Benzeno – AcOEt (97:3 v/v)	Vanilina/ ácido sulfúrico	(WAGNER, 1996)

METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR	REFERÊNCIA
Triterpenos e Esteróides	Benzeno –ACOEt (80:20 v/v)	Lieberman/ Burchard	HARBORNE, 1998)
Iridóides	EtOAc – HCOOH – AcOH – H_2O (100: 11: 11: 26 v/v)	Vanilina/ ácido sulfúrico	HARBORNE, 1998)
Cumarinas	Éter-Tolueno-AcOH 10% (50:50:50 v/v)	U.V	(WAGNER, 1996)
Derivados cinâmicos	EtOAc – HCOOH – AcOH – H_2O (100:11: 11: 26 v/v)	NEU	(WAGNER, 1996)
Fenilpropanoglicosídeos	EtOAc – HCOOH – AcOH – H_2O (100:11:11: 26 v/v)	NEU	(WAGNER, 1996)
Flavonóides	EtOAc – HCOOH – AcOH – H_2O (100:11:11: 26 v/v)	NEU	(WAGNER, 1996)

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.4 Cromatografia em Coluna Aberta em gel de Sílica do Extrato em Acetato de Etila

Dois gramas e meio do extrato em acetato de etila foram cromatografados em coluna aberta, usando-se como fase estacionária gel de sílica com granulometria entre 0,05 – 0,2 mm, empacotada e eluída inicialmente com n-hexano, elevando-se a força de eluição por adição gradativa de clorofórmio nas

proporções de 99:1 a 0:100 (v/v). Em seguida, continuou-se elevando a força de eluição adicionando-se EtOAc gradativamente ao $CHCl_3$, nas proporções de 99:1 a 0:100 ($CHCl_3$/AcOEt, v/v).

5.3. Extração e Caracterização do Óleo essencial de *G. parvulum*

A extração do óleo essencial de *G. parvulum* foi realizada por hidrodestilação, onde 550 g do pó do basidioma foram adicionados junto com 1L de água destilada a um aparato de hidrodestilação do tipo Clenvenger e aquecido a uma temperatura de 110 ± 2º C, durante 4 h. Após esse período, foram coletadas as frações que foram armazenadas em frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração a 10º C. Em seguida, o material coletado foi transferido para funil de separação e misturado com diclorometano e agitado vigorosamente. Após a separação, a fase orgânica foi separada e seca em sulfato de sódio anídrico e o óleo separado do solvente em evaporador rotativo sob baixa pressão. O óleo obtido foi seco em sulfato de sódio anidro, acondicionado em frasco âmbar, lacrado e armazenado a -18º C (JONG; BIRMINGHAM, 1993). . Uma parte do óleo foi encaminhada para análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrógrafo de massas e a outra foi encaminhada para avaliação da atividade antibacteriana.

5.3.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG/EM) do Óleo Essencial de *G. parvulum.*

O óleo essencial foi analizado num CG/EM Shimadzu QP 2010 (Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna OV-5 (30 m x 25 mm, 0,25 µm de espessura). Hélio foi usado como gás carreador, a uma vasão de 0,7 mL/min, e o volume de injeção foi de 1 µL. A temperatura da coluna foi mantida inicialmente a 25º C e elevada a 50º C a uma taxa de 5º C/min; de 60 a 120º C, numa taxa de 6º C/min. e de 120-230º C, a uma taxa de 8º C/min, sendo esta última temperatura mantida por 16 minutos. A tentativa de identificação dos compostos prováveis foi realizada por comparação dos espectros de massa de cada pico com os dados da biblioteca Wiley 229 MS e com dados encontrados na literatura.

5.4 Estudos Morfoanatômicos de *G. parvulum*

Visando a identificação precisa da droga fúngica, dados morfológicos do basidioma de *G. parvulum* foram registrados quanto à coloração, o comprimento do estipe, diâmetro e forma do píleo, espessura do contexto, a presença de deposição de material resinoso, a forma dos poros, o número de poros por milímetro, e a estratificação (SILVA e GIBERTONE, 2006; TORRES-TORRES e GUSMÁN-DÁVALOS, 2012; TORRES-TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012).

Foram realizadas observações microscópicas, em microscopia de luz, de cortes a mão livre das superfícies himenial e abhimenial do píleo, do estipte e do contexto, usando-se lâminas de aço inoxidável. Os cortes foram acondicionados em água destilada e transferidos para lâminas de microscopia contendo uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 0,5 %. Foram feitas observações corando-se o material com azul de Amann ou com Reagente de Melzer (SILVA e GIBERTONE, 2006; TORRES-TORRES e GUSMÁN-DÁVALOS, 2012).

5.5 Estudos Físicos do Pó de *G. parvulum*

Foram avaliados o teor de cinzas totais, a perda por dessecação, a granulometria do pó (basidiomas triturados em moinho de facas) e a análise microscópica do pó.

5.5.1 Perda por Dessecação

A perda por dessecação foi expressa em percentual, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), onde 2 g do pó foram transferidos para um pesa filtro previamente dessecado e pesado. Em seguida a amostra mais o pesa filtro foram pesados e transferido para uma estufa aquecida a 105 ºC, permanecendo por 2 h. Após esse período a amostra foi arrefecida até a temperatura ambiente

num dessecador e pesada novamente. O procedimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

5.5.2 Cinzas Totais

A porcentagem de cinzas totais em relação à amostra seca ao ar foi determinada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010). Foram transferidos 3 g da amostra para um cadinho de porcelana dessecado e pesado. Em seguida o cadinho contendo a amostra foi pesado e levado para uma mufla aquecida a 600 ± 25 ºC, até que todo carvão foi eliminado. Após, o material foi arrefecido em dessecador e em seguida pesado. O procedimento foi feito em triplicata e repetido duas vezes.

5.5.3 Granulometria do Pó de *G. parvulum*

A granulometria do pó foi determinada segundo ALLEN JR, POPOVICH e ANSEL (2007) e pela Farmacopéia Brasileira (2010). Foram transferidos 10 g do pó para um tamizador vibratório Ber Fel® modelo 2499, com uma sequência de tamizes com abertura de malha de 850 µm, 425 µm, 250 µm e 90 µm. Em seguida o equipamento foi mantido a 60 vibrações por minuto durante 15 minutos, após o ciclo de vibração, o material retido em cada tamiz e na bandeija de fundo foi pesado. A análise foi realizada em triplicata em três repetiços.

5.5.4 Análise Microscópica do Pó

Cerca de 0,5 g do pó foi suspenso em 20 mL de solução salina e observado diretamente, sob microscopia de luz, usando-se ou não reagente de Melzer. O objetivo foi observar a presença de estruturas que pudessem fornecer elementos para identificação de *G. parvulum* como sendo realmente a droga fungica.

5.6 Avaliação das Atividades Biológicas

Foram avaliadas as atividades antibacteriana dos extratos e do óleo essencial, e citotóxica dos extratos de *Ganoderma parvulum.*

5.6.1 Atividade Antibacteriana dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila de *G. parvulum*

Para atividade antimicrobiana foram utilizadas linhagens da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), representadas por bactérias gram positivas e negativas (Quadro 5).

Quadro 5 - Microrganismos ensaiados para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólico e em acetato de etila

MICRORGANISMOS	Nº DE REGISTRO NA UFPEDA
Bactérias Gram +	
Staphylococcus aureus	02
Bacillus subtilis	86
Micrococcus luteus	100
Bactérias Gram -	
Escherichia coli	224
Klebsiella pneumoniae	396

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e em acetato de etila de *G. parvulum* foi realizada usando-se adaptação do método descrito por Bauer et al. (1966) e OSTROSKY et al. (2008), onde as bactérias foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton a 37 ° C e após 6 horas de crescimento, foram plaqueadas em meio a ser testado. Após crescimento, as bactérias foram suspensas em solução fisiológica até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala

de McFarland, sendo inoculado na superfície do meio contido em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Em seguida, discos de papel xarope (6 mm de diâmetro) embebidos com 20 µl de cada extrato (300 µg / disco), previamente preparados para a evaporação total dos solventes, foram depositados nas superfícies das placas. A gentamicina foi utilizado como padrão (10 µg).

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após este período, as zonas de inibição foram observadas e mensuradas. A atividade antibacteriana foi considerada positiva apenas para os discos onde a formação de halos de inibição ocorreram igual ou maior do que 10 mm de diâmetro (OSTROSKY et al., 2008), medidos com uma régua milimétrica. Para cada tratamento, foram utilizadas três repetições.

5.6.1.1 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila*

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizada a técnica da microdiluição em placas de 96 poços com fundo em “U” (OSTROSKY et al.,2008; SANTOS et al., 2010). A cada poço, foi adicionado o meio de Muller-Hinton mais 5 µL do inoculo bacteriano, obtendo-se a concentração de 0,5 na escala de McFarland. Em seguida foi adicicionado o extrato nas concentrações testadas (1000 - 7,8 µg x mL^{-1}) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO 2,5%), obtendo-se um volume final de 100 µL. Gentamicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 10 µg x mL^{-1}, sendo o meio mais DMSO e o inóculo bacteriano, como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C durante vinte e quatro horas quando 15 µL de uma solução aquosa de resazurina 0,01% foram adicionados e após quatro horas de incubação, a leitura foi realizada. Resazurina facilita a verificação da presença de crescimento microbiano, porque a cor azul indica a ausência de crescimento microbiano, quando uma cor vermelha, indica a presença do crescimento de células viáveis. Para a determinação da CIM foram usados as seguintes linhagens bacterianas: *S. aureus* UFPEDA 02, *B.*

subtilis UFPEDA 86, *M. luteus* UFPEDA 100, *E. coli* UFPEDA 224 e *K. pneumoniae* UFPEDA 396. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

5.6.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana do Óleo Essencial de *G. parvulum*

Devido à volatilidade do óleo essencial, a avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela variante da técnica de difusão em Agar, usando-se poços (GROVE e RANDALL, 1955; QUERESHI et al., 2010). Para a padronização da concentração do inóculo foi utilizada uma concentração padrão de 0,5 na escala McFarland. Um mililitro da suspensão do inóculo foi aplicado sobre a superfície da placa de Petri de 90 cm de diâmetro contendo o meio Muller-Hinton Agar. Após a inoculação, as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 20 minutos e foram feitos poços com a ajuda de um vazador metálico de 6 mm de diâmetro, sendo adicionados 50 µL e 70 µL do óleo essencial, em triplicata. Para o controle positivo foi utilizada a gentamicina e a concentração ajustada para se obter 10 µg por poço. Em seguida, as placas foram mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas aerobicamente a 37 ± 1 °C durante vinte e quatro horas, quando os diâmetros das zonas de inibição foram medidos com uma paquímetro. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Para atividade antimicrobiana do óleo essencial foram utilizadas linhagens da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), representadas por bactérias gram positivas e negativas (Quadro 6).

Quadro 6 - Microrganismos ensaiados para avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ganoderma parvulum*

MICRORGANISMO	Nº DE REGISTRO NA UFPEDA
Bactérias Gram +	
Staphylococcus aureus	02
Bacillus subtilis	86
Micrococcus luteus	100
Bactérias Gram -	
Escherichia coli	224
Klebsiella pneumoniae	396
Pseudomonas aeruginosa	416

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6.2.1 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Óleo Essencial*

A determinação da CIM do óleo essencial seguiu a mesma metodologia utilizada para a determinação da CIM para os extratos (5.6.1.1), apenas adicionando-se a cada poço, o meio Muller-Hinton suplementado com 0,7% de agar, 5 µL do inoculo bacteriano equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland, a concentração do óleo testado (1.000 - 31,25 µg x mL^{-1}), dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) , perfazendo um volume final de 100 µl. A droga usada como padrão foi a gentamicina na concentração de 40 µg x mL^{-1} e o meio mais DMSO e o inóculo bacteriano, como o controle negativo. Foram utilizadas as mesmas linhagens bacterianas usadas na avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial (Quadro 6).

5.7 Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila

Os potenciais citotóxicos dos extratos metanólico e em acetato de etila de *G. parvulum* foram avaliados pelo ensaio do sal de tetrazólio, brometo de 3 - (4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983), frente a duas linhagens de células tumorais humanas: HEp-2 (carcinoma epidermóide da laringe humana) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), obtidos a partir do Banco de Célula no Rio de Janeiro, Brasil. As linhagens de células foram mantidas no meio DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino (PBS), 100 U/mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina, a 37 ºC em estufa de CO_2 a 5%. Em seguida, a metodologia usual foi seguida para a determinação do potencial citotóxico, em que as células foram transferidas para placas de 96 poços, a 1x 10^5 células/mL. Os extratos foram diluídos em DMSO a 0,1% e testado em concentração única de 50 µg/mL, em quadruplicata. Após 72 h de incubação, as amostras foram retiradas cuidadosamente e, em seguida, os poços foram lavados com 300 µL de PBS, e adicionado 200 µL de MTT a 0,5 mg/mL e incubado nas mesmas condições anteriores. Três horas mais tarde, o MTT foi retirado e o formazano produzido foi dissolvido em 400 µL de DMSO, sendo a placa mantida sob agitação por 30 min para a solubilização dos cristais de formazana. Em seguida a absorvância foi aferida à 595 nm em leitor para enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Doxorrubicina foi usado como o padrão. Os experimentos foram realizados em duplicata e foram analisados de acordo com suas médias e desvios-padrão.

5.8 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por análise unidirecional de variância (ANOVA). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas metodologias propostas e usadas no presente trabalho, foram alcaçados resultados inéditos quanto a prospecção micoquímica, como a presença de fenil propano glicosídeos, derivados cinâmicos e flavonóides; quanto a composição do óleo essencial; e quanto as atividades biológicas.

6.1 Abordagem Micoquímica de *Ganoderma parvulum*

A prospecção micoquímica (Tabela 1) identificou a presença de triterpenos e esteróides como metabolitos secundários majoritários que podem ser usados como marcadores químicos, bem como tendo uma relação com a atividade biológica (MILES E CHANG, 1997; SMÂNIA et al., 2003; ZJAWIONY, 2004; FAN et al., 2006). No extrato metanólico de *G. parvulum* foram detectadas a presença de mono, sesqui e diterpenos, triterpenos e esteróides, sendo detectados, também, fenilpropanoglicosídeos derivados cinâmicos e flavonóides. No extrato em acetato de etila, evidenciou-se apenas a presença de terpenos (mono, sesqui, diterpenos, triterpenos e esteróides). Triterpenos e esteróides isolados de várias espécies de *Ganoderma*, particularmente *G. lucidum*, possuem várias atividades biológicas relatadas, dentre as quais destacam-se a atividade antimicrobiana (MILES e CHANG, 1997; SMANIA et al., 2003; ZJAWIONI, 2004; FAN et al., 2006), antitumoral (MILES e CHANG, 1997; XU et al., 2010; MOHSIN et al., 2011).

Tabela 1- Screening Micoquímico por CCD dos extratos metanólico e em acetato de etila de *Ganoderma parvulum*

Classe de Metabólito	Extrato Metanólico	Extrato em Acetato de Etila
Alcalóides	-	-
Mono, Sesqui e Diterpenos	+	+
Iridóides	-	-
Triterpenos e Esteróides	+	+

Classe de Metabólito	Extrato Metanólico	Extrato em Acetato de Etila
Fenilpropanoglicosídeo	+	_
Cumarinas	-	-
Derivados Cinâmicos	+	-
Flavonóides	+	-

Fonte: Elaborada pelo autor

Nas condições cromatográficas empregadas no presente trabalho, não foram encontrados alcalóides (Figura 24). De uma forma geral, são poucos os relatos para alcalóides em *Ganoderma*, como por exemplo, Liu et al. (2010) descrevem um alcalóide, a sinesina, para *G. sinense.*

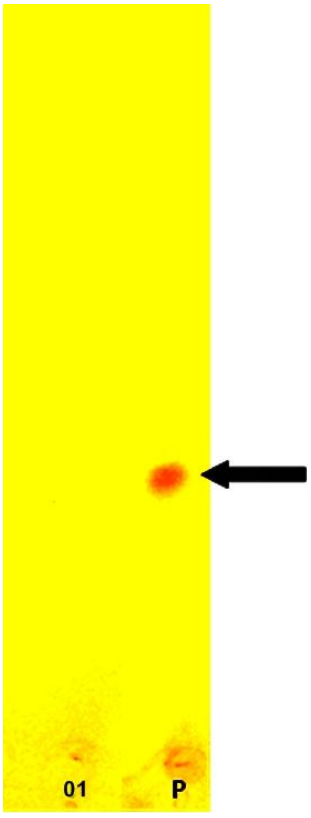


Figura 24 - Cromatograma revelado para alcalóides: 01 – *Ganoderma parvulum*; P – Padrão (N,N-dimetiltriptamina, fonte: jurema preta *Mimosa tenuriflora*)

Para os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (Figura 25); esteróides e triterpenos (Figura 26), ambos os extratos demonstraram riqueza nestes compostos, o que se pode constatar também pela vasta citação na literatura para o gênero *Ganoderma* (SMÂNIA et al., 2003; ZJAWIONY, 2004; LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005; POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006; FAN et al., 2006; COY; NIETO, 2009; MOHAMMED et al., 2009).

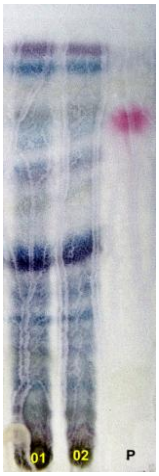


Figura 25 - Cromatograma revelado para Monoterpenos, Diterpenos e sesquiterpenos: 01 – extrato metanólico de *G. parvulum;* 02 – extrato em acetato de etila de *G. parvulum*; P – Padrão (Timol)

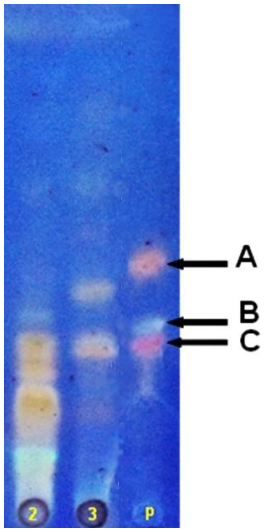


Figura 26 - Cromatograma revelado para Esteróides e triterpenos visualizado sob luz UV (365nm): 2 – extrato em acetato de etila de *G. parvulum ;* 3 – extrato metanólico; P – Padrão (A: β-Amirina, B: β-Sistosterol e C: Ácido ursólico)

Como indicativo da presença de fenilpropanoglicosídeos, foi observado se surgiam manchas tenuamente azuladas quando as placas eram reveladas em câmara de UV (365 nm) e se essas manchas mudavam de cor após revelação com reagente NEU e nova observação no UV, passando de azul para verde-limão. Nenhum dos extratos ensaiados evidenciou a presença de fenilpropanoglicosídeos nas condições cromatográficas deste trabalho. Se nas mesmas condições, as manchas tênues azuis mudassem para azul fortemente fluorescente, seria um indicativo da presença de derivados cinâmicos, o que não ocorreu nas condições cromatográficas deste trabalho. O cromatograma do extrato metanólico de *G. parvulum* só foi sugestivo para a presença de flavonóides (Figura 27) quando desenvolvido na fase móvel (100: 2: 2 – AcOEt:HCOOH:AcOH). Porém, na partição em acetona-água 3:1 do extrato metanólico, quando revelada nas condições descritas acima, foram sugestivas para fenilpropanoglicosídeos e para derivados cinâmicos (Figura 28), indicando a presença dessas classes de metabólitos secundários para o fungo *G. parvulum*.

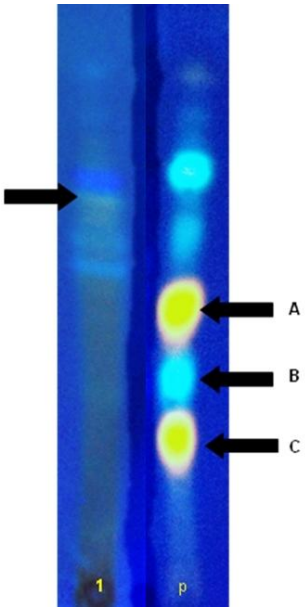


Figura 27 - Cromatograma revelado para Flavonóides: 1 – Extrato metanólico*;* P – Padrão (A: luteolina 7-glicosídeo; B: ácido clorogênico; C: luteolina 7-rutinosídeo. Fonte: Alcachofra *Cynara scolymus* L)

Figura 28– Cromatograma da partição em acetona-água 3:1 do extrato metanólico - fase móvel: EtOAc – HCOOH – AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v); revelador: Reagente de NEU. Setas brancas: flavonóides; setas laranjas: fenilpropanoglicosídeos; seta amarela: derivados cinâmicos

6.1.1 Separação em Coluna de Gel de Sílica do Extrato em Acetato de Etila

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), usando-se fases móveis e reveladores adequados para triterpenos e esteróides e agrupadas de acordo com o perfil micoquímico. Entretanto a quantidade de bandas dificultou a purificação, mesmo quando as frações eram repassadas nas colunas, variando-se os sistemas de eluição. Como alternativa, algumas frações com menos bandas foram submetidas à CCD preparativa em placas de vidro 20 x 20, tendo como fase estacionária sílica F 254 Merck. Após a migração, as placas foram reveladas em luz UV a 365 nm e 254 nm, sendo coletado o material separado junto com a sílica, ressuspendido em clorofórmio, filtrado e analizado. Com isso, foi possível a purificação de uma substância (Figura 29), porém numa pequena quantidade (5 µg), impossibilitando a realização de técnicas de espectroscopia para sua elucidação.

A substância purificada, submetida à CCD tendo como fase móvel o sistema diclorometano: metanol na proporção de 9:1, quando observada sob luz UV a 365 nm, ou quando revelada para triterpenos e esteróides, apresentou R*f* ~ 0,93, o que segundo Wagner et al. (2011), tem uma grande probabilidade de ser o ergosterol. O ergosterol é um esteróide presente na membrana plasmática ou esterificado a ácidos graxos no citosol ou ligados às organelas de fungos. Apresenta várias atividades biológicas, desde antitumoral a precursor da vitamina D 2, anti HIV, dentre outras (KOBORI, 2007; VILLARES et al., 2012).

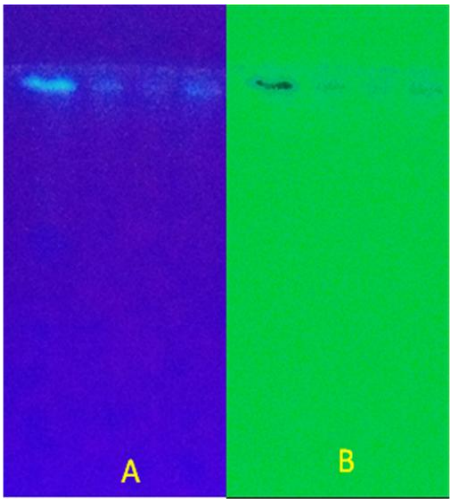


Figura 29 – Cromatograma da substância purificada por CCD preparativa. Cromatograma revelado sob luz UV: (A) 365 nm; (B) a 254 nm.

6.2 Extração e Caracterização do Óleo Essencial de *Ganoderma parvulum*

O rendimentodo do óleo essencial de *G. parvulum* foi de 0,06 % (p/p), que pode ser considerado baixo comparado a outras espécies do gênero, como é o caso de *G. japonicum* que teve um rendimento de 0,18 % (p/p) (LIU et al., 2009).

Os picos e os respectivos tempos de retenção encontrados na análise por CG-EM do óleo essencial de *G. parvulum*, nas condições referidas, são apresentados na Tabela 2.

Table 2 - Composição do óleo Essencial de *Ganoderma parvulum* por CG-EM

pico	Tempo de retenção (min)	Área	Altura	A/A	Area %	Altura %
1	8, 028	144916	89557	1,58	0,75	0,64
2	10,784	50335	40755	1,22	0,26	0,29
3	11,036	18394091	13326863	1,38	95,26	95,27
4	13, 016	459122	342690	1,33	2,38	2,45
5	13,855	188443	188443	1,38	1,35	1,35

Fonte: Elaborada pelo autor

O primeiro pico, por comparação do tempo de retenção e espectro de massa (Figura 30 A), corresponde ao ácido benzóico (KARTAL et al., 2002; LEE et al., 2008). O ácido benzóico é encontrado em diferentes vegetais, mas também é encontrada em cogumelos (LEE et al., 2008; ELZAAWELY, 2010). Lee et al. (2008) mencionam que o ácido benzóico é um dos conservantes mais usados na indústria de alimentos, sendo utilizado em diferentes tipos de alimentos, como refrigerantes, sucos de frutas, iogurtes, compotas de frutas, entre outros.

O segundo pico, por comparação do espectro de massa (Figura 30 B), corresponde ao sesquiterpeno aristolona mono-oxigenado, 1,1,7,7a-Tetrametil-1,1a,4,5,6,7,7a,7b-octahidro-ciclopropa[a]naftaleno-2-ona (EL-GOHARY, 2004). Os sesquiterpenos do tipo aristolona, estão presentes em diferentes organismos, desde algas, plantas, esponjas, cnidários, até mesmo em fungos (HARRIGAN, 1993; TAN et al., 2001). Exemplos interessantes de aristolonas em macrofungos, são rulepidol e lepidamina isolados de *Russula lepida*, sendo a lepidamina um dos primeiros aristolonas sesquiterpenos alcalóides isolado na natureza (BOUFTIRA et al., 2007). A atividade biológica de destaque exibida pela aristolona é atividade

genotóxica, causando rupturas de filamentos duplos durante a mitose em leveduras (HARRIGA, 1993).

O terceiro pico foi designado pela biblioteca e sugerido por comparação do espectro de massas com a literatura (BOUFTIRA, 2007), como sendo 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (Figura 30 C), composto produzido por certos organismos, tais como organismos do fitoplâncton (BABU, 2008) e pela planta halofita *Mesembryanthemum crystallinum*, em que a presença deste composto é uma credencial para fins medicinais, cosméticos e industriais (BOUFTIRA, 2007).

De acordo com os dados espectrais e da literatura, o quarto pico é um derivado de quinazolinona A, originado a partir da benzoilação do 3-amino-2-hidroxi-4 (3H)-quinazolinona, (EI-DEEN, 2003), N-(2-hidroxi-4-oxo-4H-quinazolina-3-il)-benzamida (Figura 30 D). Este composto apresenta um padrão de fragmentação muito semelhante ao apresentado por benzoato de metila $[Ph\text{-}CO]^{+\cdot}$, justificando o pico de base a 105 m/z, que indica que é uma amida aromática (MHASKE e ARGADE, 2006).

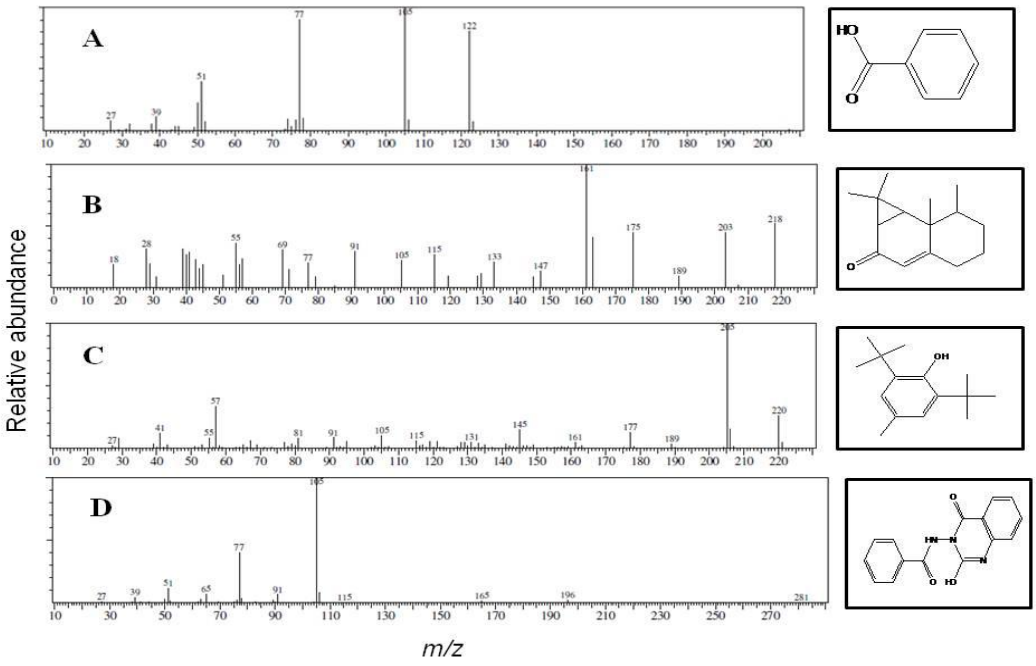


Figura 30 - Os espectros de massa dos compostos encontrados no óleo essencial de *Ganoderma parvulum* Murrill. **A**: ácido benzóico; **B**: 1,1,7,7 a-Tetrametil-1, 1a, 4,5,6,7,7 a, 7b-octa-hidro-ciclopropa [a] naftalen-2-ona;

C: 2 6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol e **D**: N-(2-hidroxi-4-oxo-4H-quinazolina-3-il)-benzamida.

6.3 Estudos Morfoanatômicos de *G. parvulum*

Morfologicamente, *G. parvulum* apresenta basidioma lateralmente estipitado (Figura 31), medindo entre 5 e 10 cm apresentando estipe 1,0-7,0 cm de comprimento e píleo espatulado ou reniforme de 1,8–7,0 x 2,0–7,0 cm, com uma superfície laqueada, na cor marrom avermelhado, e uma superfície himenial poroide com 4 poros/mm, mas isso pode variar de acordo Ryvarden (2004) de 3-6 poros/mm. No entanto, as características fundamentais destacadas pelo Ryvarden (2004) e por Torres-Torres e Guzmán-Dávalos (2012) é a presença de linhas escuras de deposição de material resinoso e coloração do contexto homogêneo (Figura 32).

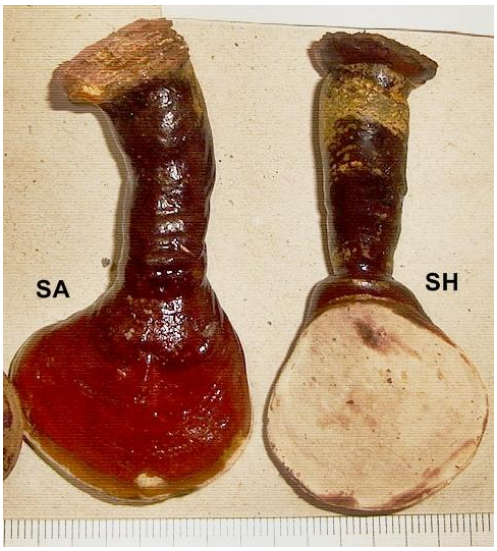


Figura 31 – Morfologia de *G. parvulum* - SH: Superfícies himenial; SA: superfície abhimenial

Figura 32 – Contexto homogêneo. Setas: linhas de deposição de material resinoso

Micromorfologicamente, a característica marcante é o basidiósporo elipsóide de parede dupla, marrom claro e ornamentado, com um comprimento inferior a 10 µm (Figura 33). Ryvarden (2004) considera que a espécie possa apresentar basidiospors com comprimento aproximado de 7,5 a 9,5 µm. Torres-Torres e Guzmán-Dávalos (2012) enfatizaram a importância da forma, cor e tamanho de basidiósporos para identificar as espécies de *Ganoderma* de superfície lacada.

Figura 33 – Basidiosporos ornamentado, de parede dupla, elipsóide, medindo menos que 10 µm. Barra: 10 µm

A superfície abhimenial é do tipo crustahimeniderme apresentando hifas clavadas (Figura 34). Segundo Torres-Torres e Guzman-Dávalos (2012) a forma das hifas da crustahimeniderme é mais importante do que o comprimento, uma vez que este pode variar de acordo com a maturidade do basidioma.

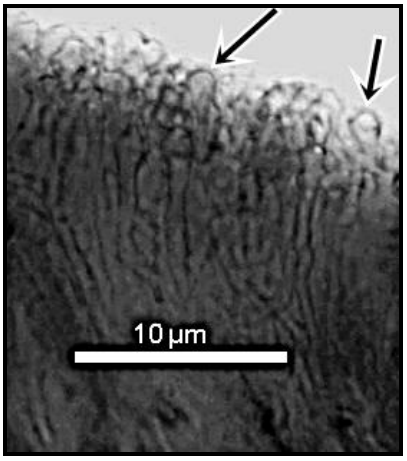


Figura 34 – Hifas clavadas da crustahimenideme

Como já mencionado, a espécie mais conhecida do gênero é *G. lucidum*, que é uma espécie muito semelhante a *G. parvulum*. As principais diferenças entre os dois são: tamanho do basidioma que é menor (5 x 10 x 1 cm) em *G. parvulum* (RYVARDEN, 2000) e maior (12-14 x 8-9 x 1,6 cm) em *G. lucidum* (BHOSLE et al., 2010), o tamanho do basidiósporos onde *G. parvulum* não excede 9,5 µm de comprimento (TORRES-TORRES E GUZMÁN-DÁVALOS, 2012) e em *G. lucidum* é maior do que 10 µm (7,5-8,5 µm x 11-13,5 µm) de comprimento (LOUGUEIRO-LEITE, 2005); o sistema hifálico em *G. lucidum* é trimítico (BHOSLE, et al., 2010) e em *G. parvulum* é dimítico, só sendo visualizadas hifas esqueléteas de parede espessa e com ramificações apicais, e hifas generativas com seus característicos grampos de conexão (Figura 35). No entanto, a principal diferença é a ausência de um depósito de material resinoso em *G. lucidum* (Ryvarden, 2000). *G. parvulum* também é muito semelhante ao *G. perzonatum e G. weberianum*, mas, em ambos, o contexto não é totalmente homogêneo, os basidiosporos de *G. perzonatum* são maiores que 10 µm e *G. werbwrianum* tem

basidiósporos com pilares sublivres (TORRES-TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012).

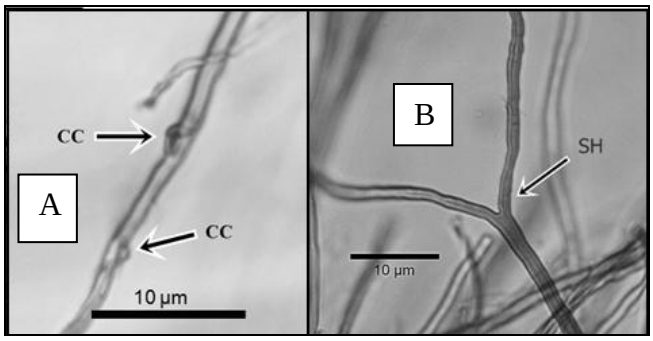


Figura 35 - Tipos de hifas contextuais de *G. parvulum* - A: hifa generativa evidenciando-se os grampos de conexão, B: Hifa esquelétea evidenciando-se uma bifurcação característica

6.4 Estudos Físicos do Pó de *G. parvulum*

Os estudos físicos do pó de *G. parvulum* mostraram-se importantes na caracterização e identificação da droga fúngica, fornecendo dados inéditos para a espécie.

6.4.1 Perda por Dessecação

O valor da perda por dessecação encontrada foi de 13% ± 0,07, que segundo Farias (2010) está de acordo com a umidade máxima definida em diferentes farmacopéias, que varia entre 8 e 14%. Isto porque o excesso de umidade nas matérias-primas permite a ação de enzimas que podem causar a degradação dos constituintes químicos e também permite o crescimento de fungos e bactérias. O mesmo autor relata que o método gravimétrico é simples de executar, determinando o percentual de material volatilizado após a dessecação. O método gravimétrico é indicado na Farmacopéia Brasileira, quando a água não é a única substância volátil (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

6.4.2 Cinzas Totais

Para cinzas totais, o valor obtido foi de 1,67% ± 0,14, um valor muito próximo aos obtidos por Mau et. al. (2001) para *Ganoderma lucidum*, que estavam entre 1,77% ± 0,005 e 1,70%. ± 0,3. A determinação do teor de cinzas, permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis, os quais podem estar presentes como contaminantes (FARIAS, 2010).

6.4.3 Análise Granulométrica do Pó de *G. parvulum*

Quanto ao grau de redução de partículas, o diâmetro médio foi de 0,353 mm, o que indica que a droga pode ser considerado como um corte fino (SONAGLIO et al., 2010). Pela distribuição de tamanho de partícula (Figura 36), o pó pode ser classificado como moderadamente espesso (FARMACOPÉIA BRASILEIA, 2010). O fato de ser considerado um corte fino, mesmo com uma distribuição de tamanho de partícula correspondente à de um pó moderadamente espesso pode ser explicada pela facilidade de agregação das partículas, devido à constituição filamentosa do micélio do fungo.

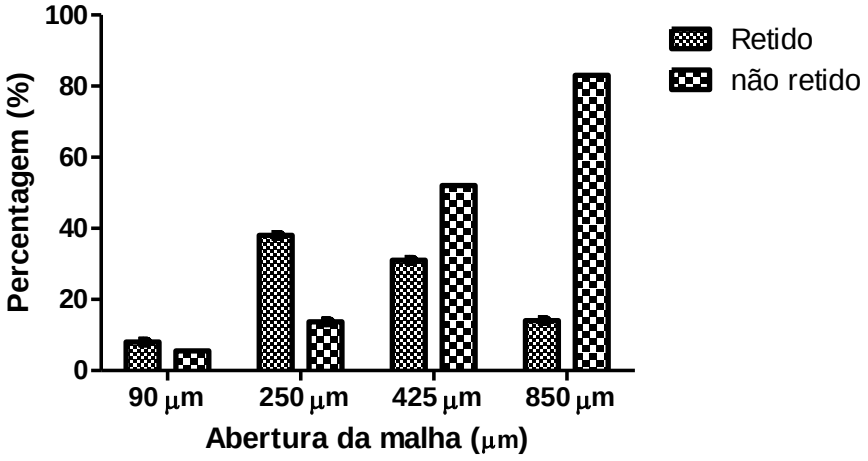


Figura 36 - Distribuição granulométrica do pó de *G. parvulum*

6.4.4 Análise Microscópica do pó

A análise microscópica é classicamente utilizada na verificação da originalidade de drogas. A análise microscópica de drogas é valiosa para a identificação de pequenos fragmentos de drogas brutas ou em pó e na detecção de adulterações, fornecendo mais informações do que a cor, odor e sabor como pistas para a sua identidade e características (YAUNGKEN,1943; BACCARIN et al., 2009).

Com a análise microscópica do pó, foi possível identificar elementos importantes na caracterização do gênero e para fornecer indícios da espécie. Foram observados basidiósporos característicos do gênero *Ganoderma* (Figura 37 A), e como eram menores que 10 µm, o que é descrito para *G.parvulum* (TORRES-TORRES; GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, 2012), esse dado fornece fortes indícios para autenticação da espécie. Fragmentos distintos de hifas esqueléteas (Figura 37 A e B), foram também observados, mas não foram observadas hifas generativas, que pode estar relacionado com a fragilidade destas hifas, em relação ao processo de trituração dos basidiomas, porque as mesmas permaneceram intactas no interior das massas miceliais (Figura 37 B).

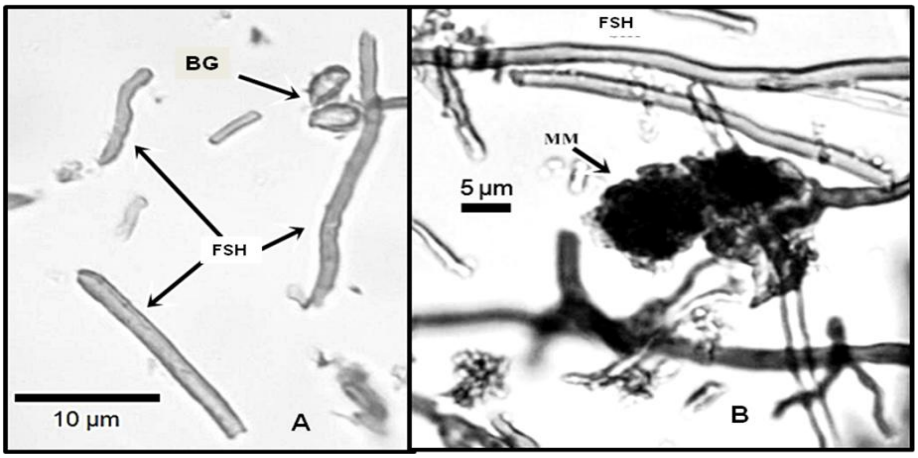


Figura 37 - Elementos relevantes observados na análise microscópica do pó de *Ganoderma parvulum* Murrill. A: Os fragmentos de hifas esqueléteas (FSH) e basidiósporos característicos do género *Ganoderma* (BG). B: massa micelial (MM) e fragmentos de hifas esqueléteas (FSH).

6.5 Avaliação das Atividades Biológicas

Quanto às atividades biológicas do extrato em acetato de estila e do óleo essencial os resultados foram muito promissores, principalmente a atividade antibacteriana frente a cepas gram-positivas, para ambos, e frente a cepas gram-negativas do óleo.

6.5.1 Atividade Antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Extratos Metanólico e em Acetato de Etila

O extrato metanólico induziu a formação de zonas de inibição de diâmmetros menores que 10 mm sobre as bactérias testadas, sugerindo não haver atividade inibitória. O extrato em acetato de etila teve atividade contra todas bactérias testadas, tanto para gram-positivas, quanto para gram-negativas (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antibacteriana dos extratos em acetato de etila (EAcOEt) e metanólico (EMeOH) e concentração inibitória mínima (CIM) do extrato em acetato de etila de *G. parvulum* Murrill

Bactéria / **Registro** UFPEDA	**AcOEt** Zona de Inibiçcao em mm ($\bar{x}$ ± DP)	**EMeOH** Zona de Inibiçcao em mm ($\bar{x}$ ± DP)	**Gentamicina** Zona de Inibição em mm ($\bar{x}$ ± DP)	**CIM (µg/mL) do EETOAc**
Staphylococcus aureus 02	12,00 ± 1,00	7,00 ± 1,00	20,00 ± 2,00	500
Bacillus subtilis 86	13,00 ± 1,00	7,00 ± 1,08	31,5 ± 1,5	250
Micrococcus luteus 100	17,66 ± 2,08	8,00 ± 1,00	32,5 ± 3,53	125
Escherichia coli 224	11,00± 1,15	6,00 ± 1,8	18,33±1,52	> 1000
Klebsiella pneumonia 396	12,00 ± 1,75	6,00 ± 1,35	23,00±1,00	1000

Fonte: Elaborada pelo autor. $\bar{x}$ = média em mm; DP= Desvio padrão

Esta atividade é justificada pelo fato de que compostos representados por esteróides, triterpenos e terpenos menores, são majoritários no extrato em acetato de etila. Smânia et al. (2003) relatam a atividade de esteróides e triterpenos de três espécies de *Ganoderma* (*G. applanatum, G. australe e G. anular*). Quereshi et al.(2010) demonstraram a atividade dos extratos de *G. lucidum* em etanol, metanol, acetona e água, contra bactérias gram- positivas e gram-negativas, e a melhor atividade foi apresentada pelo extrato em acetona, a fracção que continha a maioria dos terpenos e esteróides. No entanto, quando se considera a concentração inibitória mínima (Tabela 3), fica claro que a atividade é considerada moderada apenas contra as bactérias gram-positivas, de acordo com a classificação descrita por Holetz et al.(2002), onde extratos que apresentaram uma CIM superior a 1000 µg/mL, foram considerados inativos; entre 501-1000 µg/mL, a atividade antimicrobiana foi fraca; de 100 a 500 µg/mL, a atividade antimicrobiana foi moderada e menor do que 100 µg/ml, a atividade antimicrobiana foi considerada boa.

6.5.2 Atividade Antibacteriana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Óleo Essencial de *G. parvulum*

O óleo essencial de *G. parvulum* demonstrou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas (Tabela 4). Não houve diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição formados entre os volumes testados do óleo essencial (70 e 50 µL), com exceção para a *Pseudomonas aeruginosa*, em que as zonas de inibição maiores foram formadas quando foi adicionado 70 µL do óleo.

As bactérias gram-positivas foram mais suscetíveis ao óleo essencial de *G. parvulum* que as bactérias gram-negativas, o que está de acordo com os resultados para os óleos essenciais de várias plantas, por exemplo, Agienda et al. (2010), atribuíram a suscetibilidade à complexidade da membrana celular, em que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis, provavelmente devido à falta da

parede externa. David et al. (2012) obtiveram resultados opostos para os óleos essenciais de diferentes macrofungos, onde as cepas gram-negativas foram mais suscetíveis, mas o óleo essencial de *G. lucidum* apresentou melhor atividade contra cepas gram-positivas, como mostrado no presente trabalho para o óleo essencial de *G. parvulum*.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ganoderma parvulum*

Linhagem Bacteriana	**Registro UFPEDA**	**Diametro (mm) da zona de inibição ($\bar{x}$ ± DP)**		
Gram-positiva		70 µL	50 µL	Gen
Staphylococcus aureus	02	36,33^{a} ± 0,33	35,33^{a} ± 0,33	16,00^{b} ± 1,75
Bacillus subtilis	86	31,33 ^{a}± 1,33	29,66^{a} ± 0,66	19,00^{b} ± 2,00
Micrococcus luteus	100	56,66^{a} ± 1,66	54,66^{a} ± 0,33	25,00^{b} ± 3,2
Gram-negativa				
Escherichia coli	224	25,0^{a} ± 0,57	25,66^{a} ± 1,20	18,95^{b} ± 1,52
Klebsiella pneumonia	396	21,0^{a} ± 1,00	21,33^{a} ± 0,33	20,5^{a} ± 1,2
Pseudomonas aeruginosa	416	26,66^{a} ± 1,76	20,0^{b} ± 2,00	21.3^{b} ± 0,35

Fonte: Elaborada pelo autor. Médias seguidas por letras diferentes diferem a p <0,05 pelo teste de Tukey; Gen: gentamicina

6.6 Atividade Citotóxica do Extrato Metanólico e em Acetato de Etila de *Ganoderma parvulum*

O extrato em acetato de etila de *G. parvulum* apresentou atividade citotóxica contra as linhagem de células tumorais HEp-2 e HT-29 (Tabela 5), utilizando-se uma dose única de 50 µg/mL. No entanto, de acordo com Fouche et al. (2008), só pode ser dito que existe a atividade citotóxica em extratos testados

em dose única de no máximo 100 µg/mL, se a percentagem de inibição da proliferação de duas ou mais linhagens celulares é igual ou maior do que 75%, mas na prática uma porcentagem de inibição acima de 70% já é considerável. Os efeitos citotóxicos em células HT-29 de extratos de cogumelos comestíveis e medicinais é principalmente devido à ação do peróxido de ergosterol e ergosterol (KOBORI et al., 2007), substâncias encontradas em altas concentrações em *Ganoderma*. Wu et al. (2001) relataram a atividade de vários triterpenos em diferentes linhagens de células tumorais, o que também justifica a alta atividade do extrato em acetato de etila de *G. parvulum*.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição do crescimento das células (IC%) das duas linhagens de células tumorais testadas numa dose única (50 µg/mL) de extratos metanólico (EMeOH) e em acetato de etila (AcOEt) de *Ganoderma parvulum* Murrill

Linhagem Tumoral	IC% EMeOH ($\bar{x}$ ± DP)	IC% AcOEt ($\bar{x}$ ± DP)
HT-29	4,73 ± 6,45	71,94 ± 2,04
HEp-2	16,27 ± 4,77	90,02 ± 2,17

Fonte: Elaborada pelo autor

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados no presente trabalho, conclui-se que:

- Foi evidenciado pela pela primeira vez a presença de fenilpropanoglicosídeos, flavonóides e derivados cinâmicos para *Ganoderma parvulum* Mrrill
- Características morfoanatômicas como tamanho do basidioma, presença de linha de deposição de material resinoso no contexto; tamanho, forma e ornamentação dos basidiósporos, sistema hifálico e morfologia das hifas da crustohimeniderme, fornecem informações suficientes para uma identificação confiável de *G. parvulum* Murrill como droga fúngica, na forma bruta ou em pó.
- O valor encontrado para cinzas totais em *G. parvulum* Murrill está de acordo com os valores relatados para as espécies de *Ganoderma.*
- A perda por dessecação do pó de *G. parvulum* Murrill encontra-se nos limites permitidos por diversas farmacopéias, o que pode possibilitar um período de armazenamento maior.
- O fato de ser considerado um corte fino e apresentar uma distribuição de tamanho de partícula correspondente à de um pó moderadamente espesso, pode ser explicado pela facilidade de agregação das partículas devido à constituição filamentosa do micélio do fungo.
- O extrato em acetato de etila de *G. parvulum* Murrill mostrou moderada atividade contra bactérias gram-positivas e fracas contra *Klebsiella pneumoniae*.

- O extrato em acetato de etila de *G. parvulum* Murrill promoveu inibição significativa da proliferação das linhagens de células tumorais HEp-2 e HT-29, mesmo utilizando-se uma dose única de 50 µg/mL.

- Concluiu-se que o óleo essencial de *G. parvulum* Murril pode ser considerado altamente ativo contra bactérias gram-positivas e ativo contra bactérias gram-negativas testadas. Isto é muito promissor devido à sua composição, podendo ter futuras utilizações para fins medicinais, cosméticos e industriais.

REFERÊNCIAS

ALLEN JR, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.

ANDRADE, M. C.; SETTE, H. **Estudos Pernambucanos – Geografia e História de Pernambuco**. São Paulo: Editora do Brasil S/A. 1969. 186 p.

ANGIENDA, P.O.; ONYANGO, D.M.; HILL, D.J.. Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research. v. 4, n. 16, p. 1678-1684, 2010.

ARBOLEDA,C.; CABANA, H.; DE PRIL, E.; JONES, J.P.; JIMÉNEZ, G. A.; MEJÍA, A.I.; AGATHOS, S.N.; PENNINCKX, M.J. Elimination of bisphenol A and triclosan using the enzymatic system of autochthonous colombian Forest fungi. **ISRN Biotechnology**. v. 2013, Article ID 968241, 12 p., 2013. doi:10.5402/2013/968241. Disponível em: <http://www.hindawi.com/isrn/biotechnology/2013/968241/cta/>, acessado em 31 de junho de 2013.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, Article ID 253643, p. 8, 2011. doi:10.1093/ecam/nep187

BACCARIN, T. CZEPULA, A.I.; FERREIRA, R.A.; LUCINDA-SILVA, R.M. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* dc. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2B, p. 612-616, 2009.

BAKKALI, F; AVERBEK, S.; AVERBEK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-475, 2008.

BENDAOUD, H.; BOUAJILA, J.; RHOUMA, A.; SAVAGNAC, A.; ROMDHANE, M. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.89, p. 1202-1297, 2009.

BARILE, F.A. Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment. *In*: CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. (EE.). ***In vitro*** **methods in pharmaceutical research**. 1th ed. San Diego, California, USA: Academic Press, 1997, 483 p.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am**erican **J**ournal of **Clin**ical **Pathology**. v.45, n.4, p.493-49, 1966.

BENDAOUD, H., J. BOUAJILA, A. RHOUMA, A. SAVAGNAC AND M. ROMDHANE. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p. 1292-1297, 2009

BERNAS, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible Mushrooms assource of valuable nutritive constituents. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**. v.5, n.1, p. 5-20, 2006.

BHOSLE, S.; RANADIVE, K.; BAPAT, G.; GARAD, S; DESHPANDE, G.; VAIDYA, J. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). **Mycosphere**., v.1, n.1, p. 249-262, 2010.

BOUFTIRA, I.; ABDELLY, C; SFAR, S. Identification of a naturally occurring 2, 6-bis(1,1-dimethyllethyl)-4-methylphenol from purple leaves of the halophyte plant *Mesembranthemum cristallinum*. Afr. J. Biotechnol., v. 6, n. 9, p.1136-1139. 2007

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y.; YU, H. S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 537-542, 1996.

CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A. Mushroom nutriceuticals. **World Journal of Microbiology and Biotecnology**. v. 12, p. 473-476, 1996.

CHEN, K-C; PENG, C-C; PENG, R. Y.; SU, C-H; CHIANG, H-S; YAN, JR-HUNG; HSIEH-LI, H. M. Unique formosan mushroom *Antrodia camphorata* differentially inhibits androgen-responsive LNCaP and -independent PC-3 prostate cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 57, n. 1, p. 111-121, 2007.

CHEN, D.H.; CHEN, W.K.D. Determination of ganoderic acids in triterpenoid constituents of *Ganoderma tsugae*. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.11, n.3, p. 195-201, 2003.

CHENG, C.R.; YUE, Q.X.; WU, Z.Y.; SONG, X.Y.; TAO, S.J.; WU, X.H.; XU, P.P.; LIU, X.; GUAN, S.H.; GUO, D.A.. Citotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. v.71, p. 1579-1585, 2010.

COY B., E.D.; NIETO R., I.J. Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 2, p. 193-196, 2009.

CORREIA, M. J.; PEREIRA JR., J. A. S.; SANTOS, J. C.;CAVALCANTI, M. A. Q. Use of Remazol Blue Dyed Avicel for the determination of cellulolytic activity Basidiomycetes. **Revista Brasileira de Microbiologia** v. 29, p. 286-288, 1998.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Technique for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants research**. v.4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAVID, O.M.; FAGBOHUN, E.D.; OLUYEGE, A.O.; ADEGBUYI, A . Antimicrobial activity and physicochemical properties of oils from tropical macrofungi. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v.3, n.1,p 1-6, 2012.

DI PIERO, R.M. & PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**.v. 30, p.243-250, 2004.

EISENBRAND, G; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PITERS,R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food an Chemichal Toxicology**. v.40, p. 193-236, 2002.

EI-DEEN, I.M.; EI-FATTAH, M.E.A. Electron impact ionization mass spectra of 3-substituted-2-hydroxy-4(3H)-quinazolinones. **Bulletin of Korean Chemestry Societ**. v. 24, n.4 , p. 473-478. 2003

EL DINE, R. S.; EL HALAWANY, A. M.; MA, C.; HATTORI, M. Inhibition of the Dimerization and Active Site of HIV-1 Protease by Secondary Metabolites from the Vietnamese Mushroom *Ganoderma colossum*. **Journal of Natural Products.** v. 72, p. 2019-2023, 2009.

EL-GOHARY, H.M.A. Study of essential oils of the tubers of *Cyperus rotundus* L. and *Cyperus alopecuroides* Rottb. **Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University**. v. 42, n. 1, p. 157-164, 2004.

ELSHAFIE, A.E; AL-BAHRY, S.N.; EL-NAGERABI, S.A.F.; AL-KINDI, K.K. New Record of *Ganoderma colossum* associated with *Sclerocarya birrea* dieback. **Australian Plant Disease Notes**. v.8, DOI 10.1007/s13314-013-0102-1,Online ISSN 1833-928X. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13314-013-0102-1#>. Acesso em: jun. 2013.

ELZAAWELY, A.A.; TAWATA, S. Preliminary phytochemical investigation on Mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **World Journal of Agricultaral Science**, vol. 6, n. 6, p. 735-739, 2010.

ENOKI, M.; WATANABE, T.; NAKAGAME, S.; MESSNER, K.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Extracellular lipid peroxidation of selective White-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEMS Microbiology Letters**. v.180, n.2, p. 205-211, 1999.

EO, S.K.; KIM, Y.S.; LEE, C.K.; HAN, S.S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of ethnopharmacology**. v.68, p 175-181, 1999.

FAN, L.; PAN, H.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Advances in mushroom research in the last decade. **Food Technology Biotechnology.** v. 44, n. 3, p. 303-311, 2006.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2010. 821p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5 ed. volume 1 - Anvisa. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª ed., 2010**.**

FIDALGO, O.; BONONI, V.L. (coords.) **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica. 1989.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 119, p. 455-461, 2008.

FUKUZAWA, F.; YAMAGUCHI, R.; HIDE, I.; CHEN, Z.; HIRAI, Y.; SUGIMOTO, A.; YSUHARA, Y.; NAKATA, Y. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores PF *Ganoderma lucidum* (reishi houshi) to its anti-tumor activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, n.10, p. 1932-1937, 2008.

GAO, J.J.; NAKAMURA, N.; MIN, B.S.; HIRAKAWA, A.; ZUO, F.; HATTORI, M. Quantitative determination of bitter principles in specimens of *Ganoderma lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to evaluation of *Ganoderma* products. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.52, n. 6, p. 688-695, 2004.

GAO, Y.; ZHOU, S.; JIANG, W.; HUANG, M.; DAÍ, X. Effects of Ganopoly® (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune funcions in advanced-stage câncer patients. **Immunological Investigations**. v. 32, n. 3, p. 201-215, 2003.

GAO, P.; HIRANO, T.; CHEN, Z.; YASUHARA, T. NAKATA, Y.; SUGIMOTO, A. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). **Fitoterapia**. v.83, n.3, p. 490-499, 2012.

GIBERTONI, T.B.; CAVALCANTI, M.A.Q. Novos registros de Aphyllophorales para o Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. v. 14, n. 3, p 267-271, 2000.

GIBERTONI, T.B. Aphyllophorales (Basidiomycotina) em Áreas de Mata Atlântica do Nordesde Brasileiro. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, 2004.

GORO, C. Immunopharmacology of letinan, a polysaccharide isolate fron *Lentinus edodes*: its application as a host defense Potentiador. **International Journal of Oriental Medicine**. v. 17, n. 2, p 57-77, 1992.

GOTTLIEB, A. M.; WRIGHT, J. E. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. **Mycological Research**. v.103, n.6, pp. 661-673,1999.

GROVE, D.C.; RANDALL, W.A.. **Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual (antibiotics monographs, 02)**. New York: Medical Encyclopedia. 1955.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M.J.; FERREIRA, I.C.F.R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**. v.32, p. 152-156, 2010.

HAMID, A.A.; AIYELAAGBE, O.O.; USMAN, L.A. Essential oils: its medicinal and pharmalogical uses. **International Journal of Current Research**. v.3, n.2, p. 86-98, 2011.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**. 3th ed., London: Chapman & Hall, p. 288, 1998.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**. v. 5, p. 294-300, 2000.

HARRIGAN, G.G.; AHMAD, A.; BAJ, N.; GLASS, T.E.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. **Journal of Natural Products**. v. 56, n. 6, p. 921-925, 1993.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**. v.95, n.6, p.641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research,** v.105, n.12, p.1422-1432, 2001.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97,n. 7, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000700017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em:15 Ago. 2010.

HOUCINE, B.; BOUAJILA, J.; RHOUMA, A.; SAVAGNAC, A.; ROMDHANE, M. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.89, n. 8, p. 1292-1297, 2009.

HSIN, I.L.; OU, C.C.; WU, T.C.; JAN, M.S.; WU, M.F.; CHIU, L.Y.; LUE, K.H.; KO, J.L. GMI, na immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum*, iduces autophagy in non-small cell lung câncer cells. **Autophagy**. v.7, n.8, p. 873-882, 2011.

HU, J.; YAN, F.; ZHANG, Z.; LIN, J. Evaluation of antioxidant and anti-fatigue activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.1, n.21, p. 4040-4044, 2012.

IMITIAJ, A; LEE, T.-S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. **World Journal of Agricultural Sciences**. v.3, n.3, p. 316-321, 2007.

JEONG, Y.T.; YANG, B.K.; JEONG, S.C.; KIM, S.M.; SONG, C.H. *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor na immunomodulating avtivity. **Phytotherapy Research**. v.22, p. 614-619, 2008.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M. Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds. In: CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; CHIU, S.W. (E.e.). **Mushroom biology and mushroom products**. Hong Kong: Chinese University Press, p.345–366, 1993.

JUNG, S.H.; LEE, Y.S.; SHIM, S.H.; LEE, S.; SHIN, K.H.; KIM, J.S.K; KIM, Y.S.; KANG, S.S. Inhibitory effects of *Ganoderma applanatum* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues **Phytotherapy Research**. v.19, p. 477-480, 2005.

JURGENS, A.; VILJOEN, A.M. (Ed.) Chemical diversity and biological functions of plants volatiles. **South African Journal of Botany**. v.76, p. 607-611, 2010

KARTAL, M.; KAIA, S; KURUCU, S; GC-MS analysis of propolis from two different regions of Turkey. Z. **Naturforsch**. v. 57, p. 905-909, 2002.

KASHIMOTO, N.; ISHII, S.; MYOJIM, Y.; USHIJIMA, M.; HAYAMA, M.; WATANABE, H. A water-soluble extract from cultured médium of *Ganoderma lucidum* (Reishi) mycelia attenuates the small intestinal injury induced by anti-cancer drugs. **Oncology Letters**. v.1, p. 63-68, 2010.

KIRK, P. M.; CANNOM, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 10 ed.. Wallingford, Oxon.: CAB international. 2008, p. 771.

KO, H.H.; HUNG, C.F.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Phytochemistry**. v.69, n.1, p. 234-239, 2008.

KOBAYASHI, N.; HIRAMATSU, A.; AKATSUKA, T. Purification and chemical properties of na inhibitor of plant vírus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 51, n. 3, p. 883-890, 1997.

KOBORI, M.; YOSHIDA, M.; OHNISHI-KAMEYAMA; SHINMOTO, H. Ergosterol peroxide from na edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cell. **British Journal of Pharmacology**. v.150, p. 209-219, 2007.

LARIYA, S.; RAJ, V.; MALVIYA, S.N. *Ganoderma lucidum* as a miraculous herb. **International Journal of Pharmaceutical Research**. v.1, n.3, p. 12-20, 2009.

LEE, I.; AHN, S.; KIM, B.; HWANG, E. ; KIM ,Y.S. Analysis of benzoic acid in quasi-drug drink using isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry. Bulletin of theKorean Chemical Societ, vol. 29, n.11, p. 2125-2128, 2008.

LI, F.; ZHANG, Y.; ZHONG, Z. Antihyperglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on streptozotociniinduced diabetic mice. **International Journal of Molecular Sciences**. v.12, p. 6135-6145, 2011.

LI, Z.; LIU, J.L.; ZHAO, Y. Possible mechanism underlying the antiherpetic activity of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum in vitro*. **Journal of Biochemistry an Molecular Biology**. vol. 38, n.1, p. 34-40, 2005.

LIN, Z. & LIN, Z. **Jun-cao technology: fungi cultivation with jun-cao**. 2 ed. Fujian Agricultural University Jun-Cao Research Center: Fuzhou, 1997. 130p.

LIN, Z.B.; ZHANG, H.-A. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.25, n.11, p. 1387-1395, 2004.

LINDEQUIST, U. NIEDERMEYER, T.H.J.; JULICH, W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complemenrary and Alternative Medicine**, vol. 2, n. 3, p. 285-299. 2005. Disponível em: <www.ecam.oxfordjournals.org>. Acesso em: 28 de mai. 2008.

LIU, C.; ZHAO, F.; CHEN, R.Y. Anovel alkaloid from the fruiting bodies of *Ganoderma sinens* Zhao, Xu *et* Zhang. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 197-199, 2010.

LIU, D.; HU, Z.; LIU, Z.; YANG, B.; TU, W.; LI, L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*. **Journal of Nanjing Medical University**. v.23, n. 3, p 168-172, 2009.

LIU, J; TAMURA, S.; KURASHIKI, K.; SHIMIZZU, K.; NODA, K.; KONISHI, F. KUMAMOTO, S.; KONDO, R. Anti-androgen effects of extracts and compounds from *Ganoderma lucidum*. **Chemistry and Biodiversity**. v.6, p. 231-243, 2009.

LIU,, J.Q.; WANG, C.F.; PENG, X.R.; QIU, M.H. New alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. **Natural Products and Bioprospecting**. v.1, p. 93-96, 2011.

LIU, W.J.; GAO, J.L.; GUAN, J.; QIAN, Z.M.; FENG, K.; LI, S.P. Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of *Ganoderma* on tumor cell lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p. 3087-3093, 2009.

LOUGUEIRO-LEITE, C., GROPOSO, C., HALMENSCHAGER, M.A. Species of *Ganoderma*Karsten in subtropical área (Santa Catarina State, southern Brazil). **Ihernigia.** v.1, p. 135-139, 2005.

LV, G.P.; ZHAO, J.; DUAN, J.D.; TANG, Y.P.; LI, S.P. Comparison of sterls and fatty acids in two species of *Ganoderma*.**Chemistry Central Journal**. v.6, n. 10, 2012. Disponível em: < http://journal.chemistrycentral.com/content/6/1/10>.Acesso em: 35 de jan. 2013.

MA, J.Q.; LIU, C.M.; QIN, Z.H.; JIANG, J.H.; SUN, Y.Z. *Ganoderma applanatum* terpenes protect mouse liver against benzo(α)pyren-induced oxidative stress and inflammation. **Enviromental Toxicology and pharmacology**. v.31, p. 460-468, 2011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAU, J.L.; LIN, H.C.; CHEN, C.C. Non-volatile taste components of several medicinal mushrooms. **Food Research International**. v. 34, p. 521-526, 2001.

MHASKE, S.B.; ARGADE, N.P. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. **Tetrahedron**. n.62, p. 9787-9826, 2006.

MILES, P.G. & CHANG, S.T. **Mushroom biology: concise basics and current developments**. Singapore: World Scientific, 1997. 194 p.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA,T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA,A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “himemtsutake,” the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry.** v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MOHAMMED, A.; ADELAIYE, A.B.; BAKARI, A.G.; MABROUK, M.A. Anti-diabetic and some haematological effects of ethylacetate and n-butanol fractions of *Ganoderma lucidum* aqueous extract in alloxan – induced diabetic wistar rats. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. v.1, n. 12, p. 530-535, 2009.

MONCALVO, J.-M.; WANG, H.-F.; HSEV, R.-S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. **Mycology Research**. v.99, n.12, p. 1489-1499, 1995.

MONCALVO, J.-M. Molecular Systematics of *Ganoderma:* What Is Reishi? **International Journal of Medicinal Mushrooms***,* v. 7, n. 3, p. 353-354. 2005.

MOHAMMED, A.; ADELAIYE, A.B.; BAKARI, A.G.; MABROUK, M.A. Anti-diabetic and some haematological effects of ethylacetate and n-butanol fractions of *Ganoderma lucidum* aqueous extract in alloxan-induced diabetic Wistar rats. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 12, p. 530-535. 2009. Disponível em: <www.academicjournals.org/ijmms >. Acesso em: 30 jun. 2010.

MOHSIN, M., NEGI, P., AHMED, Z. Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (W.Curt. Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 6, p. 535-544, 2011.

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

MOTHANA, R.A.A.; JANSEN, R.; JULICH, W.D.; LINDEQUIST, U. Ganomicinas A e B, new antimicrobial farnesyl hidroquinones from the Basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 416-418, 2000.

MURRILL, W. A. The Polyporaceae of North America. I. The Genus *Ganoderma*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Vol. 29, n. 10, p. 599-608, 1902.

NCUBE, N.S.; AFOLAYAN, A.J.; OKOH, A.I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant oringin: current methods and future trends. **African Journal of Biotecnology**. v.7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

NIEDERMEYER, T.H.J.; LINDEQUIST, U.; MENTEL, R.; GORDES, D.; SCHMIDT, K.T.; LALK, M. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of Natural Products**. v.68, p. 1728-1731, 2005.

NILES, A.L.; MORAVEC, R.A.; RISS, T. L. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opnion on Drug Discovery**. v.3, n. 6, p. 655-669, 2008.

NILES, A.L.; MORAVEC, R.A.; RISS, T.L. *In vitro* viabililyty and Cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. **Current Chemical Genomic**. v. 3, p. 33-41, 2009.

NIU, X.M.; LI, S.H.; SUN, H.D.; CHE, C.T. Prenylated phenolics from *Ganoderma fornicatum*. **Journal of Natural Products**, v.69, p. 1364-1365, 2006.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.O.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, n.2, p. 05-08, 2003.

OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revisata Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p. 301-307, 2008.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para Avaliação e Pesquisa da Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 102-107, 2007.

PATERSON, R.R.M. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**. v.67, p. 1985-2001, 2006.

PENNGELLY, A. **The constituents of medicinal plants – na introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. 2 th ed. Crows Nest – Australia: Allen & Unwin, 2004. 172 p.

PEREIRA JR, J.A.S.; CORREIA, M.J.; OLIVEIRA, N.T. Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Strain grown in media containig corboximetilcellulose or microcrystallline cellulose. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n.3, p 333-337, 2003.

PETSKO, G.A. For medicinal purposes. **Nature**, v.384, p. 7-9, 6604 suppl., 1996.

PERNAMBUCO (Estado). Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Plano de manejo fase I – Estação Ecológica de Caetés**. Recife, 2006. 63 p.

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.

QUERESHI, S.; PANDEY, A.K.; SANDHU, S.S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. **People's Journal of Scientific Research**, vol. 3, n. 1, p. 09-14, 2010.

RAHAR, S.; SWAMI, G.; NAGPAL, N.; NAGPAL, M.A.; SINGH, G.S. Preparation, characterization, and biological properties of β-glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**. v.2, n.2, p.94-103, 2011.

RIAHI, H.; SARGAZI, F.; SHEIDAI, M.. Inseticidal activities of ling zhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoro myceidae) extract against *Tribolium castaneum* and *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Medicinal Mushrooms.** v.11, n.3, p. 329-334, 2009.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia.** 1. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.

RODRIGUES, S. B.; JABOR ,I. A. S.; MARQUES-SILVA G. G.; ROCHA, C. M. C. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 513-517, 2003.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v.6, n.3, p. 317-320, 2003.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L.. Screening of brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.

RUBEL, R. Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, UFPR, Curitiba, 2006.

RUSSOMANO, O.M.R.; COUTINHO, L.N; KRUPPA, P.C.; PORTO, B.H.C. *Ficus elastica*: novo hospedeiro de *Ganoderma aplannatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 74, n. 1, p. 59-62, 2012.

RYVARDEN, L. Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. **Mycologia**. v. 92, p. 180-191, 2000.

RYVARDEN, L. Neotropical polypores, part 1. **Synopsis Fungorum**. v.19, p.69-102, 2004.

SADAVA, D.; STILL, D.W.; MUDRY, R.R.; KANE, S.E. Effect of *Ganoderma* on drug-sensitive and multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cell. **Cancer Latters**. v.277, p. 182-189, 2009.

SALTARELLI, R.; CECCAROLI, P.; LOTTI, M.; ZAMBONELLI, A.; BUFFALINI, M.; CASADEI, L.; VALLORANI, L.; STOCCHI, V. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from central Italy. **Food Chemistry**. v. 116, p. 143-151, 2009.

SANODIYA, B.S.; THAKUR, G.S.; BAGHEL, R.K.; PRASSAD, G.B.K.S.; BISEN, P.S. *Ganoderma lucidum*: a potent phasmacological macrofungus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v.10, p. 717-742, 2009.

SATO, N.; ZHANG, Q.; MA, C-M.; HATTORI, M. Anti-human Immunodeficiency Virus-1 Protease Activity of New Lanostane-Type Triterpenoids from *Ganoderma sinense.* ***Chemical Pharmacology Bulletin***, v. 57, n. 10, p.1076-1080, 2009.

SHARIFI, A.; KHORAMROOZ, S.S.; JAHEDI, S.; KHOSRAVANI, S.A. Screning of antimicrobial activity of sesquitepenoid crude extract of *Ganoderma*. **Life Science Journal**. v.9, n.4, p.2516-2519, 2012 a.

SHARIFI, A.; NASERI, M.H.; JAHEDI, S; SARKARY, B.; ROOZ, S.S.K.; KHOSRAVANI, S.M.; KALANTAR, E. Antimicrobial potentials of crude fractions of polysaccharides of *Ganoderma* spp. **African Journal of Microbiology Research**. v.6, n.39, p. 6817-6821, 2012 b.

SILVA, G. T.; GIBERTONE, T.B. Aphyllophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da região metropolitana do Recife, PE, Brasil. **Hoehnea**. v. 33, n.4, p. 533-543, 2006.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis, RJ: Eventos, 1999.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R(org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2010. 821p.

SMÂNIA, E.F.A; MONACHEB, F. D.; SMANIA-JR, A.; YUNESC, R.A.: CUNEOA, R.S. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare.* **Fitoterapia**, v.74, p. 375-377, 2003.

SMITH, B.J.; SIVASITHAMPARAM, K. Morphological studies of *Ganoderma* (Ganodermataceae) from Australasian and Pacific regions. **Australian Systematic Botany**. v.16, p. 487-503, 2003.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. **Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments.** U.K. : University of Strathclyde – Cancer Research. 234 p., 2002.

SONÁGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSAN, V.L. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A; PETROVICK, P. R (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2010. 821p.

SONE, Y.; OKUDA, R.; WADA, N., KISHIDA, E.; MISAKI, A. Structures and antitumor activites of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. **Agricultural Biology and Chemistry**. v.49, p. 2541-2653, 1985.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W.; SAITO, M.L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew.**Journal of Plant Diseases and Protection**. v.110, n.4, p. 383-393, 2003.
TAN, J.W.; DONG, Z.J.; LIU, J.K.; HU, L. A new sesquiterpenoid from *Russula* lepida. **Acta Botanyc Sinica**. vol. 43, n.3, p. 329-330**.** 2001.

TORRES-TORRES, M.G., L. GUZMÁN-DÁVALOS. The morphology of *Ganoderma* species with laccate surface. ***Mycotaxon***. v. 119, p.201-216, 2012.

TORRES-TORRES, M.G., L. GUZMÁN-DÁVALOS; GUGLIOTTA, A.M. *Ganoderma in* Brasil: known species and new records. ***Mycotaxon***. v. 121, p. 93-132, 2012.

TSENG, Y.H.; MAU, J.L. Antioxidant properties of cold water extracts from *Ganoderma tsugae*. **Fungal Science**. v.22, n. 1, p. 13-23, 2007.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; RAMOS, A. Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. Truffles. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 26, p. 177-182, 2012.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 303 p.

WAGNER, H..; BAUER, R.; MELCHART, D.; XIAO, P.G.; STAUDINGER, A. (ee.). **Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines: Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs**. v.1 e v.2, 2 ed. New York: Springer, 2011. 1024p.

WANG, C.L.; LU, C.Y.; PI, C.C.; ZHUANG, Y.J.; CHU, C.L.; LIU, W.H.; CHEN, C.J. Extracellular polysaccharides produced by *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage activation via multiple pattern-recognition receptors. **Complementary and Alternative Medicine**. v.12, p. 119, 2012. Disonível em: <www.biomedcentral.com/1472-6882/12/19>. Acesso em: 30 dez. 2012.

WANG, D.M.; WU, S.H.; SU, C.H.; PENG, J.T.; SHIH, Y.H.; CHEN, L.C. *Ganoderma multipileum*, the correct name for '*G. lucidum*' in tropical Asia. **Botanical Studies.** v.50, p. 451-458, 2009.

WANG, J.H.; ZHOU, Y.J.; ZHANG, M.; KAN, L.; HE, P. Active lipids of Ganoderma lucidum spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways. **Journal of Ethnopharmacology.** v.139, p. 582– 589, 2012.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and biotecnology**. v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P. Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v.12, n.1, p. 1–16, 2010

WEI, W.; ZHENG, L.; YU, M.; JIANG, N.; YANG, Z.; LUO, X. Anti-fadigue activity of extract form the submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* using *Radix astragali* as substrate. **Journal of Animal & Plant Sciences**. v.6, n. 3, pp. 677-684. 2010.

WU, T.S.; SHI, L.S.; KUO, S.C. Citotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes. **Journal of Natural Products**. v.64, p. 1121-1122, 2001.

XU, K.; LIANG, X.; GAO, F.; ZHONG, J.; LIU, J. Antimetastatic effect of ganoderic acid T *in vitro* through inhibition of cancer cell invasion. **Process Biochemistry**. v.45, p. 1261-1267, 2010

YANG, J.J.; YU, D.Q. Synthesis of ganoderma alkaloid A and B. **Yao Xue Xue Bao**. v.25, n.7, p.555-559, 1990.

YANG, X.J.; LIU, J; YE, L.B.; YANG, F.; YE, L; GAO, J.R.; WU, Z.H. **World Journal of Gastroenterology** v.7, n.9, p. 1379-1385, 2006.

ZANG, Z.M.; WU, W.W.; LI, G.K. A GC-MS study of the volatile organic composition of straw and oyster mushrooms during maturity and its relations to antioxidant activity. **Journal of Chromatographic Science**. v.46, p. 690-696, 2008.

ZHOU, Y.Q.; YANG, X.T.; MI, K.; FENG, H.Q.; LI, X.Q.; YANG, Q.Y. A compararison study of the anticancerous activity and mechanism of ethanolic extracts from different *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd strains. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v.7, p. 488-489, 2005.

ZJAWIONY, J.K. Biollogically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Productes**, v. 67, n. 02, p. 300-310, 2004.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO

Latin American Journal of Pharmacy
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. **32** (7): 996-1003 (2013)

Regular Article
Received: May 5, 2013
Revised version: June 27, 2013
Accepted: July 2, 2013

Contribution to Pharmacognostic and Morphoanatomical Studies, Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Ganoderma parvulum* Murrill (Basidiomycota, Polyporales, Ganodermataceae)

José A. de S. PEREIRA-JR [1], Douglas P. RODRIGUES [2], Rômulo C. PEIXOTO-FILHO [2], Isla V. G. A. BASTOS [1], Gibson G. de OLIVEIRA [1], Janete M. ARAÚJO [1] & Sebastião J. MELO [1]*

[1] *Departamento de Antibióticos* & [2] *Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Artur Sá s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brazil.*

SUMMARY. **It has been verified that morphoanatomical analysis assures accurate identification of *Ganoderma parvulum* and that the microscopic study of the powder provides elements for drug certification. Mycochemical screening demonstrates a wealth of triterpenes and steroids, which explains the higher activity of the extract in ethyl acetate compared to methanolic. The particle size of the powder indicated that it was a moderately coarse powder. Total ash content was 1.67 ± 0.14% and loss on drying was 13% ± 0.07, within the levels found for the genus. Both antibacterial and cytotoxic activity were only observed in the ethyl acetate extract, which showed moderate activity against gram positive strains and weak against *Klebsiella pneumoniae*. The cytotoxic activity in a single dose of 50 µg / mL of extract was 71.94 % ± 2.04 against lineage cells HT29 and 90.02 % ± 2.17 against lineage cells HEP-2.**

INTRODUCTION

The empirical use of fungi by humans is fairly old, for example in the use of yeast in fermentation and macrofungi in cooking and medicine. Macrofungi are fungi that have macroscopic structures and are treated indistinctly as mushrooms. According to Miles & Chang [1], the mushroom is a macro fungus with a distinctive fruiting body, which can be either epigeous or hypogeous and large enough to be seen with naked eye and usually picked by hand. Several groups of fungi take the form of mushrooms, mainly Basidiomycetes and Ascomycetes, with some forms traditionally used in medicine in Asian countries and more recently in the West [2]. Pegler [3] used the term "basidioma" for distinguishing the mushrooms produced by Basidiomycetes.

The use of mushroom of the genus *Ganoderma* P. Karst. (Polyporales, Ganodermataceae), can be considered the oldest recorded medical use, by Asians, mainly the Chinese for over 2000 years [4,5]. Wang *et al.* [6] reported the ethnopharmacological importance of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr) P. Karst., as the most representative specie of the genus, used, for instance, in the treatment of chronic liver disease, hypertension, hyperglycemia and cancer. Several medicinal activities have been proven for *G. lucidum,* such as anti-inflammatory, antitumoral, anti HIV, antibacterial, antiparasitic, blood pressure regulation, antidiabetic, immunomodulatory, tonic renal function, hepatoprotective, nerve tonic, among others [7].

Many taxonomic mistakes have been associated with *Ganoderma lucidum* and related species, mainly those species with a lacquered surface, with the species type from Europe, differing phylogenetically, in morphological and molecular characteristics, from those found in Chinese and other Asian locations, and traditionally used for over 2000 years [8,9]; many papers and patents have called other species *G. lucidum* because of this confusion [10,11]. Regardless of taxonomic differences, it is important to note that these fungi, belonging to the group

KEY WORDS: Antibacterial, Citotoxicity, *Ganoderma parvulum,* Morphoanatomical, Total ash.

* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* melosebastiao@yahoo.com.br

ISSN 0326-2383

known as the "*Ganoderma lucidum* complex", have several characteristics similar to *G. lucidum*, which may present the same economic and pharmacological potential. An example of this confusion is *Ganoderma parvulum* Murrill, which is a species of *Ganoderma* with a lacquered surface that occurs in neotropical forests, and has been historically confused with *G. lucidum*, a species restricted to temperate zones [12,13].

This work aimed to conduct pharmacomycological studies, characterizing *Ganoderma parvulum* Murrill as a fungal drug, providing physicochemical, morphological and anatomical data, as well as to evaluate the antibacterial and cytotoxic activities of its methanolic and ethyl acetate extracts, since this specie may represent potential economic and pharmacological uses that could be exploited in the Brazilian Northeast, without the need to cultivate an exotic species, while at the same time respecting and adding value to local biodiversity.

MATERIAL AND METHODS

Raw material

Ganoderma parvulum was collected in April 2012 in a zone of remnant rainforest belonging to the Caetés Ecological Reserve, located in the municipality of Paulista state of Pernambuco, in northeastern Brazil. The material was preserved according to Fidalgo & Bononi [14], remaining 72 h in an oven at 48 ± 2 °C. Some of the material was used for identification: voucher specimens were deposited in the Padre Camille Torrent Herbarium (URM), in the Mycology Department of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, as registration number URM 83795. Another part was destined towards morphoanatomical studies and for obtaining the extract.

Morphoanatomical studies

Morphological data was recorded regarding the staining, the stem length, diameter and pileus shape, thickness context, the presence deposition of resinous material, pore shape, number of pores per mm, and stratification [15,16].

Microscopic observations were made cutting the himenial and abhimenial surfaces freehand, as well as the context, using a stainless steel blade. The sections were placed in distilled water and then transferred to a microscope slide containing an aqueous solution of 0.5% potassium hydroxide. In some cases Amann blue or Melzer reagent was used [15,16].

Preparation of extracts

The mushrooms were dried in an oven at 48 ± 2 °C for 72 h and then ground using an electric mill; 500 g of the powder was subjected to maceration in 1500 mL of cold MeOH or ethyl acetate for 48 h, protected from light and shaken three times every 24 h. Then these solutions were filtered and the obtained solution was concentrated under reduced pressure at 40 °C using a rotatory evaporator. The residue obtained after total evaporation of the solvent, corresponded to the methanol extract or ethyl acetate of *G. parvulum*.

Preliminary mycochemical screening

The preliminary mycochemical screening of *G. parvulum* was obtained by analysis using thin layer chromatography, applying 10 µL aliquots of the extracts on silica gel chromatographic plates (Merck, Germany, Art. 105,554), using mobile phases and reagents suitable for the characterization of the classes of substances to be studied. The presence of the following secondary metabolites was anayzed: triterpenes and steroids [17,18], alkaloids [17], flavonoids, glycosides fenilpropanoids, cinnamic derivatives [17,19], mono., di- and sesquiterpenes [17].

Microscopic analysis of the powder

About 0.5 g of the powder was suspended in 20 mL of saline and observed directly under an optical microscope with or without Melzer reagent. The aimed was to identify different types of hyphae as well as other structures, such as the presence of basidiospores that might indicate at least the genus.

Particle size analysis

The granulometry of the powder was measured according to the method recommended by Allen *et al.* [20] and Brazilian Pharmacopoeia [21]. A Ber Fel® model 2499 sieving apparatus was used. The stainless steel mesh sieves had openings of 850, 425, 250, and 90 µm. 60 vibrations per min were applied for 15 min. Three repetitions were performed.

Loss on drying

The loss on drying was expressed in percentage, according to the Farmacopéia Brasileira [21]. Two g of powder were transferred immediately to a weighing bottle previously desiccated and weighed. Then, the weighing bottle, containing the sample, was weighed and transferred to the drying ovens. The sample was maintained

at a temperature of 105 °C for 2 h. After this period, the sample was cooled to room temperature in a desiccator and was then weighed again.

Total ash

The percentage of ash in relation to the air dried sample was expressed according to Farmacopéia Brasileira 21. Three g of the sample was weighed and then transferred to a preweighed crucible. The sample was maintained in a muffle furnace at a maximum temperature of 600 ± 25 °C until all the coal charcoal was eliminated. After this, the material was cooled in a desiccator and weighed.

Antibacterial activity

For antibacterial activity, strains were used from the collection of microorganisms of the Departamento de Antibioticos (UFPEDA), Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, represented by three Gram-positeve bacteria (*Staphylococcus aureus* 02 UFPEDA, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 and *Micrococcus luteus* UFPEDA 100) and two Gram-negative (*Escherichia coli* UFPEDA 224 and *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396.

The determination of the antibacterial activity of methanolic and ethyl acetate extracts of *G. parvulum* was performed by adapting the method described by Bauer *et al.* [22], where the bacteria were grown in a Mueller-Hinton broth at 37 °C and after 6 h of growth were plated into the medium to be tested. After growth, the bacteria were suspended in a physiological solution until turbidity reached 0.5 on the MacFarland scale, being inoculated on the surface of the medium contained in Petri dishes with 90 mm diameters. Next, filter paper discs (6 mm diameter) soaked with 20 µL of each extract (300 µg/disc) previously prepared for total evaporation of the solvents, were inserted in the cultures. Gentamicin was used as the standard (10 µg).

The plates were incubated at 37 °C for 24 h. After this period zones of inhibition could be observed. Antimicrobial activity was considered positive only for discs where the formation of halo was equal to or greater than 10 mm in diameter. For each treatment, three replicates were used.

Determining the minimum inhibitory concentration (MIC)

For the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), the technique of microdilution in 96 well plates with fund "U" was used [23]. To each well was added the Muller-Hinton medium, 5 µL of the bacterial inoculum, equivalent to 0.5 on the McFarland scale, The concentration of the tested extract (1000 to 7.8 µg/mL) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), making a final volume of 100 µL. The drug used for positive control was the gentamicin in a concentration of 40 µg/mL and the medium plus DMSO and the bacterial inoculum as the negative control. The plates were incubated at 37 ± 1 °C for 24 h when 15 µL of an aqueous solution of resazurin 0.01 % was added; and after 4 h of incubation, the reading was performed. Resazurin facilitates checking the presence of microbial growth, because the blue color indicates the absence of microbial growth, whereas a red color indicates the presence of the growth of viable cells. The whole experiment was performed in triplicate.

Cytotoxicity evaluation

The cytotoxic potential of methanol and ethyl acetate extracts of *G. parvulum* was evaluated by the MTT assay [24], compared with two human tumor cell lines: Hep-2 (human larynx epidermoid carcinoma) and HT29 (human colon carcinoma) obtained from the Cell Bank in Rio de Janeiro, Brazil. The cell lines were maintained in a DMEN medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, at 37 °C with 5% CO_2. Then the usual methodology was followed for determining the cytotoxic potential, where the cells were plated in 96-well plates at 1×10^5 cells/mL. The extracts were diluted in DMSO 0.1% and tested in quadruplicate in a 50 µg/mL concentration. After 72 h of incubation, 25 µL of MTT (5 mg/mL) was added. Three h later the MTT formazan product was dissolved in 100 mL DMSO and absorbance was measured at 595 nm. Doxorrubicine was used as the standard. The experiments were carried out in duplicate and they were analyzed according to their averages and standard deviations.

Statistical analysis

Results were expressed as mean values ± SD for each experimental group, and statistical analysis performed between groups by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test, considering a confidence interval of 95%, only for p values less than 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphoanatomical studies

Morphologically, we observed the laterally stipitate basidiomata (Fig. 1 A), with a lacquered surface, reddish brown in color, and a poroid himenial surface with 4 pores/mm, but according Ryvarden [25] this can vary between 3-6 pores/mm. However the crucial features highlighted by Ryvarden [25] and by Torres-Torres & Guzmán-Dávalos [16] are the presence of resinous material deposition lines and homogeneous context staining (Fig. 1 B).

Micromorphologically, the striking feature is the double-walled, ellipsoid, clear brown and ornate basidiosporo, with a length less than 10 µm (Fig. 2 A). Ryvarden [25] considers the species to have a length from 7.5 to 9.5 µm. Torres-Torres & Guzmán-Dávalos [16] emphasized the importance of the shape, color and size of basidiospores for identifying the species *Ganoderma* with a laccate surface.

The abhimenial surface is the crustohymeniderm type presenting clavate hyphae (Fig. 2 B). According Torres-Torres & Guzmán-Dávalos [16] the hyphal shape of the crustohymeniderm is more important than the length, since the latter can vary according to the maturity of basidiomata.

As mentioned, the most important species in the genus is *G. lucidum,* which is very similar to *G. parvulum*. The main differences between the two species are: size of the basidiomata which is smaller (5 x 10 x 1 cm) in *G. parvulum* [13] and larger (12-14 x 8-9 x 1.6) in *G. lucidum* [26,27]; the size of the basidioporo where *G. parvulum* does not exceed 9.5 µm in length [16] and *G. lucidum* is larger than 10 µm (7.5-8.5 µm x 11-13.5 µm) in length [28]; the hyphal system in *G. lucidum* is trimitic [26] and *G. parvulum* is dimitic. However, the main difference is the absence of a deposit of resinous material in *G. lucidum* [13,16,29].

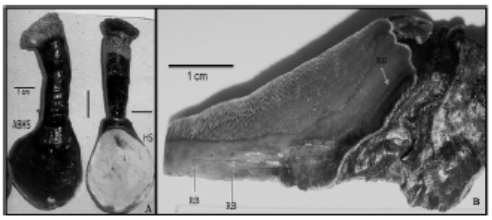


Figure 1. Morphological aspects of the *Ganoderma parvulum* Murrill. **A**. Abhimenial surfaces (ABHS) and himenial surface (HS); **B**. Longitudinal section of basidiomata, emphasizing homogeneous context and band deposition of resinous material (RB).

G. parvulum is also very similar to *G. perzonatum* and *G. weberianum* but both present a not fully homogeneous context, the basidiospores of G. perzonatum being greater than 10 µm and *G. werburianum* has basidiospores with subfree pillars [29].

Preliminary mycochemical screening

The preliminary mycochemical screening identified the presence of secondary metabolites that can be used as chemical markers, as well as having a relation to biological activity. In the methanol extract of *Ganoderma parvulum* the presence of mono-, sesqui- and diterpenes, triterpenes and steroids, phenylpropaneglycoside and flavonoids were detected. The preliminary mycochemical screening of the ethyl acetate extract revealed the presence of terpenoids (mono-, sesqui-, diterpenes, triterpenes and steroids). Terpenes and steroids isolated from several species of *Ganoderma,* particularly *Ganoderma lucidum,* demonstrated several biological activities, among which we highlight antimicrobial activity [1,30-33], antitumor [1,34-36], antioxidant [32],

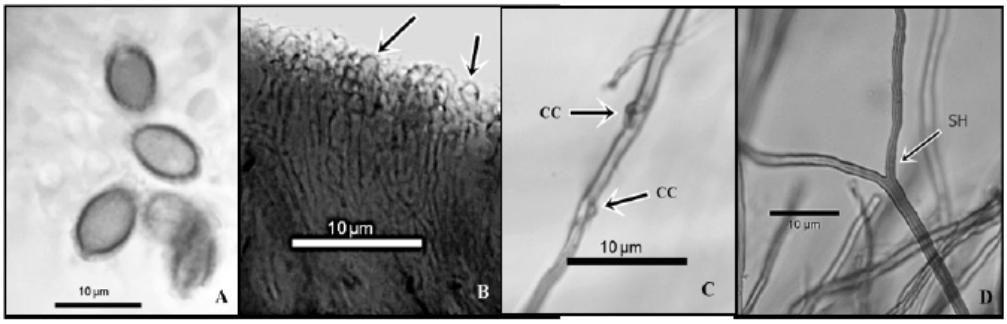


Figure 2. Micromorphology of *Ganoderma parvulum* Murrill. **A**. Basidiospores smaller than 10 mm, ellipsoid, double wall and ornate; **B**. crustohymeniderme detail, highlighting the clavadas hyphae extremities (arrows); **C**. generative hyphae of context presenting thin wall and clamp connection (CC); **D**. skeletal hyphae (SH) of the context presented thickened walls and branched extremity.

anti HIV [37,38], antiinflammatory [1,39], and antimetatastic [40], among others. The presence of flavonoids is also reported for *Ganoderma lucidum* [41], which can be related to antioxidant activity, in the same way as polyphenols as phenylpropaneglycoside [42].

Microscopic analysis of the powder

Microscopic analysis is classically used in verifying the originality of drugs. According to Youngken [43], microscopical methods of evaluating drugs are indispensable for the identification of small fragments of crude and powdered drugs and in the detection of their adulterants, for these possess few features other than color, odor and taste as clues to their identity.

With the microscopic analysis of the powder, it was possible to identify important elements in the characterization of the genus and to provide evidence of the species. Basidiospores were observed, characteristic of the genus *Ganoderma* (Fig. 3A) being smaller than 10 µm, as described for *Ganoderma parvulum*. Distinct fragments of skeletal hyphae (Figs. 3A and 3B) were also observed, but no generative hyphae were observed, which we believe to be related to the fragility of the hyphae, because they had already been observed in the mycelial mass (Fig. 3B), where they were still intact.

Particle size analysis

As to level of particle reduction, the medium diameter was 0.353 mm, indicating that the drug can be regarded as fine cut [44]. By the particle size distribution (Fig. 4), the powder can be classified as moderately thick [21]. The fact of being considered a fine cut even with a particle size distribution corresponding to a moderately thick powder can be explained by the ease of particle aggregation, due the filamentous constitution of the fungal mycelium.

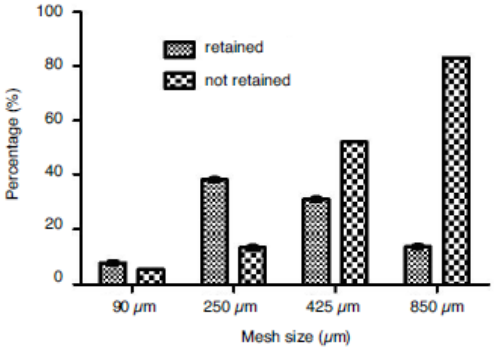


Figure 4. Particle size distribution of the powder obtained from *G. parvum*.

Loss on drying

The value of the loss on drying found was 13% ± 0.07, which according to Farias [45] would agree with the maximum humidity set in different pharmacopoeias, ranging between 8 and 14%. This is because excess moisture in raw materials allows the action of enzymes, which can cause degradation of the chemical constituents and also allows the growth of fungi and bacteria. The same author reports that the gravimetric method is simple to perform, determining the percentage of material volatilized after desiccation. The gravimetric method is indicated by the Brazilian Pharmacopoeia, when water is not the only volatile substance [21].

Total ash

For total ash, the value obtained was 1.67% ± 0.14, a value very close to those obtained by

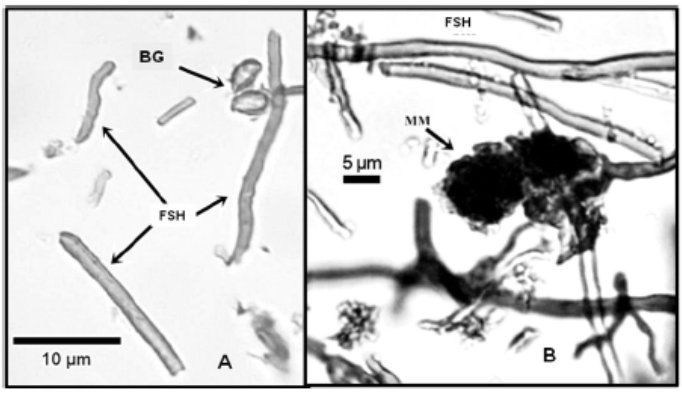


Figure 3. Relevant elements observed in the microscopic analysis of the powder of *Ganoderma parvulum* Murrill. **A**) Fragments of skeletal hiphae (FSH) and basidiospores of the genus *Ganoderma* (BG). **B**) mycelia mass and fragments of skeletal hiphae (FSH).

Microrganism	(EAEGP)	Gentamicin	MIC (µg/mL)
	Inibition Zone (mm ± SD)	Inibition Zone (mm ± SD)	
Staphylococcus aureus 02	12.00 ±1.00	20.00 ± 2.00	500
Bacillus subtilis 86	13.00 ± 1.00	31.5 ± 1.5	250
Micrococcus luteus 100	17.66 ± 2.08	32.5 ± 3.53	125
Escherichia coli 224	11.00 ± 1.15	18.33 ± 1.52	> 1000
Klebsiella pneumonia 396	12.00 ± 1.75	23.00 ± 1.00	1000

Table 1. Antibacterial activity and Minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethyl acetate extract of *G. parvulum* Murrill (EAEGP).

Mau *et al*. [46] for *Ganoderma lucidum*, which were between 1.77% ± 0.005 and 1.70 %. ± 0.3. The determination of the ash content enables verification of non-volatile inorganic impurities which may be present as contaminants [45].

Antibacterial activity

The methanol extract formed inhibition zones smaller than 10 mm on the bacteria tested, suggesting no inhibitory activity present. The ethyl acetate extract showed activity against the bacteria tested for both gram positive and gram negative (Table 1).

This activity is justified by the fact that the major compounds, represented by steroids, triterpenes and minor terpenes, are found in greater quantity in the ethyl acetate extract. Shekhar *et al*. [47] found similar results for *G. parvulum* demonstrating activity against bacteria of the same species as tested in this study. Smania [30] reports the activity of steroids and triterpenes of three species of *Ganoderma (G. applanatum, G. australe* and *G. annulare)*. Quereshi *et al*. [48] demonstrated the activity of extracts *G. lucidum* in ethanol, methanol, acetone and water against gram positive and gram negative, and the best activity was presented by acetone extract, the fraction that contained the most terpenoids and steroids. However, when considering the minimum inhibitory concentration (Table 1), it is clear that the effectiveness of the activity is considered moderate only against gram positive bacteria, according to the classification described by Holetz *et al*. [49], where extracts displaying an MIC over 1000 µg/mL were considered inactive; from 500 to 1000 µg/mL the antimicrobial activity was weak; from 100 to 500 µg/mL the antimicrobial activity was moderate and less than 100 µg/mL, the antimicrobial activity was good.

Tumor Lineage	Mean (IC%) MEGP	Mean (IC%) EAEGP
HT29	4.73 ± 6.45	71.94 ± 2.04
HEP-2	16.27 ± 4.77	90.02 ± 2.17

Table 2. Percent inhibition of cell growth (IC%) of the three tumor cell lines tested in a single dose (50 µg/mL) of *Ganoderma parvulum* Murrill. MEGP: Methanol extract from *Ganoderma parvulum;* EAEGP: ethyl acetate extract of *G. parvulum*.

Cytotoxic potential

The ethyl acetate extract of *G. parvulum* (EAEGP) showed cytotoxic activity against the tumor cell line Hep-2 and HT29 (Table 2) using a single dose of 50 µg/mL. However, according to Fouche *et al*. [50], it can only be said that there is cytotoxic activity in extracts tested in single doses of at most 100 g/mL, if the percentage of inhibition of the proliferation in two or more cell lineages is equal to or larger than 75%. The cytotoxic effects on cell HT29 of edible and medicinal mushrooms extracts is mainly due to the action of the ergosterol peroxide and ergosterol [51]. Wu *et al*. [52] reported the activity of several triterpenes in different tumor cell lines, which also justifies the high activity of the ethyl acetate extract of *G. parvulum*.

CONCLUSIONS

Morphoanatomic characteristics such as basidiomata size, presence of deposition line of resinous material in context; size, shape and ornamentation of the basidiospores; hyphal system, form of hyphae of the crustohymeniderme, provide sufficient information for a reliable identification of *Ganoderma parvulum* Murrill. The skeletal hyphae and basidiospores provide grounds for identification of *Ganoderma* powder, while the size of less than 10 µm of the ba-

sidiospores, provides strong evidence of the species *G. parvulum*. The value found for total ash of the *G. parvulum* is in agreement with values reported for the *Ganoderma* species. The ethyl acetate extract of *G. parvulum* showed moderate activity against gram positive bacteria and weak against *Klebsiella pneumoniae*. The ethyl acetate extract of *G. parvulum* promoted an inhibition of the proliferation of the tumoral cell line Hep-2, but further experiments against other tumor cell lines, including varying the concentration until 100 µm/mL are required.

Acknowledgments. The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support awarded to J.A. de S. Pereira Junior; the Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos de Pernambuco (CPRH), all linked to Estação Ecológica de Caetés (ESEC-Caetés) and the Companhia Independente de Policiamento do Meio Ambiente (CIPOMA) making it possible to collect the mushrooms.

REFERENCES

1. Miles, P.G. & S.T. Chang (1997) *Musbroom biology: concise basics and current developments*. Singapore: World Scientific.
2. Lindequist, U, T.H.J. Niedermeyer & W.-D. Julich (2008) *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2**: 285-99.
3. Pegler, D.N. (1996) *Mycol. Res.* **100**: 129-42.
4. Chen, A.W. & P.G. Miles (1996) Biomedical research and the application of the mushroom nutriceuticals from *Ganoderma lucidum*, in *Musbroom Biology and Musbroom Products* (D.J. Royse, ed.). University Park, PA: The Pennsylvania State University
5. Chang, S.T. & J.A. Buswell (1996) *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 473-6.
6. Wang, J.H., Y.J. Zhou, M. Zhang, L. Kan & P. He (2012) *J. Ethnopharmacol.* **139**: 582-9.
7. Smith, J. E., N.J. Rowan & R. Sullivan (2002) *Medicinal musbrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. U.K.: University of Strathclyde – Cancer Research.
8. Moncalvo, J.M., H.F. Wang & R.S. Hsev (1995) *Mycol. Res.* **99**: 1489-99.
9. Wang, D.M., S.H. Wu, C.H. Su, J.T. Peng, Y.H. Shih & L.C. Chen (2009) *Bo Stud. J.* **50**: 451-8.
10. Moncalvo, J.M. (2005) *Int. J. Med. Musbrooms* **7**: 353-4.
11. Wasser, S. P. (2010) *Int. J. Med. Musbrooms* **12**: 1-16.
12. Moncalvo, J.M. & L. Ryvarden (1997) *Fungiflora* **11**: 1-114.
13. Ryvarden, L (2000) *Mycologia* **92**: 180-91.
14. Fidalgo, O. & V.L. Bononi (1989) *Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico*. São Paulo: Instituto de Botânica.
15. Silva, G.T. & T.B. Gibertoni (2006) *Hoenea* **33**: 533-43.
16. Torres-Torres, M.G. & L. Guzmán-Dávalos (2012) *Mycotaxon* **119**: 201-16.
17. Wagner, H. & S. Bladt (1996) *Plant drugs analysis. A thin layer chromatography atlas*. 2nd ed., Munich, Springer.
18. Harbone, J.B. (1998) *Phytochemical Methods*. 3rd ed., London, Chapman & Hall.
19. Neu, R. (1956) *Naturwissenschaften* **43**: 82.
20. Allen, L.V., N.G. Popovich & H.C. Ansel (2007) *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. Porto Alegre: Artmed.
21. Farmacopeia Brasileira 2010. 5th ed., Parte II, Brasília: Editora da Anvisa.
22. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Turk (1966) *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-6.
23. Santos, S.C., F.S. Ferreira, A. O. Damião, J.C. Rossi-Alva & L.G. Fernandez (2010) *Rev. Bras. Farmacogn.* **20**: 124-9.
24. Mossman, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
25. Ryvarden, L. (2004) *Synopsis Fungorum* **19**: 1-229.
26. Brosle, S., K. Ranadives, G. Bapat, S. Garad & J. Vaidya (2010) *Mycosphere* **1**: 249-62.
27. Melo, I. (1986) *Int. J. Mycol. Lichenol.* **2**: 183-204.
28. Lougueiro-Leite, C., C. Groposo & M.A. Halmenschager (2005) *Iberigia* **1**: 135-9.
29. Torres-Torres, M.G., L. Guzmán-Dávalos & A.M. Gugliotta (2012) *Mycotaxon* **121**: 93-132.
30. Smania, E.F.A. (2003) *Sterols and triterpenes isolated from Ganoderma species Karrsten and its antimicrobial activity*. Florianópolis. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Catarina
31. Zjawiony, J.K. (2004) *J. Nat. Prod.* **67**: 300-10.
32. Fan, L., H. Pan, A. T. Soccol, A. Pandey & C.R. Soccol (2006) *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 303-11.
33. Kamra, A. &, A.B. Bhatt (2012) *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**: 359-62.
34. Pengelly, A. (2004) *The constituients of medicinal plants – An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. 2nd ed. Crows Nest – Australia: Allen & Unwin.
35. Zhou, Y.-Q., X.-T. Yang, K. Mi, H.-Q. Feng, X.-Q. Lin & Q.-Y. Yang (2005) *Int. J. Med. Mushrooms* **7**: 488-9.
36. Fan, L., H. Pan, A.T. Soccol, A. Pandey & C.R. Soccol (2006) *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 303-11.

37. Pengelly, A. (2004) *The constituients of medicinal plants – An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. 2nd ed. Crows Nest – Australia: Allen & Unwin
38. Sato, N., Q. Zhang, C.-M. Ma & M. Hattori (2009) *Chem. Pharm. Bull.* **57**: 1076-80.
39. Ko, H.H., C.F. Hung, J.P. Wang & C.N. Lin (2008) *Phytochemistry* **69**: 234-9.
40. Xu, K., X. Liang, F. Gao, J. Zhong & J. Liu (2010) *Process Biochem.* **45**: 1261-7.
41. Mohammed, A., A.B. Adelaiye, A.G. Bakari & M.A. Mabrouk (2009) *Int. J. Med. Sci.* **1**: 530-5.
42. Mohsin, M., P. Negi & Z. Ahmed (2011) *Int. J. Med. Mushrooms* **6**: 535-44.
43. Youngken, H.W. (1943) *Text book of pharmacognosy*. 5 ed. Philadelphia, USA: The Blakiston Company.
44. Sonáglio, D., G.G. Ortega, P.R. Petrovick & V.L. Bassan (2010) *Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos, in Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento* (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, orgs.). Editora da UFRGS, Porto Alegre.
45. Farias, M.R. (2010) *Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais, in Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento* (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick, orgs.). Editora da UFRGS, Porto Alegre.
46. Mau, J.-L., H.-C. Lin & C.-C. Chen (2001) *Food. Res. Int.* **34**: 521-6
47. Shekhar, R.B., B. Gauri, G.V. Jitendra, A.G. Sandhya & B. S. Hiralal (2010) *Int. J. Pharm. Life Sci.* **1**: 234-40.
48. Quereshi S., A.K. Pandey & S.S. Sandhu (2010) *Peo. J. Scient. Res.* **3**: 9-14.
49. Holetz, F.B., G. L. Pessini, N.R. Sanches, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura & B.P. Dias Filho (2002) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 1027-31.
50. Fouche, G., G.M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V.J. Maharaj & J. Senabe (2008) *J. Ethnopharmacol.* **119**: 455-461
51. Kobori, M., M. Yoshida, M. Ohnishi-Kameyama & H. Shinmoto (2007) *Brit. J. Pharmacol.* **150**: 209-19.
52. Wu, TS, L.S. Shi & S.C. Kuo (2001) *J. Nat. Prod.* **64**: 1121-2.