

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Gabriele Do Carmo

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS DOS FUNGOS *Phellinotus*
piptadeniae E *Pisolithus tinctorius***

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Gabriele do Carmo

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE METABÓLITOS DOS FUNGOS *Phellinotus piptadeniae* E *Pisolithus tinctorius***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Do Carmo, Gabriele
ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS DOS FUNGOS *Phellinotus*
piptadeniae E *Pisolithus tinctorius* / Gabriele Do
Carmo.- 2019.
149 p.; 30 cm

Orientador: Ademir Farias Morel
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

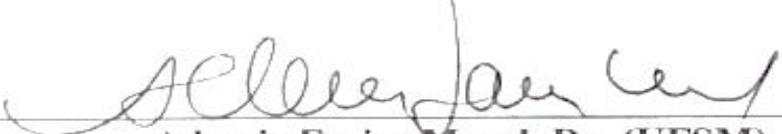
1. Metabólitos secundários 2. Atividade antioxidante
3. Atividade antimicrobiana I. Farias Morel, Ademir II.
Título.

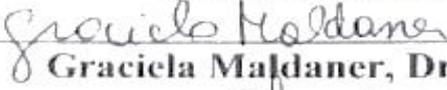
Gabriele do Carmo

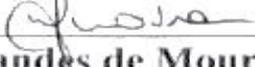
**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE METABÓLITOS DOS FUNGOS *Phellinotus piptadeniae*
E *Pisolithus tinctorius***

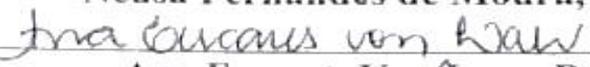
Tese apresentada ao Curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Química**.

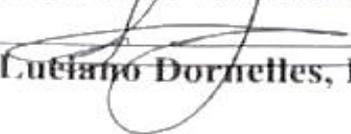
Aprovada em 29 de janeiro de 2019:


Ademir Farias Morel, Dr. (UFSM)
(Presidente-orientador)


Graciela Maldaner, Dra. (URCAMP)


Neusa Fernandes de Moura, Dra. (FURG)


Ana Eucares Von Laer, Dra. (UFSM)


Luciano Dornelles, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Náira e Jesus,
pelo apoio e incentivo.
E principalmente,
por não terem as mesmas oportunidades
que eu tive.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me dar forças para enfrentar os momentos de dificuldades, permitindo que eu seguisse em frente.

Ao Anderson, por estar comigo em mais essa jornada. Apoio, atenção e carinho prestados e segurar a minha mão nos momentos difíceis.

A minha irmã Danusa, que mesmo longe, de alguma forma manteve-se presente.

Ao meu orientador professor Dr. Ademir F. Morel, sou eternamente grata pela oportunidade e todos os aprendizados.

A minha querida Gisele, eterna IC, por toda a ajuda, carinho e amizade. Contigo não teve tempo ruim, chuva, sol, final de semana, à noite, tu estavas sempre disposta. Deixo aqui o meu muito obrigado, tua ajuda foi fundamental.

Aos amigos e ex-colegas de NPPN Mateus, Sabrina e Alessandra, obrigado pelo apoio de sempre.

Aos professores Dra. Graciela Maldaner, Dra. Neusa Fernandes de Moura, Dra. Ana Eucares e Dr. Luciano Dornelles por compor a banca de avaliação e pelas respectivas contribuições.

Ao professor Dr. Gilberto Coelho pela coleta e identificação do material fúngico.

A professora Dr. Ionara pela participação no exame de qualificação e convivência durante esses anos de grupo NPPN.

A Dra. Denise, pela ajuda durante a coleta do material, processo de qualificação, correções da tese, conselhos e todas as conversas trocadas. Muito obrigado!

A Dra. Liziane pela ajuda durante os cultivos de fungos.

Aos colegas de NPPN, Adri, Adriano, Fred, Janice, Janaína e Leonardo.

Aos colegas Adriana, Adriano e Frederico pelas análises de RMN.

Aos colegas de curso Guilherme, Ana e Lucila pelas análises de CG/ms e LC/ms.

Ao professor Dr. Robert Burrow pela análise de difração de raios-X.

A professora Dr. Cristina Nogueira e ao professor Dr. Gilson Rogério Zeni pelo empréstimo do leitor de placas.

Ao colega Fallon Siqueira pela execução das atividades antimicrobianas.

A colega Débora Gonçalves Farina, no auxílio da técnica dos antioxidantes totais.

Ao Dr. Ubiratan pelas análises de espectrometrias de massas de alta resolução.

A UFSM por ter me acolhido durante esses anos (Graduação, mestrado e doutorado) e por me proporcionar muitas vivências, entre elas pessoais e profissionais.

Ao Programa de pós-graduação em química e aos secretários do PPGQ Ademir e Valéria. Sempre solícitos em ajudar no que fosse preciso.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado.

Seremos sementes
(Autor: Bernardo Rodrigues da Silva)

Entre etapas evoluo
Edifico-me, elevo-me
Escadarias, estórias
Estrelas, ensinamentos

A água que por mim passa
A seiva que me alimenta
O rio que me transforma
O ser que em mim vigora

Semente seja santa
Suspira sua súplica
Sacia, sorria, sofia

E o caminho parece tão longo
Meus passos me levam em frente
A chegada é só um ponto no trajeto

RESUMO

ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS DOS FUNGOS *Phellinotus piptadeniae* E *Pisolithus tinctorius*

AUTORA: Gabriele do Carmo
ORIENTADOR: Dr. Ademir Farias Morel

Fungos Basidiomicetos são importantes organismos vivos que apresentam diversos compostos bioativos, os quais conferem potencial antimicrobiano, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatório. Inúmeros compostos e potencialidades desta classe de fungos ainda são desconhecidos. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo preparar frações de *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius*, isolar e identificar os metabólitos secundários e avaliar as atividades antimicrobianas das frações e compostos obtidos. A atividade antioxidante também foi avaliada para as frações da espécie *P. piptadeniae*. A investigação química de *Phellinotus piptadeniae* levou ao isolamento de cinco compostos, sendo dois triterpenos (peróxido do ergosterol (**D1**) e ergosterol (**D2**)), dois ésteres de cadeia longa (2-hidróxi-pentadecanoato de etila (**D6**) e 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (**D11**)) e um composto fenólico (derivado da hispidina (**D9**)) ao qual ainda não foi descrito na literatura. O acetato de ergosterol (D2a) foi obtido de uma modificação estrutural através da reação de acetilação do triterpeno D2. O estudo da espécie *Pisolithus tinctorius* levou ao isolamento de dois triterpenos do tipo lanostanos (pisolactona (**P180**) e lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**)), onde, o composto **P65** foi identificado como ainda não descrito na literatura. Além disso, um ácido de cadeia longa (ácido hexadec-5-enóico (**P1**)) e uma ceramida (**P56**), não encontrada anteriormente na espécie, também foram identificados. Todas as frações obtidas das espécies *P. piptadeniae* e *P. tinctorius* apresentaram ações antibacterianas e antifúngicas. Enquanto que, frente a micobactérias, apenas as frações hexânica e metanólica de *P. piptadeniae* e a fração acetato de etila de *P. tinctorius* foram efetivas nas concentrações testadas. Os triterpenos, derivados ácidos e composto fenólico foram ativos frente a bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos e micobactérias. As frações acetato de etila e metanólica da espécie *P. piptadeniae*, quando testada a sua capacidade antioxidante, apresentaram resultados promissores, com valores de CI_{50} , próximos ao padrão BHT.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

ISOLATION, STRUCTURAL DETERMINATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF METABOLITES FROM *Phellinotus piptadeniae* AND *Pisolithus tinctorius* FUNGI

AUTHOR: Gabriele do Carmo
ADVISOR: Dr. Ademir Farias Morel

Basidiomycete fungi are important living organisms that present several bioactive compounds, which have antimicrobial, antitumor, antioxidant, and anti-inflammatory potential. Several compounds and potentialities of this class of fungi are still unknown. Therefore, the objective of this work was to prepare fractions of *Phellinotus piptadeniae* and *Pisolithus tinctorius*, isolate and identify the secondary metabolites, and evaluate the antimicrobial activities of the fractions and compounds obtained. The antioxidant activity was just assessed for the fractions from *P. piptadeniae* species. The chemical investigation of *P. piptadeniae* led to the isolation of five compounds, two triterpenes (ergosterol peroxide (**D1**) and ergosterol (**D2**)), two long chain esters (pentadecanoic acid-2-hydroxy, ethyl ester (**D6**) and tetracosanoic-2-hydroxy, methyl ester (**D11**)), and a phenolic compound (derived from hispidin (**D9**)), which was not yet described. The ergosterol acetate (**D2a**) was obtained from an structural modification through the acetylation reaction of triterpene D2. The study of the *Pisolithus tinctorius* species drive to the isolation of two lanostane triterpenes (pisolactone (**P180**) and lanostane, 7,22-dien-3-ol, 24-methyl (**P65**)), where, P65 compound was identified as a novel metabolite in the literature. In addition, a long chain acid (5-hexadecenoic acid (**P1**)) and ceramide (**P56**), it was not in this species, were also identified. All fractions obtained from the species *P. piptadeniae* and *P. tinctorius* had antibacterial and antifungal actions. Whereas, against mycobacteria, only the hexanic and methanolic fractions of *P. piptadeniae* and the ethyl acetate fraction of *P. tinctorius* were effective at the concentrations tested. The triterpenes, acid derivatives and phenolic compound were active against bacteria (Gram-positive and Gram-negative), fungi and mycobacteria. The ethyl acetate and methanolic fractions of the *P. piptadeniae* species, when tested against their antioxidant capacity, showed promising results with IC₅₀ because their values were close to the BHT standard.

Key words: Secondary metabolites. Antioxidant activity. Antimicrobial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	2 e 3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	Di-terc-butil Metil Fenol
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI	Committee for Clinical Laboratory Standards
COSY	Correlated Spectroscopy
CI ₅₀	Concentração com 50% de Inibição
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
ddd	Duplo dupleto de dupleto
dq	Duplo quarteto
Dept 135	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAcOEt <i>Pt</i>	Fração Acetato de Etila <i>Pisolithus Tinctorius</i>
FAcOEt RS <i>Pp</i>	Fração Acetato de Etila Rio Grande do Sul <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
FAcOEt SC <i>Pp</i>	Fração Acetato de Etila Santa Catarina <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
FDA	Food And Drugs Administration
FHex <i>Pt</i>	Fração Hexânica <i>Pisolithus Tinctorius</i>
FHex RS <i>Pp</i>	Fração Hexânica Rio Grande do Sul <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
FHex SC <i>Pp</i>	Fração Hexânica Santa Catarina <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
FMeoH RS <i>Pp</i>	Fração Metanólica Rio Grande do Sul <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
FMeOH SC <i>Pp</i>	Fração Metanólica Santa Catarina <i>Phellinotus Piptadeniae</i>
Hex	Hexano
HIV	Vírus da imunodeficiência
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IC	Isolado clínico
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
m/z	Razão Massa Carga

MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> ₄	Metanol Deuterado
MHz	Mega Hertz
mL.	Mililitro
Nm	Nanômetros
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
NCTC	National Collection of Type Cultures
NPPN	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
OADC	Ácido oleico albumina dextrose catalase
pag.	Página
PF	Ponto de Fusão
Ppm	Parte por Milhão
<i>Pt</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>
<i>Pp</i>	<i>Phellinotus piptadeniae</i>
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RS	Rio Grande do Sul
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
s	Simpleto
SC	Santa Catarina
<i>sp.</i>	Espécie
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TTC	2,3,5-trifeniltetrazólio
UFSM	Universidade Federal De Santa Maria
UV	Ultravioleta
VRS	Vírus sincicial respiratório
δ	Deslocamento Químico
λ	Comprimento De Onda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos.....	49
Tabela 2 – Rendimento das frações neutras	54
Tabela 3 – Separação em CC da fração AcOEt SC (FAcOEt SC <i>Pp</i>) obtido de <i>P. piptadeniae</i>	56
Tabela 4 – Separação em CC da fração Hexânica (FHex <i>Pt</i>) obtido da espécie <i>Pisolithus tinctorius</i>	59
Tabela 5 – Separação em CC da fração Acetato de etila (FAcOEt <i>Pt</i>) obtido da espécie <i>Pisolithus tinctorius</i>	60
Tabela 6 – Peróxido do ergosterol (D1) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz).....	71
Tabela 7 – Ergosterol (D2) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz)	74
Tabela 8 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6) e 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (D11) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz)	77
Tabela 9 – Composto fenólico (D9) (MeOH- <i>d</i> ₄ , RMN de ¹ H a 600 MHz, RMN de ¹³ C a 150 MHz).....	88
Tabela 10 – Ácido hexadec-5-enóico (P1) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz).....	91
Tabela 11 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz).....	101
Tabela 12 – Pisolactona (P180) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz)	105
Tabela 13 – Ceramida (P56) (C ₅ D ₅ N, RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz)...	109
Tabela 14 – Acetato do ergosterol (D2a) (CDCl ₃ , RMN de ¹ H a 400 MHz, RMN de ¹³ C a 100 MHz).....	112
Tabela 15 – Antioxidantes totais de <i>Phellinotus piptadeniae</i>	113
Tabela 16 – Atividade antioxidante da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> frente ao DPPH.....	114
Tabela 17 – Concentração inibitória (CI ₅₀) das frações da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> .	114
Tabela 18 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal mínima (CLM) das frações da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> frente a bactérias.....	117
Tabela 19 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> frente a fungos	118
Tabela 20 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie <i>Pisolithus Tinctorius</i> frente a bactérias	119
Tabela 21 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie <i>Pisolithus Tinctorius</i> frente a fungos.....	119
Tabela 22 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> frente a bactérias	122
Tabela 23 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie <i>Pisolithus tinctorius</i> frente a bactérias	123
Tabela 24 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie <i>Phellinotus piptadeniae</i> frente a fungos.....	124
Tabela 25 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie <i>Pisolithus tinctorius</i> frente a fungos.....	125
Tabela 26 – Atividade antimicobacteriana das diferentes frações proveniente das extrações dos fungos <i>Phellinotus piptadeniae</i> e <i>Pisolithus tinctorius</i>	126
Tabela 27 – Atividade antimicobacteriana dos compostos isolados dos fungos <i>Phellinotus piptadeniae</i> e <i>Pisolithus tinctorius</i>	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécies-alvo deste trabalho	24
Figura 2 – Terpenos isolados da espécie <i>Coprinus radians</i>	26
Figura 3 – Triterpenos isolados de <i>Ganoderma lucidum</i>	26
Figura 4 – Bis-sesquiterpeno isolado de <i>Agrocybe salicicola</i>	27
Figura 5 – Triterpenos da espécie <i>Antrodia camphorata</i>	28
Figura 6 – Diterpeno isolado de <i>Pleurotus passeckerianus</i>	28
Figura 7 – Triterpenos isolados de <i>Astraeus hygrometricus</i> e <i>Polyporus ellisii</i>	29
Figura 8 – Alcaloides isolados de <i>Ganoderma sinense</i>	30
Figura 9 – Alcaloides de <i>Ganoderma lucidum</i>	30
Figura 10 – Alcaloide isolado no gênero <i>Boletus spp</i>	31
Figura 11 – Alcaloide isolado de <i>Fomitopsis sp</i>	31
Figura 12 – Compostos fenólicos isolados da espécie <i>Cyathus stercoreus</i>	34
Figura 13 – Compostos fenólicos isolados da espécie <i>Inonotus hispidus</i>	34
Figura 14 – Redução do DPPH via Radical Livre	48
Figura 15 – Fracionamento neutro do fungo <i>Phellinotus piptadeniae</i> RS	52
Figura 16 – Fracionamento neutro do fungo <i>Phellinotus piptadeniae</i> SC	53
Figura 17 – Fracionamento neutro do fungo <i>Pisolithus tinctorius</i>	53
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹ H expandido do peróxido do ergosterol (D1) em CDCl ₃ a 400 MHz	69
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹ H expandido do peróxido do ergosterol (D1) em CDCl ₃ a 400 MHz	70
Figura 20 – Espectro de RMN de ¹³ C do peróxido do ergosterol (D1) em CDCl ₃ a 100 MHz	70
Figura 21 – Espectro de RMN de ¹ H do ergosterol (D2) em CDCl ₃ a 400 MHz	72
Figura 22 – Espectro de RMN de ¹³ C do ergosterol (D2) em CDCl ₃ a 100 MHz	73
Figura 23 – Espectro de RMN de ¹ H do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6) em CDCl ₃ a 400 MHz	75
Figura 24 – Espectro de RMN de ¹ H expandido do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6) em CDCl ₃ a 400 MHz	76
Figura 25 – Espectro de RMN de ¹³ C do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6) em CDCl ₃ a 100 MHz	76
Figura 26 – Espectro de RMN de ¹ H do 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (D11) em CDCl ₃ a 400 MHz	78
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹³ C do 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (D11) em CDCl ₃ a 100 MHz	79
Figura 28 – Cromatograma de CLAE do Composto D9	81
Figura 29 – Cromatograma de CLAE do Composto D9	82
Figura 30 – Espectro de RMN de ¹ H expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	82
Figura 31 – Espectro de RMN de ¹ H expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	83
Figura 32 – Espectro de RMN de ¹³ C expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 150 MHz	83
Figura 33 – Espectro de RMN de ¹³ C do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 150 MHz	84
Figura 34 – Espectro de COSY expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	84
Figura 35 – Espectro de COSY do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	85
Figura 36 – Espectro de HSQC expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	85
Figura 37 – Espectro de HSQC expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	86
Figura 38 – Espectro de HMBC expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	86
Figura 39 – Espectro de HMBC expandido do Composto D9 em MeOH- <i>d</i> ₄ a 600 MHz	87
Figura 40 – Espectro de RMN de ¹ H do ácido hexadec-5-enóico (P1) em CDCl ₃ a 400 MHz	89

Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido hexadec-5-enóico (P1) em CDCl_3 a 100 MHz	90
Figura 42 – Espectro de COSY do ácido hexadec-5-enóico (P1) em CDCl_3 a 400 MHz	90
Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	93
Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	93
Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	94
Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 100 MHz	94
Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 100 MHz	95
Figura 48 – Espectro de RMN Dept 135 expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 100 MHz	95
Figura 49 – Espectro de COSY do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	96
Figura 50 – Espectro de COSY expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	96
Figura 51 – Espectro de HSQC do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	97
Figura 52 – Espectro de HSQC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	97
Figura 53 – Espectro de HSQC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	98
Figura 54 – Espectro de HMBC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	98
Figura 55 – Espectro de HMBC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65) em CDCl_3 a 400 MHz	99
Figura 56 – Espectrometria de massas de alta resolução do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65)	99
Figura 57 – Cromatografia gasosa do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65)	100
Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Pisolactona (P180) em CDCl_3 a 400 MHz	102
Figura 59 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Pisolactona (P180) em CDCl_3 a 400 MHz	103
Figura 60 – Espectro de RMN de ^{13}C da Pisolactona (P180) em CDCl_3 a 100 MHz	103
Figura 61 – Estrutura obtida por difração de raios-X da Pisolactona (representação ORTEP)	104
Figura 62 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Ceramida (P56) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz	107
Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Ceramida (P56) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz	107
Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C da Ceramida (P56) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 100 MHz	108
Figura 65 – Espectro de HSQC da Ceramida (P56) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz	108
Figura 66 – Espectro de HMBC da Ceramida (P56) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz	109
Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H do acetado do ergosterol (D2a) em CDCl_3 a 400 MHz	110
Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H expandido do acetado do ergosterol (D2a) em CDCl_3 a 400 MHz	111
Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C do acetado do ergosterol (D2a) em CDCl_3 a 100MHz	111

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1– Reação de acetilação do ergosterol	61
---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA RS DE <i>Phellinotus piptadeniae</i>	143
APÊNDICE B – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA SC DE <i>Phellinotus piptadeniae</i>	143
APÊNDICE C – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO METANÓLICA RS DE <i>Phellinotus piptadeniae</i>	144
APÊNDICE D – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO METANÓLICA SC DE <i>Phellinotus piptadeniae</i>	144
APÊNDICE E – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1).....	145
APÊNDICE F – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO 2-HIDRÓXI-PENTADECANOATO DE ETILA (D6).....	145
APÊNDICE G – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO 2-HIDRÓXI-TETRACOSANOATO DE METILA (D11).....	146
APÊNDICE H – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO ÁCIDO HEXADEC-5-ENÓICO (P1).....	146
APÊNDICE I – ESPECTRO DE HSQC DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl ₃ A 400 MHZ.....	147
APÊNDICE J – ESPECTRO DE HSQC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl ₃ A 400 MHZ.....	147
APÊNDICE K – ESPECTRO DE HMBC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl ₃ A 400 MHZ.....	148
APÊNDICE L – ESPECTRO DE HMBC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl ₃ A 400 MHZ.....	148
APÊNDICE M – ESPECTRO DE COSY DO ERGOSTEROL (D2) EM CDCl ₃ A 400MHZ.....	149

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. OBJETIVOS	21
1.1.1 Geral	21
1.1.2 Objetivos específicos	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E SISTEMÁTICOS	22
2.1.1 Família Hymenochaetaceae	22
2.1.2 Família Sclerodermataceae	24
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM BASIDIOMICETOS, FAMÍLIAS HYMENOCHAETACEAE E SCLERODERMATACEAE E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS	25
2.2.1 Basidiomicetos	25
2.2.1.1 Terpenos e esteróis	25
2.2.1.2 Alcaloides	29
2.2.1.3 Polissacarídeos	31
2.2.1.4 Compostos fenólicos.....	32
2.2.2 Família Hymenochaetaceae	34
2.2.3 Família Sclerodermataceae	37
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	38
2.3.1 Atividade antimicrobiana	38
2.3.2 Atividade antioxidante	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 MATERIAL FÚNGICO	44
3.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	44
3.2.1 Cromatografia em coluna (CC)	44
3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	44
3.2.3 Cromatografia em placa preparativa (CCDP)	45
3.2.4 Cromatografia Gasosa (CG), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)	45
3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)	45
3.3 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS	46
3.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H E ¹³ C	46
3.5 ANÁLISES POR ESPECTRÔMETRIA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	46
3.6 ANÁLISES POR ESPECTROFOTOMETRIA – FLUORÍMETRO	47
3.7 PONTO DE FUSÃO	47
3.8 POLARIMETRIA	47
3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	47
3.9.1 Método dos antioxidantes totais	47
3.9.2 Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo	47
3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	49
3.10.1 Padrões utilizados nos Ensaio Microbiológicos	50
3.10.2 Meios de culturas empregados	50

3.10.3 Preparação dos inóculos e determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo.....	50
3.10.4 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)	50
3.11 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES NEUTRAS	52
4.2 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES	54
4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS	54
4.3.1 Frações neutras de <i>Phellinotus iptadeniae</i>	55
4.3.1.1 Frações hexânicas	55
4.3.1.2 Frações acetato de etila	55
4.3.1.3 Frações metanólicas	58
4.3.2 Frações neutras de <i>Pisolithus tinctorius</i>	58
4.3.2.1 Fração hexânica.....	58
4.3.2.2 Fração acetato de etila.....	60
4.4 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS.....	61
4.4.1 Acetilação do ergosterol.....	61
4.5 DADOS DOS COMPOSTOS	62
4.5.1 Metabólitos isolados da espécie <i>Phellinotus iptadeniae</i>	62
4.5.1.1 Composto D1 – Peróxido do Ergosterol	62
4.5.1.2 Composto D2 – Ergosterol.....	63
4.5.1.3 Composto D6 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila.....	63
4.5.1.4 Composto D11 – 2-hidróxi-tetracosanoato de metila	64
4.5.1.5 Composto D9	64
4.5.2 Derivados do Ergosterol	65
4.5.2.1 Composto D2a – Acetato do ergosterol	65
4.5.3 Metabólitos isolados da espécie <i>Pisolithus tinctorius</i>	65
4.5.3.1 Composto P1– Ácido hexadec-5-enóico.....	65
4.5.3.2 Composto P65 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil.....	66
4.5.3.3 Composto P180 – Pisolactona.....	67
4.6 METABÓLITOS ISOLADOS.....	68
4.6.1 Composto D1– Péróxido do ergosterol.....	68
4.6.2 Composto D2 – Ergosterol	71
4.6.3 Composto D6 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila	74
4.6.4 Composto D11 – 2-hidróxi-tetracosanoato de metila.....	77
4.6.5 Composto D9	79
4.6.7 Composto P1 – Ácido hexadec-5-enóico.....	88
4.6.8 Composto P65 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil	91
4.6.9 Composto P180 – Pisolactona	101
4.7 DERIVADOS.....	110
4.7.1 Composto D2a – Acetato do ergosterol	110
4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	112
4.8.1 Antioxidantes Totais	112
4.8.2 Redução DPPH.....	113
4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	114
4.9.1 Atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias	114
4.9.2 Atividade antimicobacteriana	126

5. CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

1. INTRODUÇÃO

Há algumas décadas, os produtos naturais ganharam destaque e importância para o desenvolvimento da indústria farmacêutica. Somente nas duas últimas, cerca de 77% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer, foram oriundos de origem natural ou análogos, como taxol e doxorrubicina. Além disso, destacam-se também os antibióticos (penicilina, eritromicina), antiparasitários (ivermectina), antimaláricos (artemisinina) e anticâncer (NOGUEIRA et al., 2010).

Principalmente após a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, os fungos vêm sendo explorados em busca de novas moléculas bioativas (JIN-MING, 2006). Cogumelos já demonstraram ações terapêuticas contra o desenvolvimento de células cancerígenas pelo fato de apresentarem essas biomoléculas, incluindo polissacarídeos, proteínas, lipídeos, lactonas, alcaloides, terpenos, esteróides e compostos fenólicos (DE SILVA et al., 2013).

Sabe-se que os fungos apresentam a segunda maior diversidade do mundo, superior ao de plantas terrestres. Apenas uma parte dessas espécies (100.000) foram descritas até o momento e dessas, poucas espécies foram exploradas as suas propriedades farmacológicas (DE SILVA et al., 2013).

Diversos medicamentos e fungicidas agroquímicos foram desenvolvidos a partir de metabólitos secundários provindos de fungos. Dentre esses pode-se citar: antibióticos (penicilina, cefalosporina), antifúngicos (equinocandina) e redutores de colesterol (lovastatina e sinvastatina) (DE SILVA et al., 2013).

Nesse contexto destacam-se os Basidiomicetos. Esses, constituem uma fonte rica de metabólitos secundários, muitos dos quais, não são encontrados nos demais fungos (ESSER, 2009). Estudos mostram que em décadas recentes, diversos compostos bioativos foram e estão sendo isolados de Basidiomicetos com atividades importantes, tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral (DE SILVA et al., 2013), antitumoral (WASSER, 2002), antioxidante (DE SILVA et al., 2013) entre outras.

Basidiomicetos abrangem uma grande classe de fungos superiores que habitam diferentes climas, desde o ártico até florestas tropicais, justificando a diversidade de metabólitos secundários encontrados nessa filogenia (SANCHEZ, 2004; SCHÜFFLER et al., 2009). Apresentam hifas septadas, com parede quitinosa e produzem esporos do tipo basidiósporo e esporângio (basídio). A partir do micélio, hifas desenvolvem-se constituindo o corpo de frutificação ou basidiocarpos (SCHOTT, 2012). Seu micélio e corpos frutíferos ficam expostos

a predadores ou outras espécies de fungos que habitam o mesmo local (fungos), o que em alguns casos, podem explicar a produção dos metabólitos responsáveis pelos potenciais biológicos (SCHÜFFLER et al., 2009).

Fungos Basidiomicetos apresentam variada classe de metabólitos secundários como alcaloides, terpenos (mono, sesqui, diterpenos e triterpenos), esteroides, compostos fenólicos, polissacarídeos ao quais são atribuídas diversas propriedades farmacológicas (JIN-MING, 2006; DE SILVA et al., 2013). Além disso, eles apresentam efeitos benéficos não somente como fonte medicinal, mas também como suplementos dietéticos e alimentares. Países como Rússia, Japão e China apresentam essa cultura bem consolidada, alguns medicamentos como Krestin obtido de *Trametes versicolor*, Lentinan de *Lentinus edodes*, Sonifilan de *Schizophyllum commune* e Befungin de *Inonotus obliquus* são comercializados e consumidos pela população (WASSER, 2010).

Outro ponto relevante é a importância no ecossistema. Eles apresentam mecanismos eficazes de absorção de metais pesados, mais do que plantas provindas do cultivo agrícola, frutas e vegetais (TURKEKUL et al., 2004).

Dada a relevância dos fungos, que além de apresentarem diversos potenciais biológicos, tem-se uma grande diversidade de espécies na natureza. Estima-se que, existem cerca de 3 a 5 milhões de espécies a mais em relação as plantas, sendo poucas conhecidas pela ciência, ou seja, a diversidade é ainda maior do que se prevê (DE SILVA et al., 2013; ROTHER e DA SILVEIRA, 2008).

Nessa perspectiva, o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) coordenado pelo professor Dr. Ademir Farias Morel tem consolidado o isolamento, identificação, e estudo de novos princípios ativos produzidos por fungos com importantes potenciais biológicos. Desta forma, selecionou-se duas espécies de interesse: *Pisolithus tinctorius* e *Phellinotus piptadeniae*. Sendo que, até o momento, a espécie *Phellinotus piptadeniae* não apresenta dados na literatura relacionados a atividade biológica e composição química.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Este trabalho propõe o estudo de metabólitos secundários e suas atividades biológicas dos fungos *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius*.

1.1.2 Objetivos específicos

- * Realizar extrações neutras;
- * Isolar e identificar novos metabólitos secundários das espécies de fungos, fazendo uso de técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais, como RMN de ^1H e ^{13}C , Dept 135, COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas e difração de raios-X;
- * Determinar a estereoquímica dos metabólitos isolados quando possível;
- * Avaliar o potencial biológico dos metabólitos isolados das espécies utilizando-se ensaios antimicrobianos e antioxidantes;
- * Contribuir para a bibliografia das famílias Sclerodermataceae e Hymenochaetaceae.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os fungos são seres eucariontes, habitam o solo, a água, plantas, matéria orgânica em decomposição e pertencem ao Reino Fungi. Diferentemente das plantas, os fungos não sintetizam clorofila. A nutrição ocorre por absorção de macromoléculas, através de degradação enzimática, onde os carboidratos são a principal fonte de energia (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Esses organismos apresentam grande importância para os demais seres vivos, podendo agir de forma patogênica ou benéfica. Sabe-se que, muitos são responsáveis por diversas doenças oportunistas, no entanto das 100 mil espécies conhecidas, estima-se que apenas 200 são patogênicas. Além disso, outros apresentam uma gama de benefícios, seja na agricultura, indústria farmacêutica e alimentícia (TORTORA et al., 2005). O destaque da importância medicinal dos fungos deu-se após a descoberta da penicilina em 1928, desde então eles estão sendo estudados como prováveis fonte de metabólitos com atividades antibióticas e outros compostos naturais potencialmente ativos (JIN-MING, 2006).

No solo, encontram-se a maior diversidade fúngica; estima-se que em um grama existem centenas de espécies. Esse fator pode explicar a importância bioquímica desses organismos em ecossistemas naturais (TALBOT et al., 2015).

Os fungos classificam-se em: Ficomicetos, Arquimicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Nesse contexto, destacam-se os Basidiomicetos, os quais compreendem macrofungos, caracterizados por apresentarem corpos de frutificação e reprodução esporulada. Até o momento, diversos compostos com potenciais farmacológicos foram isolados de Basidiomicetos, como a estrobilurina A, um derivado do ácido β -metoxiacrílico, com ação antibiótica, e a muscarina (+), um alcaloide extraído do gênero *Amanita*, cuja atividade está relacionada ao sistema nervoso central, ajudando a compreender processos bioquímicos da doença de Alzheimer (JIN-MING, 2006).

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E SISTEMÁTICOS

2.1.1 Família Hymenochaetaceae

Hymenochaetaceae é uma das famílias mais importantes dos Basidiomicetos devido as propriedades medicinais. Cerca de 27 gêneros e 487 espécies já foram descritas e encontram-se distribuídas em diversas partes do mundo como: América do Sul e Norte, Europa, África,

Rússia, norte da China e Japão. Os gêneros *Phellinus*, *Hymenochaete* e *Inonotus* são os mais encontrados (WAGNER e FISCHER, 2002; DAI, 2010; POLEMIS et al., 2013).

Pertencente a classe dos Agarycomycetos e ordem Hymenochaetales, essa família caracteriza-se por reunir fungos que utilizam a madeira como principal fonte de matéria orgânica. As espécies apresentam coloração marrom-amarelada e corpos frutíferos de superfície lisa e perene. Além disso, Hymenochaetaceae abrange espécies lignícolas responsáveis pela podridão branca, bem como patógenos e ectomicorrizas às plantas (WAGNER e FISCHER, 2001; GOMES-SILVA et al., 2009).

Dados da literatura descrevem diversos gêneros encontrados no Brasil, entre eles, *Fuscoporia*, *Coltricia*, *Inonotus*, *Hymenochaete*, *Phylloporia* e *Phellinus* (BALTAZAR et al., 2009; BALTAZAR et al., 2010; ABRAHÃO e GUGLIOTTA, 2012; GOMES-SILVA et al., 2012; SALVADOR-MONTOYA., 2015; LOPES et al., 2016).

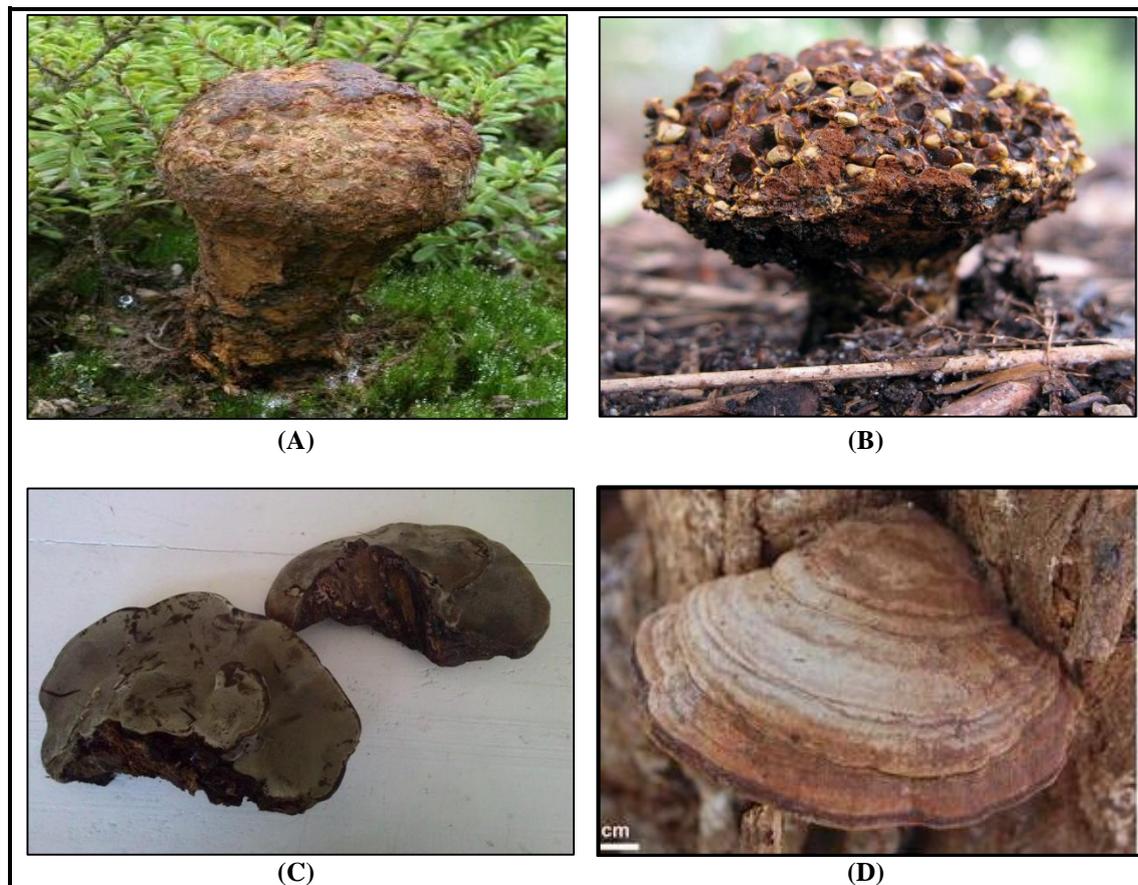
O gênero *Phellinus* (*Phellinotus*) tem cerca de 220 espécies descritas, sendo poucas estudadas até o momento (DAI et al., 2010). Algumas dessas espécies, já demonstraram potenciais antimicrobianos (ROSA et al., 2003; SHENNA et al., 2003; HUR et al., 2004), antidiabética (LIU et al., 2009), antitumoral (YANG et al., 2009) e antioxidante (SHON et al., 2003; LEE et al., 2015). Além disso, fungos pertencentes a esse gênero têm sido bem utilizados na medicina tradicional de alguns países como China, Japão e Korea para tratar doenças estomacais, úlceras, gastroenterites, artrite e doenças linfáticas (LEE et al., 2015).

A espécie saprofítica *Phellinus piptadeniae*, pertencente a família Hymenochaetaceae, uma das maiores constituídas por fungos degradadores de madeira, é encontrada na América do Sul. Dados da literatura relatam a espécie *Piptadenia gonoacantha* como a principal hospederia do fungo, por isso a denominação *Phellinus piptadeniae* (*Phellinotus*) (Figura 1) (SALVADOR-MONTOYA et al., 2015).

Conhecida popularmente como pau-de-jacaré, *Piptadenia gonoacantha*, está distribuída na mata atlântica e cerrado. No entanto, estudos posteriores mostraram outras espécies, distribuídas na caatinga do nordeste brasileiro, *Senegalia Raf.*, *Mimosa R.Br.* e *Piptadenia Benth*, como hospedeiras (SALVADOR-MONTOYA et al., 2015).

Devido a importância medicinal do gênero *Phellinus*, e o fato da espécie *Phellinotus piptadeniae* não apresentar estudos químicos e biológicos, optou-se por realizar o estudo da espécie.

Figura 1 – Espécies-alvo deste trabalho



Imagens dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* (A) e (B) e *Phellinotus piptadeniae* (C) e (D).
 Fontes: (A) <http://www.hiddenforest.co.nz/fungi/family/sclerodermataceae/scler04.htm>; (B) <https://www.flickr.com/photos/shyzaboy/2786014507/>; (C) DO CARMO, G.; (D) Salvador-Montoya et al., 2015.

2.1.2 Família Sclerodermataceae

Sclerodermataceae é uma família pertencente a divisão dos Basidiomicetos, filum agaricomycotina, classe agaricomycetos e ordem boletales (CHAMBERS e CAIRNEY, 1999).

A ordem boletales compreende macrofungos do tipo boletoide, gasteroide e poliporoide, incluindo espécies saprofíticas, micorrízicas e/ou micoparasitas. No Brasil, essa ordem ainda é pouca estudada. Dados da literatura reportam cerca de 20 gêneros e 70 espécies, excluindo o gênero *scleroderma* (CORTEZ et al., 2011).

Dentre os gêneros pertencentes a essa família e/ou ordem boletales, destacam-se: *Scleroderma*, *Rhizopogon* e *Pisolithus* que são encontrados em abundância e distribuídos em regiões tropicais e temperadas (DE MELLO et al., 2006). Esses gêneros são classificados como ectomicorrízicos. O conceito de ectomicorriza está relacionado com a capacidade de associação

simbiótica entre raízes de plantas hospedeiras e fungos, que, em termos histofisiológicos são órgãos de natureza multivariada e especializados em absorção de íons, moléculas e outras substâncias, e que exercem esta função duplamente: absorvem nutrientes e água do solo tanto para os fungos, quanto para as plantas (BRUNDRETT, 2004; WANG e QIU, 2006). Com relação às famílias de árvores propensas à formação de ectomicorrizas destacam-se: *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Myrtaceae* e *Salicaceae* (DE SOUZA et al., 2006).

O gênero *Pisolithus* é um grupo de gasteromicetos distribuídos mundialmente. A disseminação de plantações de eucaliptos e pinus, permitiu a ampla distribuição em muitos países da Europa, América do Sul, África e Ásia (KASUYA et al., 2010). Os fungos pertencentes a esse gênero apresentam evidente importância, não só medicinal, mas em programas de reflorestamento. Apesar dos avanços científicos, esse gênero necessita ser melhor estudado quanto a taxonomia e classificação (GOMES et al., 2000).

No Brasil, *Pisolithus spp* foram encontrados em plantações de eucaliptos nos estados de Minas Gérias (KASUYA et al., 2010) e Rio Grande do Sul (CORTEZ et al., 2011).

As ectomicorrizas da família Sclerodermataceae estudadas até o momento apresentam um grupo relevante de triterpenoides tetracíclicos derivados do lanosterol (NAKATA et al., 2009) que estão sendo testados como anticancerígenos (NOMURA et al., 2008; HUANG et al., 2012), antimicrobianos (BAE e MIN, 2000; LIU, Xue-Ting et al., 2010), anti-inflamatórios (KAMO et al., 2003) e como antivirais (LI et al., 1993). Diante desse contexto, escolheu-se a espécie *P. tinctorius* (Figura 1) como fonte de estudo.

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM BASIDIOMICETOS, FAMÍLIAS HYMENOGYSALES E SCLERODERMATACEAE E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

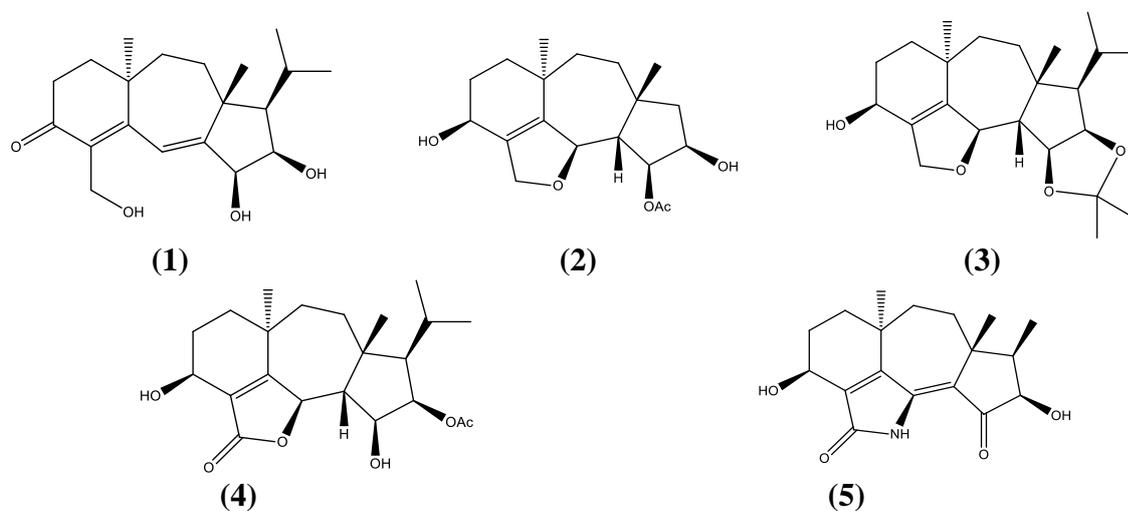
2.2.1 Basidiomicetos

2.2.1.1 Terpenos e esteróis

Terpenos é a classe mais numerosa e diversificada de metabólitos já encontrados em fungos, abrangendo mais de 30.000 membros (HEMMERLIN et al., 2003; WALKER e POULTER, 2005). Das principais classes de metabólitos secundários, os terpenos e terpenóides correspondem 55%, seguido dos alcaloides, com 27% e os compostos fenólicos 18% (PERES, 2004). Sesquiterpenos, triterpenos lanostanos (os mais comuns) e diterpenos (em menor quantidade) são relatados na literatura como parte de metabólitos já isolados (ZHANG, 2015). Terpenos são biossintetizados a partir de unidades de isopreno podendo ser através de duas vias

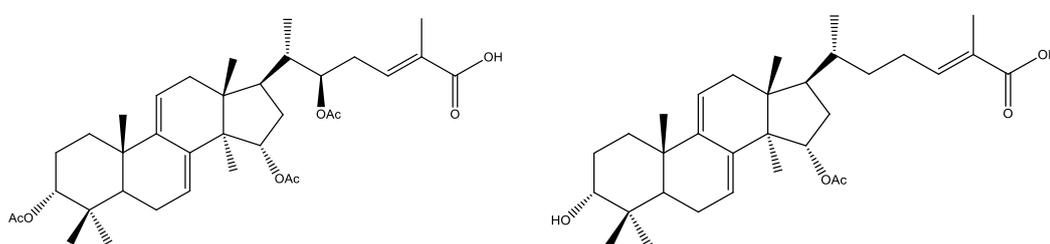
metabólicas isopentenil pirofosfato (IPP) e di-metilalil pirofosfato (DMAPP), podem ser lineares ou cíclicos, saturados ou insaturados (ESSER, 2009). Dentre os terpenos, a maioria deles destacam-se, principalmente, pelo potencial farmacológico. Ou e col. (2012) isolaram os diterpenoides (1), (2), (3), (4) e (5) (Figura 2) da espécie *Coprinus radians*, os quais foram possíveis atribuir o potencial anticâncer. O composto (1) foi o que mostrou melhor atividade frente as células cancerígenas MDA-MB-435 (células da mama).

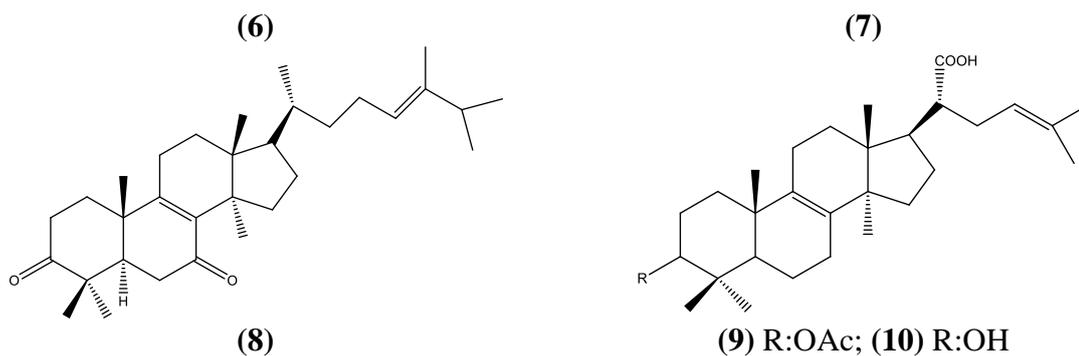
Figura 2 – Terpenos isolados da espécie *Coprinus radians*



Estudos relacionados com a espécie *Ganoderma lucidum* demonstraram o isolamento dos triterpenos: ácido ganodérmico T (6) o qual apresenta função de induzir a morte celular de células cancerígenas do pulmão em fase de metástases, o ácido ganodérmico DM (7) com potencial inibidor de células cancerígenas da mama e o triterpeno do tipo lanostano (8) do extrato de acetato de etila onde demonstrou-se efeito citotóxico frente as células cancerígenas SMMC-7721(fígado) e A549 (pulmão) (Figura 3). Além disso, os lanostanos (9) e (10) (Figura 3) com atividade anticâncer significativa frente a células do tipo T-24 (bexiga) (JIN-MING, 2006; DE SILVA et al., 2013).

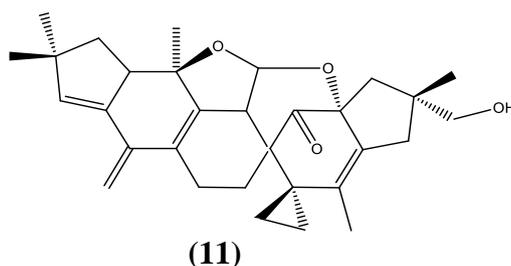
Figura 3 – Triterpenos isolados de *Ganoderma lucidum*





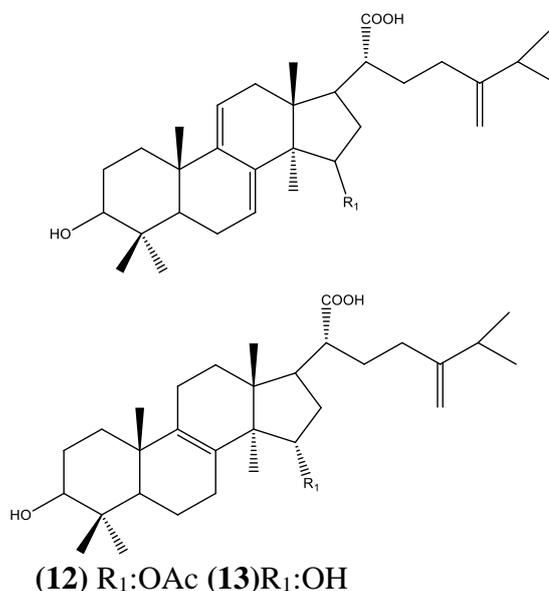
A espécie *Agrocybe salicicola* mostrou-se potencialmente ativa frente ao vírus (VRS), responsável por infecções respiratórias em recém-nascidos. Essa atividade pode ser comprovada através do isolamento do sesquiterpeno agrocibona (11) (Figura 4) (ZHU et al., 2010).

Figura 4 – Bis-sesquiterpeno isolado de *Agrocybe salicicola*



Lanostanos foram isolados do extrato etanólico da espécie *Astraeus pteridis* e apresentaram atividade antimicrobiana moderada frente a *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria responsável pela tuberculose (STANIKUNAITE et al., 2008). Triterpenos do tipo lanostano (12) e (13) (Figura 5) foram descritos em espécies de *Antrodia camphorata* conferindo a espécie atividade citotóxica frente a células cancerígenas do tipo HT-29 (colon), HCT-116 (colon), SW-480 (colon) e MDA-MB-231 (mama) (YEH et al., 2009).

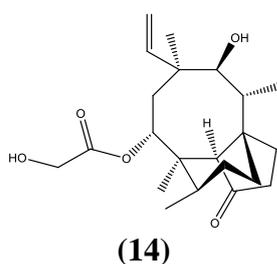
Figura 5 – Triterpenos da espécie *Antrodia camphorata*



A espécie *Ganoderma pfeifferi* mostrou-se efetiva frente ao vírus influenza A, devido a presença de triterpenos lanostanos (DE SILVA et al., 2013). Além disso outras espécies de Basidiomicetos como *Daedaleopsis confragosa*, *Datronia mollis*, *Ischnoderma benzoinum*, *Laricifomes officinalis*, *Lenzites betulina*, *Trametes gibbosa* e *T. versicolor* também têm sido descritas pelo potencial antiviral (TEPLYAKOVA et al., 2012). A presença de sesquiterpenos nas espécies *Ganoderma lucidum*, *G. praelongum* e *G. resinaceum* foram ativos frente a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (AMERI et al., 2011a).

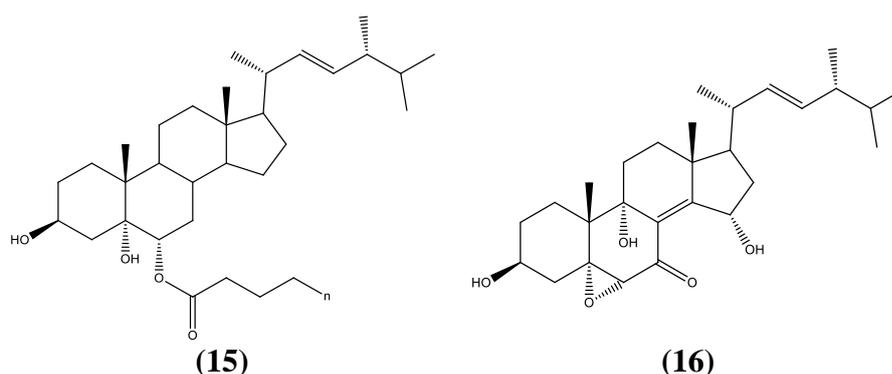
O diterpenóide pleuromutilina (14) (Figura 6) tem sido bem isolado da espécie *Pleurotus passeckerianus* atribuindo a essa espécie atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, β -*hemolytic streptococci*, *Streptococci viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium spp*, *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp*, *Fusobacterium spp*, *Bacteroides spp* e *Clostridium spp* (NAGABUSHAN et al., 2010).

Figura 6 – Diterpeno isolado de *Pleurotus passeckerianus*



Esteroides também são encontrados em espécies de Basidiomicetos. Estudos realizados com a espécie *Astraeus hygrometricus* comprovaram a presença do esteroide 3 β ,5 α -Dihidroxi-(22E,24R)-ergosta-7,22dien-6 α -il (**15**) (Figura 7). Já na espécie *Polyporus ellisii* foram isolados diversos esteroides, dentre eles o 5 α ,6 α -epoxi-3 β ,9 α ,15 α -trihidroxi-(22E,24R)-ergosta-8 (14),22-dien-7-ona (**16**) (Figura 7) com significativa atividade citotóxica frente as linhagens celulares tumorais HL-60 (sangue), SMMC-7721 (fígado), A-549 (pulmão), MCF-7 (mama) e SW480 (colon) com valores de inibição de 50% 1,5; 3,9; 2,7; 3,1 e 2,9 μ M, respectivamente (ZHANG, 2015). Esteroides e triterpenos lanostanos também foram isolados da espécie *Ganoderma zonatu*, onde também demonstraram atividade citotóxica, porém moderada frente a linhagens celulares SMMC-7721 (fígado) e A549 (pulmão) (KINGE e MIH, 2011).

Figura 7 – Triterpenos isolados de *Astraeus hygrometricus* e *Polyporus ellisii*

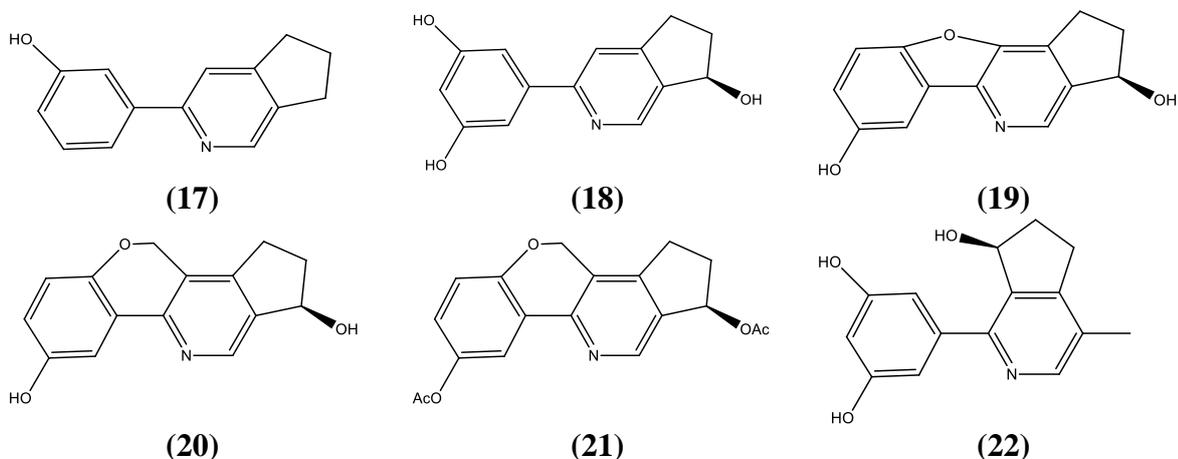


2.2.1.2 Alcaloides

Alcaloides são metabólitos secundários que apresentam estruturas orgânicas básicas nitrogenadas, podendo ser oriundos de plantas, fungos, micro-organismos e invertebrados marinhos. A importante atividade biológica dessa classe desperta interesse no meio científico (KUKLEV e DEMBITSKY, 2016). O primeiro alcaloide isolado de fungo foi da espécie *Claviceps purpúrea* (Fries). Após a descoberta, em 1960, grupos de estudos mostraram que outros fungos também eram capazes de produzir esse mesmo alcaloide, além de outros derivados (MAHMOOD et al., 2010).

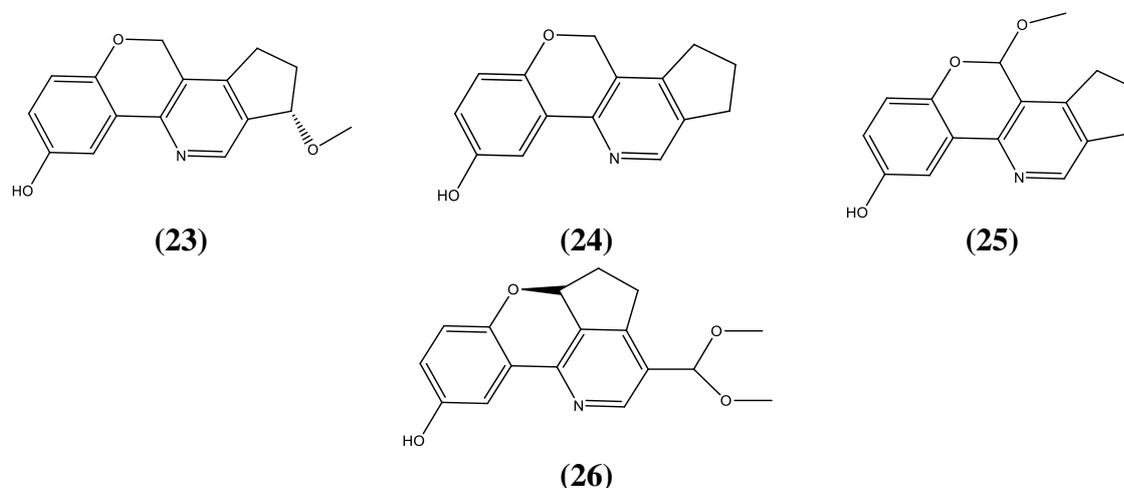
Estudos realizados com o extrato etanólico da espécie *Ganoderma sinense* demonstraram a presença dos alcaloides sinenses (**17**), (**18**), (**19**), (**20**), (**21**) e (**22**) (Figura 8) (LIU et al., 2010; LIU et al., 2011).

Figura 8 – Alcaloides isolados de *Ganoderma sinense*



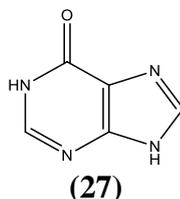
ZHAO e col. (2015) estudando outra espécie de *Ganoderma lucidum*, isolaram os alcaloides lucidimina (23), (24), (25) e (26) (Figura 9).

Figura 9 – Alcaloides de *Ganoderma lucidum*



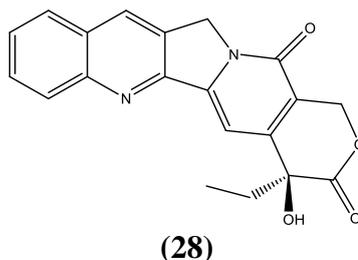
Basidiomicetos do gênero *Boletus* também são conhecidos por apresentar diversos alcaloides como fonte de metabólitos secundários. Os alcaloides mais reportados desse gênero são conhecidos pela importância farmacológica. Dentre eles (Figura 10), a hipoxantina (27), importante em processos celulares e metabólicos de bactérias (MAHMOOD et al., 2010).

Figura 10 – Alcaloide isolado no gênero *Boletus spp*



O gênero endofítico *Fomitopsis sp* produziu o alcaloide camptotecina **(28)** (Figura 11). Além disso, os extratos metanólicos e acetato de etila mostraram-se citotóxicos frente a células cancerígenas de colon e mama (CHEN et al., 2014).

Figura 11 – Alcaloide isolado de *Fomitopsis sp*



2.2.1.3 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros constituídos de resíduos de monossacarídeos unidos entre-si por ligações glicosídicas. Apresentam uma gama de variedade estrutural, sendo lineares ou ramificados o qual apresentam alta capacidade de conduzir informações biológicas, superior a proteínas e ácidos nucléicos (WASSER, 2002).

A presença de polissacarídeos biologicamente ativos do tipo α e β -glucanas, heteroglucanas, glicanas e heteropolissacarídeos como monogalactoglucanas, riboglucanas, glucomananas e arabinogalactoses em diversas espécies de fungos Basidiomicetos, desperta interesse dos pesquisadores, uma vez que apresentam importantes potenciais medicinal e farmacêutico de interesse. Estudos mostram que os polissacarídeos são responsáveis pelas relevantes atividades antitumoral e imunestimulante dessas espécies (WASSER, 2002).

A diferenciação dos polissacarídeos como peso molecular, tipo de estrutura (linear ou conjugada a proteínas) está ligada diretamente às atividades biológicas presentes. A importante propriedade anticâncer está relacionada a fatores que contribuem como: composição do açúcar,

alto peso molecular, solubilidade em água, presença de outros ligantes (proteínas), estrutura terciária e modificações químicas (LEMIESZEK e RZESKI, 2012).

Produtos a base de polissacarídeos são comercializados em países como Japão e China, dentre esses Lentinan, PSK (Krestin) e Schizophyllan. O lentinan (ligações β (1-3) e (β -1-6)) isolado de *Lentinus edodes* é comercializado como suplemento alimentar. Estudos confirmam que o lentinan tem a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos, monócitos e macrófagos. Além disso é capaz de aumentar a reatividade das células imunes e estimulá-las a secretar substâncias biologicamente ativas. PSK (Krestin, ligações β (1-3) e (β -1-6)) é isolado da espécie *Cariolus versicolor* e utilizado como medicamento de forma oral ou intravenosa em pessoas com células tumorais. Estudos apontam que o PSK tem a capacidade de estimular células do tipo T responsáveis pelo reconhecimento e destruição de células tumorais. Já o Schizophyllan isolado de *Schizophyllum commune* tem sido utilizado no tratamento de câncer. Sua ação contra sarcoma 180 foi confirmada, além disso apresenta estrutura e mecanismo semelhante ao lentinan, com ação imunomoduladora (LEMIESZEK e RZESKI, 2012).

Estudos reportados com espécies de *Agaricus* demonstram o potencial antitumoral e ação imunoestimulante devido a presença de α -glucanas (1 \rightarrow 6, 1 \rightarrow 4), heteroglucanas e polissacarídeos β -glucanas (1 \rightarrow 6) complexadas com proteínas (DIDUKH et al., 2003).

Espécies de *Pleurotus florida* são importantes, pois apresentam diversos potenciais biológicos como antioxidante, imunoestimulador, antitumoral e anti-inflamatório. Em vista disso, Ganeshpurkar e col. (2014) investigaram a ação antidiabética da fração polissacarídica obtida dos corpos frutíferos. Os resultados foram positivos, demonstrando maior potencial antidiabético devido a presença dos polissacarídeos.

Frações foram extraídas do micélio da espécie *Hericiium erinaceus*. A fração que apresentou a presença de polissacarídeos, demonstrou-se efetiva frente a atividade gastro-protetora (WANG et al., 2015).

Espécies de Basidiomicetos das famílias Auriculariales, Dacrymycetales, Tremellales, Aphyllophoromycetidae, Cantharellaceae, Clavariaceae, Corticiaceae, Hymenochaetaceae, Ganodermataceae, Polyporaceae, Boletaceae, Tricholomataceae e Agaricaceae demonstraram bons potenciais antitumoral e ação imunoestimuladora (WASSER, 2002).

2.2.1.4 Compostos fenólicos

A via fenilpropanóide dá origem a diversos compostos como taninos, ligninas e flavonoides. Esses compostos fenólicos formam diversas classes de metabólitos secundários,

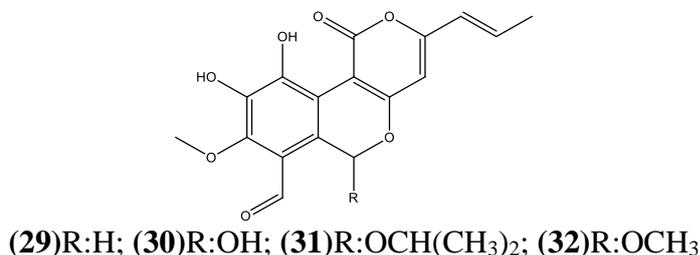
os quais apresentam importantes funções biológicas. Taninos e flavonoides desempenham papel importante na defesa aos predadores e proteção frente a radiação UVB. Ligninas atuam como componente da parede celular de células vegetais de vasos condutores, os quais permitem a condução de água e seiva, além de conferir integridade às células para defesa contra insetos herbívoros e patógenos (SUTELA et al., 2009).

Compostos fenólicos podem ser encontrados em fungos, algas ou plantas. As concentrações dos compostos variam de acordo com o desenvolvimento da planta ou fungo. Esses compostos diferenciam-se quanto a classificação estrutural química. De maneira geral, compostos fenólicos apresentam estruturas simples ou complexas, com a presença ao menos de um anel aromático e uma molécula de hidrogênio substituída por um grupamento hidroxila. Eles são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico (mais comumente) e a via do acetato polimalato (acetil-coA e malonil-coA), além disso pigmentos também podem ser formados através da via do ácido chiquímico. Já os flavonóides possuem 15 átomos de carbono em sua estrutura básica, constituído de duas fenilas ligadas entre si por uma cadeia de três carbonos. São classificados de acordo com o tipo de ligação, quantidade de hidroxilas, e presença ou ausência de cetonas (SIMÕES et al., 1999; SUTELA et al., 2009; DE SILVA, 2013).

Devido a presença de compostos fenólicos, diversas espécies de fungos já foram descritas na literatura por apresentarem importante atividade antioxidante (DE SILVA, 2013). Algumas espécies dos gêneros *Phellinus* e *Inonotus spp* são conhecidas na medicina pelo seu uso em tratamentos de doenças cancerígenas, gastrointestinais, tuberculose, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras. Estudos com as espécies *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus ribis*, *Inonotus obliquus* e *Inonotus xeranticus* comprovaram a presença de compostos do tipo estilipirona (pigmentos), os quais apresentam diversas atividades biológicas, incluindo antioxidativa, anti-inflamatória, citotóxica, antidiabética, antiedemência e antiviral (LEE e YUN, 2011).

Os compostos fenólicos cianus A (29), B (30), C (31) e D (32) (Figura 12) foram isolados da espécie *Cyathus stercoreus*. Testes com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) demonstraram o potencial antioxidante desses compostos (KANG et al., 2007).

Figura 12 – Compostos fenólicos isolados da espécie *Cyathus stercoreus*

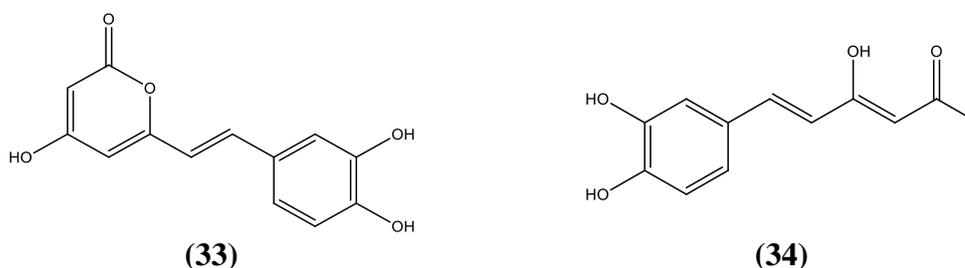


Estudos realizados por Tamrakar e col. (2016) identificaram a presença de compostos fenólicos em diferentes espécies de fungos Basidiomicetos. Na espécie *Cyclomyces setiporus* foi possível verificar a presença dos ácidos: clorogênico (54,1 µg/mg extrato), gálico, 3,4-Diidroxibenzóico, p-cumárico, verátrico, abscícico, vanílico, rutina e vanilina. Os ácidos gálico e 3,4-diidroxibenzóico foram isolados de *Inonotus sp.*, enquanto que ácido 5-sulfosalicílico e vanilina o foram em *Xylobolus princeps*. Além disso, também foram atribuídos o potencial antioxidante das espécies, bem como a porcentagem de inibição do DPPH.

A presença dos compostos ácido p-cumárico, quercetina, campferol, catequina, ácido gálico, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico atribuiu a capacidade antioxidante da espécie de Basidiomiceto *Laetiporus sulphureus* (OLENNIKOVA et al., 2011).

Ali e col. (2003) investigaram a atividade antiviral da espécie *Inonotus hispidus*. Nesse estudo foram isolados os compostos hispidina (33) e hispolona (34) (Figura 13) e testada frente aos vírus H1N1 E H3N2. O extrato etanólico bem como os compostos isolados demonstraram-se ativo frente a esses tipos de vírus.

Figura 13 – Compostos fenólicos isolados da espécie *Inonotus hispidus*



2.2.2 Família Hymenochaetaceae

Dentre os metabólitos isolados na família Hymenochaetaceae, estudos relatam a presença de terpenos do tipo lanostanos e derivados do ergosterol, diterpenos, sesquiterpenos,

açúcares do tipo β -glucana e compostos fenólicos derivados do hipidina, os quais conferem diversos potenciais biológicos (ZHENG et al., 2010).

Estudos realizados por Yang e col. (2013) e Isaka e col. (2017) identificaram sesquiterpenos em espécies de *Inonotus*. O composto inonoalliacana A foi efetivo frente a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus*, enquanto que inonoalliacane B apresentou atividade antiviral frente ao vírus da Herpes (tipo 1).

Kim e col. (2011) em estudos realizados com a espécie *Inonotus obliquus* isolaram do extrato metanólico os triterpenos lanosterol, β -sitosterol, peróxido do ergosterol, inotodiol, ácido trametenólico, 3β -hidroxilano-8,24-dien-21-ol, lanosta-8,25-dien-3,22,24-triol, betulina e os compostos fenólicos 2,5-dihidroxibenzaldeído e 3,4-dihidroxibenzalacetona. Testes citotóxicos frente a células tumorais A549 (Carcinoma), L1210 (leucemia linfática), COLO 205 (adenocarcinoma colorretal), HL60 (leucemia promielocítica aguda) e MCF-7 (adenocarcinoma) foram realizados. O composto mais efetivo foi 3,4-Dihidroxibenzalacetona frente as linhagens celulares A549 e HL60, com valores de CI_{50} 23,6 e 21,7 μ M, respectivamente. Além disso, o potencial anti-inflamatório e antinocepcivo *in vitro* e *in vivo* foram detectadas, com resultados bastante promissores (PARK et al., 2005).

A investigação antimicrobiana, antioxidante e inibição da enzima Xantina Oxidase foi realizada por Kovács e col. (2017) nas espécies *Fomitiporia hartigii*, *F. punctata*, *F. robusta*, *Fuscoporia torulosa*, *Phellinopsis conchata*, *Phellinus igniarius*, *Ph. tremulae*, *Ph. tuberculatus*, *Phellopilus nigrolimitatus* e *Porodaedalea chrysoloma*. Os estudos mostraram que as espécies *F. robusta*, *F. torulosa*, *P. chrysoloma* e *P. nigrolimitatus*, de forma geral, apresentaram atividades antibacterianas moderadas, quando comparadas aos padrões. Extratos de *Fomitiporia robusta* demonstrou-se efetivos frente a cepa *M. catarrhalis*, enquanto que os extratos de *P. chrysoloma* apresentaram potencial antibacteriano frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes* e MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina). Com relação a atividade antioxidante, extratos de todas as espécies, com exceção de *P. igniarius*, apresentaram potencial frente ao radical DPPH. Além disso, os melhores inibidores da enzima Xantina Oxidase foram as espécies *F. punctata*, *F. robusta*, *F. torulosa*, *P. igniarius*, *P. nigrolimitatus* e *P. chrysoloma*. De forma geral, as espécies *F. torulosa*, *Ph. nigrolimitatus* e *P. chrysoloma* apresentaram atividades excelentes frente aos testes realizados.

Derivados do ergosterol encontrados na espécie *Phellinus linteus* demonstraram-se inibidores da Elastase Neutrófila, uma proteínase responsável pela liberação de leucócitos nos tecidos conjuntivos, os quais apresentaram valores consideráveis de CI_{50} . Dentre os compostos testados, o composto 3β , 5α - dihidroxi- 6β -metoxiergostano-7,22-dieno apresentou inibição

significativa da enzima, exibindo valores de IC_{50} 14,6 μ M, quando comparado ao padrão epigalocatequina-3-galato (EGCG), com 12,5 μ M (LEE et al., 2012). Park e col. (2004a) estudando a mesma espécie, determinaram o potencial inibidor do hispidina (composto fenólico) frente a enzima β -secretase, responsável pela clivagem do peptídeo β -amiloide. O acúmulo extracelular desse peptídeo contribui para o dano da função neuronal.

Lee e col. (2017) isolaram os compostos fenólicos 3,4-dihidroxibenzaldeído, 4-(4-hidroxifenil)-3-buten-2-ona e 4-(3,4-dihidroxifenil)-3-buten-2-ona, o sesquiterpeno 3 β -hidroxicinamilida, os esteróis 9,11-peróxido de hidroergosterol e peróxido do ergosterol, o ácido etil linoleato e um derivado lipídico de *Phellinus Baumii*. Os compostos foram testados quanto a ação anti-inflamatória, onde os compostos fenólicos apresentaram resultados promissores.

Terpenóides foram isolados de uma cultura de *Inonotus obliquus* e investigada sua atividade inibitória frente a enzima α -glicosidase (diabete tipo 2), onde os triterpenos inotolactonas A e B mostraram-se mais eficientes do que o padrão acarbose, com valores de CI_{50} 0,24 mM, enquanto que o controle positivo apresentou CI_{50} 0,46 mM (YING et al., 2014). Em estudos realizados com a espécie *Phellinus gilvus*, por Liu e col. (2009), foi investigada a atividade hipoglicêmica do extrato bruto e triterpenos isolados. No entanto, os triterpenos não apresentaram resultados significativos, enquanto que o extrato etanólico sim. Portanto esses metabólitos isolados não são responsáveis pela atividade do extrato.

Wang e col. (2009) estudando a espécie *Phellinus igniarius* isolaram triterpenos lanostanos e derivados do ergosterol. Testes de atividade inibitória da enzima iNOS foram realizados. Essa enzima é responsável pela catálise no processo de oxidação da L-arginina para a produção de óxido nítrico (radical livre). O extrato etanólico de *P. igniarius* apresentou potente atividade inibitória com CI_{50} 29,57 μ M, bem como os lanostanos Igniarenos B (47,89 μ M) e Igniarenos D (91,74 μ M). Os mesmos compostos foram testados quanto a atividade citotóxica, no entanto não apresentaram citotoxicidade.

O potencial antioxidante dos extratos de *P. baumii* (SHON et al., 2003), *P. linteus* (PARK et al., 2004b) e *I. obliquus* (CUI et al., 2005) foram investigados. Extratos metanólicos e aquoso de *P. baumii* apresentaram taxas de 80 a 90% na inibição dos radicais peróxido de hidrogênio, hidroxila e DPPH (SHON et al., 2003). *Phellinus linteus* produziu extratos, os quais demonstraram bom potencial antioxidante frente aos radicais DPPH e peróxido de hidrogênio (PARK et al., 2004b). Estudos com a espécie *I. obliquus* relataram que o extrato rico em polifenóis foi efetivo frente aos radicais DPPH, peroxila e superóxido na concentração de 5 μ g/mL. (CUI et al., 2005)

2.2.3 Família Sclerodermataceae

Triterpenos do tipo lanostanos e derivados do ácido púlvico, são os metabólitos mais comuns encontrados nessa família. Estudos realizados com a espécie *Pisolithus tinctorius* mostraram a presença de alguns pigmentos derivados do ácido pulvínico, dentre eles a Pisoquinona (GILL e LALLY, 1985; GILL e KIEFEL, 1994).

Triterpenos do tipo lanostanos como a pisolactona, entre outros, têm sido comumente isolados de *P. tinctorius* (LOBO et al., 1983; LOBO et al., 1985; FUJIMOTO et al., 1994). Montenegro e col. (2008) avaliaram o potencial antitumoral *in vivo* da pisolactona, o qual mostrou-se efetiva frente a células tumorais Sarcoma 180.

Estudos realizados por Zamuner e col. (2005) demonstraram a presença de diversos triterpenos lanostanos. Os autores isolaram pisosterol, pisolterol, 3-*epi*-pisosterol e 3 β ,22 ξ ,23 ξ -triidróxi-23 ξ -acetóxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno e 3 β ,22 ξ ,23 ξ -triidróxi-22 ξ -acetóxi-24-etil-lanosta-8,24(28)-dieno do corpo de frutificação de *P. tinctorius* micorrizados com *Eucalyptus spp.* Já da espécie micorrizada com *Pinus taeda* foram isolados os compostos lanosterol, agnosterol, 3 β ,22 ξ -diidróxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno e 3 β ,22 ξ -diidróxi-24-etillanosta-8,24(28)-dieno.

O potencial antimicrobiano de *Pisolithus albus* foi investigado. Os autores testaram diferentes extratos frente a trinta cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina. Os extratos acetato de etila e metanólico foram os mais efetivos, enquanto que o extrato aquoso mostrou atividade moderada (AMERI et al., 2011b). KOPE e col. (1991) reportaram a atividade antifúngica frente a *Truncatella hartigii* dos compostos pisolitina A e pisolitina B.

Khadhri e col. (2017) testaram o extrato etanólico de *P. albus* frente as bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* [American Type Culture Collection (ATCC) 29212], *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Bacillus subtilis* (ATCC 6059) e Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (NCTC 6017) e *Aeromonas hydrophila* (IC). A espécie apresentou CIM (12,5 mg/mL) com exceção para as cepas *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (CIM 25 mg/mL), o que evidencia o potencial bacteriostático da espécie. Já a concentração letal mínima (CLM) variou de 25 a 50 mg/mL, demonstrando o potencial bactericida.

Morandini e col. (2016) estudando uma espécie de *Scleroderma spp* (UFSM SC1), descreveram o isolamento de dois novos triterpenos lanostanos Sclerodol A e B, além do triterpeno (3S*,5R*,10S*,13R*,14R*,17R*,20R*)-lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol e os açúcares

trealose e manitol. O extrato metanólico e os lanostanos foram testados quanto a capacidade antifúngica, o qual demonstraram potencial fungioestático e fungicida. Sclerodol B foi o mais efetivo, exibindo capacidade inibitória mínima (CIM) de 6,25 µg/mL frente *C. Krusei*, seguido da *C. parapsilosis* (12,5 µg/mL), e *C. tropicalis* e *C. albicans*, o que evidenciou o potencial anti-candidíase da espécie.

Dois triterpenos, não relatados anteriormente na literatura, foram isolados por Annang e col. (2018) da espécie *Scleroderma areolatum*. Os autores testaram os compostos quanto a capacidade anti-parasita (*Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*) e citotóxica (Hep G2-hepática). Os compostos apresentaram valores de CI₅₀ para *T. cruzi* 13,65-5,04 µM e *P. falciparum* 6,78-1,65 µM, o que evidenciou o potencial anti-protozoário. Com relação ao efeito citotóxico, os compostos não foram efetivos (ANNANG et al., 2018).

O potencial anti-inflamatório dos extratos de *S. nitidum* foi investigado. Os autores extraíram os polissacarídeos dos corpos frutíferos da espécie e testaram frente a diferentes modelos (induzidos) de inflamação. Os autores comprovaram o potencial anti-inflamatório da espécie, uma vez que os polissacarídeos testados apresentaram redução significativa das inflamações (NASCIMENTO et al., 2012). Kanokmedhakul e col. (2003), em estudos realizados com a espécie *S. citrinum*, isolaram o lanostano (20S, 22S, 23E)-22-*O*-acetil-25-hidroxi-lanostano-8,23(E)-dien-3-ona e os ácidos pirúvicos metil-4,4-dimetoxivulpinato e ácido 4,4-dimetoxivulpínico. O lanostano apresentou potencial anti-viral (Herpes simples), enquanto que o ácido dimetoxivulpínico foi efetivo frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.3.1 Atividade antimicrobiana

As infecções causadas por micro-organismos patógenos são um dos maiores problemas de saúde pública mundialmente. O surgimento de novas doenças infecciosas e a multirresistência aos antibióticos já estabelecidos, por consequência, tem aumentado o índice de mortalidade e morbidade (OTEO e ARACIL, 2015).

A resistência microbiana está relacionada a mutações genéticas das cepas e a presença de biofilmes. Os biofilmes são o conjunto de micro-organismos (bactérias/micobactérias) unidos a uma superfície sólida e cobertos por uma matriz exopolissacarídica; formados por uma ou mais espécies, sendo de dez a mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos (MAH

e O'TOOLE, 2001). Além disso, o acentuado uso indevido de antibióticos nas práticas médicas, agrárias e veterinárias contribuem para esse problema (SILVA et al., 2010).

Dados apontam que o uso excessivo dos antibióticos resultou em uma emergência global acelerada por novos agentes antimicrobianos, pois os antibióticos atualmente disponíveis não são suficientes, ou seja, estão esgotando-se rapidamente, sendo assim, requer o uso de outros fármacos (WHO, 2014).

Diante desses problemas, diversas medidas tecnológicas foram sugeridas para resolver o empasse da resistência desses agentes microbianos, dentre elas a busca por novos medicamentos ou protótipos oriundos de espécies vegetais, uma vez que as plantas produzem uma variedade de metabólitos com propriedades antimicrobianas (OSTROSKY et al., 2008; SILVA et al., 2010; NCUBE et al., 2012).

Nesse contexto destacam-se também os fungos Basidiomicetos. Estes constituem em uma fonte rica em metabólitos secundários, muitos dos quais não são encontrados nos demais fungos (ESSER, 2009). Estudos mostram que em décadas recentes, diversos compostos bioativos foram isolados de Basidiomicetos com potenciais biológicos importantes, tais como antibacteriano e antifúngico (DE SILVA et al., 2012).

As bactérias são classificadas como Gram-positivas e Gram-negativas, diferindo-se na composição da parede celular. As bactérias Gram-positivas contêm peptidoglicano e ácido teicóico, enquanto que as Gram-negativas contêm peptidoglicano, lipopolissacarídeo, lipoproteína, fosfolípídeo, proteína e o ponto crítico desses micro-organismos é a parede peptidoglicano, ou seja, a perda ou dano a essa camada destrói a rigidez da parede celular bacteriana (NEU e GOOTZ, 1996). Entre as diversas bactérias Gram-positivas pode-se citar o gênero *Enterococcus*, responsável por infecções hospitalares, sendo que, a maioria das infecções são causadas pela espécie *Enterococcus faecalis* (80%) (CERCENADO, 2011). *Staphylococcus aureus* também é citado como um patógeno oportunista de infecções hospitalares, atua na pele, em ferimentos e, quando associados a *Staphylococcus epidermidis* causa infecções em pacientes que necessitam de procedimentos médicos internos (FOSTER, 1996; RÍNCON et al., 2014). A espécie *Bacillus cereus* pode ser encontrada no solo, vegetais e água e é prejudicial ao homem devido a intoxicações gastrointestinais (DUPORT et al., 2016). *Bacillus subtilis* também está associada a infecções gastrointestinais, do sistema respiratório e trato urinário (TURNBULL, 1996).

Ao que se refere a bactérias Gram-negativas, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a responsável por infecções respiratórias e infecções hospitalares, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos, além de causar pneumonia em pacientes que necessitam de

ventilação mecânica (CAUSAPÉ et al., 2018). *Klebsiela pneumoniae* é umas das principais responsáveis pela pneumonia, além de ocasionar doenças no trato urinário (GUENTZEL, 1996; VUUREN e HOLL, 2017). *Proteus mirabilis* também está associada a casos de infecções urinárias (VUUREN e HOLL, 2017). A espécie *Escherichia coli* encontrada comumente no trato intestinal, quando em desequilíbrio pode causar diarreia inflamatória ou não, além de estar associada a infecções urinárias (JUNIOR e EVANS, 1996; VUUREN e HOLL, 2017).

O gênero *Shigella* é conhecido mundialmente por ser a principal causa de diarreia e disenteria. A transmissão ocorre através da água e alimentos. Estima-se que, anualmente, cerca de 165 milhões de pessoas são afetadas pela Shigelose (WHO, 2014). *Enterobacter aerogeneses* é uma espécie oportunista, responsável por infecções do trato gastrointestinal, urinário e respiratório. É uma dos patógenos que apresenta grande resistência frente a antibióticos (REGLI e PÀGES, 2015). *Morganella morganii* pode ser encontrada no meio ambiente, na microbiota intestinal de humanos, mamíferos e mucosas de répteis. Os pacientes pós-operatórios e crianças são os mais suscetíveis a desenvolver infecções causada por essa espécie, associadas principalmente ao trato urinário, pele e meningite (FALAGAS et al., 2006; MANTADAKIS et al., 2015). O gênero *Salmonella* é responsável por doenças como gastroenterite e diarreia inflamatória. As infecções causadas por *Salmonella* são classificadas clinicamente como: gastroenterite, bacteremia, febre entérica e convalescente (SMITH et al., 2016). *Burkholderia cepacia* é responsável por infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística e imunocomprometidos (LOUTET e VALVANO, 2010).

Outros microorganismos patógenos responsáveis por casos de mortalidade e morbidade são os fungos filamentosos. Eles são responsáveis por diversas infecções e afetam principalmente pessoas imunocomprometidas, entre elas, portadoras do vírus SIDA (em inglês HIV), pacientes que necessitam de tratamentos quimioterápicos e/ou transplantados. De acordo com a literatura, as infecções fúngicas podem ser classificadas em duas categorias: origem oportunista ou endêmica. Os oportunistas geralmente atuam na microbiota intestinal e incluem os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Já as endêmicas dependem principalmente da exposição geográfica ao habitat natural do fungo, como os *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitidis* (GAONA-FLORES et al., 2016). Estima-se que 1,7 bilhões de indivíduos são infectados por ano (SPITZER et al., 2016). Espécies do gênero *Candida*, dentre elas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* causam principalmente a candidíase. O gênero *Cryptococcus* é responsável pela criptococose (GAONA-FLORES et al., 2016). As espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são encontradas no solo ou materiais orgânicos em decomposição. Essas espécies podem causar pneumonia, disseminar-se pelo corpo e evoluir

para meningite. Além disso, *C. gattii* responde mais lentamente aos tratamentos antifúngicos quando comparado ao *C. neoformans* (ESPINEL-INGROFF e KIDD, 2015). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida principalmente pelo uso industrial, no entanto, esse fungo quando associado a espécies do gênero *Candida*, apresenta riscos a saúde humana (SILVA et al., 2011).

Micobactérias é um amplo grupo de micro-organismos responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade. Estima-se que mais de 170 espécies já foram protocoladas, responsáveis por diversas doenças (ALCAIDE et al., 2017). As micobactérias do gênero *Mycobacterium* apresentam quatro camadas na parede celular, composta por peptidoglicano, arabinoglicano, ácidos micólicos e uma variedade de lipídeos, sucessivamente (HINRICHSEN, 2007; CARDOSO, 2009).

Usualmente, as micobactérias são classificadas em: *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias não tuberculosas e *M. leprae* (GRIFFITH et al., 2007). As micobactérias não tuberculosas podem ser encontradas no solo, água, nas plantas e na vida animal (RAO e SILVEIRA, 2018). Existem diversas espécies, entre elas, as de crescimento rápido, responsáveis por doenças em seres humanos, como infecções de pele e tecidos moles, doenças pulmonares, linfadenite, inclusive disseminação (WU e HOLLAND, 2015). As micobactérias não tuberculosas compreendem as espécies *Mycobacterium abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*. No mundo, estima-se que existe um aumento considerável de infecções provindas de micobactérias (VARGHESE et al., 2017). No Brasil, a maioria dos casos estão relacionados a falhas no processo de limpeza, desinfecção e esterilização de materiais cirúrgicos (ANVISA, 2008). Em um relatório publicado pela ANVISA no período de 1998 a 2009, verificou-se que as espécies mais incidentes foram: *M. abscessus* (31,3%), *M. abscessus* subsp. *bolletii* (30,4%); *M. fortuitum* (13,8%) e *M. chelonae* (1,5%) (ANVISA, 2011). Diversos surtos foram relatados envolvendo micobactérias, entre esses, na cidade de Campinas (SP) envolvendo *M. fortuitum* e *M. porcinum* isoladas de próteses mamárias, após pacientes serem submetidas a mastoplastia (PADOVEZE et al., 2007). *Mycobacterium abscessus* é uma espécie responsável por diversas infecções, principalmente pós-transplante, sendo na pele e nos tecidos moles as mais comuns. Além disso, *M. abscessus* é um patógeno preocupante, devido a baixa suscetibilidade aos antimicrobianos, toxicidade dos tratamentos e o risco de recorrência (RAO e SILVEIRA, 2018). *Mycobacterium fortuitum* está associada a infecções em pele, ossos, articulações, atingindo principalmente pacientes imunocomprometidos. Em adição, há ocorrência de infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes com tuberculose, câncer de pulmão e outras doenças

pulmonares (OKAMORI et al., 2018). *Mycobacterium massiliense* relacionam-se a doenças pulmonares, como fibrose cística e pulmonares crônicas (CHOI et al., 2017).

2.3.2 Atividade antioxidante

O oxigênio molecular obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbicos, no entanto, a formação de radicais livres *in vivo* em excesso resulta no estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de agentes oxidantes e dos agentes deteriorantes, chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) está em desequilíbrio. Os fatores que influenciam são: predisposição genética, ambientais, como radiação UV e propriedades intrínsecas específicas de grupo celulares que podem favorecer ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (VICENTINO e MENEZES, 2007). Os exemplos mais comuns encontrados de EROs são radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila ($RO_2^{\cdot-}$), alcoxila (RO^{\cdot}), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot-}$). Moléculas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrato (ONOO) apesar de não serem radicais livres, podem levar à formação deles através de reações químicas (VICENTINO e MENEZES, 2007).

Os radicais livres formam-se, principalmente, nas mitocôndrias, citoplasma e membranas celulares. Em condições fisiológicas cerca de 85 a 90% do oxigênio é metabolizado na mitocôndria, o restante é utilizado por enzimas, tais como, oxidases e oxigenases. Entretanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio metabolizado são desviados para outra via metabólica, reduzidos e dando origem aos radicais livres. Outra fonte geradora de radicais são as enzimas NADPH oxidases, responsáveis pela transferência de elétrons entre membranas celulares (BARBOSA et al., 2010).

Estudos apontam que os radicais livres estão relacionados com a patogenia de doenças, tais como, diabete, isquemia cardíaca, arteriosclerose, câncer, processo de envelhecimento e alterações no DNA (BARREIROS et al., 2006; JUNG et al., 2008).

Sendo assim, a busca de antioxidantes provindo de fontes naturais (fungos e plantas) tem sido uma alternativa, pois a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos e flavonoides, muitas vezes, apresentam bons potenciais antioxidante. Ademais, antioxidantes naturais podem ter menos efeitos toxicológicos quando comparado aos sintéticos, por exemplo: hidroxitolueno butilado (BHT) e 2 e 3 terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) (JUNG et al., 2008).

Testes *in vitro* são utilizados para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais utilizando um radical estável (2,2-difenil-1-picrilidrazila, DPPH), medindo-se, então, a capacidade dos compostos naturais sequestrarem esse radical (MENSOR et al., 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL FÚNGICO

O fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* foi coletado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - 29° 42' 7.77" S, 53° 43' 16.07" W; Latitude: -29.702158, Longitude: -53.721131) (https://tools.wmflabs.org/geohack/geohack.php?language=pt&pagename=Camobi¶ms=29_42_7.77_S_53_43_16.07_W_type:city_region:BR_scale:75000_scale:7500), localizada na cidade de Santa Maria-RS, em maio de 2015, próximo a uma plantação de *Pinus*. A espécie foi identificada pela professora Dra. Zaida Inês Antonioli, do Departamento de Solos da UFSM.

A espécie saprofítica *Phellinotus piptadeniae* foi coletada em dois locais: sede da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) localizada na região do distrito de Boca do Monte (29° 40' 19.7" S, 54° 0' 21.04" W; Latitude -29.672103, Longitude -54.005844) ([https://pt.wikipedia.org/wiki/Boca_do_Monte_\(distrito_de_Santa_Maria\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Boca_do_Monte_(distrito_de_Santa_Maria))), no município de Santa Maria (RS), em setembro de 2016 e Florianópolis-SC (27° 35' 49" S, 48° 32' 56" W, Latitude: -27.596944, Longitude: -48.548889) (https://tools.wmflabs.org/geohack/geohack.php?language=pt&pagename=Florian%C3%B3polis¶ms=27_35_49_S_48_32_56_W_type:city_region:BR_scale:75000), em outubro de 2016. Ambos materiais foram coletados de troncos da espécie *Piptadeniae Gonoacantha* (conhecida popularmente como pau-de-jacaré). A espécie foi identificada pelo professor Dr. Gilberto Coelho, do Departamento de Educação da UFSM.

3.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.2.1 Cromatografia em coluna (CC)

Para as colunas cromatográficas de diferentes diâmetros internos utilizou-se sílica gel (SILICYCLER) tipo 60 (Sorbent) (70-230 e 230-400 mesh), como adsorvente e foram eluídas por solventes puros ou sistemas gradientes, para a separação inicial de alguns dos compostos.

3.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada foi efetuada em cromatoplacas de folhas de alumínio usadas como suporte e sílica gel 60 GF254 com 0,25 mm de espessura, como

adsorvente. As placas foram reveladas em lâmpada ultravioleta ($\lambda = 264$ e 365 nm, spectroline) usando-se os reativos de vanilina e anisaldeído para terpenos em geral, solução de cloreto férrico para os compostos fenólicos e borrifação com solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico para os demais metabólitos.

3.2.3 Cromatografia em placa preparativa (CCDP)

Para a purificação de alguns compostos utilizou-se placas de vidro (20 cm x 20 cm) recobertas com sílica gel 60 GF254 (Sorbent) e água deionizada para a deposição.

3.2.4 Cromatografia Gasosa (CG), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR)

Os procedimentos em CG foram realizados em cromatógrafo a gás (Varian), modelo 3800 do grupo NPPN. Os sinais foram observados através de um detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), com uma pressão de 7 Psi, Split 10, temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 280 °C.

As análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução modelo Xevo G2 Q-TOF (Waters) do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais/CEPETRO. A amostra foi introduzida em infusão em solução de Acetonitrila-H₂O (1:1) com 0,1 % de ácido fórmico a 5 μ L/min, em modo ESI (+), tensão do capilar 2 kV, cone de extração 1V, cone de amostragem 15V, temperatura da fonte foi de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 500 °C, cone de gás a 10 L/hora, gás de dessolvatação a 600 L/hora, utilizando-se como gás de dessolvatação nitrogênio.

3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 com detector DAD (210 a 380 nm), utilizando-se coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 nm; 5 μ m) em forno a 40 °C. Foi utilizado um gradiente de solvente de MeOH:H₂O com fluxo de 1 ml.min⁻¹. A amostra foi introduzida inicialmente sob infusão em um gradiente de solução de MeOH (95:05) com 0,1 % de ácido fórmico. No tempo de 15 minutos essa proporção variou até resultar em 100% de MeOH, que se manteve até o final da análise (30 min).

3.3 REAGENTES E SOLVENTES UTILIZADOS

Os reagentes e solventes utilizados tem procedência Vetec e Tedia, de grau comercial, purificados por técnicas de destilação. Os gradientes de misturas de solventes utilizados estão descritos no decorrer do texto.

3.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H E ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC, Dept 135) foram realizados em um espectrômetro Bruker DPX 400, operando a 400,13 MHz para ^1H e 100, 62 MHz para ^{13}C , e um espectrômetro Bruker ASCEND 600, operando a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidade entre 3-20 mg de amostra em 0,4 mL de solvente deuterado em tubos de 5 mm. Os solventes deuterados utilizados para as análises das amostras foram clorofórmio (CDCl_3), piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e metanol ($\text{MeOH-}d_4$). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros utilizou-se como referência interna o TMS (δ 0,00) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de ^{13}C utilizou-se CDCl_3 (δ 77,00), $\text{MeOH-}d_4$ (δ 49,05) e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (δ 135,00). Os espectros 1D e 2D foram processados com o software da Bruker TOPSPIN-NMR 3.2. Os espectros 2D Homonuclear ($^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY-45) e Heteronuclear (HSQC, HMBC) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo software TOPSPIN-NMR 3.2 da Bruker.

3.5 ANÁLISES POR ESPECTRÔMETRIA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Os dados das medidas cristalográficas foram obtidos em aparelho Bruker kappa-Apex II CCD sistema difratômetro equipado com um monocromador de grafite e um cristal de molibdênio (Mo) selado em tubo cerâmico de raios-X ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) do Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Santa Maria.

3.6 ANÁLISES POR ESPECTROFOTOMETRIA – FLUORÍMETRO

Para as leituras de microplacas (96 poços) utilizadas na avaliação das atividades biológicas utilizou-se espectrofotômetro SpectraMax M2 e SoftMax Pro 5.4.1 (Molecular Devices Inc., USA), do departamento de bioquímica da UFSM, operando em 620 nm para os testes antimicrobianos, 517 e 695 nm para os testes antioxidantes.

3.7 PONTO DE FUSÃO

Os valores de ponto de fusão das substâncias isoladas foram determinados em um aparelho MQAPF-301 da Microquímica, do departamento de química da UFSM.

3.8 POLARIMETRIA

A determinação da rotação ótica das amostras foi realizada em polarímetro Auto Pol I, cédula de 1 dm de comprimento, utilizando clorofórmio como solvente. Os experimentos foram realizados no Laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (NPPN).

3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

3.9.1 Método dos antioxidantes totais

O potencial antioxidante total das frações FAct e FMeOH da espécie *Phellinotus piptadeniae* foram avaliados pelo método do fosfomolibdênio (PRIETO et al., 1999). As frações e o BHT (controle positivo) foram testados nas concentrações 500, 100 e 10 µg/mL. Os frascos foram tapados e incubados a 95 °C por 90 min. Depois de resfriar a mistura até à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 695 nm, utilizando um Spectra Max Plate Reader® M2 (Molecular Devices), Sunnyvale, Califórnia, EUA.

3.9.2 Método do Radical Livre – Ensaio Quantitativo

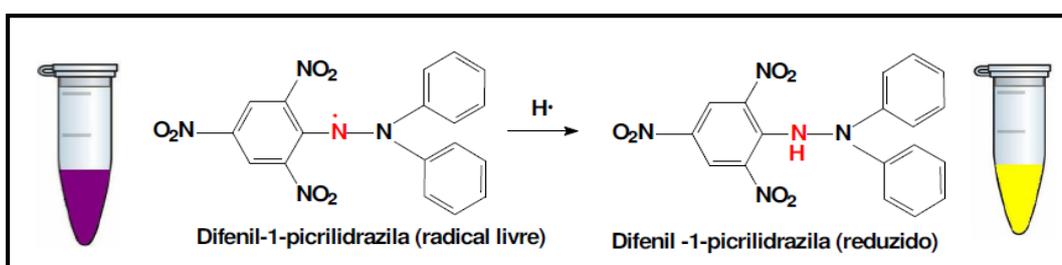
O método consiste na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (BROINIZI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2011; SOUSA et al., 2007), onde avalia-se a capacidade dos compostos testados de serem doadores de hidrogênio (ação antioxidante). A

solução de DPPH possui uma coloração violeta que se descolore progressivamente, tornando-se amarelada, permitindo assim, a observação da capacidade antioxidante do composto testado.

Com o intuito de se avaliar a capacidade antioxidante de frações e metabólitos isolados, foi realizado o teste quantitativo. Realizou-se a leitura da absorbância das amostras, em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices Corp.), em um determinado comprimento de onda (517 nm) frente o Branco e controle positivo (BHT).

Para a avaliação da capacidade antioxidante, as amostras e o padrão BHT foram preparados em concentrações de 1000 μ g/mL. Após, 200 μ L de cada amostra é transferida para a primeira linha da placa (96 poços) nos seis primeiros poços correspondente a amostra (triplicata), a seguir adiciona-se 100 μ L de metanol a partir da segunda linha da placa procedendo-se as diluições em série até se obter concentrações de 500 a 7,81 μ g/mL. A cada diluição, são acrescentados nas colunas pares 100 μ L de solução de DPPH 0,004% e nas colunas ímpares 100 μ L. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 30 minutos, sob proteção da luz. Após, ocorre a descoloração das amostras, passando de roxa para amarelada, naquelas que apresentarem atividade antioxidante positiva. A estrutura do DPPH e sua redução por um agente antioxidante é ilustrada na Figura 14.

Figura 14 – Redução do DPPH via Radical Livre



Através da leitura, é possível determinar a redução do radical livre. Para avaliar a atividade de captura do radical pelas amostras testadas, a porcentagem de inibição é calculada pela fórmula: % de inibição = $[(Ac-Aa)/Ac] \times 100$, onde Ac é a absorbância da solução controle e Aa é a absorbância da amostra testada, no tempo de 30 minutos. Através de regressão linear, a partir das médias das porcentagens, é obtida a IC₅₀, sendo a concentração que causa 50% de inibição do radical livre DPPH.

3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os métodos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM) foram os de microdiluição em caldo padronizados (M7-A6) e (M27-A2) pelo National Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2005; NCCLS, 2002).

Os micro-organismos que foram empregados para a realização da atividade antimicrobiana são cepas referência da American Type Collection (ATCC), constituídos de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (Tabela 1).

Tabela 1 – Micro-organismos

Características	Micro-organismo	ATCC
Gram – positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	19659
	<i>Enterococcus sp.</i>	6589
	<i>Bacillus cereus</i>	11778
	<i>Enterococcus faecalis</i>	19433
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Gram – negativas	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
	<i>Burkholderia cepacia</i>	17759
	<i>Morganella morganii</i>	25829
	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	14028
	<i>Shigella Sonnei</i>	25931
	<i>Proteus mirabilis</i>	25933
	<i>Shigella flexneri</i>	12022
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	13076
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
Fungos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IC
	<i>Candida albicans</i>	10231
	<i>Candida tropicalis</i>	750
	<i>Candida krusei</i>	6258
	<i>Candida parapslosis</i>	22019
	<i>Candida dubliniensis</i>	MYA-577
	<i>Candida glabrata</i>	2001
	<i>Sacharomyces cervisiae</i>	2601
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	28952
	<i>Cryptococcus gattii</i>	56990

3.10.1 Padrões utilizados nos Ensaio Microbiológicos

Os padrões utilizados foram Cloranfenicol e Ampicilina para bactérias e Fluconazol e Nistatina para fungos (200-1,56 $\mu\text{g/mL}$).

3.10.2 Meios de culturas empregados

Os meios foram preparados conforme instruções do fabricante e, esterilizados em autoclave a 121°C, 1atm, durante 20 minutos. As cepas dos micro-organismos indicadores foram armazenados em geladeira, sendo utilizado meio Ágar Müller-Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para fungos (meio repique).

3.10.3 Preparação dos inóculos e determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo

Com o auxílio de uma alça de inoculação transferiu-se culturas dos micro-organismos indicadores para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,8%. Os inóculos foram estandardizados a 0,5 da escala nefelométrica de McFarland.

As amostras foram diluídas em meio líquido (Metanol, DMSO – 2,5 mg/mL para extratos e 1mg/mL para padrões) e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para extratos e 200 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para substâncias puras. Cada poço foi inoculado com os micro-organismos e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e 48h a 27°C para fungos. Após a incubação e o período de crescimento, realizou-se a leitura das placas.

A leitura foi realizada através da medida de Densidade Ótica em um aparelho espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2). A microplaca de 96 poços foi colocada num Spectra Max M2 espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices Corp) programado para realizar as medições a 25°C. As densidades óticas das culturas celulares foram lidas utilizando com um comprimento de onda de 620 nm (LEHTTINEN et al., 2006).

3.10.4 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

Nos poços que não apresentaram crescimento de micro-organismos, foram realizados repiques das diluições para outra placa de 96 poços contendo caldo Casoy para bactérias e Sabourand para fungos. Após o período de incubação, fez a leitura novamente em

espectrômetro a 620 nm, sendo assim, foi possível determinar a menor concentração capaz de causar a morte dos microrganismos (CLM). Todos os testes foram realizados em triplicata, efetuando-se a análise dos padrões simultaneamente.

3.11 ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

Para o estudo da atividade antimicobacteriana utilizou-se os micro-organismos *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *M. fortuitum* (ATCC 6841) e *M. massiliense* (ATCC 48898). As colônias foram isoladas em meio sólido Löwesten-Jensen (HiMedia Laboratories) e em seguida cultivadas em meio Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories) contendo 0,2% (vol/vol) de glicerol e 10% (vol/vol) de OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase).

Os testes de suscetibilidade foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo padrão CLSI M24-A2 (CLSI 2011). As amostras foram avaliadas nas seguintes concentrações: frações 1250-9,76 $\mu\text{g/mL}$ e compostos puros 500 $\mu\text{g/mL}$ - 3,90625 $\mu\text{g/mL}$. As soluções-estoque iniciais das frações e compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 50 mg / mL, das quais foram feitas diluições adicionais no caldo Mueller-Hinton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Índia). A padronização da densidade do inóculo para o teste de suscetibilidade foi realizada de acordo com a escala McFarland 0.5. A leitura das placas foi realizada após 72 h de incubação a 35 ° C e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo uso do indicador 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Brasil) (CLSI, 2013).

Sulfametoxazol e Claritromicina foram utilizados como padrões e os ensaios foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES NEUTRAS

Os fungos *Phellinotus iptadeniae* (I RS-1,030 Kg e II SC-3,400 Kg) (Figura 15 e Figura 16) e *Pisolithus tinctorius* (1,200 Kg) (Figura 17) e foram picados em pequenos pedaços e secos em estufa de ar circulante à 50°C, durante 48 h, obtendo-se 0,550 Kg, 2,340 Kg e 0,809 Kg, respectivamente. Após a secagem, os materiais fungicos foram submetidos a extrações a frio com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e metanol para *Pp* e hexano e acetato de etila para *Pt*), por um período de 45 dias até a completa exaustão. Ao final de cada extração, o solvente era evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se assim as respectivas frações de cada espécie.

Das extrações da espécie *Phellinotus iptadeniae* coletada no RS e SC obteve-se as seguintes frações: fração hexânica RS (FHex RS *Pp*) 0,9g e SC (FHex SC *Pp*) 2,9g, fração acetato RS (FACOEt RS *Pp*) 1,1 g e SC (FACOEt SC *Pp*) 8,65g, fração metanol RS (FMeOH RS *Pp*) 6,5g e SC (FMeOH SC *Pp*) 36,6g. Enquanto que as extrações da espécie *Pisolithus tinctorius* resultaram nas seguintes frações: Fração hexânica (FHex *Pt*) 3,0 g e a fração acetato de etila (FACOEt *Pt*) 5,8 g.

Figura 15 – Fracionamento neutro do fungo *Phellinotus iptadeniae* RS

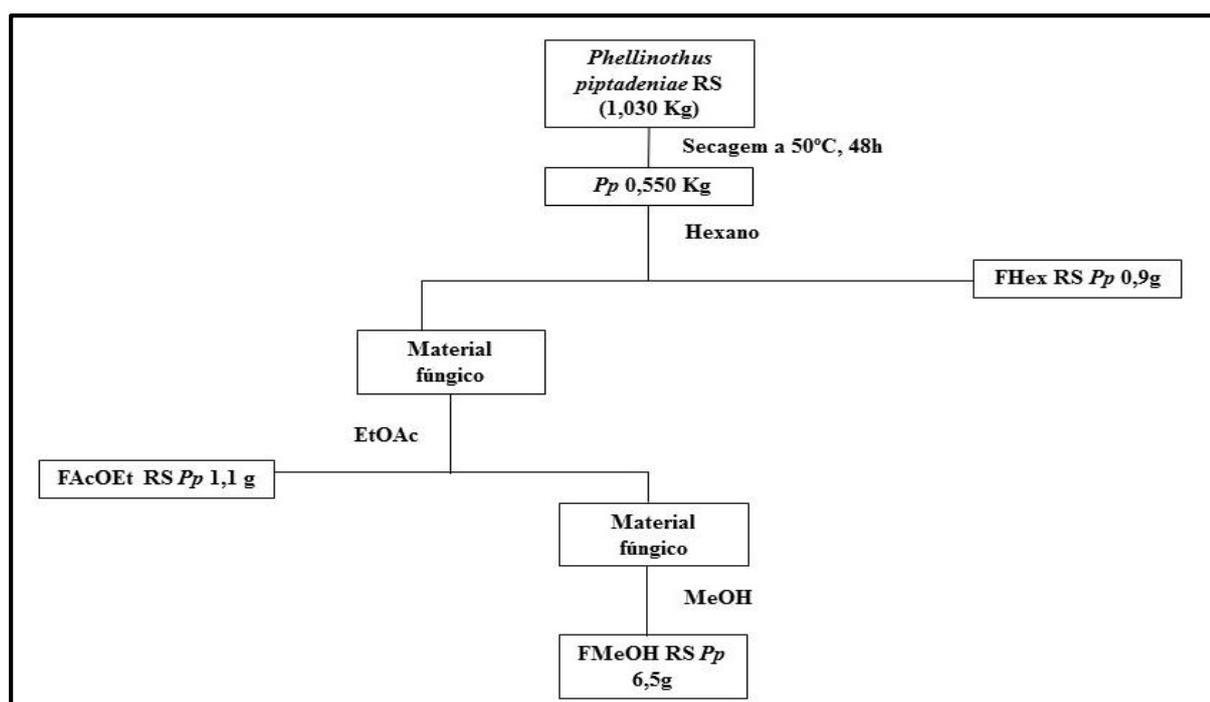


Figura 16 – Fracionamento neutro do fungo *Phellinotus iptadeniae* SC

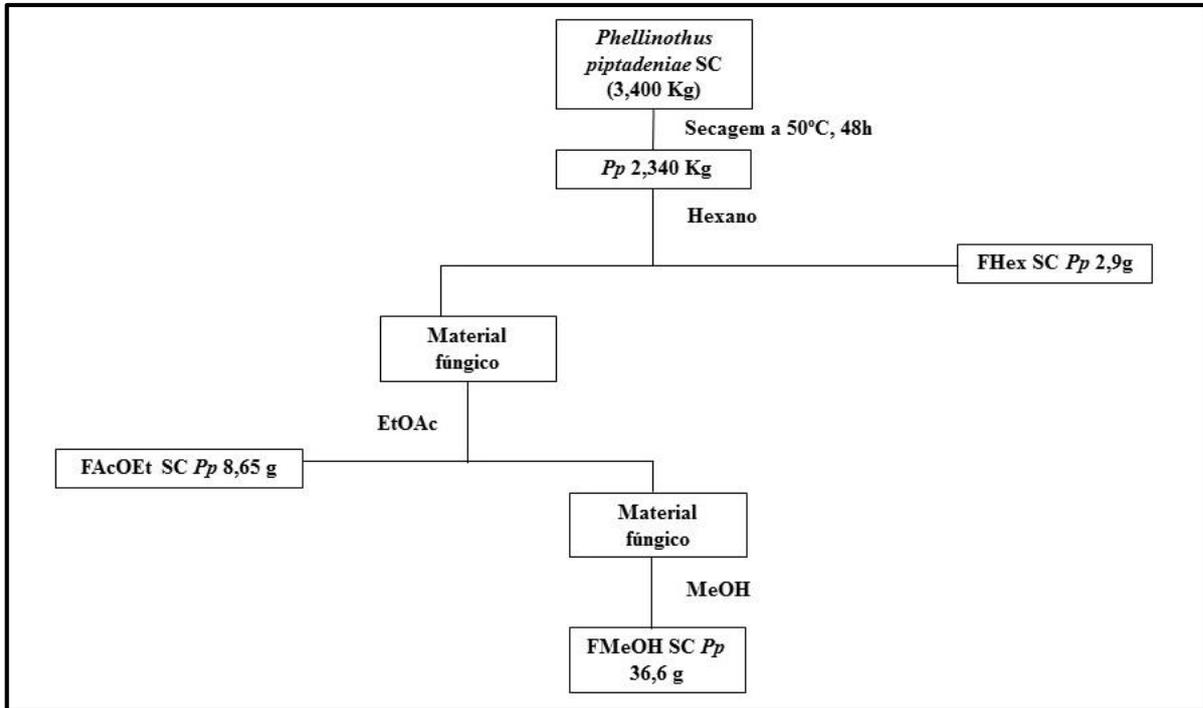
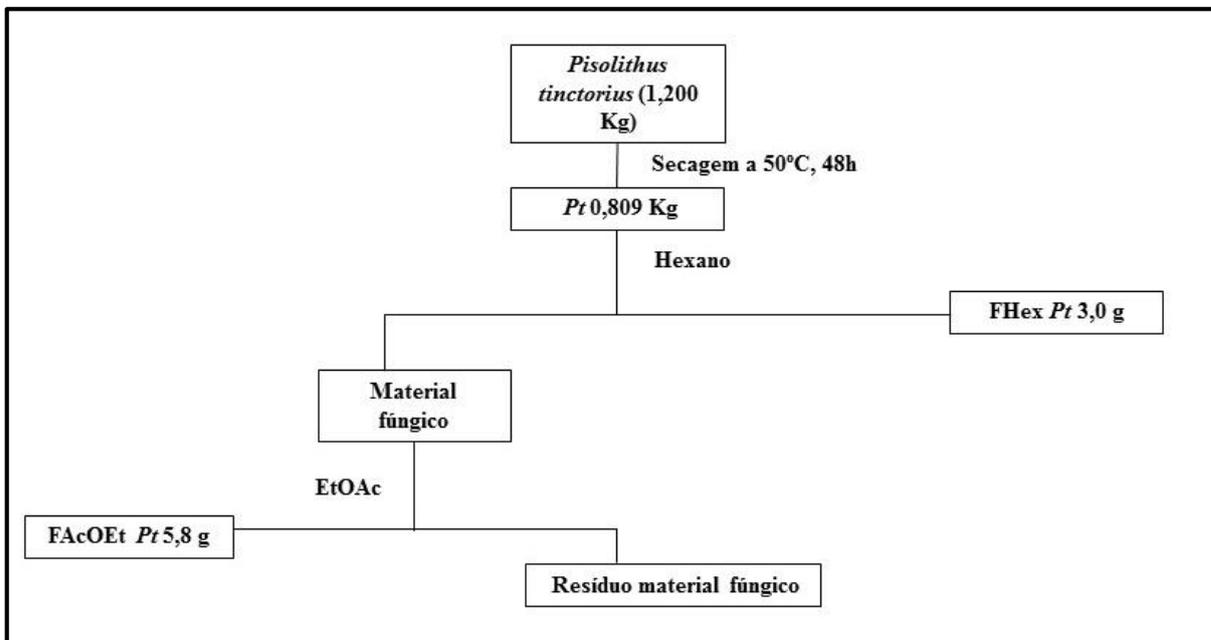


Figura 17 – Fracionamento neutro do fungo *Pisolithus tinctorius*



4.2 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES

Os rendimentos das frações das espécies estudadas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento das frações neutras

Frações	Quantidades obtidas (g)	% em Relação ao Material Seco
FHex RS <i>Pp</i>	0,9	0,17
FAcOEt RS <i>Pp</i>	1,1	0,2
FMeOH RS <i>Pp</i>	6,5	1,2
FHex SC <i>Pp</i>	2,9	0,12
FAcOEt SC <i>Pp</i>	8,65	0,37
FMeOH SC <i>Pp</i>	36,6	1,6
F Hex <i>Pt</i>	3,0	0,37
F AcOEt <i>Pt</i>	5,8	0,72

4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

As frações obtidas foram analisadas por meio de CCD, em diferentes solventes e gradientes de misturas, e reveladas posteriormente em lâmpada UV 254nm e UV 365nm, com aplicação de vanilina para identificação da presença de triterpenos, anisaldeído para terpenos em geral, solução de cloreto férrico para compostos fenólicos e solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico para os demais metabólitos.

As frações FAcOEt RS, FAcOEt SC, FMeOH Rs e FMeOH SC apresentaram positividade para compostos fenólicos quando revelados com solução de cloreto férrico, além disso todas as frações obtidas da espécie *Phellinotus piptadeniae* mostraram positividade para terpenos, através de testes realizados com reagente anisaldeído.

As frações FHex *Pt* e FAcOEt *Pt* obtidas da espécie *Pisolithus tinctorius* demonstraram positividade para triterpenos e terpenos em geral, quando testados com os reagentes vanilina e anisaldeído.

A purificação das frações e isolamento dos metabólitos foram realizados através de técnicas de cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

4.3.1 Frações neutras de *Phellinotus piptadeniae*

4.3.1.1 Frações hexânicas

A fração Hex RS (FHex RS *Pp* 0,9 g) foi submetida a uma lavagem com hexano, afim de retirar parte da pigmentação e gordura presentes nessa fração. Após a lavagem, obteve-se cristais brancos e finos. Esses foram submetidos a análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e, comparando com os dados relatados na literatura (CHANG et al., 2018) identificou-se como sendo o triterpeno ergosterol (D2; 140,2 mg).

A fração Hex SC (FHex SC) foi cromatografada em coluna empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/acetato de etila com gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Essa fração apresentou dificuldade de se realizar o isolamento de metabólitos puros, uma vez que esses encontraram-se na forma de misturas, contendo 2 a 3 triterpenos, os quais foram analisados e confirmados através de análises de cromatografia gasosa.

4.3.1.2 Frações acetato de etila

Devido a maior quantidade obtida da fração FAcOEt SC, optou-se por investigar os metabólitos presentes. Uma parte da FAcOEt Sc (7,2 g) foi submetida a CC empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/ acetato de etila/metanol com gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 618 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a similaridade (Tabela 3).

A maioria das frações mostrou ser composta por mistura de metabólitos. Essas frações foram submetidas a novos processos de purificação, através de cromatografia em placa preparativa (CCDP).

Tabela 3 – Separação em CC da fração AcOEt SC (FAcOEt SC *Pp*) obtido de *P. piptadeniae*

Frações	Subfrações	% solventes	Peso (mg)	Substância
1-14	1 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 1%	3,9	Mistura
15-49	2 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 1%	9,8	Mistura
50-65	3 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 3%	1,0	Mistura
66-99	4 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 5%	114,5	Mistura
100-105	5 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 5%	5,9	Mistura
106-109	6 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 5%	2,2	Mistura
109-114	7 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	9,9	D6 + Mistura
115-122	8 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	13,1	D11 + Mistura
123-128	9 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	4,8	D11 + Mistura
129-135	10 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	4,8	D11 + Mistura
136-147	11 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	9,2	D11+ Mistura
148-150	12 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	4,2	Mistura
151-155	13 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 8%	5,4	Mistura
156-163	14 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 10%	9,6	Mistura
164-172	15 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 10%	7,2	Mistura
173-178	16 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 10%	29,1	Mistura
179-183	17 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 10%	27,8	Mistura
184-189	18 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 10%	31,1	Mistura
190-235	19 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 12%	289,4	Mistura
236-290	20 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 15%	492,1	Mistura
291-331	21 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 18%	182,5	Mistura
332-364	22 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 20%	69,4	D1 + Mistura
365-393	23 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 25%	60,2	Mistura
394-442	24 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 30%	154,2	Mistura
443-462	25 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 35%	97,2	Mistura
463-472	26 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 35%	167,3	Mistura
473-482	27 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 35%	67,4	D9 + Mistura
483-488	28 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 40%	34,0	Mistura
489-496	29 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 40%	22,6	Mistura
497-502	30 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 40%	31,1	Mistura
503-506	31 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 40%	27,5	D9 + Mistura
507-511	32 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 40%	33,6	D9 + Mistura
512-517	33 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	46,6	Mistura
518-520	34 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	21,6	Mistura
521-525	35 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	33,8	Mistura
526-532	36 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	68,7	Mistura
533-537	37 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	33,9	Mistura
538-542	38 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	29,3	Mistura
544-548	39 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	32,7	Mistura
549-550	40 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	12,5	Mistura
618	48 <i>Pp</i>	Metanol	308,1	Mistura
551-556	41 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 50%	81,1	Mistura
557-568	42 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 80%	221,0	Mistura
569-580	43 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 80%	273,1	Mistura
581-590	44 <i>Pp</i>	Hex/AcOEt 80%	249,0	Mistura
591-600	45 <i>Pp</i>	Acetato	276,6	Mistura
611-617	47 <i>Pp</i>	AcOEt/MeOH 30%	115,2	Mistura

Foi realizada CCDP da subfração 7 *Pp* (9,9 mg) utilizando-se o sistema solvente eluente Hex/AcOEt 10%, e após testado em CCD e cromatografia gasosa, confirmou-se a presença do composto puro. Esse apresentou positividade frente ao reagente anisaldeído a absorção na luz UV 254 nm. Posteriormente, as análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais levaram a identificação do composto como sendo o 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6, 5,1 mg). O mesmo procedimento foi realizado para as subfrações 8 *Pp*, 9, 10 e 11 *Pp*, porém isolou-se outro composto, onde através de técnicas de RMN ^1H e ^{13}C possibilitou-se a identificação do 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (D11, 16,4 mg).

Na subfração 22 *Pp* (69,4 mg), após a evaporação do solvente em temperatura ambiente ocorreu a formação de cristais finos de coloração branca e amareladas misturadas, os quais foram submetidos à lavagem com n-hexano, para remoção de impurezas. Os cristais foram solubilizados em clorofórmio e testados em CCD, revelados com anisaldeído, confirmando ser um triterpeno. Além disso, realizou-se análise de CG para determinar a porcentagem da pureza da amostra. Dessa forma, obteve-se uma substância pura (30 mg) que, através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (FANGKRATHOK et al., 2013), permitiu-se a identificação do triterpeno nomeado como Peróxido do ergosterol (D1, 30mg).

Em um primeiro momento, a subfração 27 *Pp* (67,4 mg) foi submetida a CCDP utilizando-se como sistema eluente uma mistura de solvente Hex CHCl_3 /AcOEt/Acetona em uma proporção de (50:5:12:33) totalizando o volume de 100 mL. As amostras obtidas foram analisadas por CCD e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV a fim de verificar a pureza. Como as amostras obtidas ainda não estavam totalmente puras, realizou-se outra CCDP, mas em menor proporção, utilizando-se o sistema eluente clorofórmio/acetona/ácido fórmico em uma proporção de (75:17:8) para o volume de 100 mL. Após análises de CCD e CLAE confirmou-se a presença de um metabólito puro, o qual apresentou positividade frente ao revelador de cloreto férrico (FeCl_3). Técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais confirmaram o metabólito como sendo o composto fenólico (D9, 3,3 mg).

As subfrações 31 *Pp* (27,5 mg) e 32 *Pp* (33,6 mg) foram submetidas a CCDP utilizando-se como sistema eluente clorofórmio/acetona/ácido fórmico em uma proporção de (75:17:8) totalizando o volume de 100 mL. Cada amostra obtida da CCDP foi tratada com soluções de cloreto férrico, anisaldeído e ácido sulfúrico sob aquecimento nas placas de CCD e CLAE (UV), com o intuito de se verificar a pureza das amostras. Desta forma, obteve-se a substâncias D9, a qual já havia sido isolada anteriormente em outra fração, onde D9 apresentou positividade frente a solução de cloreto férrico confirmando ser um composto fenólico.

As demais frações também foram trabalhadas separadamente, através de técnicas cromatográficas de CCD, CC, CCDP, entretanto, não foi possível a purificação dos metabólitos secundários presentes nas mesmas, devido a grande semelhança dos Rf's dos metabólitos presentes, além disso a presença de compostos muito polares.

4.3.1.3 Frações metanólicas

A maior parte das subfrações foram analisadas e trabalhadas individualmente, no entanto o grau de polaridade dificultou o isolamento e purificação dos compostos presentes, uma vez que estas apresentavam muitos compostos com Rf's similares, sendo difíceis de separar através das técnicas disponíveis no laboratório de pesquisa.

Além disso, as subfrações também foram analisadas através de cromatografia líquida com detector UV e cromatografia gasosa, permitindo assim identificar a presença dos mesmos metabólitos presentes na FAcOEt SC, trabalhada anteriormente (Apêndice A, Apêndice B, Apêndice C e Apêndice D).

4.3.2 Frações neutras de *Pisolithus tinctorius*

4.3.2.1 Fração hexânica

A fração FHex Pt (2,8 g) foi submetida a CC empregando sílica gel 60H (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano/acetato de etila/metanol com gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 243 frações de 150 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com a similaridade, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Separação em CC da fração Hexânica (FHex *Pt*) obtido da espécie *Pisolithus tinctorius*

Frações	Subfrações	% solventes	Peso (mg)	Substâncias
1-5	1 <i>Pt</i>	Hexano	12,6	Mistura
6-25	2 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 10%	14,0	Mistura
26-52	3 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 15%	350	P1 + Mistura
53-56	4 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 15%	40,4	Mistura
54-70	5 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 20%	136,7	P 65 + Mistura
71-87	6 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 25%	227,3	P 180 + Mistura
88-111	7 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 30%	89,7	Mistura
112-165	8 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 40%	237,4	Mistura
166-179	9 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 50%	58,1	Mistura
180-202	10 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 60%	66,9	Mistura
203-209	11 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 70%	142,4	Mistura
210-217	12 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 80%	135,0	Mistura
218-225	13 <i>Pt</i>	Acetato	82,3	Mistura
226-235	14 <i>Pt</i>	AcOEt/MeOH 30%	150,0	Mistura
236-242	15 <i>Pt</i>	AcOEt/MeOH 50%	157,4	Mistura
243	16 <i>Pt</i>	Metanol	280,0	Mistura

Um metabólito de coloração branca (8,4 mg) foi obtido após separação, por CC, da subfração 3*Pt* (350 mg) retirada da fração hexânica neutra, acompanhada de análise em CCD e revelador vanilina, utilizando-se como eluente um sistema com gradiente de polaridade crescente Hex/AcOEt. Análises de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram a identificação do metabólito P1 como sendo o ácido hexadec-5-enóico.

A subfração 5*Pt* (136,7 mg) foi submetida a CCDP utilizando o sistema eluente Hex/AcOEt 20%. A amostra obtida apresentou positividade frente ao revelador vanilina em placas de CCD. Através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais levaram a identificação do composto como sendo o triterpeno lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P,65, 2,8 mg).

Na subfração 6 *Pt*, após a evaporação do solvente em temperatura ambiente ocorreu a formação de cristais de coloração branca e amareladas misturadas, os quais foram submetidos à lavagem com n-hexano, para remoção de impurezas. Os cristais de coloração branca foram solubilizados em clorofórmio e testados em CCD com revelador vanilina, confirmando ser um triterpeno. Dessa forma obteve-se uma substância pura (P180, 90 mg) que através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C , difração de raios-X e dados da literatura (XU et al., 2001), levaram a identificação de um triterpeno conhecido como Pisolactona.

4.3.2.2 Fração acetato de etila

A fração acetato de etila neutra (5,0 g) foi cromatografada em coluna, empregando sílica gel F60 (240-400 mesh) como fase estacionária e Hex/AcOEt/MeOH num gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Foram coletadas 195 frações de 200 mL e evaporadas com evaporador rotatório. As frações foram comparadas em CCD e reunidas conforme suas similaridades, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Separação em CC da fração Acetato de etila (FAcOEt *Pt*) obtido da espécie *Pisolithus tinctorius*

Frações	Subfrações	% solventes	Peso (mg)	Substâncias
1-4	1 <i>Pt</i>	Hexano	12,0	Mistura
5-12	2 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 10%	104,6	Mistura
13-20	3 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 20%	343,0	Mistura
21-53	4 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 30%	559,8	P180 + P46 + Mistura
54-82	5 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 40%	436,1	P12 + Mistura
83-94	6 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 50%	178,0	Mistura
95-112	7 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 60%	62,0	Mistura
113-128	8 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 70%	49,0	Mistura
129-134	9 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 80%	67,0	Mistura
135-144	10 <i>Pt</i>	Hex/AcOEt 90%	83,0	Mistura
145-190	11 <i>Pt</i>	Acetato	310,0	P56 + Mistura
191	12 <i>Pt</i>	Metanol	200,0	Mistura

Parte da subfração 4*Pt* (559,8 mg) foi recromatografada em CCDP, sendo essa eluída com Hex/AcOEt a 15%, permitindo a purificação de um composto incolor (P46, 5,8 mg). Esse foi identificado através de experimentos de RMN de ¹H e ¹³C unidimensionais como sendo um derivado ftálico, compostos esses que estão presentes em materiais plásticos. Acredita-se que, é um produto de contaminação, sendo assim, decidiu-se não discutir e apresentar os espectros. Ademais, o composto pisolactona, isolado anteriormente na fração hexânica *Pt*, foi isolado nessa subfração, embora em menor quantidade (10 mg).

Devido a frequência do isolamento de derivados ftálicos no grupo NPPN, destaca-se aqui a importância e o cuidado ao utilizar-se materiais plásticos no laboratório, uma vez que o contato dos solventes orgânicos com esses materiais, podem ocasionar contaminação nas frações e amostras.

A CC foi realizada da subfração 5*Pt* (436,1 mg) utilizando-se como sistema eluente Hex/AcOEt, permitindo a purificação de um composto amarelo oleoso (P12, 2,9 mg). Análises

unidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C levaram a identificação do composto como sendo um derivado ftálico (Ftalato de bis 2-etil-heptila).

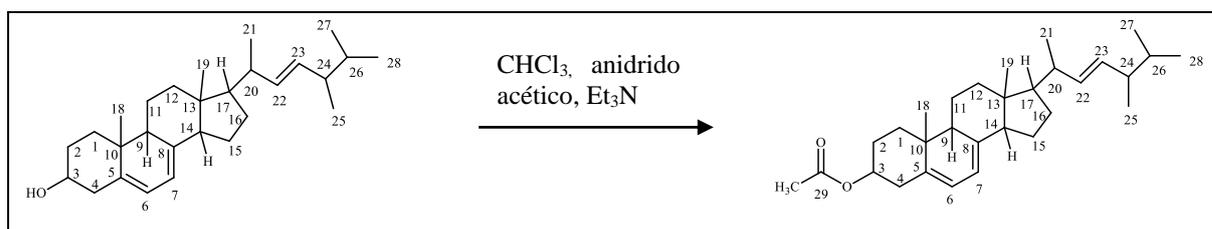
A subfração 11Pt (310 mg), após a evaporação do solvente, ocorreu a formação de um precipitado branco e marrom misturadas, os quais foram submetidos à lavagem com metanol, para remoção de impurezas. O sobrenadante foi removido com pipeta de Pasteur. O sólido branco foi solubilizado em piridina e testado em CCD. Após análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, identificou-se o composto como uma ceramida (P56, 98,4 mg).

4.4 MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

4.4.1 Acetilação do ergosterol

Em um balão de fundo redondo provido de agitação magnética adicionou-se (40 mg, 0,101 mmols) do ergosterol isolado da fração hexânica (FHex RS) da espécie *Phellinotus piptadeniae*, anidrido acético em excesso (40 mmols), 3 gotas de trietilamina e 20 mL de clorofórmio como solvente. A reação permaneceu sob agitação constante (24 h) a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD e, após observar a formação do produto, foi evaporado o solvente em um rotaevaporador. O bruto reacional foi purificado em CCDP utilizando-se como solvente Hex/AcOEt 10%. Obtendo-se o composto acetato do ergosterol (D2a 14 mg, 32%).

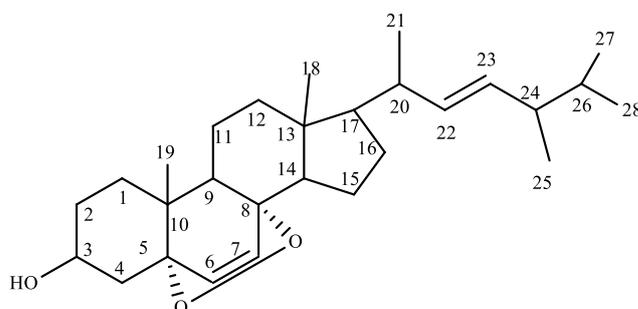
Esquema 1– Reação de acetilação do ergosterol



4.5 DADOS DOS COMPOSTOS

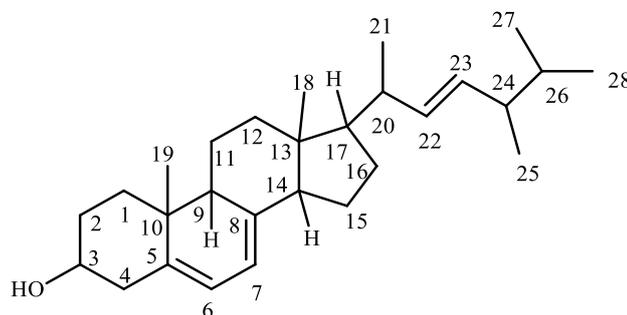
4.5.1 Metabólitos isolados da espécie *Phellinotus piptadeniae*

4.5.1.1 Composto D1 – Peróxido do Ergosterol



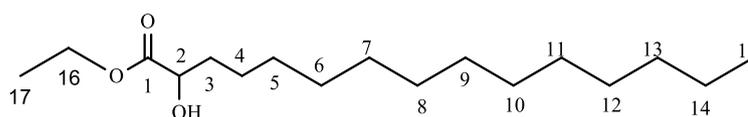
30,0 mg, sólido branco cristalino, p.f.: 175-177°C (LIT: 179-182°C, KIM et al., 1997), fórmula molecular: $C_{28}H_{44}O_3$, $[(M+H)^+] = 429,3369$ (teórico), $[(M+H)^+] = 429,3367$ (experimental), isolado da fração acetato FAcOEtSC *Pp* (Hex/AcOEt 20%), RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,82 (3H, s, H-18), 0,83 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-27), 0,84 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-28), 0,88 (3H, s, H-19), 0,91 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-25), 1,00 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-21), 1,22 (1H, m, H-11), 1,23 (1H, m, H-9), 1,24 (1H, m, H-15), 1,26 (1H, m, H-1), 1,37 (1H, m, H-16), 1,40 (1H, m, H-16'), 1,48 (1H, m, H-26), 1,48 (1H, m, H-14), 1,49 (1H, m, H-15'), 1,54 (1H, m, H-1'), 1,56 (1H, m, H-17), 1,58 (1H, m, H-11'), 1,67 (1H, m, H-12), 1,70 (1H, m, H-12'), 1,87 (1H, m, H-24), 1,90 (1H, ddd, $J=2,04, 5,2$ e $13,8$ Hz, H-2), 1,96 (1H, m, H-4), 1,96 (1H, m, H-20), 2,04 (1H, m, H-4'), 2,11 (1H, ddd, $J=2,04, 5,2$ e $13,8$ Hz, H-2'), 3,97 (1H, m, H-3), 5,15 (1H, m, H-22), 5,23 (1H, m, H-23), 6,23 (1H, d, $J=8,50$ Hz, H-7), 6,50 (1H, d, $J=8,50$ Hz, H-6), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 13,06 (C-18), 17,75 (C-25), 18,33 (C-19), 19,77 (C-27), 20,11 (C-28), 20,86 (C-11), 21,08 (C-21), 23,55 (C-15), 28,76 (C-16), 30,43 (C-1), 33,20 (C-26), 34,89 (C-12), 37,13 (C-2), 39,56 (C-4), 39,78 (C-20), 43,03 (C-13), 43,03 (C-24), 44,82 (C-10), 51,52 (C-14), 51,99 (C-17), 56,44 (C-9), 66,78 (C-3), 79,69 (C-8), 82,36 (C-5), 130,99 (C-6), 132,60 (C-23), 135,44 (C-22), 135,64 (C-7).

4.5.1.2 Composto D2 – Ergosterol



140, 2 mg, sólido branco cristalino, p.f.: 154,1-156,5°C (LIT: 159-161°C, CHANG et al., 2018), fórmula molecular: $C_{28}H_{44}O$, isolado da fração hexânica FHexRS *Pp*, RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,63 (3H, s, H-18), 0,83 (3H, d, $J=6,4$ Hz, H-27), 0,83 (3H, d, $J=6,4$ Hz, H-28), 0,91 (3H, d, $J=6,88$ Hz, H-25), 0,94 (3H, s, H-19), 1,02 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-21), 1,24 (1H, m, H-17), 1,25 (1H, m, H-12), 1,33 (1H, m, H-1), 1,33 (1H, m, H-15), 1,33 (1H, m, H-16), 1,48 (1H, m, H-2), 1,48 (1H, m, H-26), 1,61 (1H, m, H-11), 1,70 (1H, m, H-15'), 1,77 (1H, m, H-11'), 1,87 (1H, m, H-2'), 1,87 (1H, m, H-24), 1,90 (1H, m, H-1'), 1,90 (1H, m, H-14), 1,90 (1H, m, H-16'), 2,02 (1H, m, H-9), 2,04 (1H, m, H-20), 2,05 (1H, m, H-12'), 2,28 (1H, m, H-4), 2,46 (1H, m, H-4'), 3,63 (1H, m, H-3), 5,19 (1H, m, H-22), 5,19 (1H, m, H-23), 5,38 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-7), 5,57 (1H, d, $J=8$ Hz, H-6), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 12,2 (C-18), 16,44 (C-19), 17,75 (C-25), 19,76 (C-28), 20,10 (C-27), 21,27 (C-11), 21,27 (C-21), 23,15 (C-15), 28,43 (C-16), 32,17 (C-2), 33,25 (C-26), 37,19 (C-10), 38,54 (C-1), 39,26 (C-12), 40,55 (C-20), 40,97 (C-4), 42,99 (C-13), 42,99 (C-24), 46,42 (C-9), 54,72 (C-14), 55,92 (C-17), 70,63 (C-3), 116,45 (C-7), 119,75 (C-6), 132,15 (C-23), 135,72 (C-22), 139,94 (C-5), 141,58 (C-8).

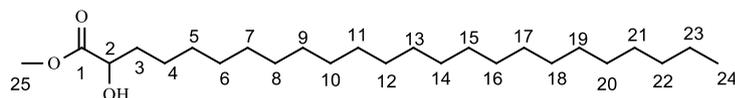
4.5.1.3 Composto D6 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila



5,1 mg, sólido branco, p.f.: 64,7-66,7°C, fórmula molecular: $C_{17}H_{34}O_3$, isolado da fração acetato FAcOEtSC *Pp* hex/AcOEt 8%), RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,88 (3H, t, $J=13,7$ Hz, H-15), 1,25 (3H, m, H-17), 1,25 (m, demais hidrogênios), 1,41 (2H, m, H-4), 1,77 e 1,59 (2H, m, H-3 e H-3'), 2,69 (1H, d, $J=3,96$ Hz, OH), 4,15 (1H, m, H-2), 4,25 e 4,23 (2H, dq, $J=7,2$ Hz, H-16 e 16'), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 14,26 (C-15 e C-17),

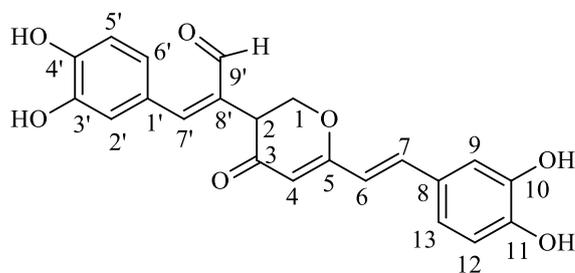
22,84 (C-14), 24,86 (C-4), 29,85 a 29,48 (demais carbonos), 32,08 (C-13), 34,59 (C-3), 61,75 (C-16), 70,61 (C-2), 175,61 (C-1).

4.5.1.4 Composto D11 – 2-hidróxi-tetracosanoato de metila



16,4 mg, sólido branco, p. f.: 62,2-63,2°C, fórmula molecular: C₂₅H₅₀O₃, m/z: 398,3760 (teórico), m/z: 398 (experimental), isolado da fração acetato FAcOEtSC *Pp* (Hex/AcOEt 8%), RMN de ¹H (400,13MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0,87 (3H, t, *J*=13,8 Hz, H-24), 1,17 e 1,61 (2H, m, H-3 e H-3'), 1,24 (m, demais hidrogênios), 1,39 (2H, m, H-4), 2,69 (1H, m, OH), 3,78 (3H, s, OCH₃), 4,18 (1H, m, H-2), RMN de ¹³C (100,62MHz, CDCl₃), δ (ppm): 14,26 (C-24), 29,45 (C-23), 29,51 (C-4), 29,84 (C-22), 29,81 a 29,60 (demais carbonos), 34,57 (C-3), 52,61 (C-25), 70,63 (C-2), 176,03 (C-1).

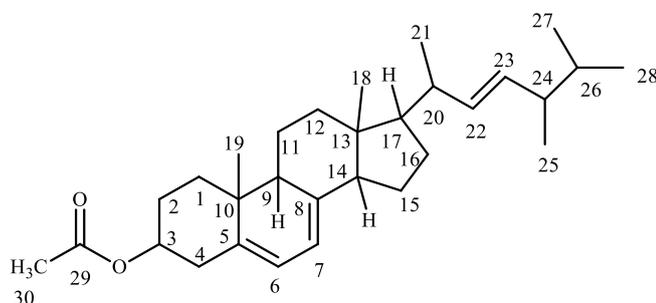
4.5.1.5 Composto D9



3,3 mg, pigmento amarelado, fórmula molecular: C₂₂H₁₈O₇, isolado da fração acetato FAcOEtSC *Pp* (Hex/AcOEt 35 e 40%), RMN de ¹H (600,13MHz, MeOH-*d*₄), δ (ppm): 3,37 (1H, m, H-2), 3,60 (2H, d, *J*=7,0 Hz, H-1), 5,22 (1H, s, H-4), 6,74 (1H, m, H-9), 6,74 (1H, m, H-2'), 6,85 (1H, m, H-5'), 6,90 (1H, dd, *J*=8,0 e 2,0Hz, H-6'), 6,91 (1H, d, *J*=2,0Hz, H-6), 7,29 (1H, d, *J*=8,0Hz, H-12), 7,30 (1H, d, *J*=2,0Hz, H-7), 7,30 (1H, s, H-7'), 7,32 (1H, dd, *J*=8,0 e 2,0Hz, H-13), 9,69 (1H, s, H-9'), RMN de ¹³C (150,62MHz, MeOH-*d*₄), δ (ppm): 49,00 (C-2), 71,56 (C-1), 104,85 (C-4), 114,82 (C-5'), 115,36 (C-12), 115,36 (C-7'), 115,82 (C-9), 116,25 (C-6), 116,25 (C-6'), 119,45 (C-2'), 126,52 (C-7), 126,52 (C-13), 130,83 (C-8), 130,83 (C-1'), 131,11 (C-8'), 147,33 (C-10), 147,33 (C-3'), 153,77 (C-11), 153,77 (C-4'), 166,48 (C-5), 193,13 (C-3), 193,10 (C-9').

4.5.2 Derivados do Ergosterol

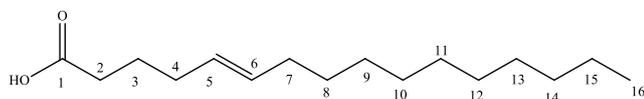
4.5.2.1 Composto D2a – Acetato do ergosterol



14,0 mg, sólido branco, p. f.: 178,1-179,5°C (LIT: 176°C, KLOSTY e BERGMANN, 1952), fórmula molecular: $C_{30}H_{46}O_2$, RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,63 (3H, s, H-18), 0,84 (3H, m, H-27), 0,84 (3H, m, H-28), 0,92 (3H, d, $J=6,84$ Hz, H-25), 0,96 (3H, s, H-19), 1,04 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-21), 1,25 (1H, m, H-12), 1,26 (1H, m, H-1), 1,26 (1H, m, H-16), 1,26 (1H, m, H-17), 1,37 (1H, m, H-15'), 1,47 (1H, m, H-26), 1,49 (1H, m, H-2), 1,67 (1H, m, H-11'), 1,74 (1H, m, H-11), 1,76 (1H, m, H-15), 1,87 (1H, m, H-24), 1,87 (1H, m, H-1'), 1,91 (1H, m, H-2'), 1,91 (1H, m, H-16'), 2,01 (1H, m, H-14), 2,03 (3H, s, H-30), 2,07 (1H, m, H-9), 2,08 (1H, m, H-20), 2,08 (1H, m, H-12'), 2,38 (1H, dd, $J=2,2$ e 5,04 Hz, H-4), 2,50 (1H, dd, $J=2,2$ e 5,04 Hz, H-4'), 4,70 (1H, m, H-3), 5,21 (1H, m, H-22), 5,21 (1H, m, H-23), 5,37 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-7), 5,57 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-6), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 12,23 (C-18), 16,36 (C-19), 17,75 (C-25), 19,80 (C-27), 20,09 (C-28), 21,24 (C-11), 21,24 (C-21), 21,27 (C-30), 23,17 (C-15), 28,41 (C-2), 29,86 (C-16), 33,29 (C-26), 36,86 (C-1), 37,31 (C-10), 38,12 (C-12), 39,26 (C-4), 40,53 (C-20), 43,04 (C-13), 43,04 (C-24), 46,28 (C-9), 54,73 (C-14), 55,99 (C-17), 73,00 (C-3), 116,05 (C-7), 120,40 (C-6), 132,26 (C-23), 135,75 (C-22), 138,76 (C-5), 141,67 (C-8), 170,68 (C-29).

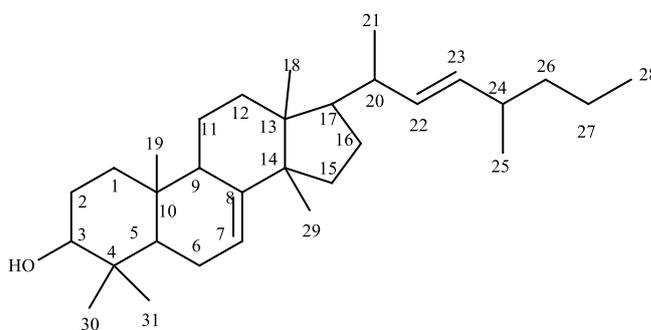
4.5.3 Metabólitos isolados da espécie *Pisolithus tinctorius*

4.5.3.1 Composto P1– Ácido hexadec-5-enóico



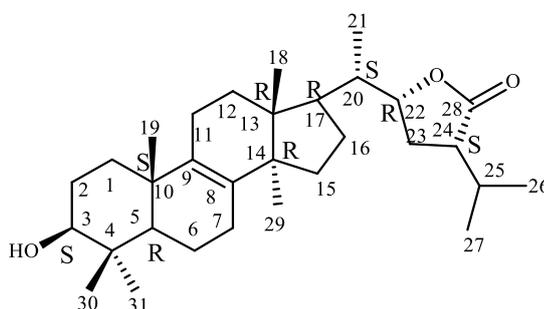
8,4 mg, sólido branco, fórmula molecular: $C_{16}H_{30}O_2$, m/z: 254,2238 (teórico), m/z: 256 (experimental), isolado da fração hexânica FHexPt (Hex/AcOEt 15%), RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0,88 (3H, m, H-16), 1,25 a 1,30 (m, H-7 ao H-15), 1,63 (2H, m, H-3), 2,00 (2H, m, H-4), 2,34 (2H, t, $J=15$ Hz, H-2), 5,34 (2H, m, H-5 e H-6), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 14,23 (C-16), 27,37 (C-3), 29,92 a 27,37 (C-7 ao C-15), 32,07 (C-4), 34,19 (C-2), 129,88 (C-5), 130,18 (C-6), 180,05 (C-1).

4.5.3.2 Composto P65 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil



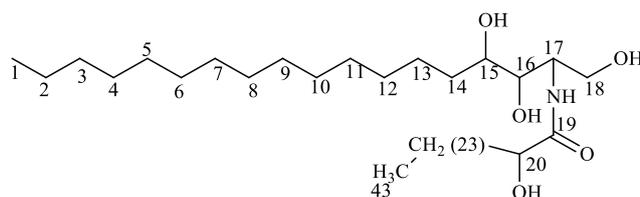
2,8 mg, sólido branco, p.f.: 92,7-94,7 °C, fórmula molecular: $C_{31}H_{52}O$, $[(M+H)]^+$: 441,4083 (teórico), $[(M+H)]^+$: 441,3005 (experimental), isolado da fração hexânica FHexPt (Hex/AcOEt 20%), RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,54 (3H, s, H-19), 0,79 (3H, s, H-18), 0,79 (3H, s, H-30), 0,80 (3H, s, H-29), 0,82 (3H, t, $J=12,96$ Hz, H-28), 0,90 (3H, s, H-31), 0,91 (3H, m, H-25), 1,01 (3H, d, $J=6,64$ Hz, H-21), 1,06 (1H, m, H-15'), 1,25 (1H, m, H-5), 1,25 (1H, m, H-1'), 1,25 (1H, m, H-6'), 1,25 (1H, m, H-12'), 1,25 (1H, m, H-16'), 1,28 (1H, m, H-26'), 1,37 (1H, m, H-27'), 1,40 (1H, m, H-2'), 1,45 (1H, m, H-27), 1,47 (1H, m, H-11'), 1,50 (1H, m, H-11), 1,62 (1H, m, H-9), 1,74 (1H, m, H-6), 1,74 (1H, m, H-26), 1,76 (1H, m, H-12), 1,76 (1H, m, H-16), 1,80 (1H, m, H-2), 1,80 (1H, m, H-15), 1,80 (1H, m, H-17), 1,87 (1H, m, H-24), 2,00 (1H, m, H-20), 2,01 (1H, m, H-1), 3,59 (1H, m, H-3), 5,15 (1H, m, H-7), 5,16 (1H, m, H-22), 5,20 (1H, m, H-23), RMN de ^{13}C (100,62MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 12,23 (C-19), 13,19 (C-18), 13,19 (C-30), 17,56 (C-7), 17,74 (C-25), 17,74 (C-31), 19,79 (C-28), 20,09 (C-29), 21,25 (C-21), 21,54 (C-11), 22,93 (C-27), 28,22 (C-6), 29,63 (C-16), 29,72 (C-12), 31,46 (C-2), 34,37 (C-10), 37,13 (C-15), 38,04 (C-26), 39,24 (C-4), 39,59 (C-1), 40,63 (C-20), 42,95 (C-24), 43,45 (C-13), 49,49 (C-14), 49,59 (C-9), 55,25 (H-17), 56,10 (C-5), 71,22 (C-3), 132,07 (C-23), 135,82 (C-22), 139,78 (C-8).

4.5.3.3 Composto P180 – Pisolactona



100 mg, sólido branco cristalino, p.f: 263-265,4 °C (278-280 °C, XU et al., 2001), fórmula molecular: $C_{31}H_{50}O_3$, isolado da fração hexânica *FHexPt* (Hex/AcOEt 25%), RMN de 1H (400,13MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 0,71 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, s, H-30), 0,90 (3H, s, H-19), 0,93 (3H, d, $J=6,88$ Hz, H-27), 0,95 (3H, d, $J=3,2$ Hz, H-21), 0,99 (3H, s, H-31), 1,00 (3H, s, H-29), 1,05 (3H, d, $J=6,88$ Hz, H-26), 1,06 (1H, m, H-5), 1,24 (1H, m, H-7'), 1,26 (1H, m, H-1), 1,35 (1H, m, H-16'), 1,56 (1H, m, H-6), 1,56 (1H, m, H-20), 1,54 (1H, m, H-16), 1,54 (1H, m, H-6'), 1,59 (1H, m, H-23'), 1,66 (1H, m, H-23), 1,68 (1H, m, H-2'), 1,70 (1H, m, H-7), 1,71 (1H, m, H-1'), 1,75 (1H, m, H-2), 1,96 (1H, m, H-15'), 1,98 (1H, m, H-17), 2,00 (1H, m, H-12'), 2,03 (1H, m, H-12), 2,04 (1H, m, H-11'), 2,06 (1H, m, H-11), 2,06 (1H, m, H-15), 2,10 (1H, m, H-25), 2,56 (1H, m, H-24), 3,24 (1H, dd, $J=$, 4,52 e 11,56 Hz, H-3), 4,46 (1H, ddd, $J=1,64$, 5,92 e 10,6 Hz, H-22), RMN de ^{13}C (100,62 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 12,37 (C-21), 15,57 (C-30), 15,76 (C-18), 18,40 (C-6), 18,40 (C-27), 19,32 (C-31), 20,87 (C-26), 21,13 (C-11), 24,40 (C-19), 26,65 (C-12), 27,00 (C-25), 27,66 (C-23), 28,01 (C-15), 28,01 (C-29), 28,11 (C-16), 31,0 (C-2), 31,06 (C-7), 35,72 (C-1), 37,20 (C-10), 39,05 (C-4), 39,99 (C-20), 44,79 (C-13), 47,01 (C-24), 49,93 (C-17), 49,96 (C-14), 50,54 (C-5), 79,09 (C-3), 80,74 (C-22), 134,32 (C-8), 134,79 (C-9), 178,61 (C-28).

4.5.3.4 Composto P56



98,4 mg, sólido branco, p.f.: 120,8-121,8°C, fórmula molecular: $C_{43}H_{87}NO_5$, isolado da fração acetato *FAcOEtPt* (AcOEt 100%), RMN de 1H (400,13MHz, C_5D_5N), δ (ppm): 0,88 (6H, m, H-1 e H-43), 2,29 a 1,28 (demais hidrogênios), 4,31 (1H, m, H-15), 4,39 (1H, t, $J=11,4$ Hz, H-16), 4,55 e 4,46 (2H, ddd, $J=4,64, 10,92, 19,60$ Hz, H-18 e H-18'), 4,66 (1H, dd, $J=3,92$ e $7,88$ Hz, H-20), 5,12 (1H, s, H-17), 8,62 (1H, d, $J=9,20$ Hz, NH), RMN de ^{13}C (100,62 MHz, C_5D_5N), δ (ppm): 14,76 (C-1 e C-43), 23,42 a 36,19 (demais carbonos), 53,49 (C-17), 62,53 (C-18), 72,99 (C-20), 73,51 (C-15), 77,26 (C-16), 176,02 (C-19).

4.6 METABÓLITOS ISOLADOS

4.6.1 Composto D1– Péróxido do ergosterol

Este composto foi obtido através do uso de técnicas cromatográficas, obtendo-o na forma de cristais brancos, o qual foi identificado como sendo o peróxido do ergosterol. Esse triterpeno tem sido relatado em espécies da família Hymenochaetaceae (KIM et al., 2011).

O experimento de RMN de 1H (Figuras 18 e 19), possibilitou a atribuição dos hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. Na região de δ 1,01 a 0,7 ppm é possível verificar a presença de seis hidrogênios metílicos, sinalizando em δ 0,82 (H-18) e 0,88 (H-19) ppm na forma de simpleto e em δ 1,00 (H-21), 0,91 (H-25), 0,83 (H-27) e 0,84 (H-28) ppm na forma de dupletos (d, $J=6,64$ Hz). Além disso, na região de δ 2,2 a 1,2 ppm sinalizam os hidrogênios metilênicos. Em δ 6,23 e 6,50 ppm é possível verificar a presença dos hidrogênios H-7 e H-6, na forma de dupletos (d, $J=8,5$ Hz), pertencente ao anel da estrutura triterpênica. Ademais, em campo mais alto, em δ 5,15 e 5,23 ppm, encontram-se os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23, na forma de multipletos, e o hidrogênio H-3 ligado ao carbono hidroxilado, sinalizando em δ 3,97 ppm.

Fazendo-se a análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 20), foi possível identificar a presença de quatro carbonos desidrogenados, onde em δ 82,36, 79,69 ppm, aparecem os C-5 e C-8, região característica de carbono ligado a oxigênio, e na região de δ 43,03 e 44,82 ppm correspondentes ao C-13 e C-10, respectivamente. Em campo baixo, é possível verificar a presença dos carbonos olefínicos C-7 e C-6, C-22 e C-23, com deslocamentos químicos de δ 135,64, 130,99, 135,44 e 132,60 ppm, respectivamente. Além disso, o experimento permitiu identificar a presença de sete carbonos metilênicos em δ 30,43 (C-1), 37,13 (C-2), 39,56 (C-4), 20,86 (C-11), 34,89 (C-12), 23,55 (C-15) e 28,76 (C-16) ppm.

Em campo alto, foi possível identificar os carbonos metílicos C-18, C-19, C-21, C-25, C-27 e C-28, sinalizando na região entre δ 34,00 e 12,00 ppm. Os dados (RMN de ^1H e ^{13}C) experimentais e da literatura estão descritos na Tabela 6. Ademais, o experimento de cromatograma de massas de alta resolução confirmou a presença de dois oxigênios na estrutura (Apêndice I), resultando em uma massa molecular de $[(M + H)^+] = 429, 3367$.

Os demais experimentos bidimensionais (HSQC E HMBC) podem ser visualizados no Apêndice I, Apêndice J, Apêndice K e Apêndice L.

Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H expandido do peróxido do ergosterol (**D1**) em CDCl_3 a 400 MHz

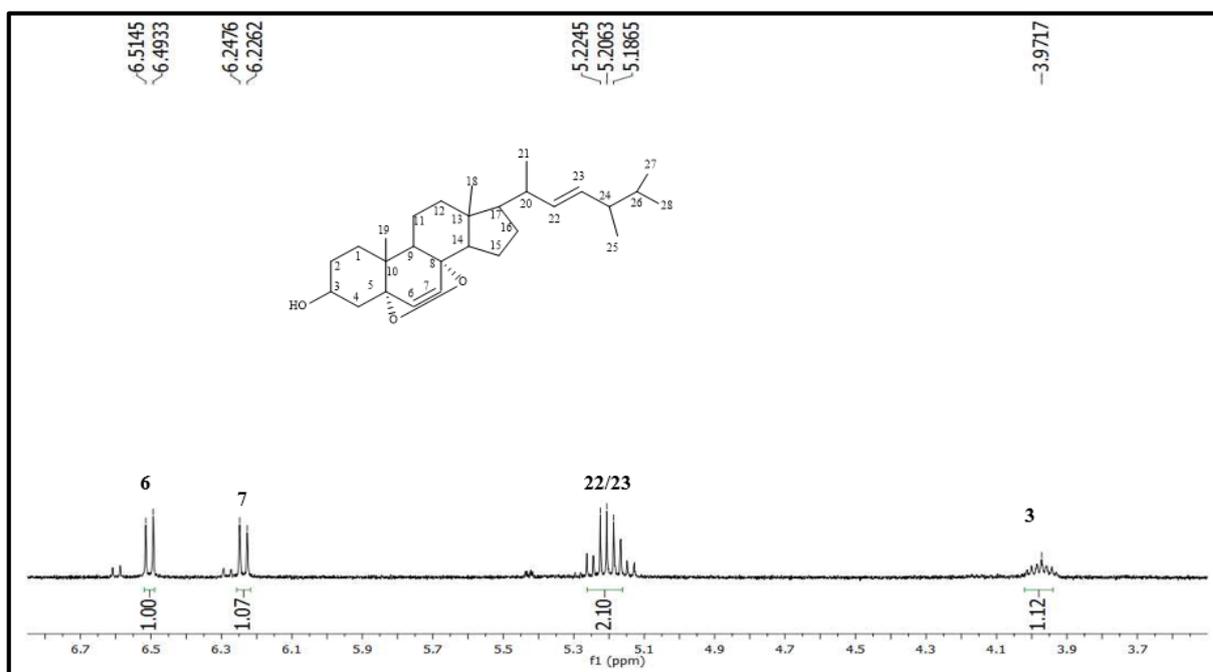


Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H expandido do peróxido do ergosterol (**D1**) em CDCl_3 a 400 MHz

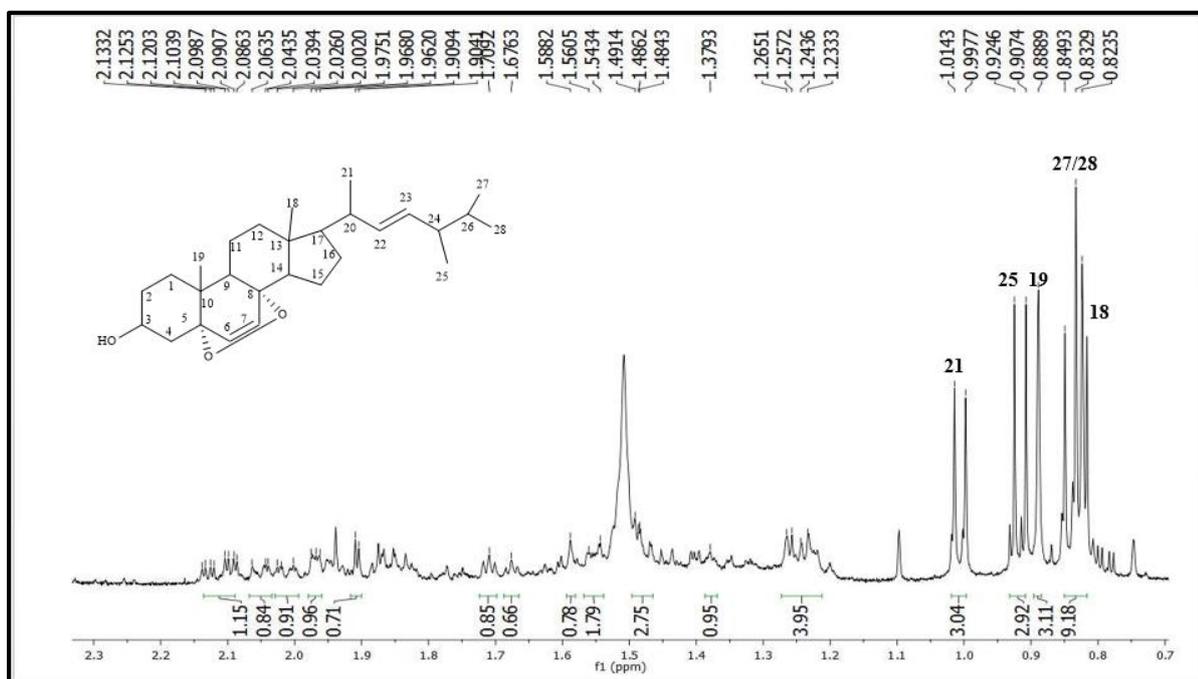


Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C do peróxido do ergosterol (**D1**) em CDCl_3 a 100 MHz

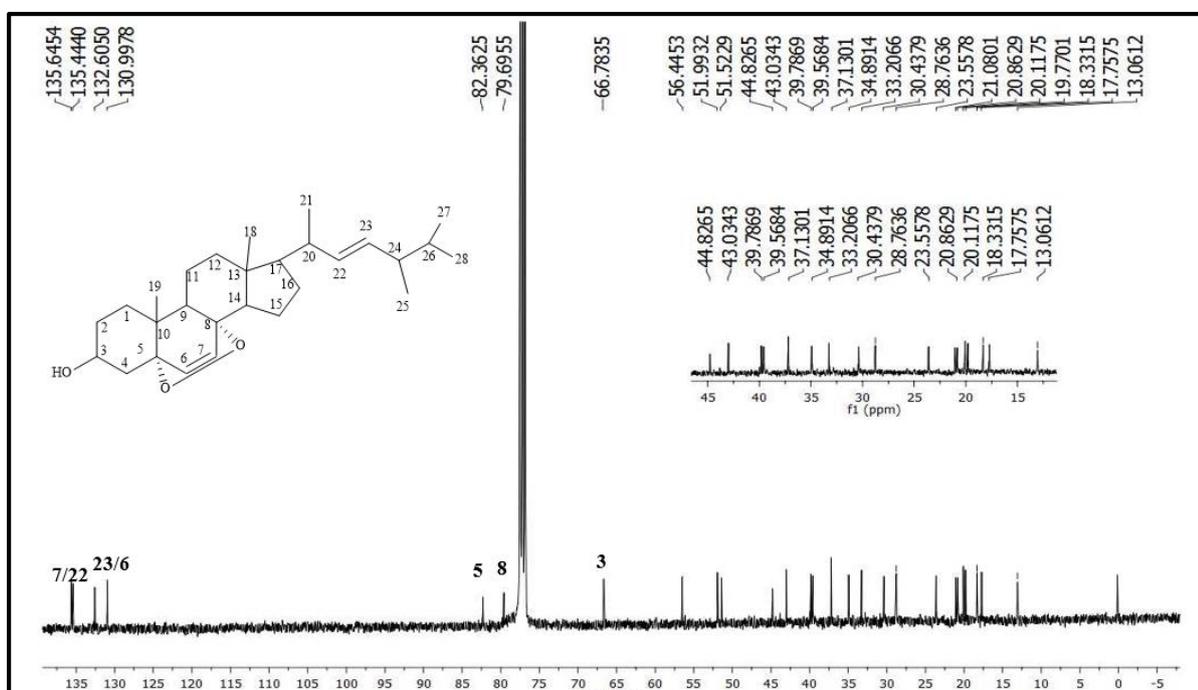


Tabela 6 – Peróxido do ergosterol (**D1**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Peróxido do ergosterol		Peróxido do ergosterol*	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	1,26 e 1,54 (m)	30,43		34,8
2	1,90 e 2,11 (ddd, <i>J</i> = 2,0, 5,2 e 13,8 Hz)	37,13		30,2
3	3,97 (m)	66,78	3,97 (m)	66,5
4	1,96 e 2,04 (m)	39,56		37,0
5		82,36		82,2
6	6,50 (d, <i>J</i> = 8,50 Hz)	130,99	6,23 (d, <i>J</i> =10Hz)	135,4
7	6,23 (d, <i>J</i> = 8,50 Hz)	135,64	6,50 (d, <i>J</i> =10Hz)	130,8
8		79,69		79,4
9	1,23 (m)	56,44		51,2
10		44,82		38,2
11	1,22 e 1,58 (m)	20,86		23,4
12	1,67 e 1,70 (m)	34,89		39,4
13		43,03		44,6
14	1,48 (m)	51,52		51,7
15	1,24 e 1,49 (m)	23,55		20,7
16	1,37 e 1,40 (m)	28,76		28,6
17	1,56 (m)	51,99		56,3
18	0,82 (s)	13,06	0,82 (s)	12,9
19	0,88 (s)	18,33	0,89 (s)	18,2
20	1,96 (m)	39,78		39,7
21	1,00 (d, <i>J</i> =6,64Hz)	21,08	1,00 (d, <i>J</i> =10Hz)	20,9
22	5,15 (m)	135,44	5,15 (dd, <i>J</i> =15,8Hz)	135,2
23	5,23 (m)	132,60	5,23 (dd, <i>J</i> =15,7Hz)	132,4
24	1,87 (m)	43,03		42,8
25	0,91 (d, <i>J</i> =6,64Hz)	17,75		33,1
26	1,48 (m)	33,20	0,83 (d, <i>J</i> =7Hz)	19,6
27	0,83 (d, <i>J</i> =6,64Hz)	19,77	0,82 (d, <i>J</i> =7Hz)	19,9
28	0,84 (d, <i>J</i> =6,64Hz)	20,11	0,91 (d, <i>J</i> =7Hz)	17,6

* δ_H e δ_C (CDCl₃ RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz) conforme FANGKRATHOK et al., 2012.

4.6.2 Composto D2 – Ergosterol

A partir da fração hexânica *Pp* RS, fez-se o isolamento da substância D2. Através de experimentos unidimensionais de RMN de ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura (Tabela 7) confirmou-se a substância como sendo o Ergosterol.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 21) pode-se atribuir as metilas, sendo duas metilas na forma de simpletos, com deslocamentos químicos de δ 0,63 (H-18) e 0,94 (H-19) ppm e as demais como dupletos H-21 (δ 1,02 ppm), H-25 (δ 0,91 ppm), onde os H-21 (d, *J*=6,64Hz)

acoplam com o H-20 e os H-25 (d, $J=6,64\text{Hz}$) com o H-24 e na região de δ 0,83 ppm os H-27 e H-28 (d, $J=6,4\text{Hz}$).

Na região de campo baixo, desblindado, é possível visualizar os H-6 e H-7, referente a dupla ligação existente no núcleo triterpênico. Estes sinalizam na forma de dupletos, em δ 5,57 e 5,38 ppm, com constante de acoplamento $J=8,00\text{Hz}$. Além disso, a presença dos H-22 e H-23 em δ 5,19 ppm, como um multipletto. Na região de δ 3,63 ppm pode-se visualizar um multipletto referente ao H-3.

O experimento de RMN de ^{13}C (Figura 22), confirmou a presença de 28 carbonos, sendo seis carbonos metílicos, sete metilênicos, onze metínicos e quatro carbonos desidrogenados. Os sinais com deslocamentos químicos δ 119,75 e 116,45 ppm são sugestivos aos carbonos olefínicos C-6 e C-7, enquanto que os sinais em δ 135,72 e 132,15 ppm são átomos de carbono da cadeia lateral da olefina dissubstituída.

Em δ 70,63 ppm, sinaliza o C-3, que está ligado a um grupamento hidroxila.

Os carbonos desidrogenados C-5, C-8, C-10 e C-13 aparecem em δ 139,94, 141,58, 37,19 e 42,99 ppm.

As demais atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na Tabela 7. Além de que, o experimento bidimensional (COSY), pode ser visualizado no Apêndice M.

Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H do ergosterol (**D2**) em CDCl_3 a 400 MHz

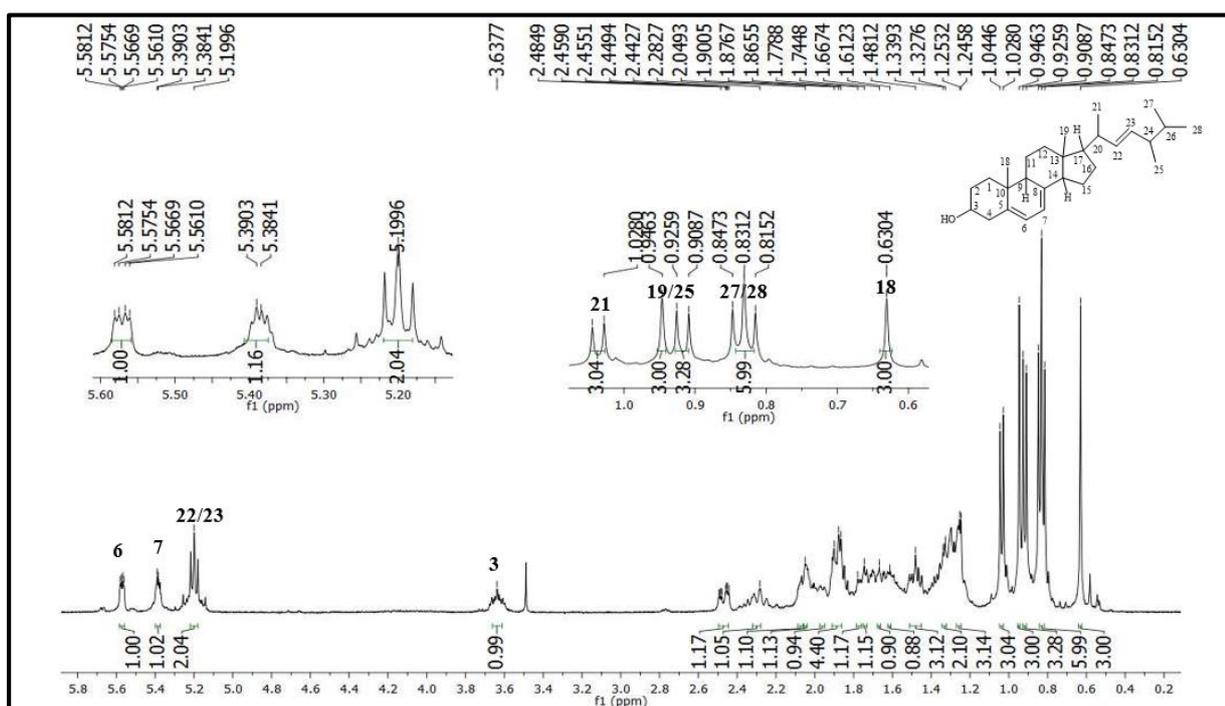


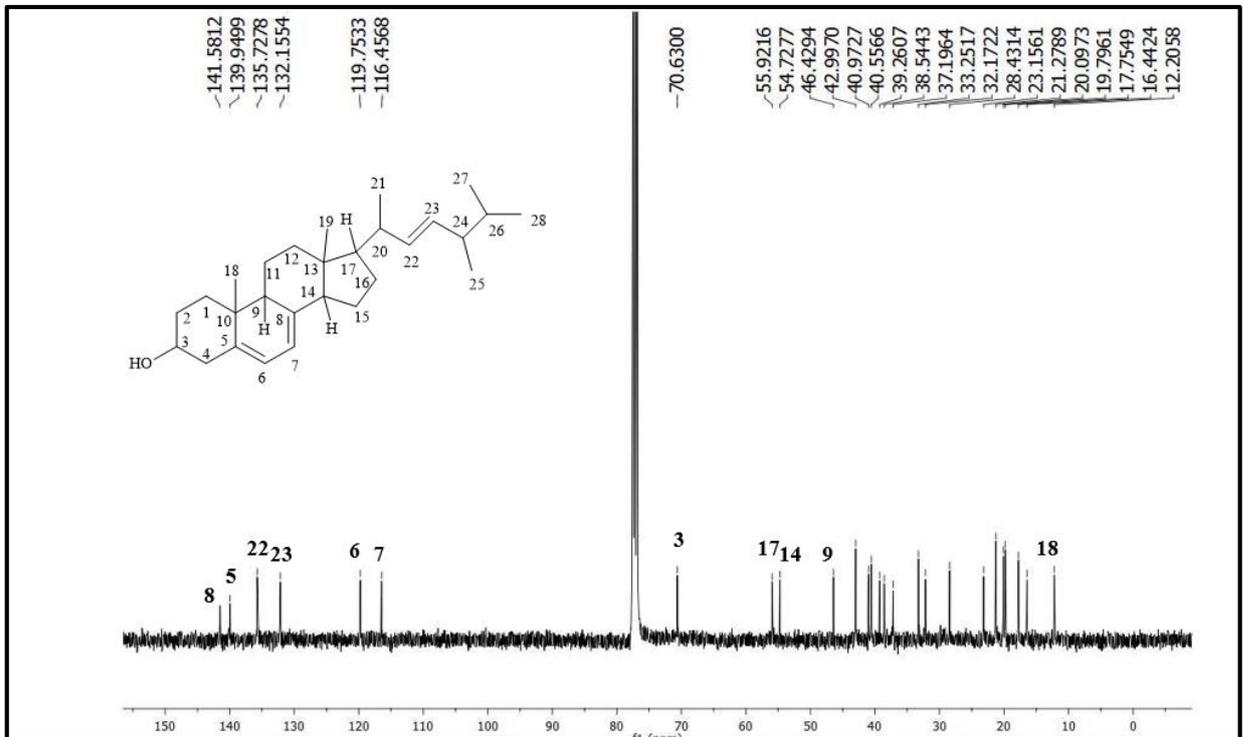
Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C do ergosterol (**D2**) em CDCl_3 a 100 MHz

Tabela 7 – Ergosterol (**D2**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Ergosterol		Ergosterol*	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	1,33 e 1,90 (m)	38,54	1,88 e 1,29 (m)	40,0
2	1,48 e 1,87 (m)	32,17	1,83 e 1,46 (m)	33,6
3	3,63 (m)	70,63	3,50 (m)	71,0
4	2,28 e 2,46 (m)	40,97	2,40 (ddd, $J=14,4, 4,8, 2,4$ Hz) e 2,23 (m)	42,5
5		139,94		142,1
6	5,57 (d, $J=8,0$ Hz)	119,75	5,53 (dd $J=6,0, 3,0$ Hz)	120,7
7	5,38 (d, $J=8,0$ Hz)	116,45	5,37 (m)	118,1
8		141,58		141,3
9	2,02 (m)	46,42	1,96 (m)	47,9
10		37,19		38,6
11	1,61 e 1,77 (m)	21,27	1,76 e 1,64 (m)	22,5
12	1,25 e 2,05 (m)	39,26	2,09 e 1,30 (m)	40,6
13		42,99		44,3
14	1,90 (m)	54,72	1,92 (m)	56,0
15	1,33 e 1,70 (m)	23,15	1,67 e 1,39 (m)	24,4
16	1,33 e 1,90 (m)	28, 43	1,81 e 1,38 (m)	29,7
17	1,24 (m)	55,92	1,32 (m)	57,3
18	0,63 (s)	12,2	0,67 (s)	13,1
19	0,94 (s)	16,44	0,95 (s)	17,4
20	2,04 (m)	40,55	2,09 (m)	42,0
21	1,02 (d, $J=6,64$ Hz)	21,27	1,07 (d, $J=6,6$ Hz)	22,3
22	5,19 (m)	135,72	5,24 (dd $J=15,6, 7,5$ Hz)	137,3
23	5,19 (m)	132,15	5,28 (dd $J=15,6, 7,2$ Hz)	133,5
24	1,87 (m)	42,99	1,88 (m)	44,5
25	0,91 (d, $J=6,88$ Hz)	17,75	1,49 (m)	34,6
26	1,48 (m)	33,25	0,85 (d, $J=7,2$ Hz)	20,7
27	0,83 (d, $J=6,4$ Hz)	20,10	0,86 (d, $J=7,2$ Hz)	21,0
28	0,83 (d, $J=6,4$ Hz)	19,76	0,94 (d, $J=6,6$ Hz)	18,8

* δ_H e δ_C (acetona-*d*₆, RMN de ¹H a 600 MHz, RMN de ¹³C a 150 MHz) conforme CHANG et al., 2018.

4.6.3 Composto D6 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila

O composto 2-hidróxi-pentadecanoato de etila, isolado da FAcOEtSC *Pp*, foi submetido a técnicas de RMN de ¹H e ¹³C. Através desses experimentos e posterior análises dos dados, foi possível determinar a estrutura do composto.

No espectro de RMN de ¹H (Figuras 23 e 24) é possível observar os hidrogênios diastereotópicos H-16 e H-16' (δ 4,27 e 4,23 ppm), na forma de duplete de quarteto ($J=7,2$ Hz), e dos H-3 e H-3' (δ 1,77 e 1,59 ppm), na forma de multiplete. Além disso, a presença de uma hidroxila, na região de δ 2,69 ppm, duas metilas, sendo uma na forma de um triplete em δ 0,88 ($J=13,7$ Hz) e outra como simpleto em δ 1,25 ppm. Em adição, observou-se o hidrogênio

metínico (m, H-2) em δ 4,15 ppm, região característica de hidrogênios vizinhos a oxigênio. Os demais hidrogênios metilênicos, sinalizam na região de δ 1,41 a 1,25 ppm.

Através do experimento de RMN de ^{13}C (Figura 25), foi possível fazer a atribuição dos carbonos metilênicos e metílicos, metínico e carbonila.

Em δ 175,61 ppm, observa-se a presença de um carbono carbonílico característico de éster. Na região de campo alto, observa-se o carbono metínico (C-2) em δ 70,61 ppm e o metilênico (C-16) em δ 61,75 ppm. Ademais, os carbonos metílicos C-17 e 15 (14,36 e 14,26 ppm), e os demais carbonos metilênicos da região espectral. Além disso, o experimento de cromatografia gasosa com detector de massas (Apêndice F) e a integração dos sinais (RMN de ^1H) permitiu atribuir o número de hidrogênios metilênicos corretamente.

Os dados estão apresentados na Tabela 8.

Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (D6) em CDCl_3 a 400 MHz

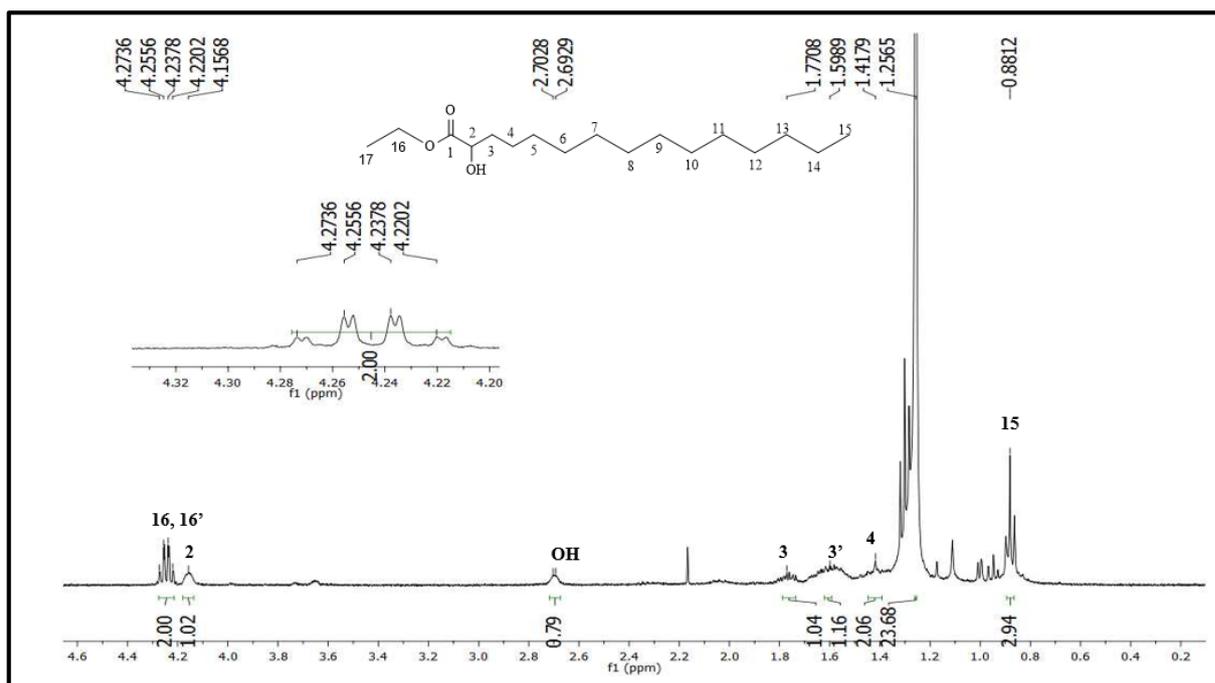


Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H expandido do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (**D6**) em CDCl_3 a 400 MHz

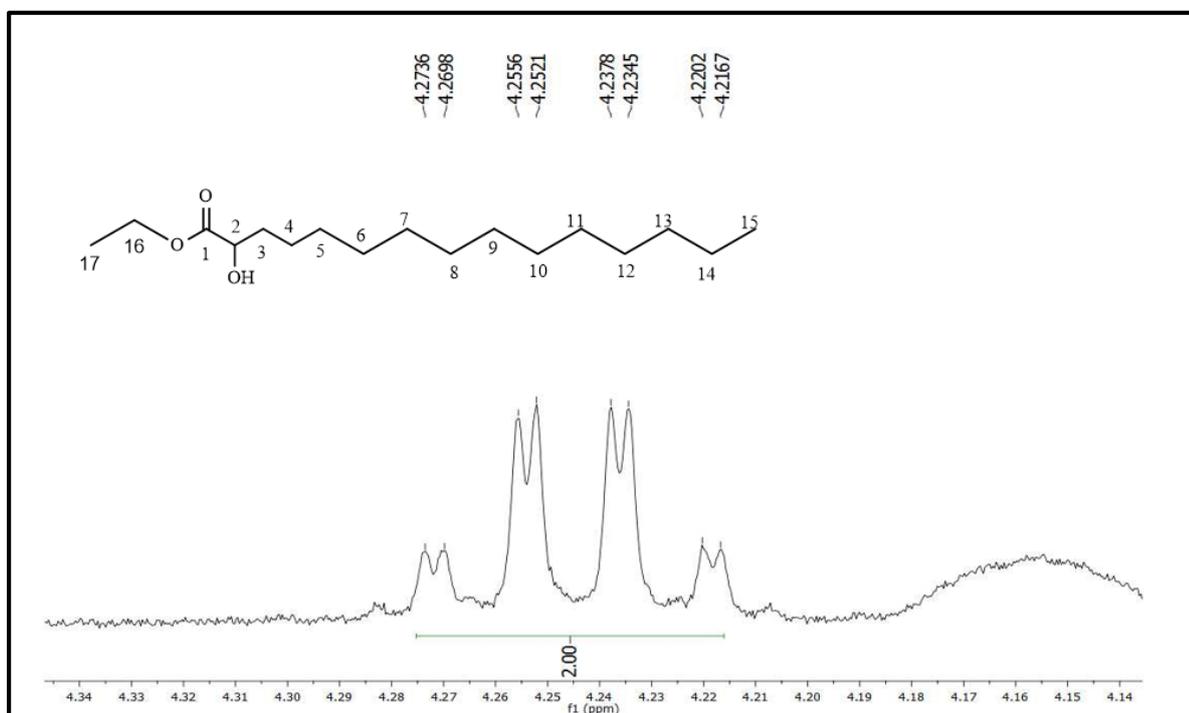


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C do 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (**D6**) em CDCl_3 a 100 MHz

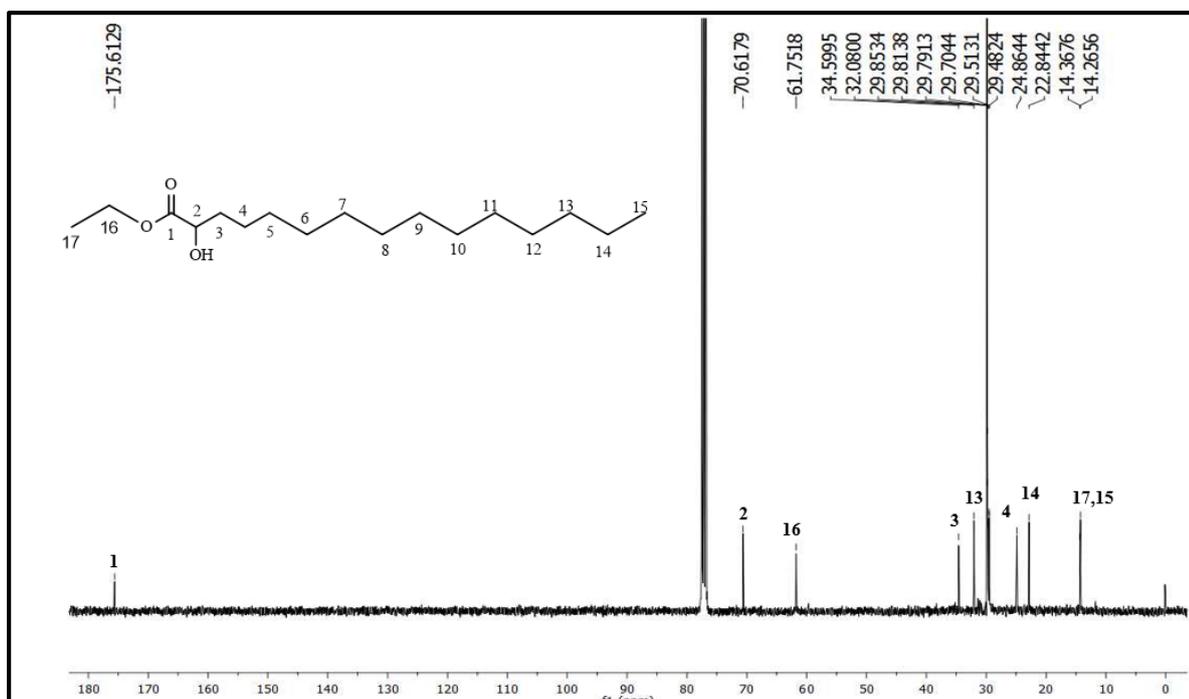


Tabela 8 – 2-hidróxi-pentadecanoato de etila (**D6**) e 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (**D11**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Composto D6		Composto D11	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		175,61		176,03
2	4,15 (m)	70,61	4,18 (m)	70,63
3	1,77 e 1,59 (m)	34,59	1,17 e 1,61 (m)	34,57
4	1,41 (m)	24,86	1,39 (m)	29,51
5	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
6	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
7	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
8	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
9	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
10	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
11	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
12	1,25 (m)	29,85 a 29,48	1,24 (m)	29,81 a 29,60
13	1,25 (m)	32,08	1,24 (m)	29,81 a 29,60
14	1,25 (m)	22,84	1,24 (m)	29,81 a 29,60
15	0,88 (t)	14,26	1,24 (m)	29,81 a 29,60
16	4,25 e 4,23 (dq, <i>J</i> =7,2 Hz)	61,75	1,24 (m)	29,81 a 29,60
17	1,25 (m)	14,26	1,24 (m)	29,81 a 29,60
18			1,24 (m)	29,81 a 29,60
19			1,24 (m)	29,81 a 29,60
20			1,24 (m)	29,81 a 29,60
21			1,24 (m)	29,81 a 29,60
22			1,24 (m)	29,84
23			1,24 (m)	29,45
24			0,87 (t, <i>J</i> =13,8 Hz)	14,26
25			1,24 (m)	52,61

4.6.4 Composto D11 – 2-hidróxi-tetracosanoato de metila

O composto 2-hidróxi-tetracosanoato de metila obtido da FAcOEt SC *Pp*, foi submetido a análises de RMN de ¹H e ¹³C para possível identificação estrutural.

Esse composto isolado é bem semelhante ao composto descrito anteriormente (item 4.6.3), onde os espectros diferem-se em alguns detalhes em relação um ao outro.

O experimento de RMN de ¹H (Figura 26), possibilitou a identificação de uma metoxila, na forma de um simpleto, em δ 3,78 ppm, além disso, o hidrogênio metínico em δ 4,18 (m) ppm vizinho a hidroxila, e um hidroxila em δ 2,69 ppm. As demais regiões do espectro coincidem com o descrito anteriormente (item 4.6.3).

Com relação ao RMN de ¹³C (Figura 27), é possível visualizar a presença do carbono metílico ligado ao oxigênio (metoxila) em δ 52,61 ppm, além do C-2 ligado a hidroxila em δ 70,63 ppm e a carbonila, em campo baixo, sinalizando em δ 176,03 ppm. Além disso, o

experimento de cromatografia gasosa com detector de massas (Apêndice G) confirmou a estrutura proposta.

Todos os dados estão descritos na Tabela 8.

Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H do 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (**D11**) em CDCl_3 a 400 MHz

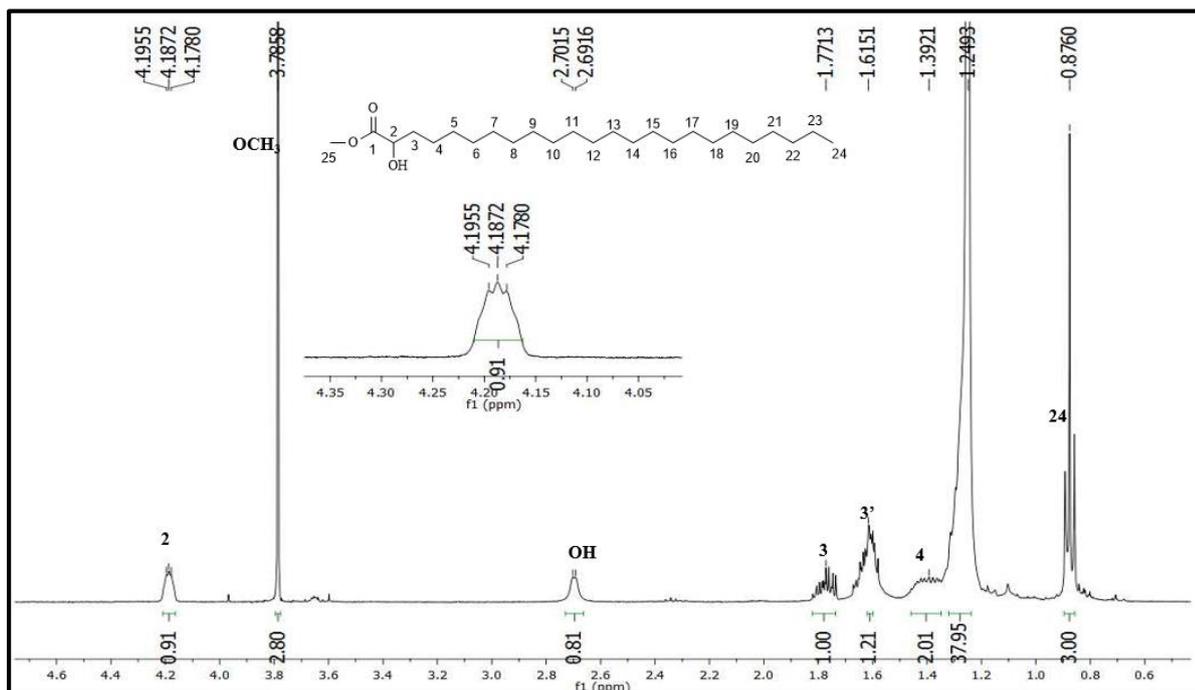
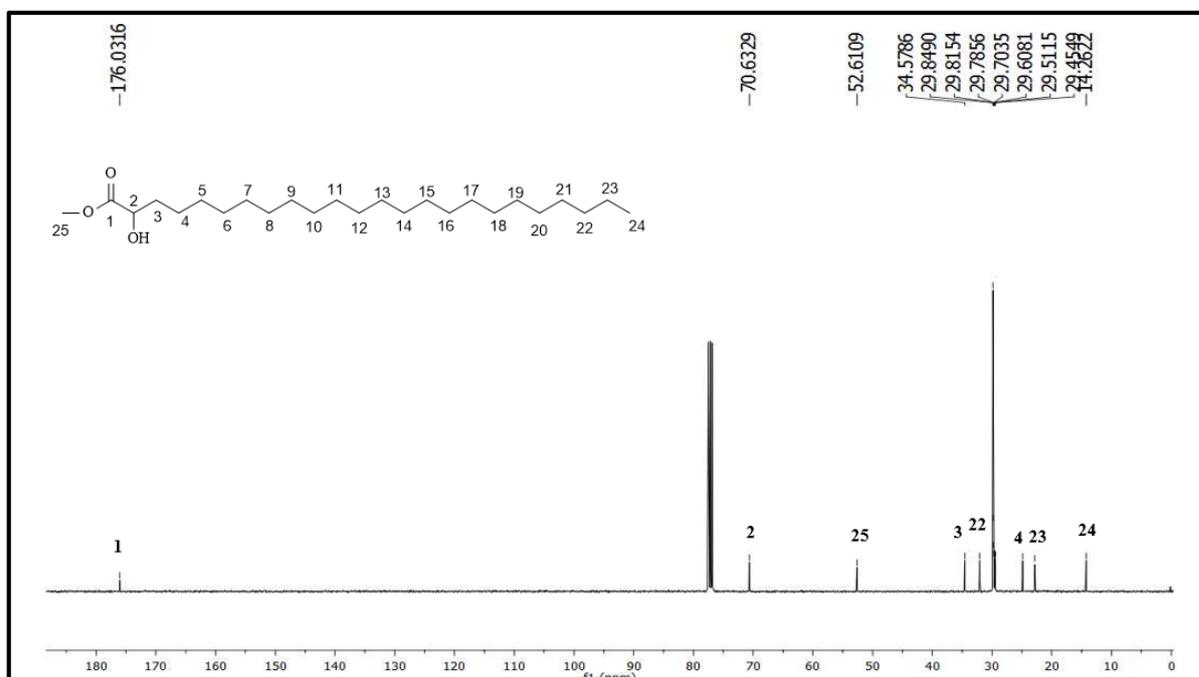


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C do 2-hidróxi-tetracosanoato de metila (**D11**) em CDCl_3 a 100 MHz



4.6.5 Composto D9

O composto D9 foi isolado da fração acetato de etila *Pp* através do uso de técnicas cromatográficas CC e CCDP. Esse foi obtido na forma de um pigmento amarelado e apresentou positividade frente ao revelador de cloreto férrico (FeCl_3). Análises de CLAE permitiram verificar a pureza da substância D9 (Figuras 28 e 29).

Os experimentos uni e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) de RMN de ^1H e ^{13}C em combinação com dados da literatura (LEE e YUN, 2007; LEE e YUN, 2006) de outros compostos fenólicos pertencentes a família Hymenochaetaceae, sugere o composto de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_7$, ainda não identificado anteriormente. Ademais, a biossíntese proposta por Lee e col. (2007) contribuiu para a determinação da posição das hidroxilas do anel aromático nas posições orto dissubstituídas.

No experimento de RMN de ^1H (Figuras 30 e 31) é possível visualizar a presença de seis hidrogênios aromáticos em δ 6,74 ppm (H-9, m), δ 7,29 ppm (H-12, d, $J=8,0\text{Hz}$), δ 7,32 ppm (H-13, dd, $J=8,0$ e $2,0\text{Hz}$), δ 6,74 ppm (H-2', m), δ 6,85 ppm (H-5', m), δ 6,90 ppm (H-6', dd, $J=8,0$ e $2,0\text{Hz}$), além de quatro hidrogênios olefinínicos nas regiões de δ 6,91 ppm (H-6, d, $J=2,0\text{Hz}$), δ 7,30 ppm (H-7, d, $J=2,0\text{Hz}$), δ 7,30 ppm (H-7', s) e δ 5,22 ppm (H-4, s).

Em δ 3,60 ppm observa-se a presença dos hidrogênios metilênicos (H-1 e H-1'), vizinhos a heteroátomo (oxigênio). Devido a estrutura proposta, sugere-se que o H-2 metínico está localizado junto aos hidrogênios do respectivo solvente deuterado. (MeOH- d_4), em δ 3,27 ppm. Ademais, a presença de hidrogênio proveniente da função aldeído em δ 9,69 (s) ppm. A estrutura proposta nesse trabalho difere-se, principalmente o anel interno, das demais encontradas na literatura. Um dos fatores que consideramos é a presença de hidrogênios metilênicos (H-1 e H-1') na região de δ 3,60 ppm, além disso, a intensidade do sinal na região de δ 193,13 ppm no espectro de RMN de ^{13}C , o que evidenciou a presença de duas carbonilas. Por isso, propôs-se a presença de uma carbonila cetônica no anel interno da estrutura e não uma lactona, como as estruturas já descritas na literatura apresentam.

Os experimentos de RMN de ^{13}C e HSQC (Figuras 32, 33, 36 e 37) (correlação ^{13}C e seu respectivo ^1H) permitiu atribuir e identificar os carbonos da substância D9. Na região de δ 71,64 ppm é possível identificar a presença de um carbono metilênico (C-1), vizinho a heteroátomo. Segundo a estrutura proposta sugere-se que o carbono metínico C-2 está localizado junto a carbono do respectivo solvente deuterado.

Na região de campo baixo em δ 193,10 ppm pode-se visualizar a presença da carbonila, respectiva ao hidrogênio do aldeído. Além disso, a presença de outra carbonila cetônica C-3 (δ 193,13 ppm). Ainda em campo baixo, é possível identificar os carbonos desidrogenados C-11 e C-4', em δ 153,77 ppm e os carbonos C-10 e C-3' em δ 147,33 ppm, referentes ao anel aromático. Em δ 131,11 ppm o C-8 e em δ 130,83 ppm o C-1'.

Os carbonos metínicos aromáticos em δ 115,82 (C-9), 115,36 (C-12), 126,52 ppm (C-13), 119,45 (C-2'), 114,82 (C-5') e 116,25 (C-6'). Também podemos identificar a presença de quatro carbonos olefínicos nas regiões de δ 104,85 (C-4), 116,25 (C-6), 126,52 (C-7), 115,36 (C-7') e dos carbonos desidrogenados C-8' (δ 131,11 ppm) e C-5 (δ 166,48 ppm), referentes as ligações duplas.

No espectro de COSY ^1H - ^1H (Figuras 34 e 35) foi possível identificar as principais correlações entre os hidrogênios de núcleos vizinhos. Como os hidrogênios aromáticos e olefínicos estão com deslocamentos químicos muito próximos, a visualização dos acoplamentos torna-se um pouco difícil. No entanto, é possível identificar a correlação dos H-6 e H-7, pertencentes a dupla ligação. Ainda, as correlações dos hidrogênios pertencente ao anel aromático H-6' e H-5'.

O experimento bidimensional de HMBC (Figuras 38 e 39) permitiu identificar as principais correlações de ^1H e ^{13}C de duas a três ligações. Foi possível visualizar poucos acoplamentos no experimento, no entanto os acoplamentos do H-9' com o C-8' e H-9' com o

C-7', foi identificado. Sendo assim, esse foi um dos pontos relevantes para a determinação da estrutura, principalmente porque ela difere das demais encontradas na literatura. Ademais, os acoplamentos do H-6' com o C-3' e o H-6 com o C-8.

Todos os dados de RMN em comparação com alguns dados de compostos relatados na família Hymenochaetaceae estão descritos na Tabela 9.

Figura 28 – Cromatograma de CLAE do Composto D9

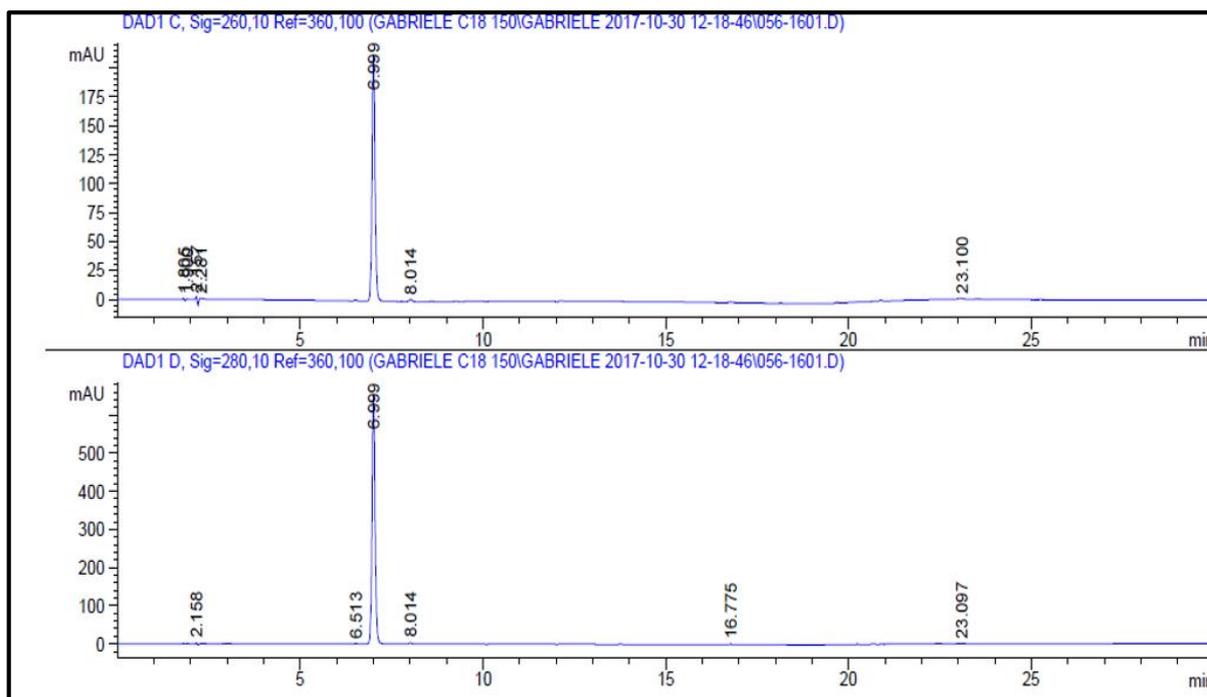


Figura 29 – Cromatograma de CLAE do Composto D9

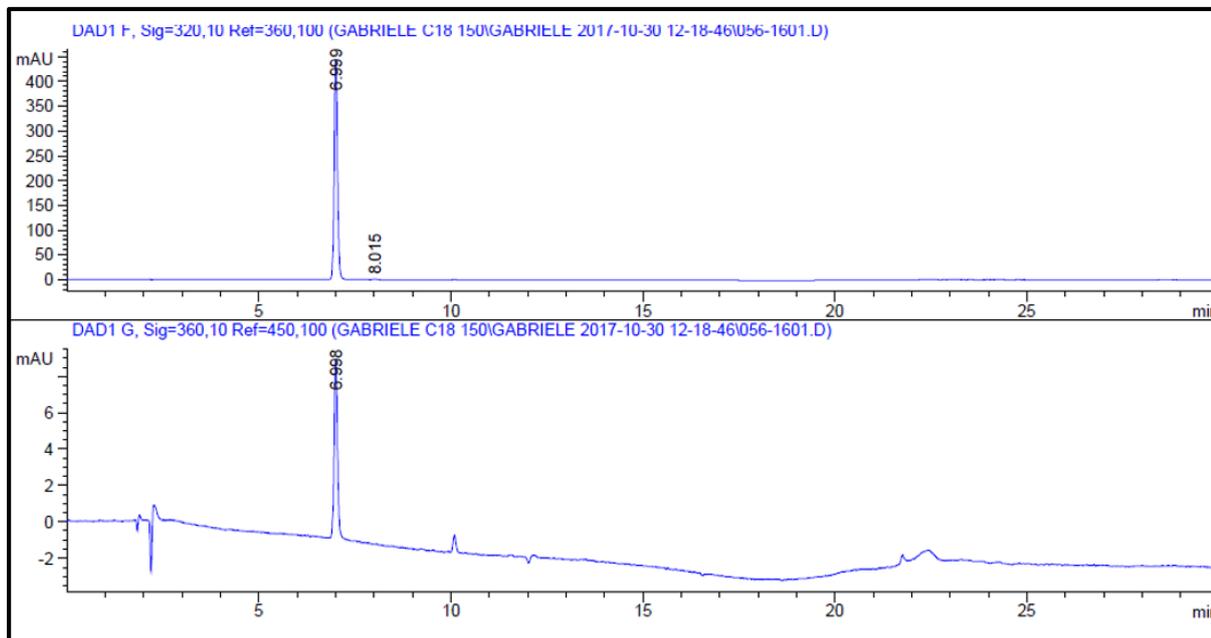
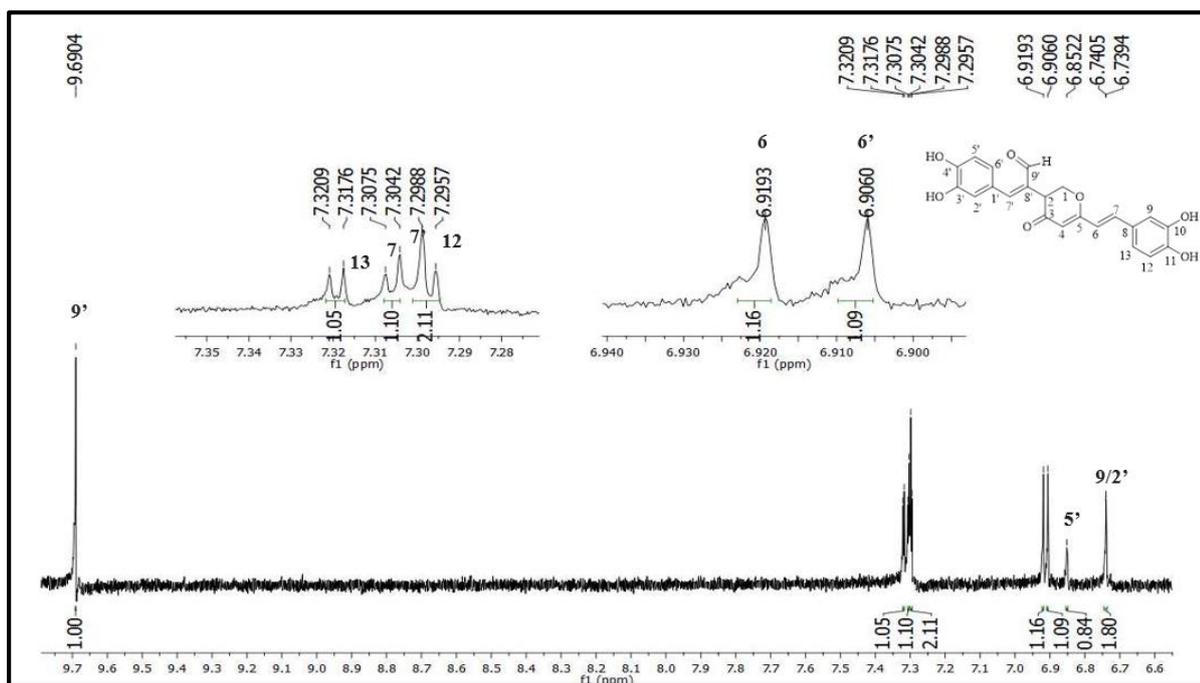
Figura 30 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Composto D9 em $\text{MeOH-}d_4$ a 600 MHz

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Composto D9 em $\text{MeOH-}d_4$ a 600 MHz

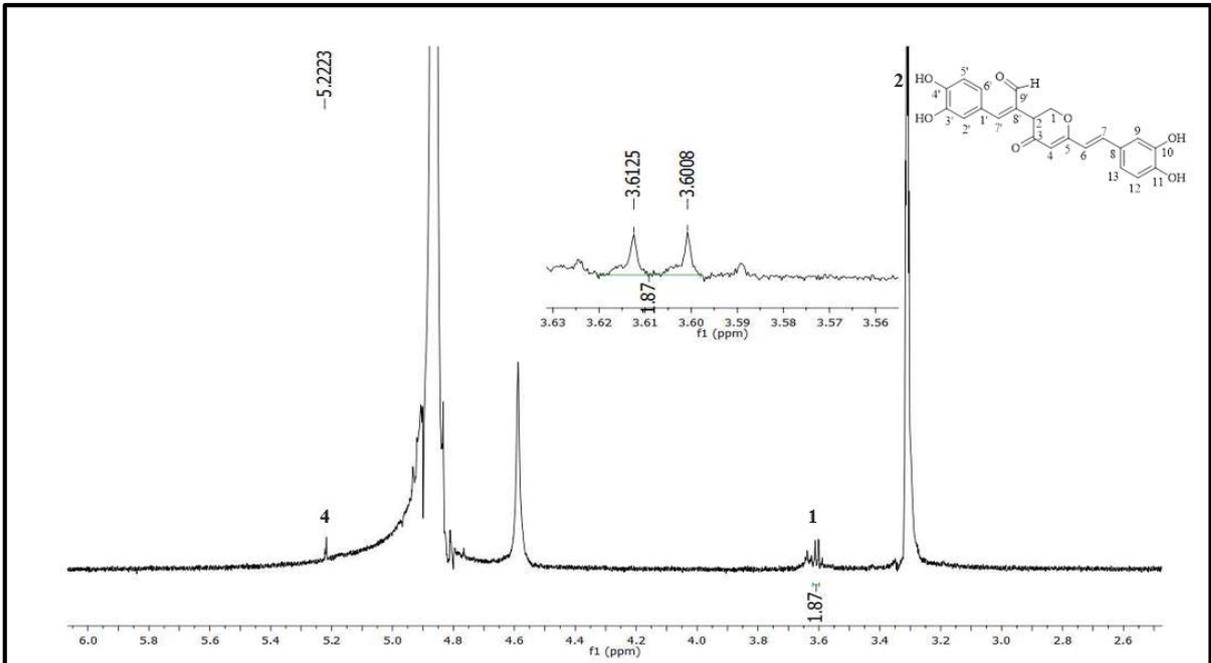


Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C expandido do Composto D9 em $\text{MeOH-}d_4$ a 150 MHz

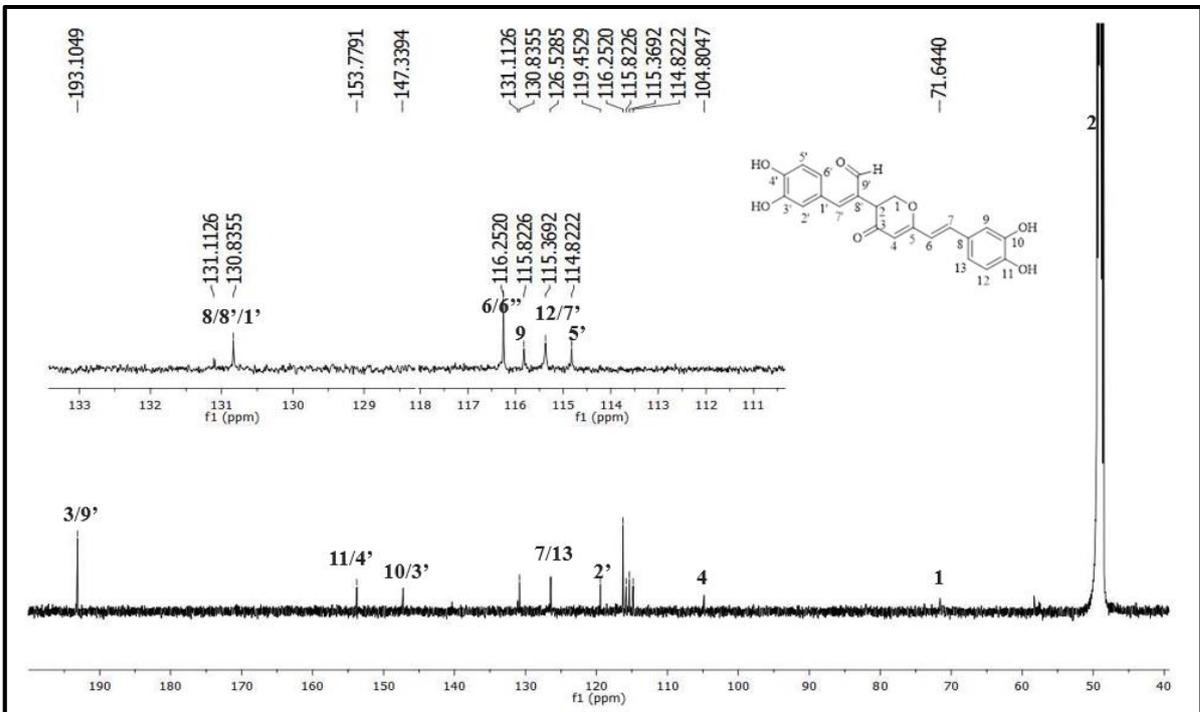


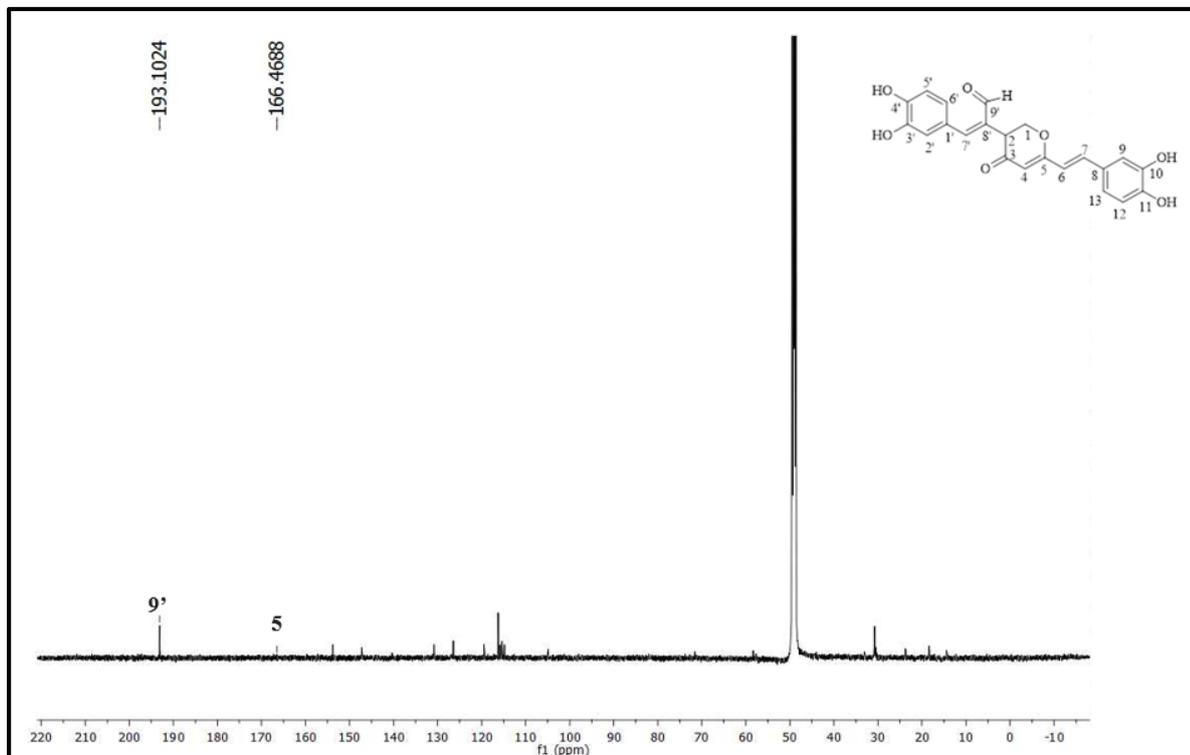
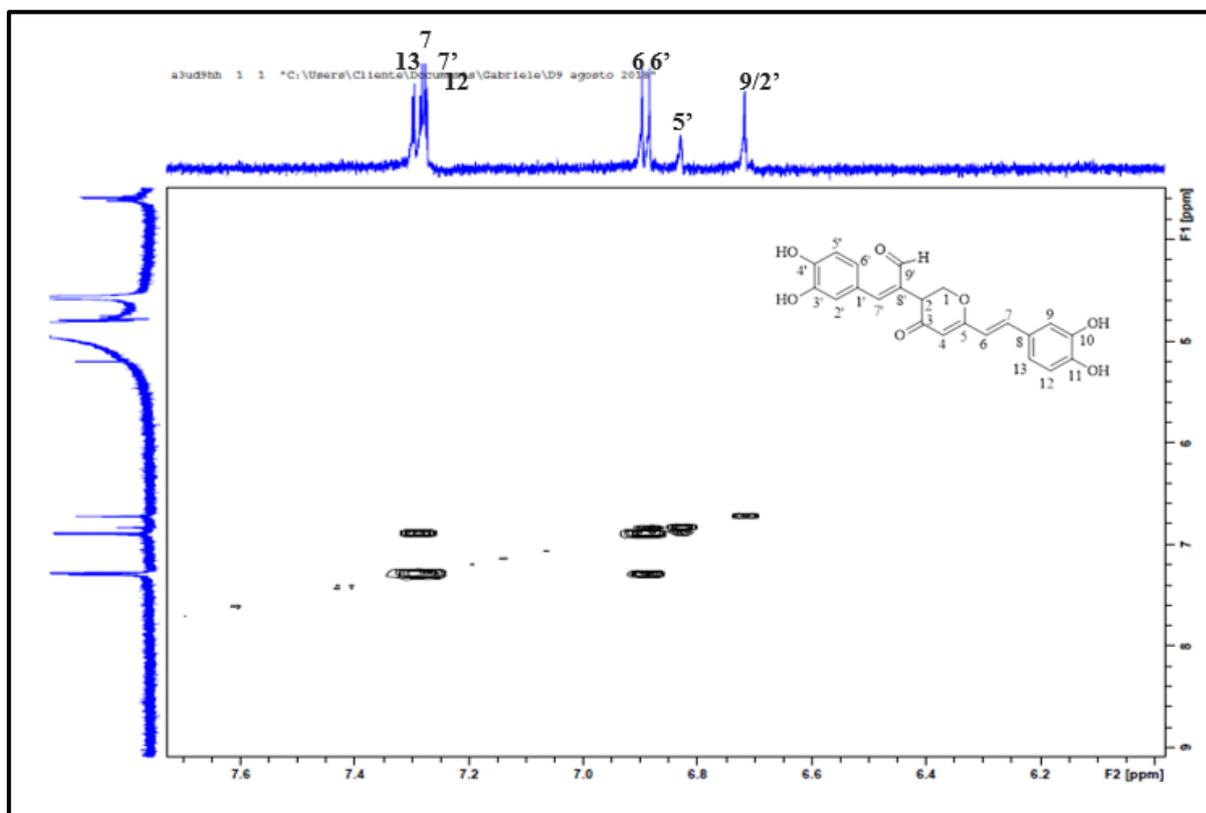
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C do Composto D9 em $\text{MeOH-}d_4$ a 150 MHzFigura 34 – Espectro de COSY expandido do Composto D9 em $\text{MeOH-}d_4$ a 600 MHz

Figura 35 – Espectro de COSY do Composto D9 em MeOH- d_4 a 600 MHz

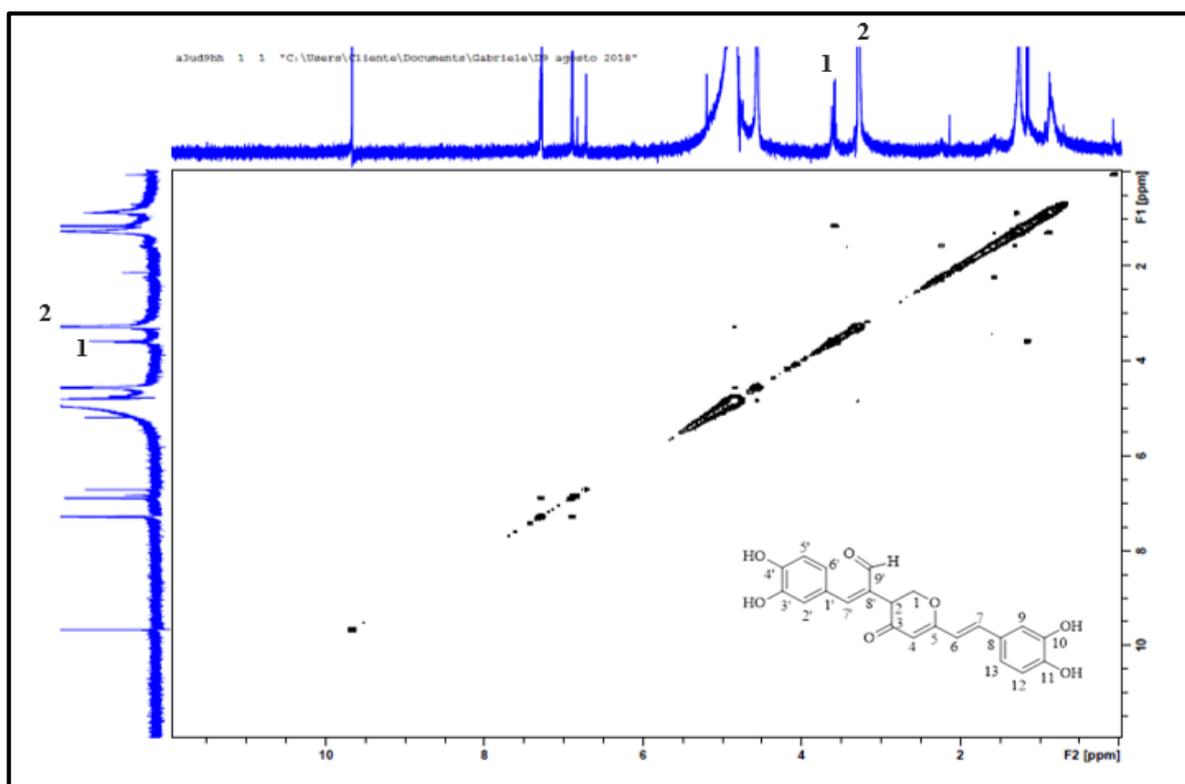


Figura 36 – Espectro de HSQC expandido do Composto D9 em MeOH- d_4 a 600 MHz

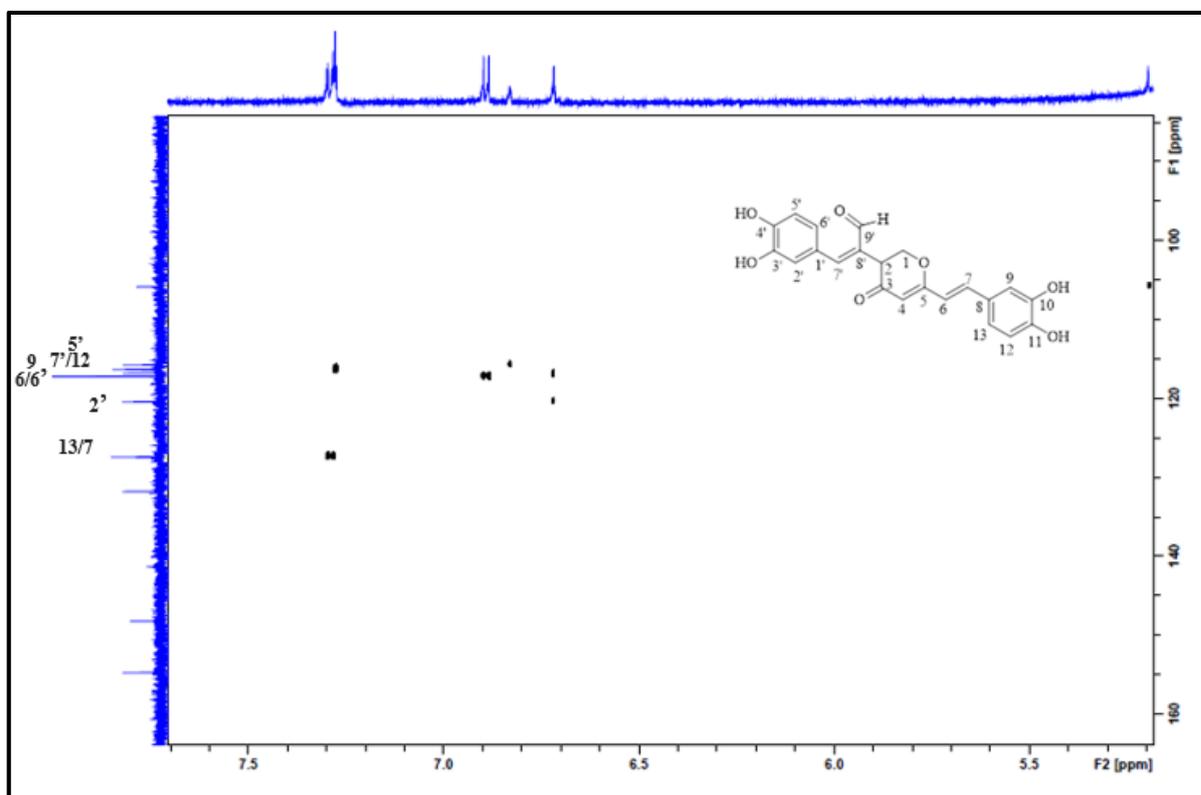


Figura 37 – Espectro de HSQC expandido do Composto D9 em MeOH- d_4 a 600 MHz

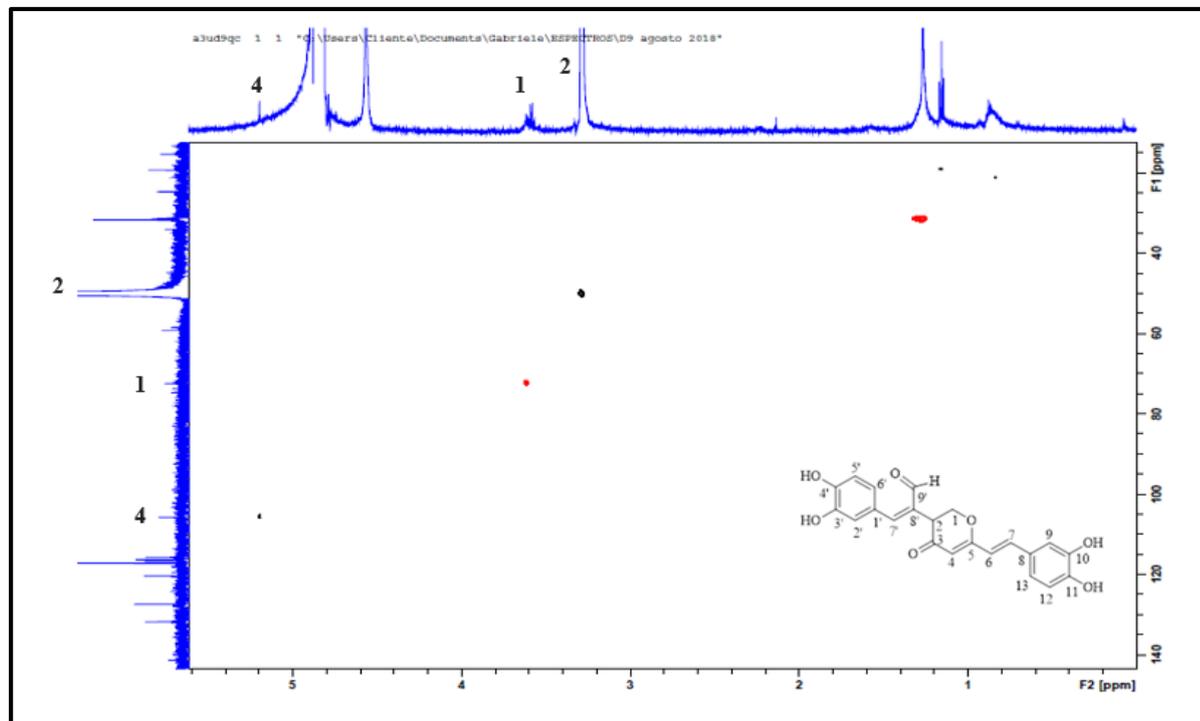


Figura 38 – Espectro de HMBC expandido do Composto D9 em MeOH- d_4 a 600 MHz

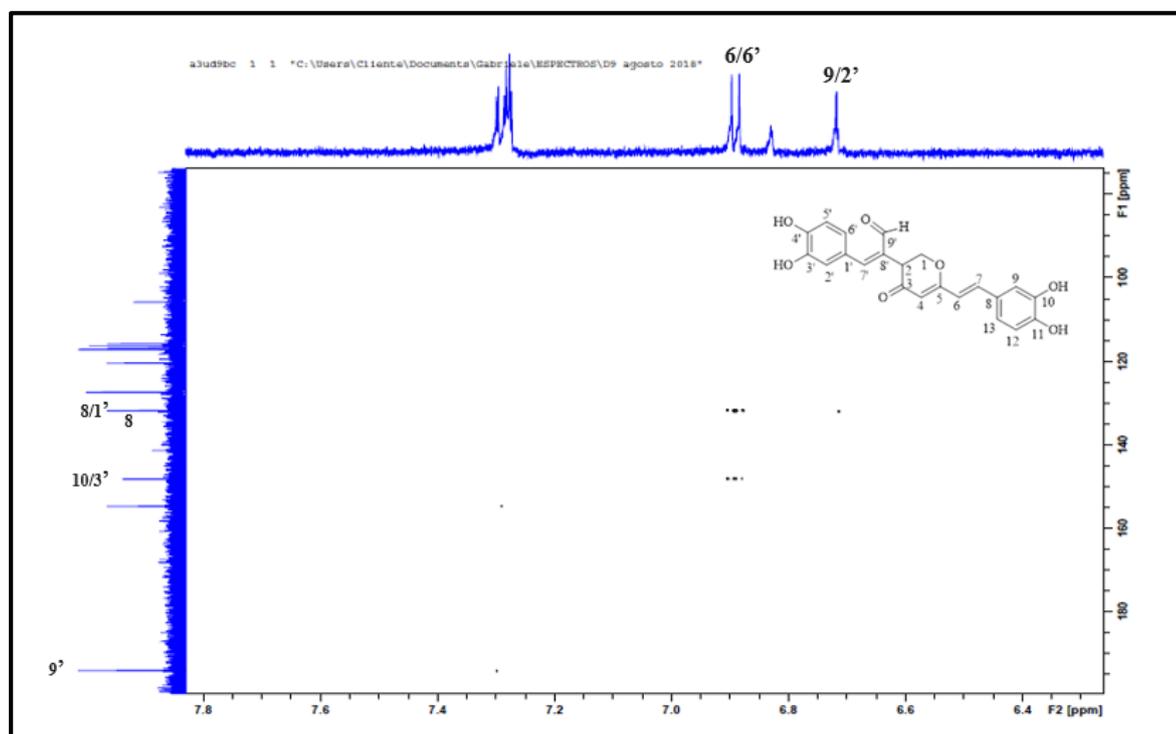


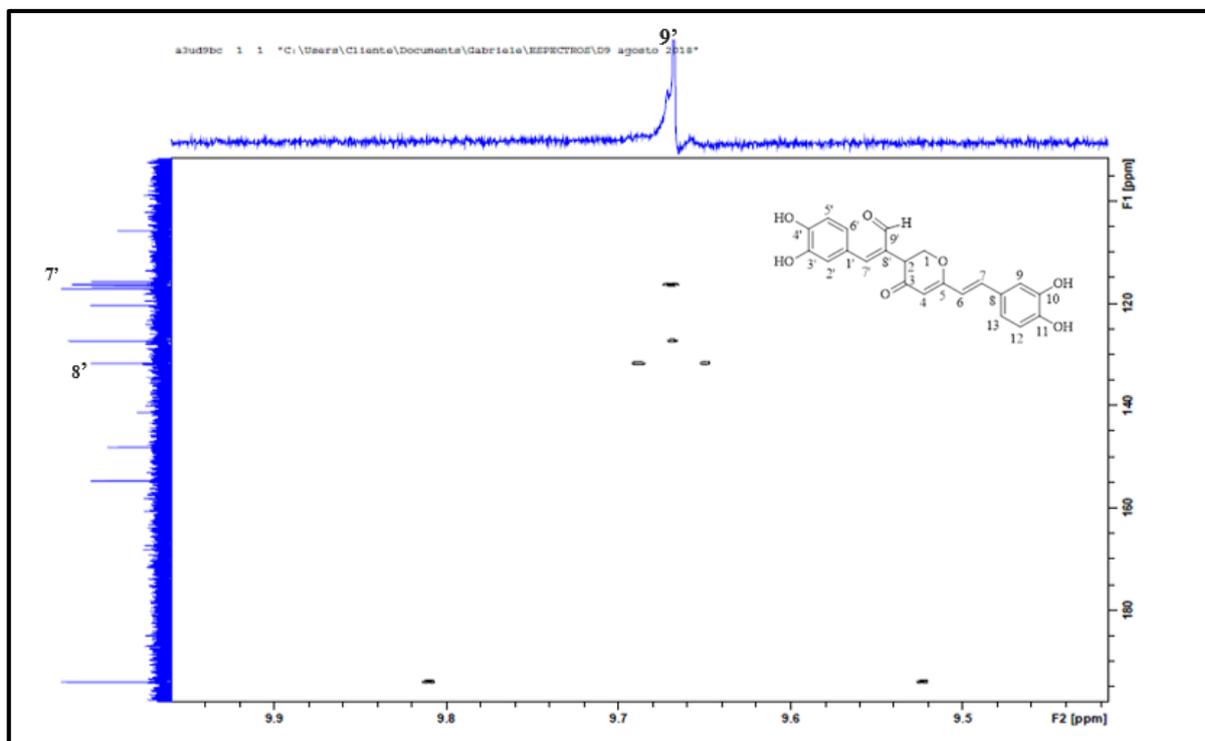
Figura 39 – Espectro de HMBC expandido do Composto D9 em MeOH-*d*₄ a 600 MHz

Tabela 9 – Composto fenólico (D9) (MeOH-*d*₄, RMN de ¹H a 600 MHz, RMN de ¹³C a 150 MHz)

Posição	Composto D9		Literatura	
	¹ H	¹³ C	¹³ C*	¹ H**
1	3,60 (d, <i>J</i> =7,0Hz)	71,56	166,10	
2	3,37 (m)	49,00	100,20	
3		193,13	170,30	
4	5,22 (s)	104,85	102,60	
5		166,48	161,10	
6	6,91 (d, <i>J</i> =2,0Hz)	116,25	117,10	
7	7,30 (d, <i>J</i> =2,0Hz)	126,52	137,20	
8		130,83	128,30	
9	6,74 (m)	115,82	114,90	
10		147,33	146,80	
11		153,77	148,60	
12	7,29 (d, <i>J</i> =8,0Hz)	115,36	116,60	
13	7,32 (dd, <i>J</i> =8,0 e 2,0Hz)	126,52	122,00	
1'		130,83	127,90	
2'	6,74 (m)	119,45	117,60	
3'		147,33	146,40	5,49 (s)
4'		153,77	149,40	
5'	6,85 (m)	114,82	116,20	
6'	6,90 (dd, <i>J</i> =8,0 e 2,0Hz)	116,25	125,60	
7'	7,30 (s)	115,36	145,80	
8'		131,11	129,00	
9'	9,69 (s)	193,10	201,50	

* δ_C (MeOH-*d*₄, RMN de ¹³C a 100 MHz) conforme LEE e YUN, 2007; ** δ_H (MeOH-*d*₄, RMN de ¹H a 400 MHz) conforme LEE e YUN, 2006.

4.6.7 Composto P1 – Ácido hexadec-5-enóico

O composto P1 foi isolado da fração Hex *Pt* na forma de sólido branco, que foi submetido a análises de RMN uni e bidimensionais e espectrometria de massas. Com a obtenção desses dados e espectrometria de massas, foi possível propor a estrutura do composto de fórmula molecular C₁₆H₃₀O₂.

Ao analisar o espectro de RMN de ¹H (Figura 40) foi possível visualizar alguns sinais, entre esses, em δ 5,34 ppm referente aos hidrogênios olefínicos H-5 (m) e H-6 (m). Além disso, em δ 2,34 (t, *J*=15Hz) ppm e δ 1,63 (m) ppm a presença de hidrogênios metilênicos α e β -carbonila, respectivamente. Em δ 0,88 ppm a presença de hidrogênios metílicos (H-16).

Com a análise do experimento de RMN de ¹³C (Figura 41), foi possível confirmar a presença de um carbono carbonílico em δ 180,05 ppm, sugerindo um grupo ácido. Ademais, a presença de carbonos olefínicos em δ 129,88 (C-6) e δ 130,18 (C-5) ppm e os carbonos

metilênicos C-2 (δ 34,19 ppm) e C-3 (δ 24,84 ppm) e um carbono metílico em δ 14,23 ppm (C-16).

O experimento bidimensional COSY (Figura 42), que analisa os acoplamentos dos hidrogênios vizinhos, permitiu visualizar as correlações entre os H-5 e H-6 com os H-4 e os H-7, além disso, o acoplamento dos H-2 com os H-3. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 10. O cromatograma de massas está ilustrado no Apêndice H.

Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H do ácido hexadec-5-enóico (**P1**) em CDCl_3 a 400 MHz

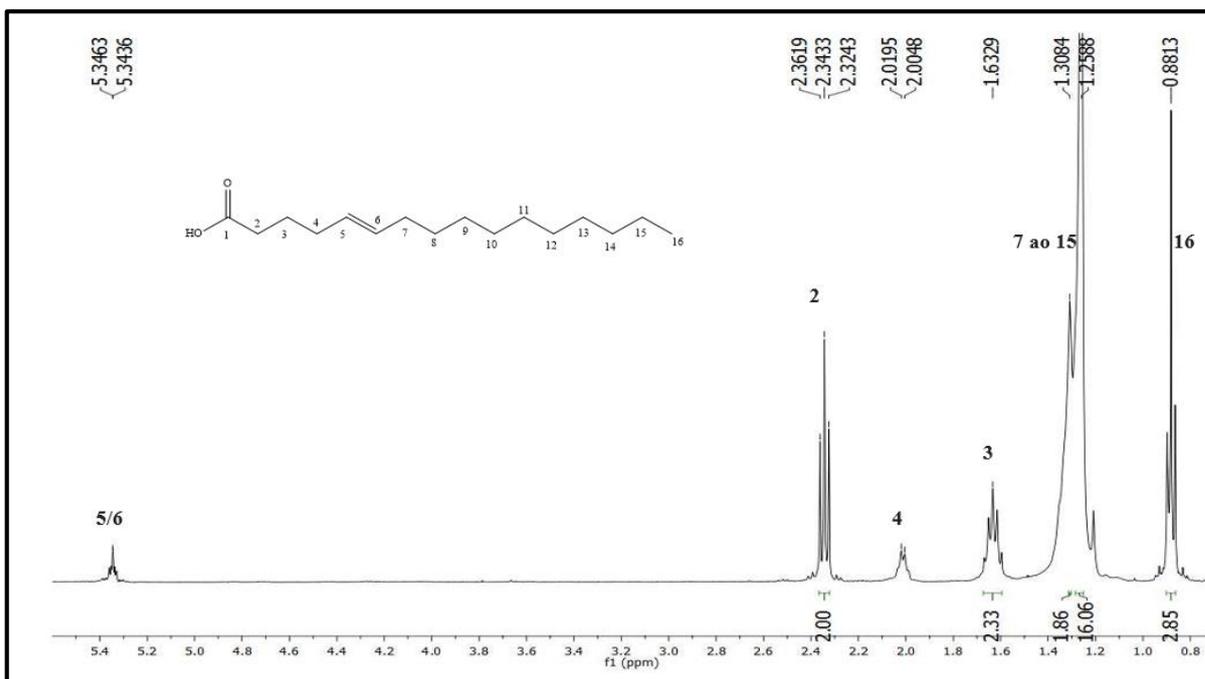


Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido hexadec-5-enóico (**P1**) em CDCl_3 a 100 MHz

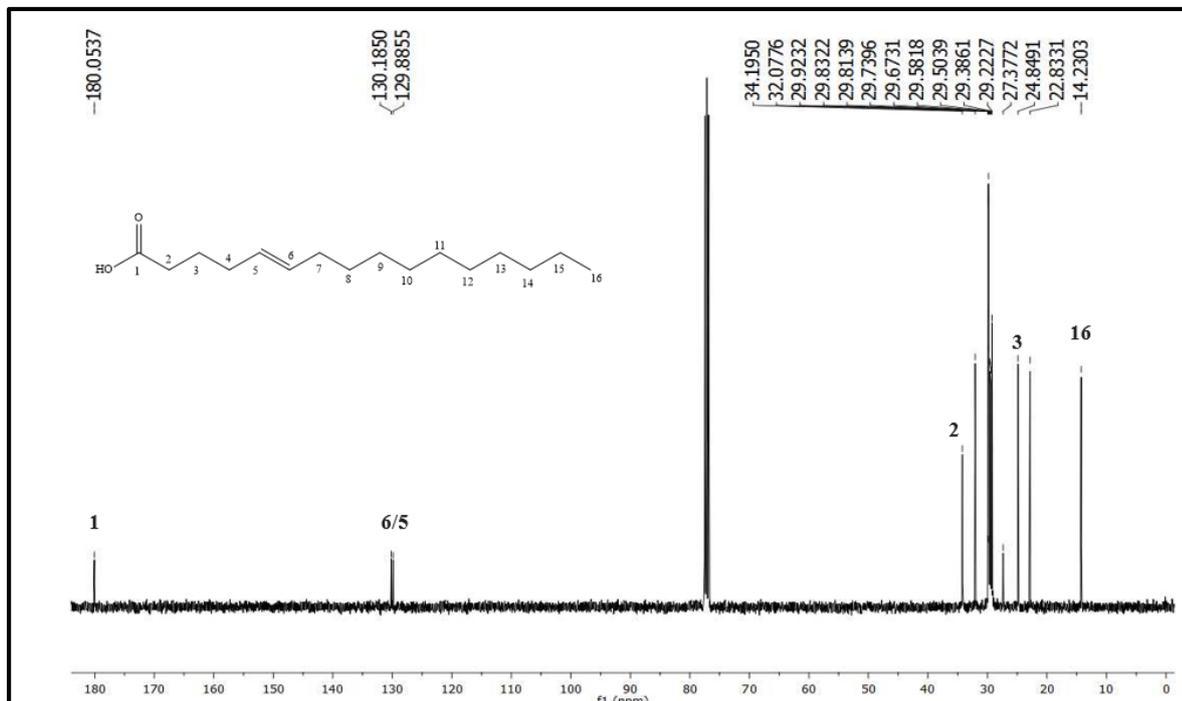


Figura 42 – Espectro de COSY do ácido hexadec-5-enóico (**P1**) em CDCl_3 a 400 MHz

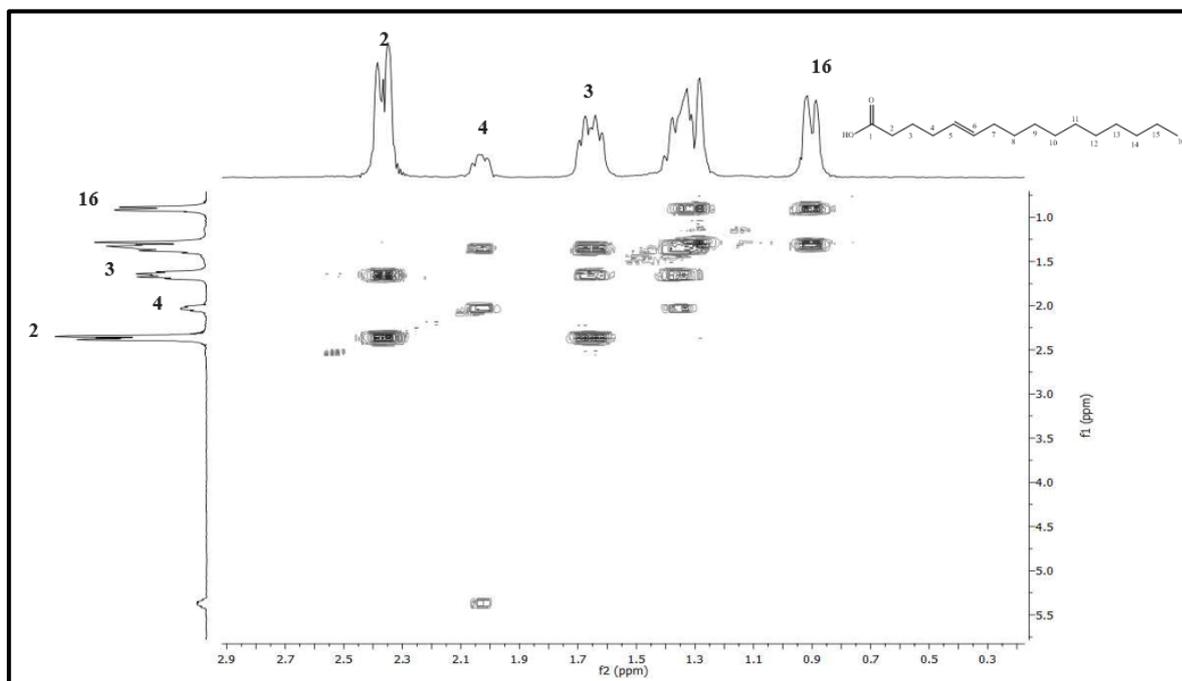


Tabela 10 – Ácido hexadec-5-enóico (**P1**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	¹ H	Composto P1	¹³ C
1			180,05
2	2,34 (t, <i>J</i> =15 Hz)		34,19
3	1,63 (m)		27,37
4	2,00 (m)		32,07
5	5,34 (m)		129,88
6	5,34 (m)		130,18
7	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
8	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
9	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
10	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
11	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
12	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
13	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
14	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
15	1,30 a 1,25 (m)		29,92 a 27,37
16	0,88 (m)		14,23

4.6.8 Composto P65 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil

O metabólito P65 foi isolado através de técnicas cromatográficas da fração hexânica de *Pisolithus tinctorius* na forma de um sólido branco, com ponto de fusão 92,7 – 94,7°C. O seu espectro de EMAR (Figura 56) exhibe $[(M + H)^+] = 441,3005$, que em combinação com os experimentos de RMN de ¹H e ¹³C, sugere uma fórmula molecular de C₃₁H₅₂O. Embora, a substância apresenta uma pequena quantidade de mistura de outro composto (não identificado), os experimentos de RMN uni (¹H, ¹³C e Dept 135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) conduziram a determinação do composto como sendo o Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil, ainda não descrito na literatura.

No espectro de RMN de ¹H (Figuras 43, 44 e 45) juntamente com o RMN de ¹³C (Figuras 46 e 47) e Dept 135 (Figura 48), é possível visualizar a presença de oito metilas, na região de δ 0,50 a 1,02 ppm, sendo cinco grupos metílicos ligados a carbonos quaternários, onde os H-18 (δ 0,79 ppm), H-19 (δ 0,54 ppm), H-29 (δ 0,80 ppm), H-30 (δ 0,79 ppm) e H-31 (δ 0,90 ppm) sinalizando na forma de simpletos, dois grupos metilas ligados a carbonos metínicos em δ 1,01 ppm (H-21, d, *J*=6,64 Hz) e em δ 0,91 ppm (H-25, m) e um grupamento metila ligado a carbono metilênico em δ 0,82 ppm (H-28, t, *J*=13 Hz). Ademais, o espectro mostra um hidrogênio metínico (H-3, m) em δ 3,59 ppm ligado ao carbono do grupamento hidroxila, três hidrogênios olefínicos, sendo dois pertencentes a cadeia lateral (H-22, m, δ 5,16

ppm; H-23, m, δ 5,20 ppm) e um ao núcleo triterpênico (H-7, m, δ 5,15 ppm) e demais hidrogênios metínicos H-5 (δ 1,25 ppm), H-9 (δ 1,62 ppm), H-17 (δ 1,80 ppm), H-20 (δ 2,00 ppm) e H-24 (δ 1,87 ppm). Os hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-16, C-26 e C-27 aparecem na região de δ 2,01 a 1,06 ppm.

Analisando o experimento de RMN de ^{13}C , é possível verificar a presença de cinco carbonos desidrogenados, sinalizando em δ 39,24 (C-4), 139,78 (C-8), 43,45 (C-13), 49,49 (C-14) e 34,37 (C-10) ppm, onde propôs que o C-14 está localizado junto ao C-9, devido a maior intensidade do pico e os deslocamentos químicos desses carbonos serem muito semelhantes. No espectro de Dept 135 (Figura 48) é possível confirmar a presença de nove carbonos metilênicos com amplitude negativa, os quais distribuem-se na região de δ 22,0 a 40,0 ppm, correspondendo aos C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-16, C-26 e C-27. Em amplitude positiva, campo baixo, é possível visualizar a presença de três carbonos metínicos, sugestivos aos carbonos olefínicos C-7 (δ 117,56 ppm), C-22 (δ 135,82 ppm) e C-23 (δ 132,02 ppm). Na região de δ 71,22 ppm, região de carbono ligado a heteroátomo (oxigênio), atribui-se ao C-3, que está ligado a hidroxila. Além disso, entre δ 56,0 e δ 12,0 ppm, somam-se ainda cinco carbonos metínicos (C-5, C-9, C-17, C-20 e C-24) e oito carbonos metílicos (C-18, C-19, C-21, C-25, C-28, C-29, C-30 e C-31) de amplitude positiva, considerando que os C-18/C-30 e C-25/C-31 apresentam o mesmo deslocamento químico.

Para a melhor visualização estão apresentadas as expansões do experimento realizado. O espectro de RMN 2D COSY H-H (Figuras 49 e 50), mostra as correlações entre os hidrogênios vizinhos de um mesmo sistema de spins. Nesse experimento foi possível verificar as correlações entre os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23, o H-3 com os H-2 e H-7 com H-6. Com o auxílio do experimento de bidimensional de HSQC (Figuras 51, 52 e 53), foi possível atribuir as correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Assim, no espectro HSQC podemos verificar que o H-7 tem correlação com o carbono que está em δ 117,56 ppm, H-22 tem correlação com o carbono que está em δ 135,82, o H-23 com o carbono que está em δ 132,02 ppm, do mesmo modo que o carbono que está a δ 71,22 ppm tem correlação com o H-3 (δ 3,59 ppm).

No experimento de RMN 2D de HMBC (Figuras 54 e 55) podemos verificar os acoplamentos dos carbonos com os hidrogênios vizinhos a duas e três ligações. Embora, nem todas as correlações foram possíveis visualizar, alguns pontos importantes puderam ser atribuídos. Ainda, é possível ver as correlações do carbono metínico C-5 com o H-3 e hidrogênio metílico H-19. Além disso, a correlação do carbono olefínico C-23 e carbono metínico C-24 com a metila H-25. As correlações das metilas H-21, H-18 e H-31 com os

carbonos C-17, C-14 e C-10, respectivamente. Ademais, o carbono quaternário C-4 com as metilas H-31 e H-19. A Tabela 11 apresenta os dados de RMN do composto obtido. Ainda, a substância foi submetida a técnica de cromatografia gasosa, a fim de verificar a pureza da amostra, onde essa apresentou uma porcentagem de 84% (Figura 57).

Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

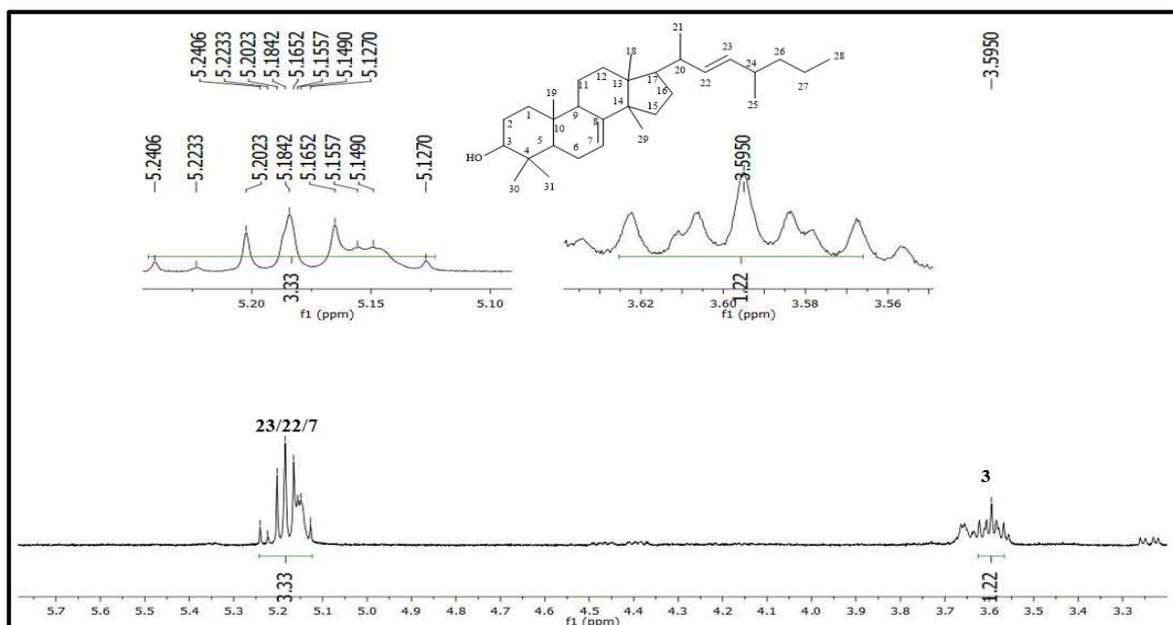


Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

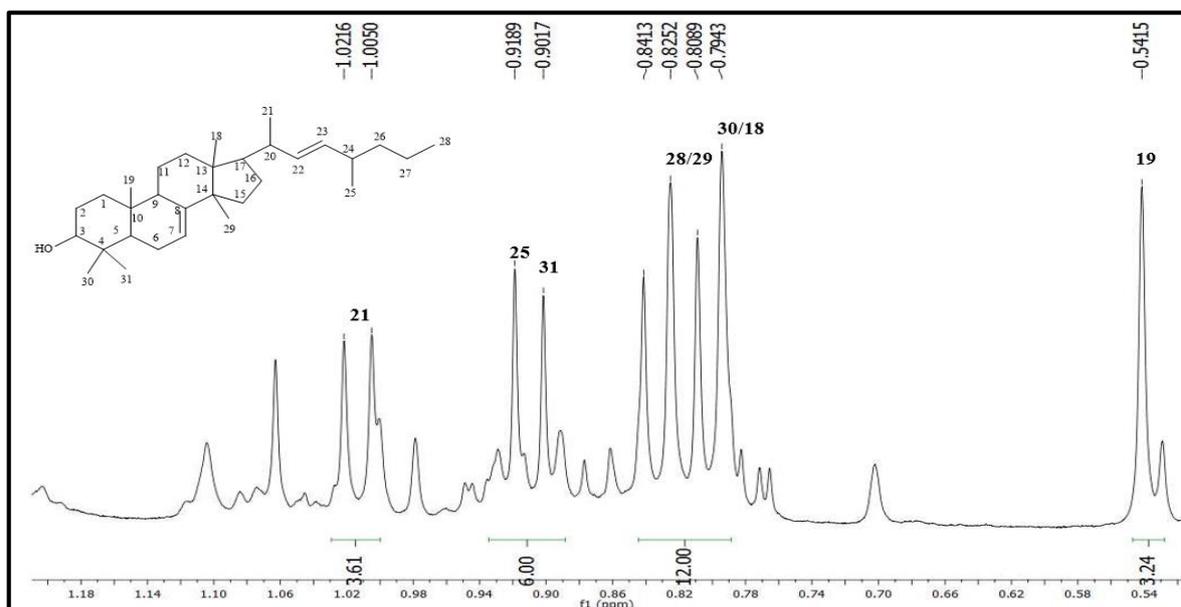


Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

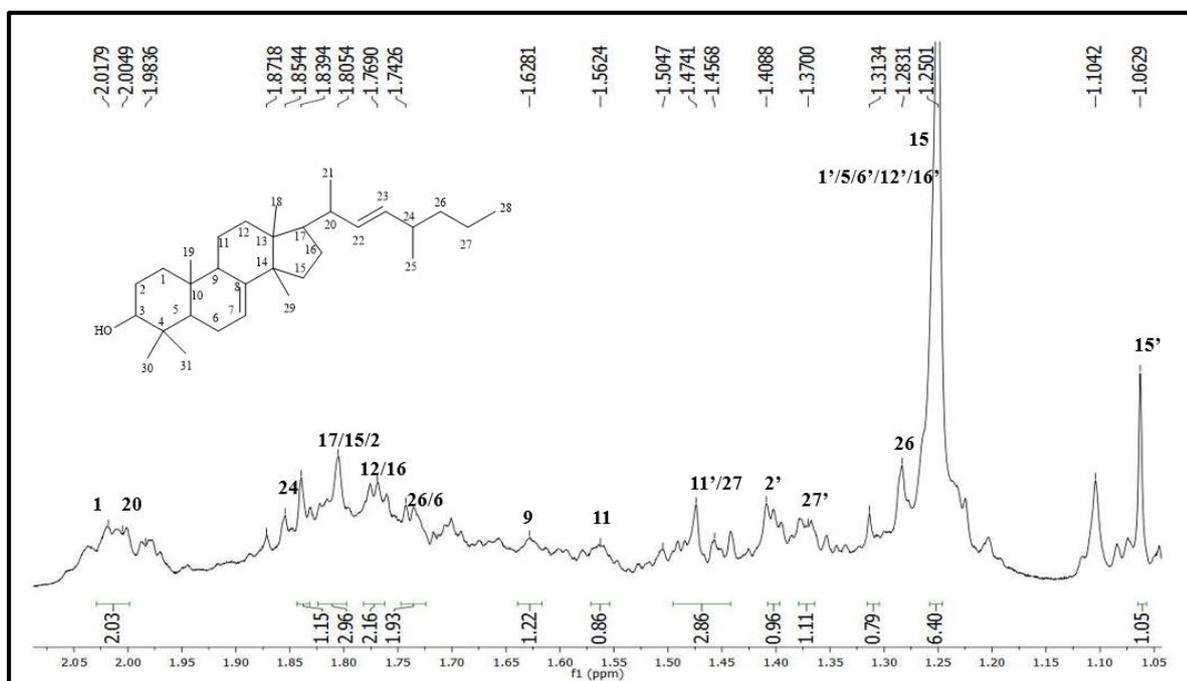


Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 100 MHz

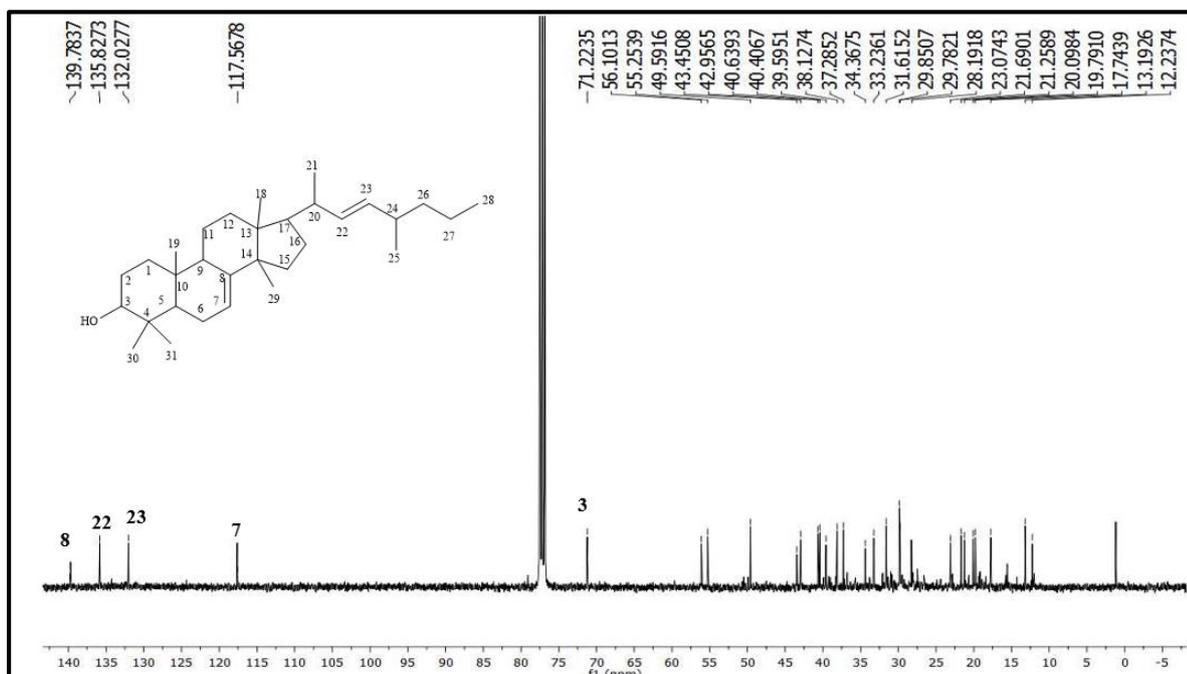


Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 100 MHz

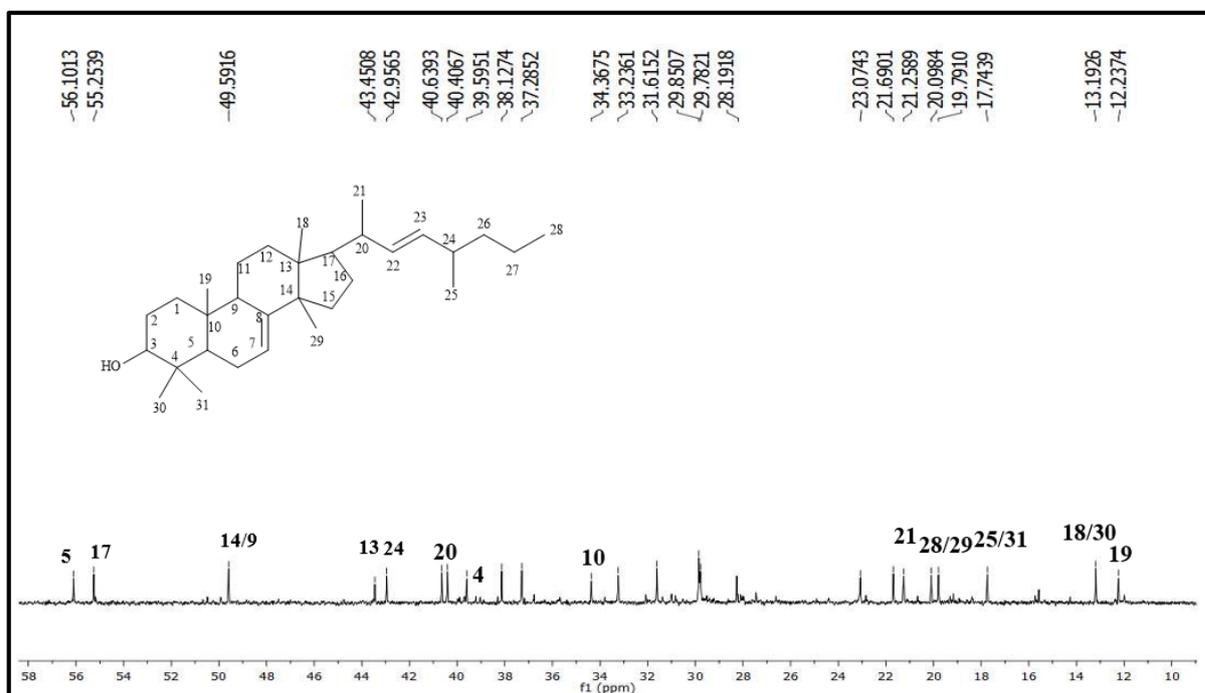


Figura 48 – Espectro de RMN Dept 135 expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 100 MHz

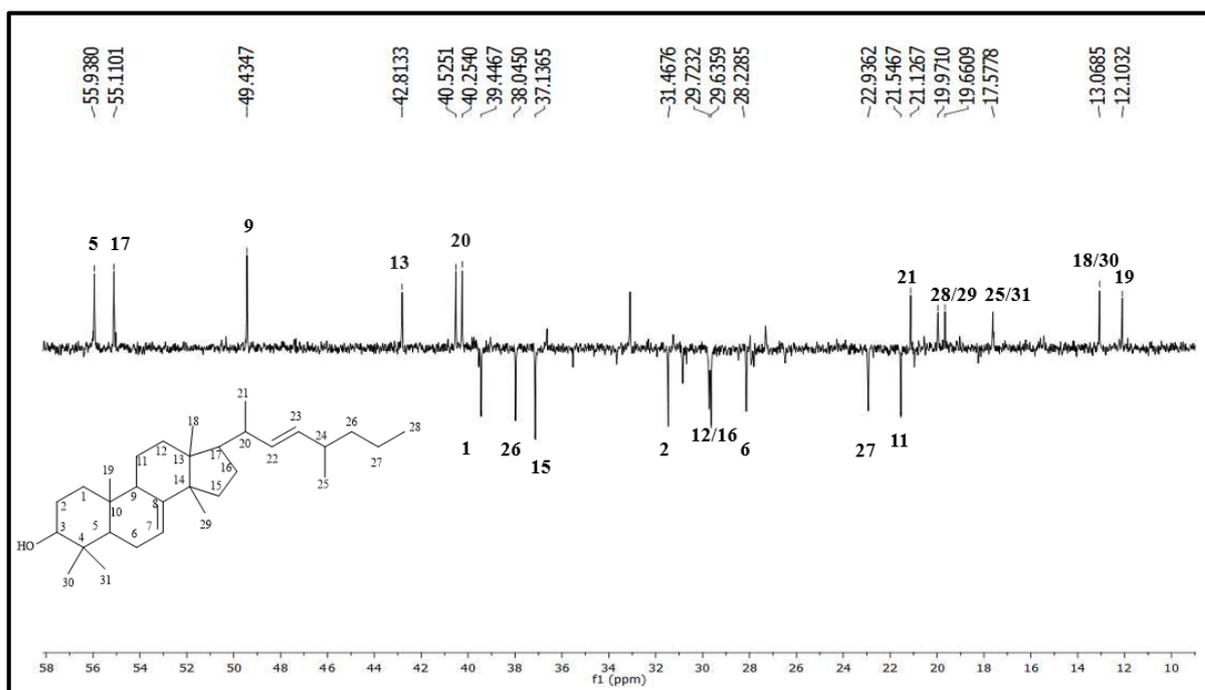


Figura 49 – Espectro de COSY do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

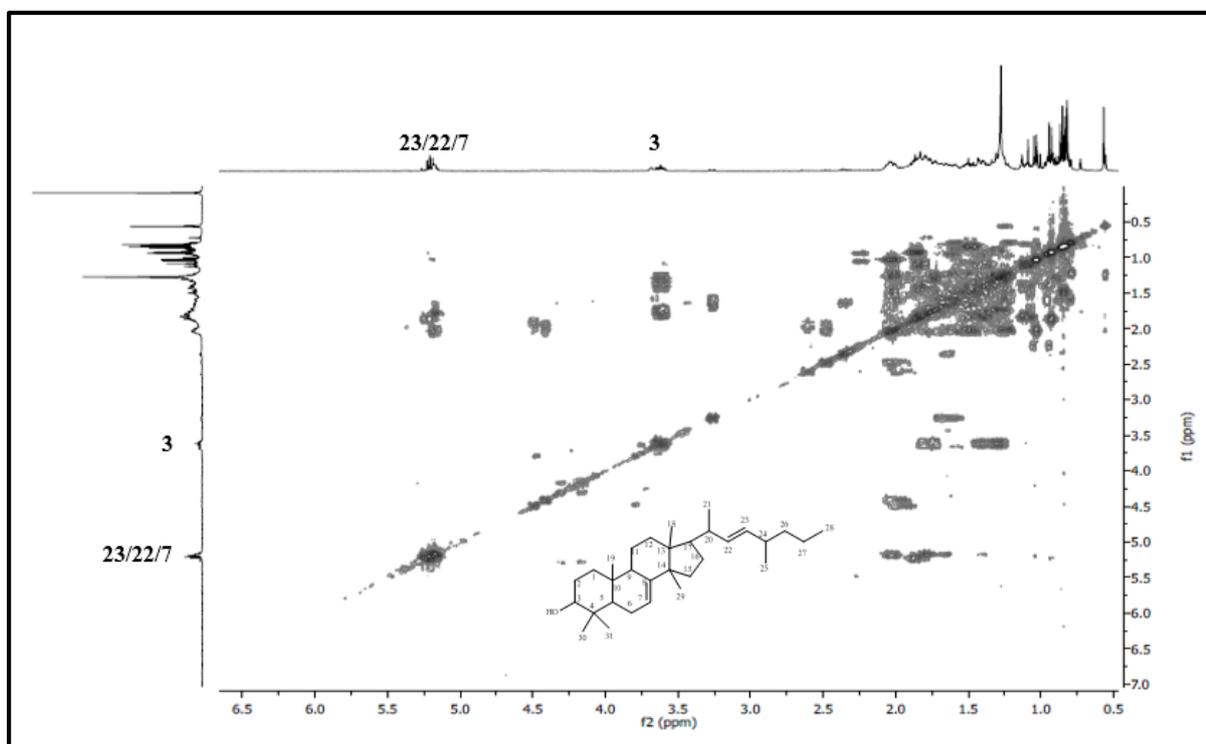


Figura 50 – Espectro de COSY expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

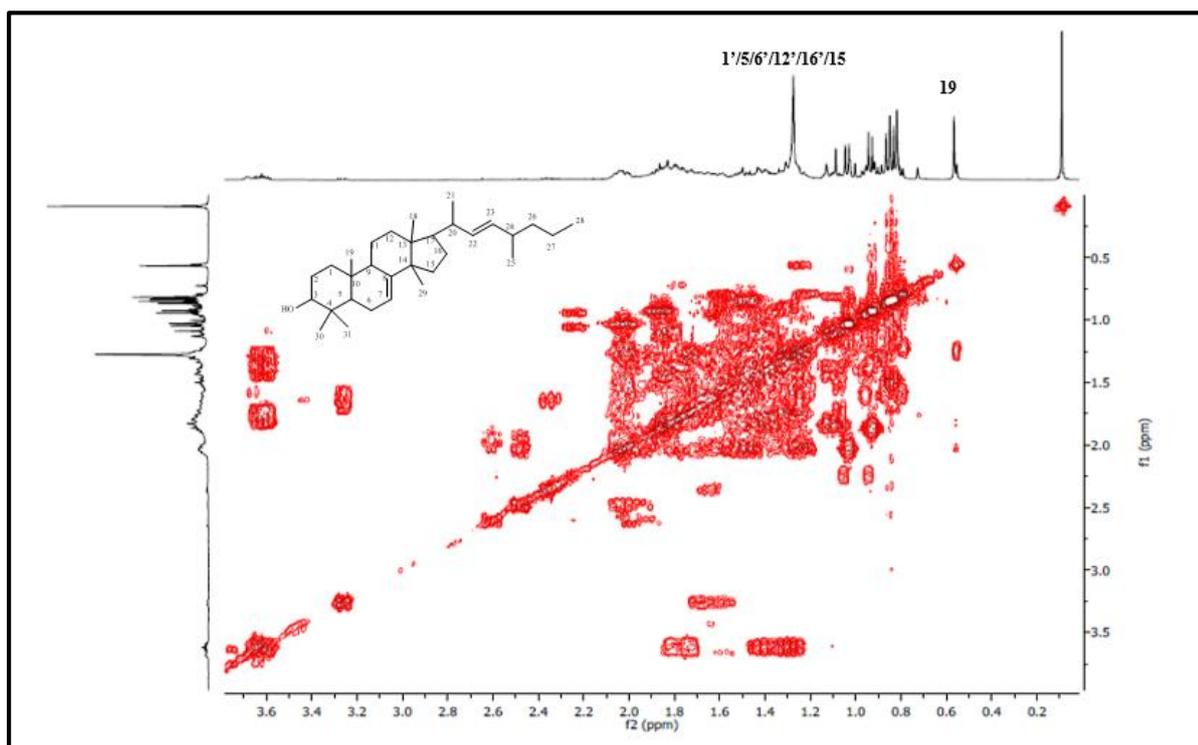


Figura 51 – Espectro de HSQC do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

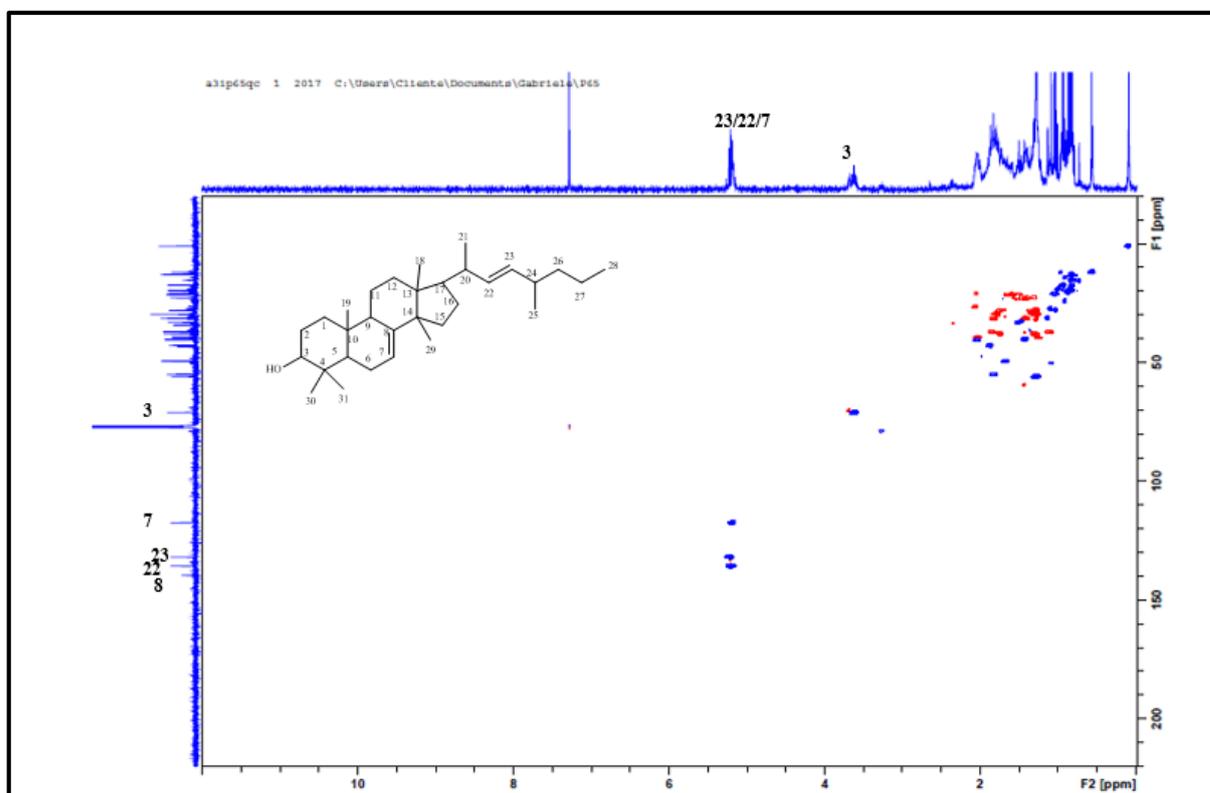


Figura 52 – Espectro de HSQC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

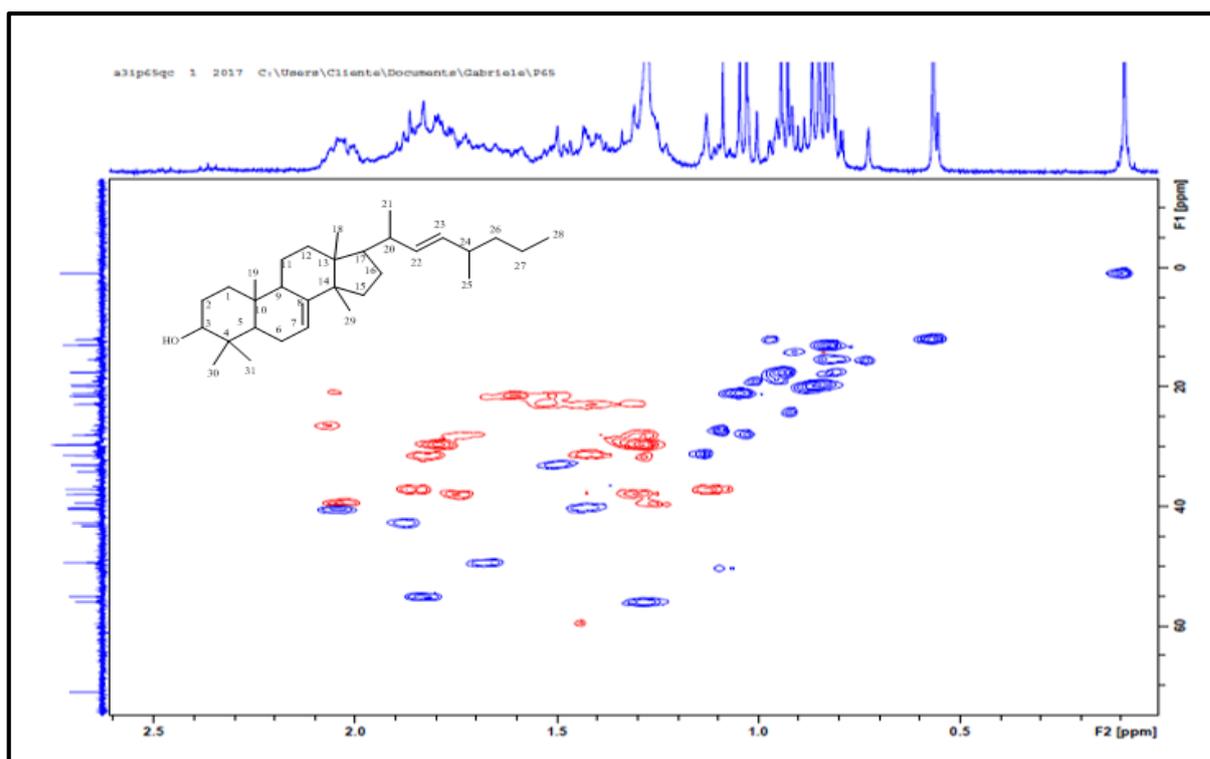


Figura 53 – Espectro de HSQC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

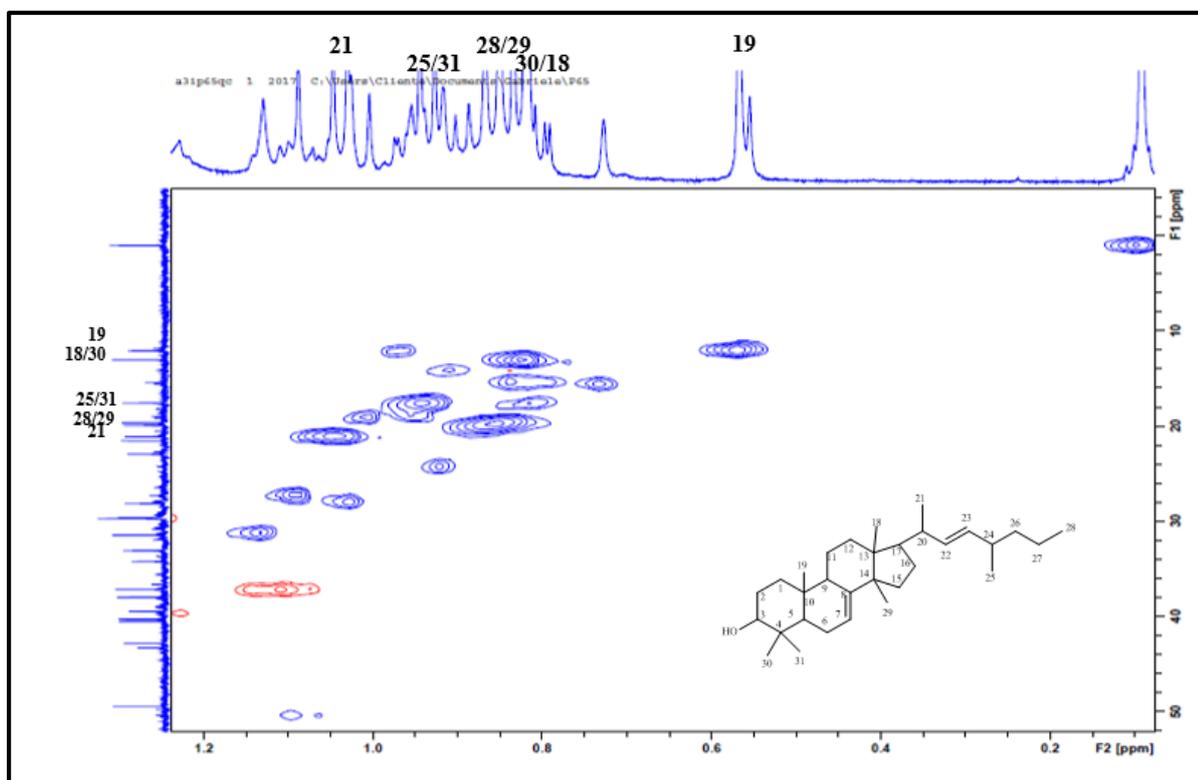


Figura 54 – Espectro de HMBC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

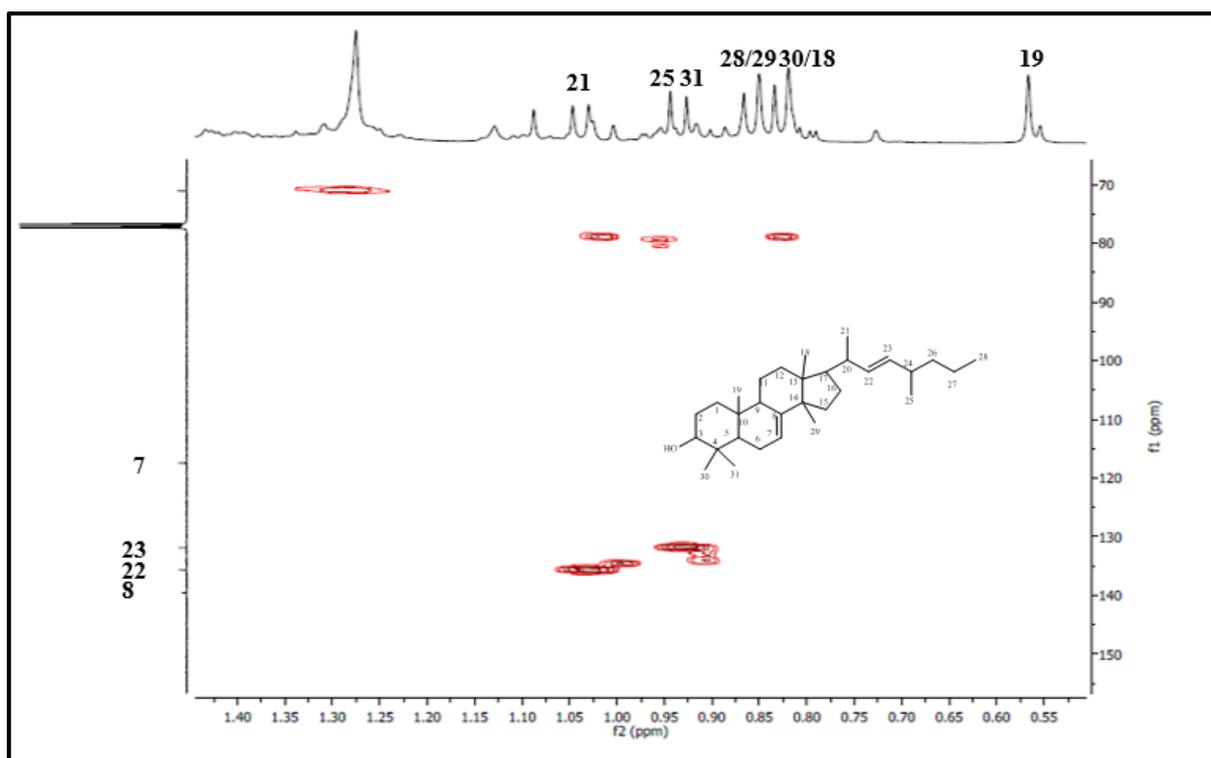


Figura 55 – Espectro de HMBC expandido do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) em CDCl_3 a 400 MHz

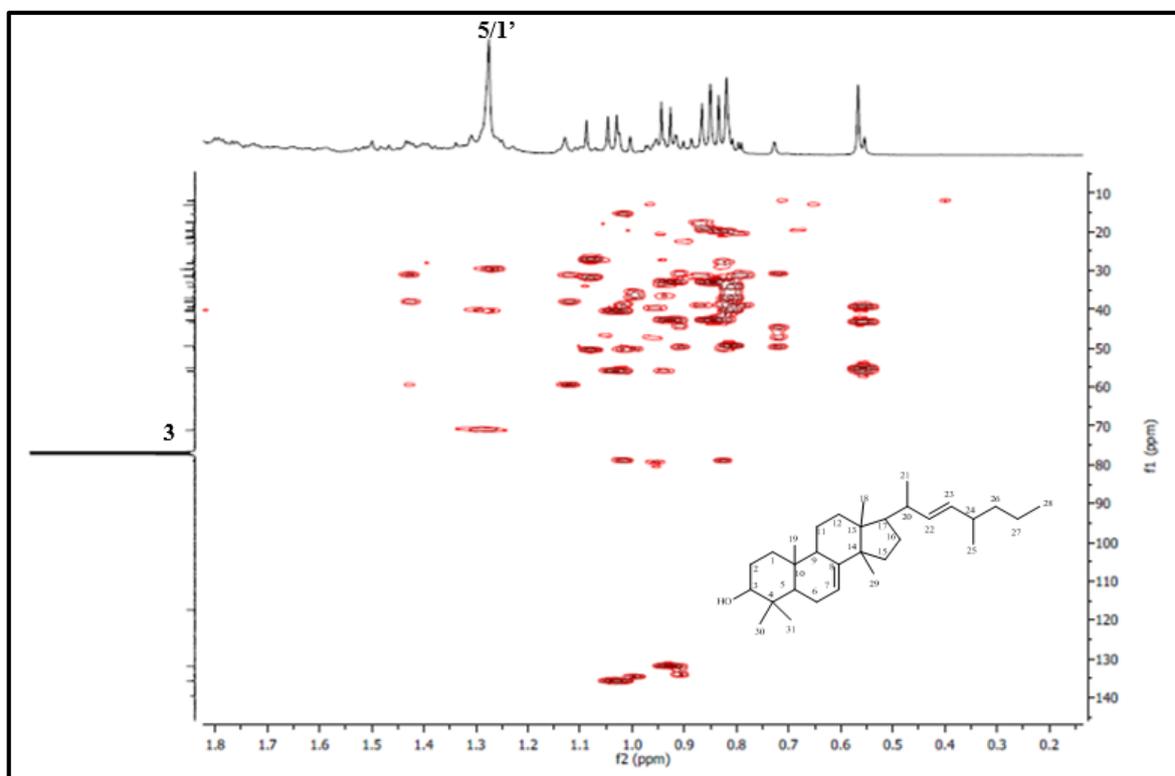


Figura 56 – Espectrometria de massas de alta resolução do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**)

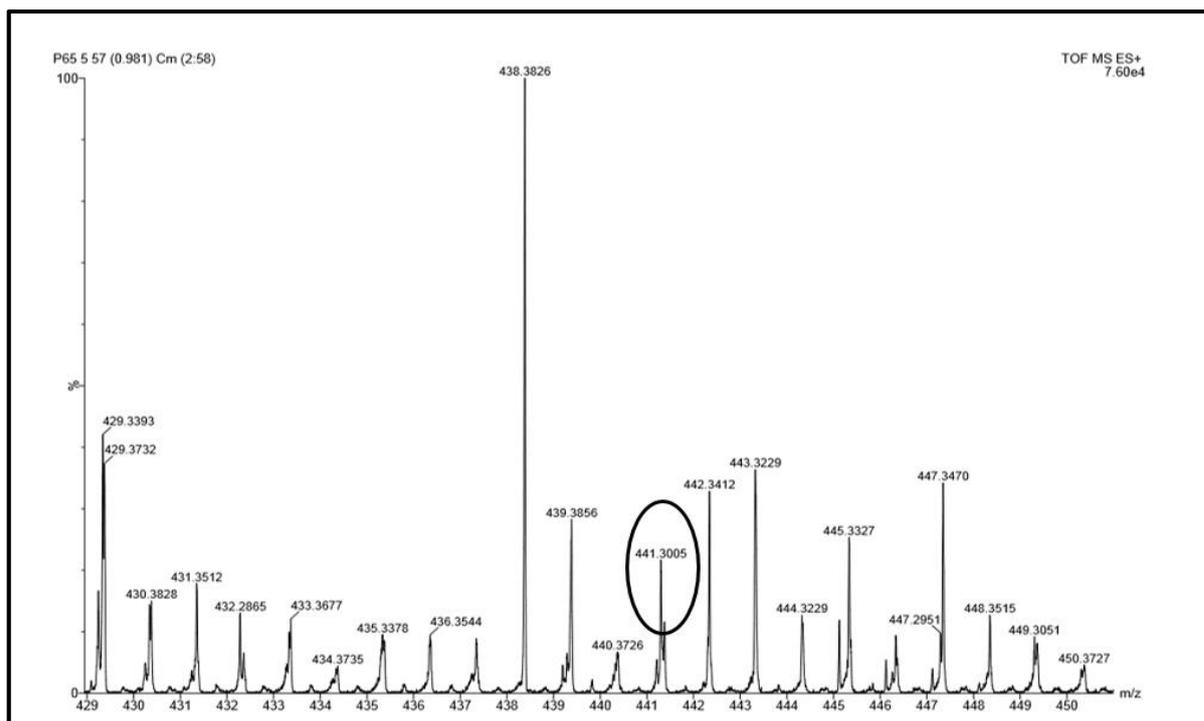


Figura 57 – Cromatografia gasosa do Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (P65)

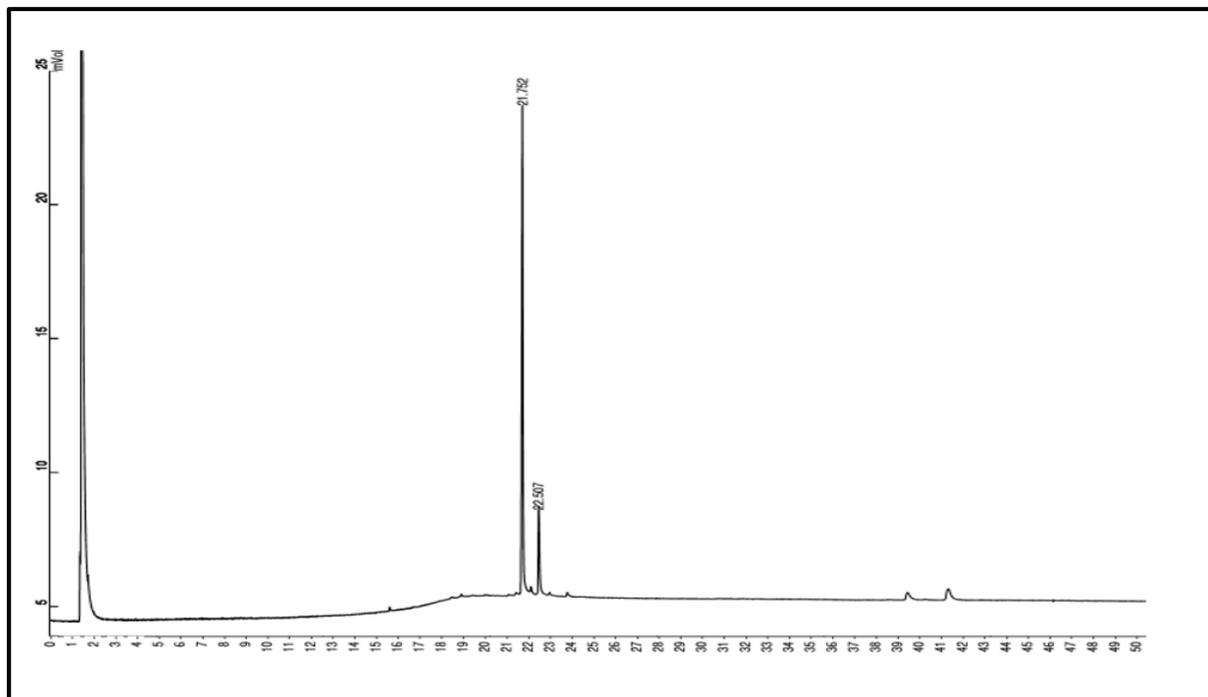


Tabela 11 – Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil (**P65**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Composto P65	
	¹ H	¹³ C
1	2,01 e 1,25 (m)	39,59
2	1,80 e 1,40 (m)	31,46
3	3,59 (m)	71,22
4		39,24
5	1,25 (m)	56,10
6	1,74 e 1,25 (m)	28,22
7	5,15 (m)	17,56
8		139,78
9	1,62 (m)	49,59
10		34,37
11	1,50 e 1,47 (m)	21,54
12	1,76 e 1,25 (m)	29,72
13		43,45
14		49,49
15	1,80 e 1,06 (m)	37,13
16	1,76 e 1,25 (m)	29,63
17	1,80 (m)	55,25
18	0,79 (s)	13,19
19	0,54 (s)	12,23
20	2,00 (m)	40,63
21	1,01 (d, <i>J</i> = 6,64Hz)	21,25
22	5,16 (m)	135,82
23	5,20 (m)	132,07
24	1,87 (m)	42,95
25	0,91 (m)	17,74
26	1,74 e 1,28 (m)	38,04
27	1,45 e 1,37 (m)	22,93
28	0,82 (t, <i>J</i> = 12,96Hz)	19,79
29	0,80 (s)	20,09
30	0,79 (s)	13,19
31	0,90 (s)	17,74

4.6.9 Composto P180 – Pisolactona

Este composto foi isolado na forma de cristais brancos, que se demonstraram puros quando eluídos em CCD, sendo submetidos às técnicas de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, além de medidas de difração de raios-X. A partir das análises desses dados e comparação com dados da literatura, pode-se propor uma estrutura química e fórmula molecular C₃₁H₅₀O₃, o qual corresponde ao triterpeno lanostano nomeado Pisolactona. No espectro de RMN de ¹H (Figuras 58 e 59), na região de δ 0,71 a 1,05 ppm, é possível identificar oito metilas, sendo cinco metilas na forma de simpletos sinalizando em δ 0,71 (H-18), 0,90 (H-19), 1,00 (H-

29), 0,81 (H-30) e 0,99 (H-31), o H-21 (δ 0,95 ppm) na forma de duplete ($J=3,2$ Hz) e os demais (H-26 e H-27, d, $J=6,88$ Hz) em δ 1,05 e 0,93 ppm como dupletos.

O espectro mostra um hidrogênio metínico ligado carbono do grupamento hidroxila em δ 3,24 ppm (1H, dd, $J=4,52$ e $11,56$ Hz, H-3). A constante de acoplamento de $11,56$ Hz sugere uma relação diaxial entre H-3 e o hidrogênio em C-2. Na região de δ 4,46 ppm, observa-se a presença de um hidrogênio metínico como um duplo duplete de duplete (ddd, $J=1,64, 5,92, 10,6$ Hz), devido ao acoplamento com os hidrogênios H-23 e o H-21. Em campo mais alto, sinaliza o H-24 na região de δ 2,56 ppm (m). Os demais hidrogênios aparecem na região entre δ 2,22 e 1,24 ppm. Para a identificação dos 31 carbonos, fez-se necessário a análise de RMN de ^{13}C . Como podemos visualizar na Figura 60, em δ 178,61 ppm, verifica-se a presença da carbonila lactônica (C-28). Ainda em campo baixo, a presença dos carbonos desidrogenados C-8 e C-9 em δ 134,32 e 134,79 ppm e os carbonos metínicos C-3 e C-22 em δ 79,09 e 80,74 ppm, região de carbonos ligados a oxigênio. Os demais carbonos sinalizam entre δ 51,0 e 18,0 ppm.

Todos os dados experimentais comparados com a literatura estão descritos na Tabela 12. Através da análise de difração de raios-X do cristal obtido na fração hexânica *Pt* foi possível confirmar a estereoquímica absoluta da pisolactona, onde o carbono C-3 apresenta estereoquímica absoluta S, o C-5 R, C-10 S, C-13 R, C-14 R, C-19 R, C-20 S, C-22 R e C-24 S, conforme a estrutura mostrada na Figura 61.

Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Pisolactona (**P180**) em CDCl_3 a 400 MHz

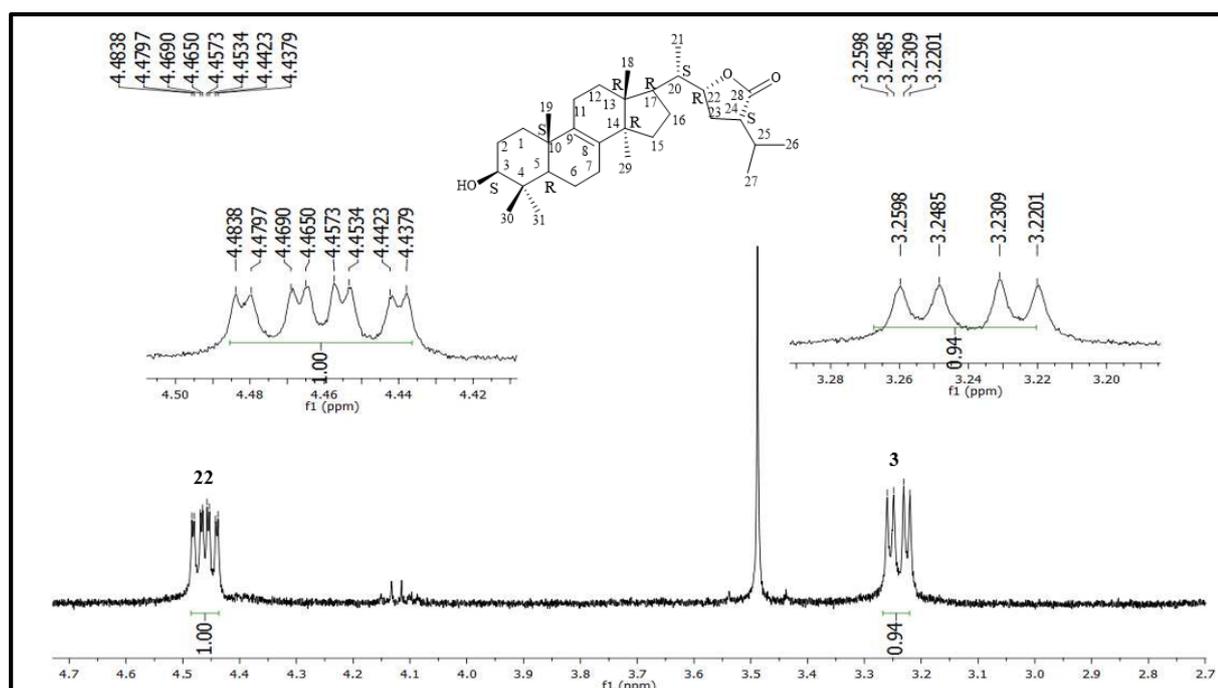


Figura 59 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Pisolactona (**P180**) em CDCl_3 a 400 MHz

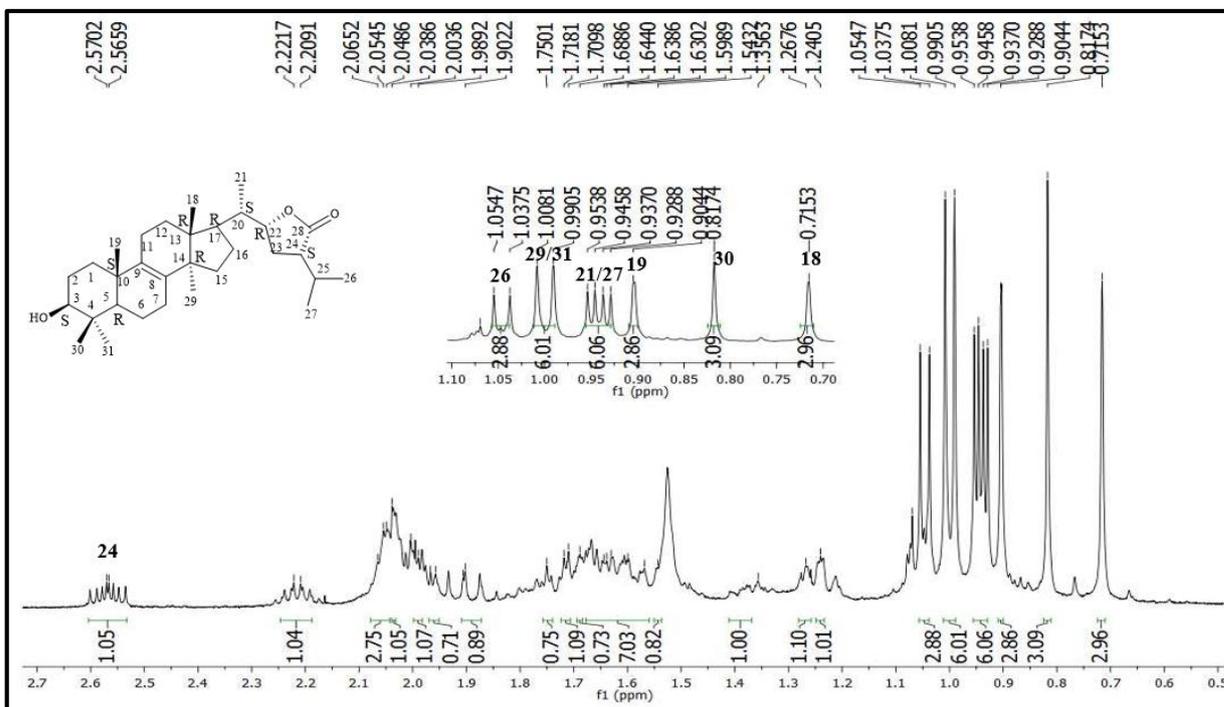


Figura 60 – Espectro de RMN de ^{13}C da Pisolactona (**P180**) em CDCl_3 a 100 MHz

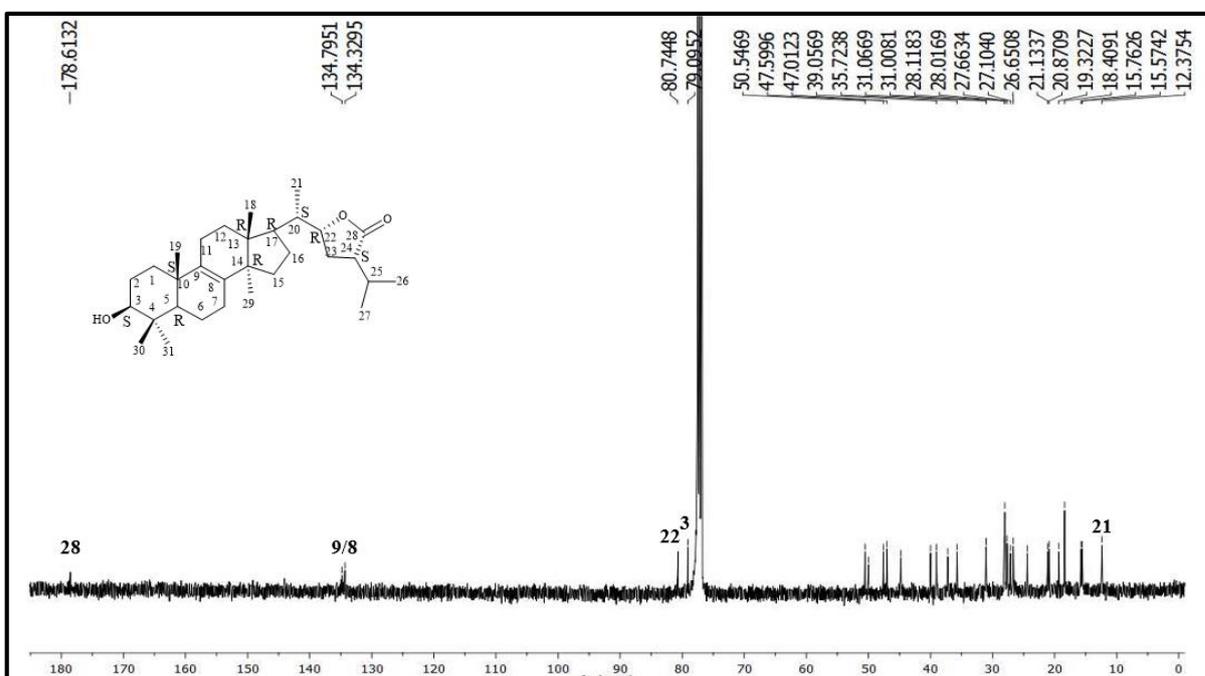


Figura 61 – Estrutura obtida por difração de raios-X da Pisolactona (representação ORTEP)

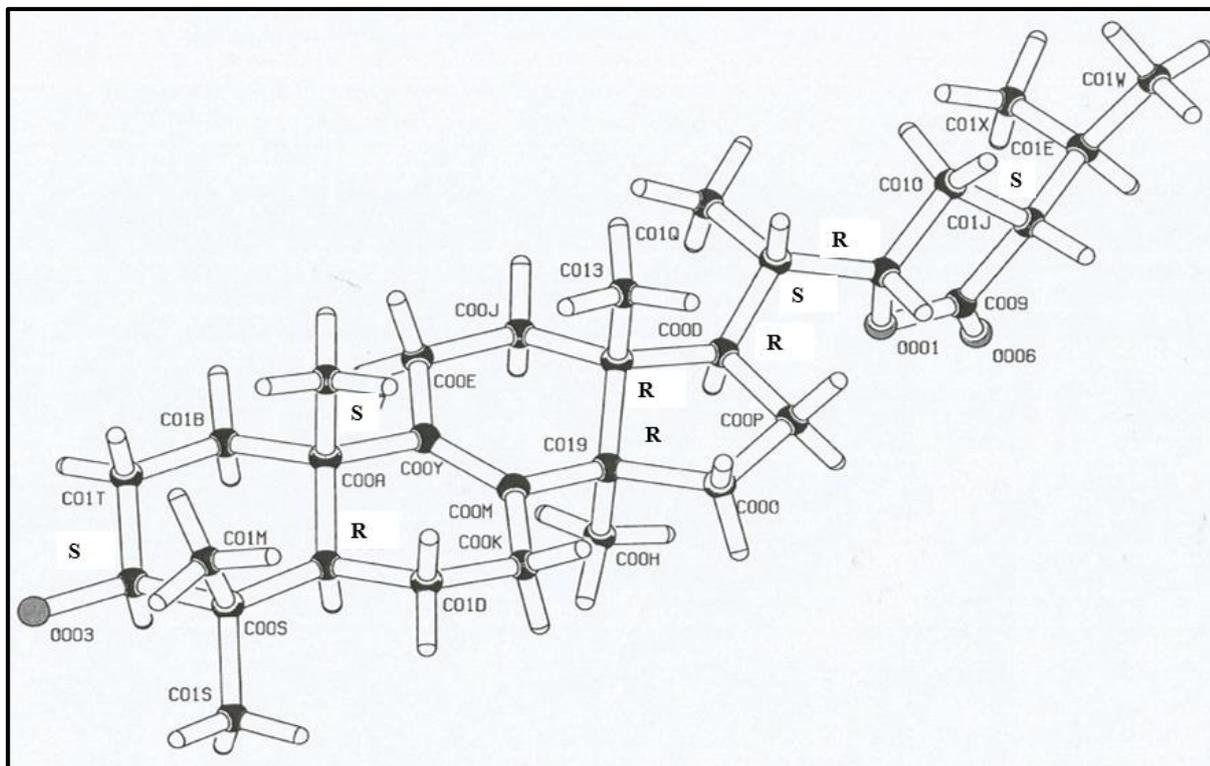


Tabela 12 – Pisolactona (**P180**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Pisolactona ¹ H	¹³ C	Pisolactona* ¹ H	¹³ C
1	1,26 e 1,71 (m)	35,72	1,65 e 1,70(m)-1,20 e 1,26(m)	35,6
2	1,75 e 1,68 (m)	31,0	1,64 e 1,68 (m)	27,5
3	3,24(dd, <i>J</i> = 4,52 e 11,56 Hz)	79,09	3,23(dd, <i>J</i> =11,6, 4,4 Hz)	78,9
4		39,05		38,9
5	1,06 (m)	50,54	1,00 e 1,08 (m)	50,4
6	1,56 e 1,54 (m)	18,40	1,45 e 1,55(m)-1,60 e 1,70(m)	18,3
7	1,70 e 1,24 (m)	31,06	1,30 e 1,40 (m)	27,9
8		134,32		134,2
9		134,79		134,7
10		37,20		37,1
11	2,06 e 2,04 (m)	21,13	1,98 e 2,07 (m)	20,7
12	2,03 e 2,00 (m)	26,65	1,60 e 1,66 (m)	26,5
13		44,79		44,7
14		49,96		49,8
15	2,06 e 1,96 (m)	28,01	1,90 e 2,04(m)-1,60 e 1,70(m)	30,7
16	1,54 e 1,35 (m)	28,11	1,86 e 1,90(m)-1,24 e 1,32(m)	30,8
17	1,98 (m)	49,93	1,94 e 2,01 (m)	47,5
18	0,71 (s)	15,76	0,72 (s)	15,6
19	0,90 (s)	24,40	0,97 (s)	18,3
20	1,56 (m)	39,99	1,36 e 1,42 (m)	39,9
21	0,95 (d, <i>J</i> =3,2 Hz)	12,37	0,94 (d, <i>J</i> =4,6 Hz)	12,2
22	4,46(ddd, <i>J</i> =1,64, 5,92, 10,6 Hz)	80,74	4,46 (dd, <i>J</i> =6,0, 5,5 Hz)	80,5
23	1,66 e 1,59 (m)	27,66	1,90 e 1,96 (m)	26,6
24	2,56 (m)	47,01	2,54 e 2,60 (m)	46,7
25	2,10 (m)	27,00	2,13 e 2,23 (m)	27,0
26	1,05 (d, <i>J</i> =6,88Hz)	20,87	1,00 (s)	21,0
27	0,93 (d, <i>J</i> =6,88Hz)	18,40	0,92 (s)	19,2
28		178,61		178,4
29	1,00 (s)	28,01	0,88 (s)	24,3
30	0,81 (s)	15,57	0,81 (s)	15,4
31	0,99 (s)	19,32	0,99 (s)	28,0

* δ_H e δ_C (CDCl₃, RMN de ¹H a 500 MHz, RMN de ¹³C a 125 MHz) conforme XU et al., 2001.

4.6.10 Composto P56 – Ceramida

O composto P56 foi isolado da fração AcOEt *Pt* na forma de um sólido branco. Este foi submetido a técnica de CCD e quando eluído demonstrou-se puro. O mesmo foi submetido a técnicas uni e bidimensionais de RMN de ¹H e ¹³C, o qual possibilitou a identificação do composto como sendo uma ceramida, ainda não descrita anteriormente nessa espécie.

Ceramidas já foram descritas em algumas espécies de Basidiomicetos, no entanto na espécie *P. tinctorius* é a primeira vez (LI et al., 2010).

Através do experimento de RMN de ^1H e a integração dos sinais presentes no espectro, foi possível determinar a relação de hidrogênios e carbons metilênicos pertencentes a estrutura do composto, sendo assim, sugere-se o composto de fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{87}\text{NO}_5$. No entanto, para confirmar o número exato de hidrogênios e carbonos, respectivamente, é necessário realizar análises de espectrometria de massas, o qual não foi realizado nesse trabalho.

No experimento de RMN de ^1H (Figura 62 e 63) e HSQC (Figura 65), é possível identificar a presença do grupamento NH na forma de um duplete ($J=9,20\text{Hz}$) referente a uma amida na região de δ 8,62 ppm, além disso a presença dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-18 e H-18' na forma de duplo duplete de duplete em δ 4,55 e 4,46 ppm ($J=4,64, 10,92, 19,60\text{Hz}$). Ademais, a presença de três hidrogênios metínicos (H-15, H-16 e H-20) na região de δ 4,31 a 4,66 ppm, sendo o H-15 na forma de multiplete, o H-16 na forma de um triplete ($J=11,4\text{Hz}$) e o hidrogênio H-20 na forma de um duplo duplete ($J=3,92$ e $7,88\text{Hz}$). Na região campo alto em δ 0,88 ppm pode-se visualizar a presença dos hidrogênios metílicos H-1 e H-43 na forma de multiplete, além disso na região entre δ 2,29 a 1,28 ppm os demais hidrogênios metilênicos. Analisando o experimento de HSQC juntamente com o espectro de RMN de ^1H , foi possível identificar também a presença de um hidrogênio metínico (H-17) em δ 5,12 ppm na forma de um simpleto. Além disso, confirmar que a inexistência da correlação do duplete na região de δ 8,62 ppm com carbono.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64) foi possível visualizar a presença de uma carbonila de ácido na região de δ 176,02 ppm. Além disso, três carbonos metínicos (C15, C-16 e C-20) na região entre 72,99 a 77,26 ppm, região característica de carbono ligados ao heteroátomo oxigênio, um carbono metilênico (C-18) em δ 62,53 ppm, além de outro carbono metínico (C17) em δ 53,29 ppm, região característica de carbono ligado a heteroátomo nitrogênio.

Na região de blindagem, observa-se também a presença de carbonos metílicos (C-1 e C-43) em δ 14,76 ppm, além dos demais carbonos metilênicos entre δ 23,42 a 36,19 ppm.

Analisando o experimento bidimensional de HMBC (Figura 66) (correlação de ^1H e ^{13}C duas a três ligações), foi possível atribuir as correlações da carbonila (C-19) com o hidrogênio referente a amida (NH) e com os hidrogênios metínicos H-17 e H-20.

Todos os dados de RMN em comparação com os dados da literatura podem ser visualizados na Tabela 13.

Figura 62 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Ceramida (**P56**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz

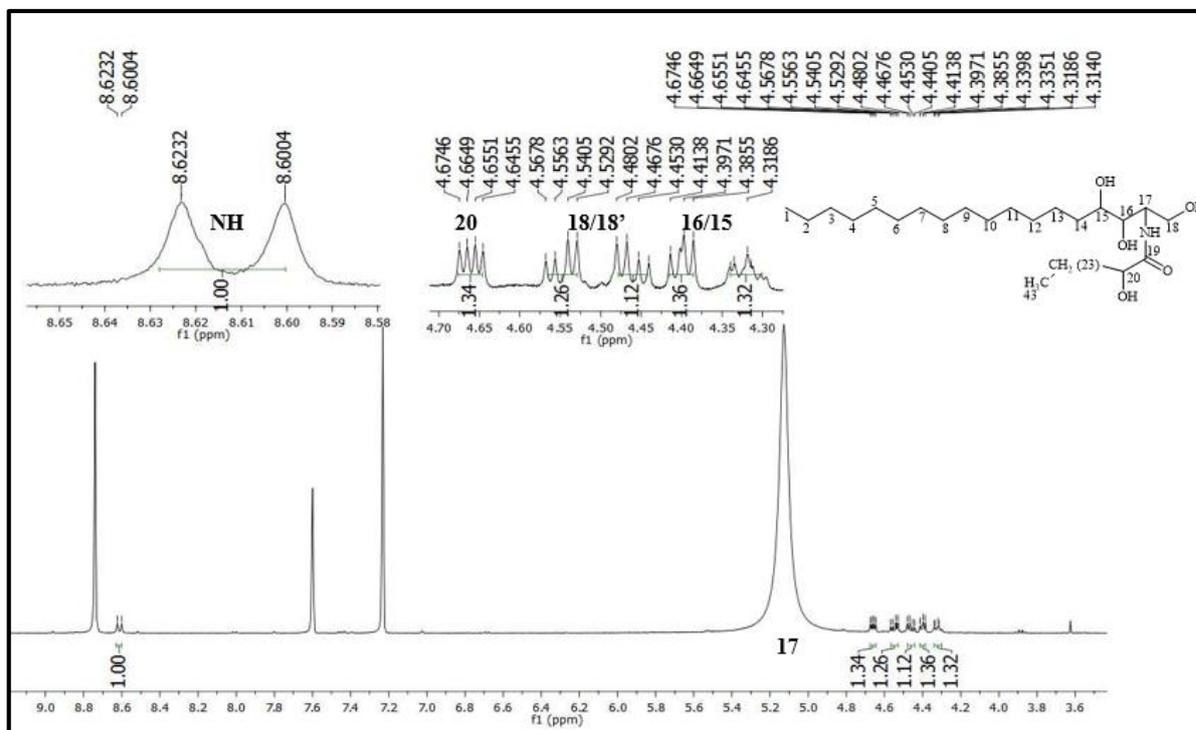


Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H expandido da Ceramida (**P56**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz

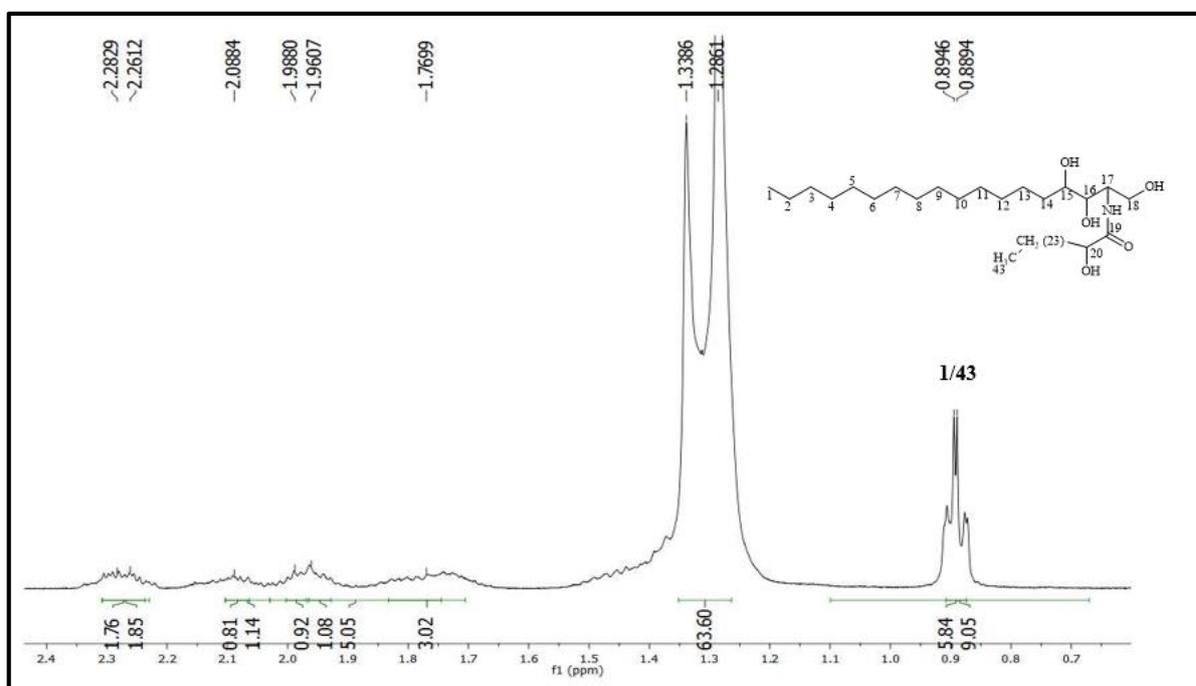


Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C da Ceramida (**P56**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 100 MHz

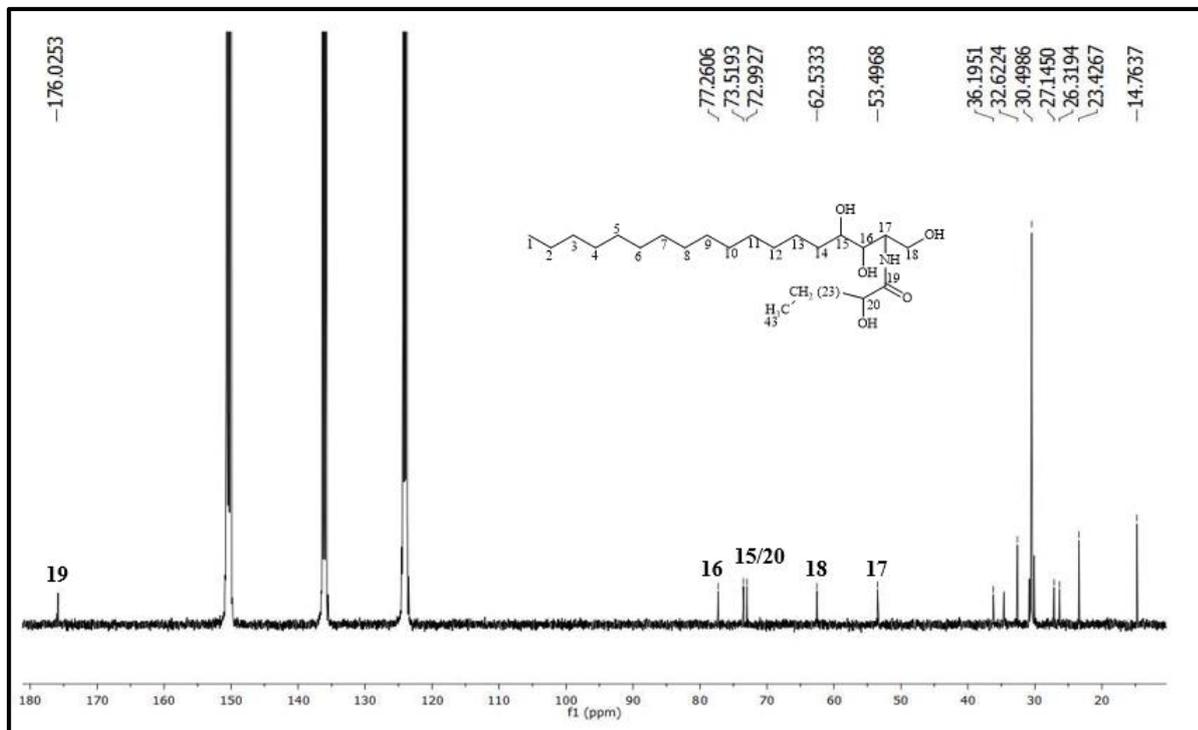


Figura 65 – Espectro de HSQC da Ceramida (**P56**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ a 400 MHz

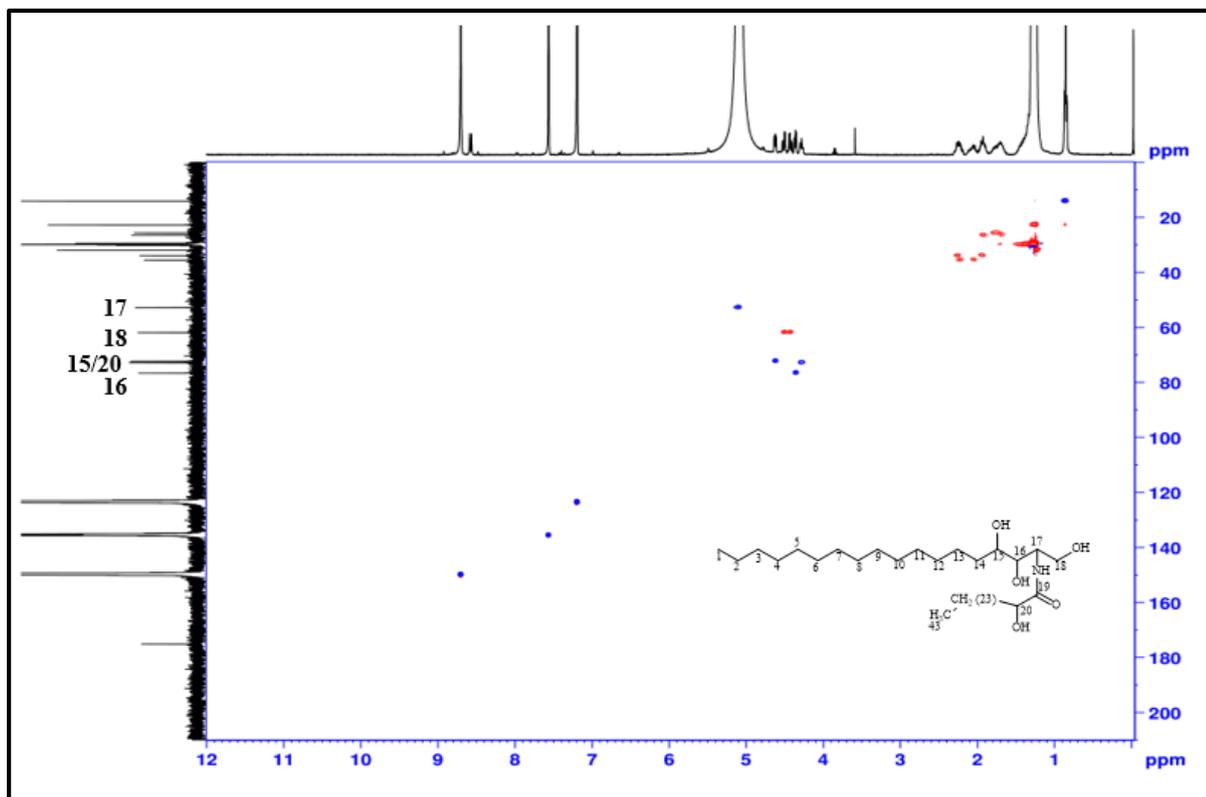
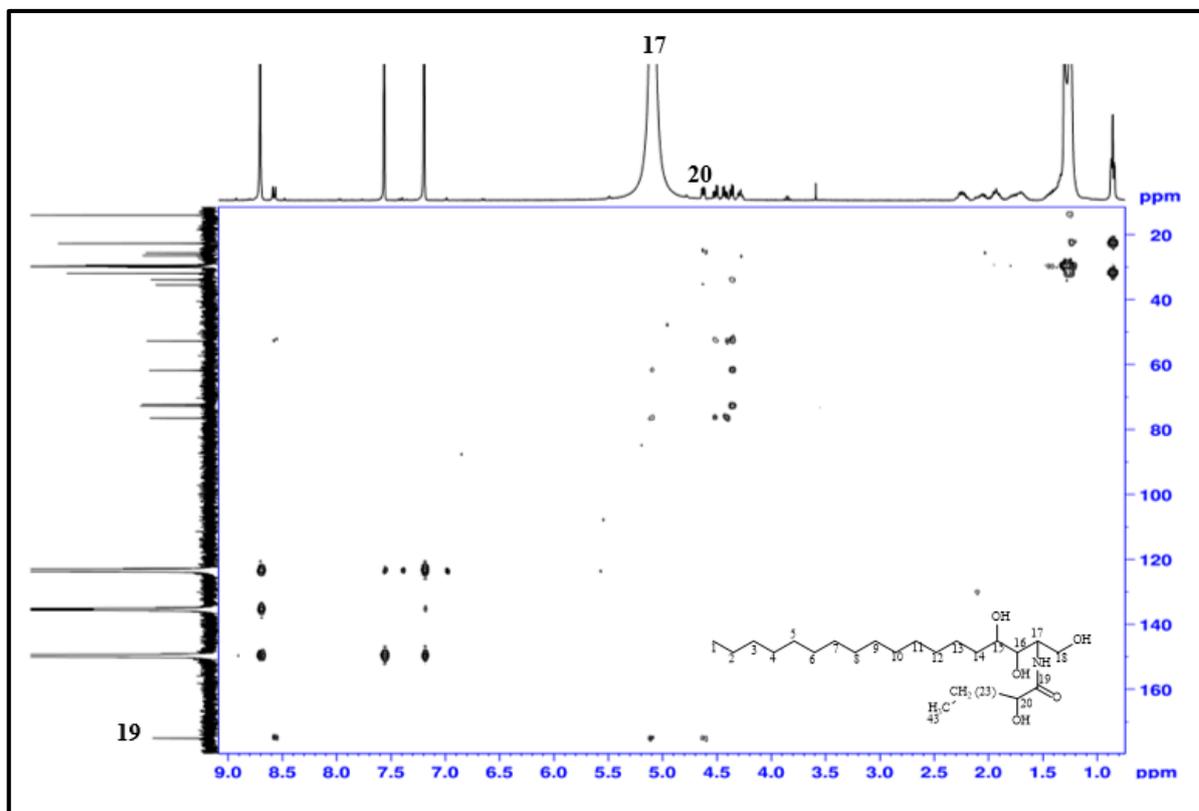


Figura 66 – Espectro de HMBC da Ceramida (P56) em C₅D₅N a 400 MHzTabela 13 – Ceramida (P56) (C₅D₅N, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	P56		Pecipamida*	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	0,88	14,76		
15	4,31 (m)	73,51		
16	4,39 (t, <i>J</i> =11,4Hz)	77,26	3,74 (m)	73,88
17	5,12 (s),	53,49	4,06 (m)	53,71
18	4,55 e 4,46 (ddd, <i>J</i> =4,64, 10,92, 19,60Hz),	62,53	3,70 e 3,94 (dd, <i>J</i> =4,3 e 10,9Hz)	62,31
19	-	176,02		174,56
20	4,66 (dd, <i>J</i> =3,92 e 7,88Hz),	72,99	4,06(m)	72,34
43	0,88	14,76		
Demais	2,29 a 1,28	23,42 a 36,19		
NH	8,62 (d, <i>J</i> =9,20Hz)	-	7,25 (d, <i>J</i> =7,84Hz)	

* δ_{H} e δ_{C} (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz) conforme Li et al., 2010.

4.7 DERIVADOS

4.7.1 Composto D2a – Acetato do ergosterol

A substância D2a foi obtida através da reação de acetilação da substância D2. Ambos os espectros são muito semelhantes, pois ocorreram poucas mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos. Os dados estão descritos na Tabela 14.

No espectro de hidrogênio (Figuras 67 e 68), nota-se a presença de sete metilas, ao invés de seis, como anteriormente. Em δ 2,03 ppm sinaliza a metila H-30 na forma de um simpleto. As demais metilas (H-18, H-19, H-21, H-25, H-27 e H-28) aparecem na região entre δ 0,63 e 1,05 ppm. Os hidrogênios metínicos H-6 e H-7 sinalizam em δ 5,57 e 5,37 ppm (d, $J= 8,0\text{Hz}$) e os H-22 e H-23 em 5,21 ppm (m). Além disso, a mudança de deslocamento químico do H-3 de δ 3,63 ppm para δ 4,70 ppm, campo mais baixo do que anteriormente, devido a mudança do grupamento ligado ao C-3.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69), os principais pontos importantes, em relação ao espectro anterior (D2), é a presença da carbonila em δ 170,68 ppm e um carbono metílico em δ 21,27 ppm. O C-3 sinaliza em 73,0 ppm, enquanto que os carbonos olefínicos C-6, C-7, C-22 e C-23 em δ 120,4, 116,04, 135,75 e 132,26 ppm, respectivamente. Os demais carbonos podem ser visualizados na Tabela 14. Devido a similaridade com a substância D2, optou-se em não discutir todos os resultados.

Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H do acetato do ergosterol (**D2a**) em CDCl_3 a 400 MHz

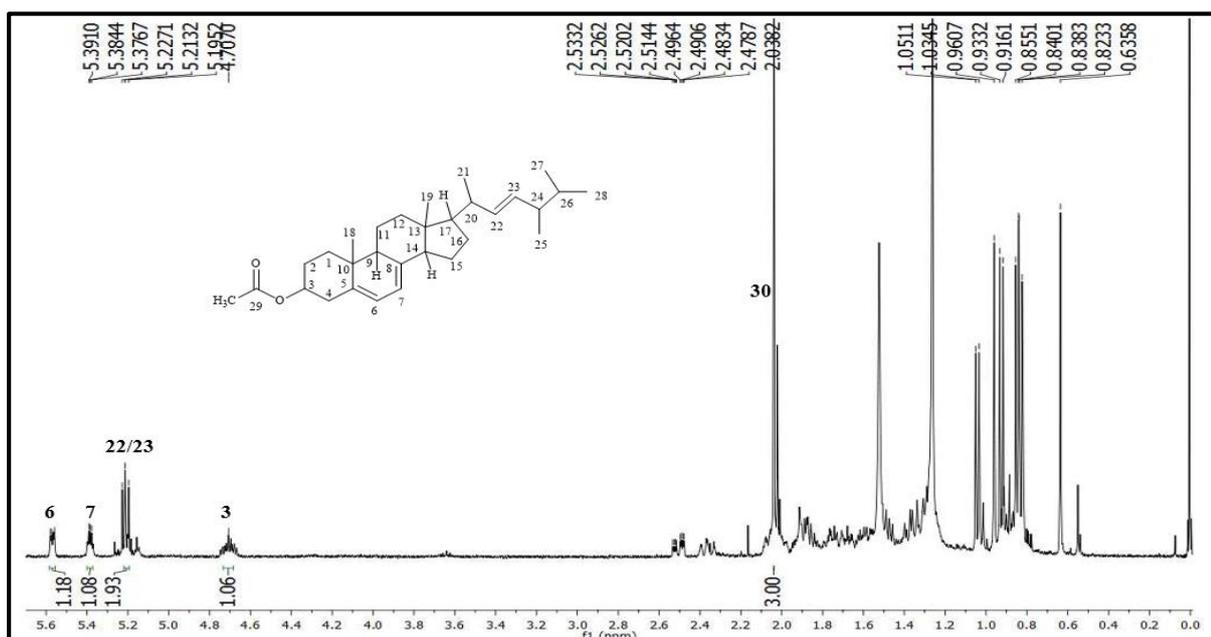


Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H expandido do acetado do ergosterol (**D2a**) em CDCl_3 a 400 MHz

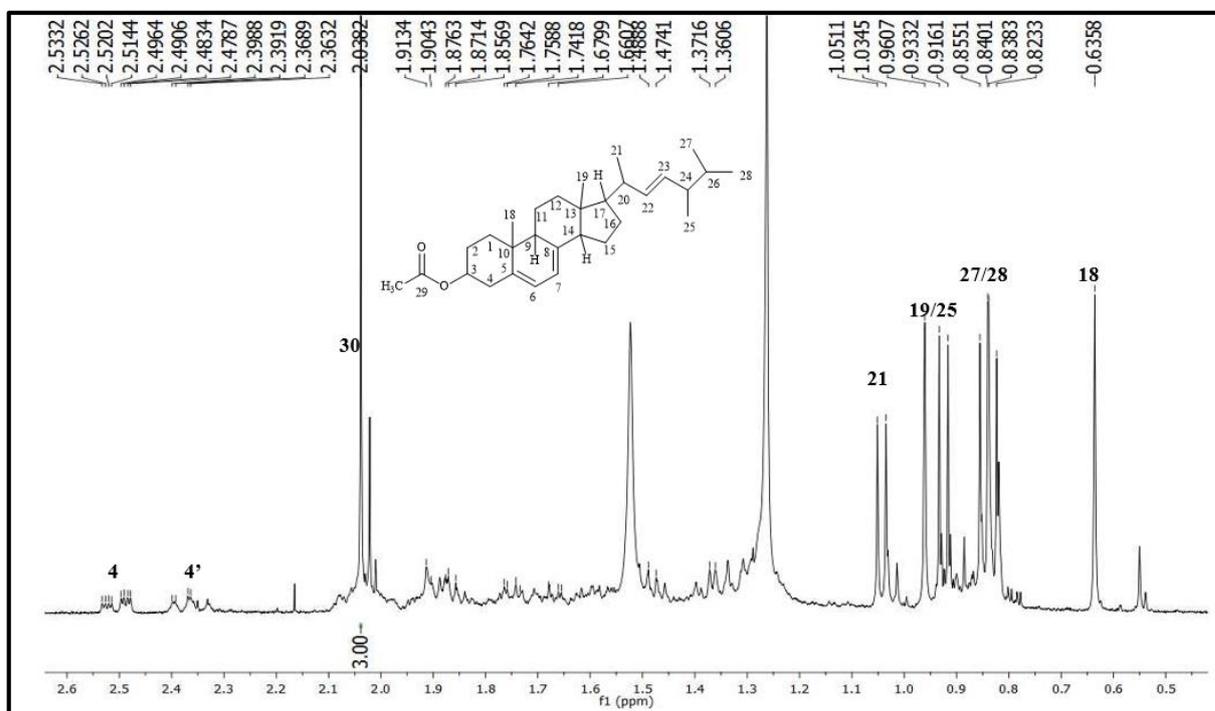


Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C do acetado do ergosterol (**D2a**) em CDCl_3 a 100MHz

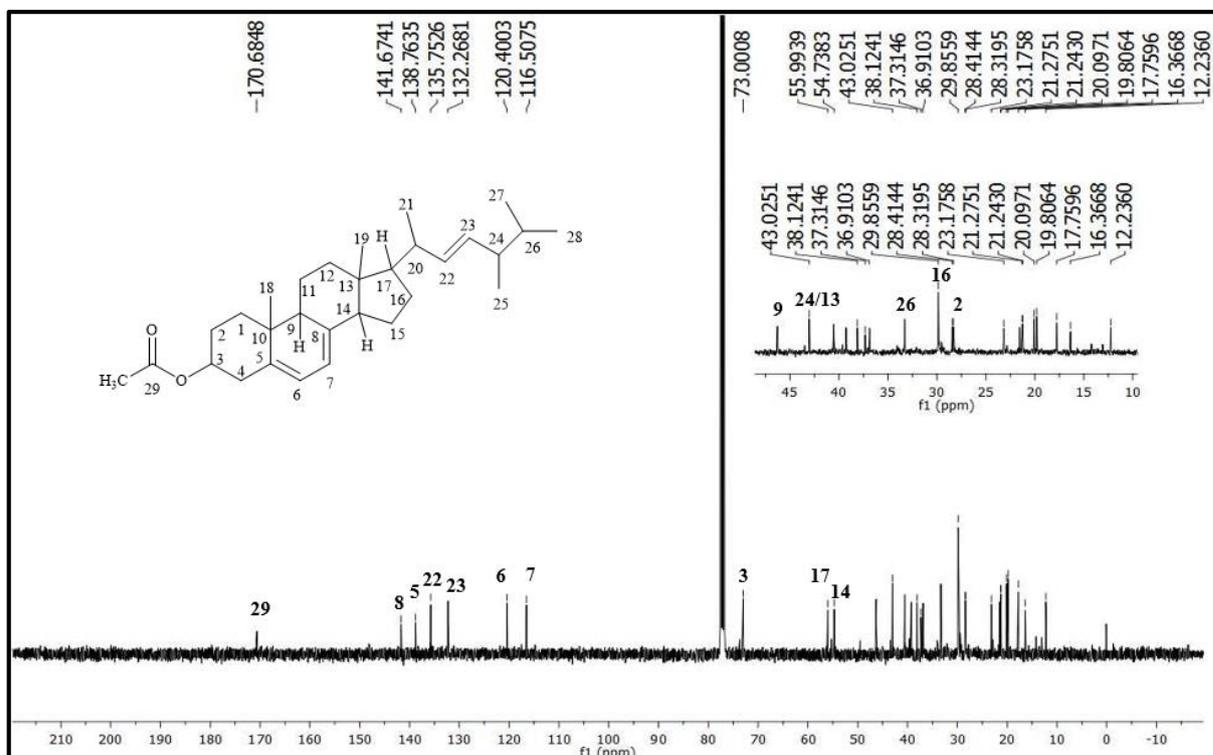


Tabela 14 – Acetato do ergosterol (**D2a**) (CDCl₃, RMN de ¹H a 400 MHz, RMN de ¹³C a 100 MHz)

Posição	Acetato do ergosterol		Acetato do ergosterol *	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	1,26 e 1,87 (m)	36,86		39,00
2	1,49 e 1,91 (m)	28,41		31,91
3	4,70 (m)	73,00	3,60 (m)	73,13
4	2,38 e 2,50 (dd, <i>J</i> =2,2 e 5,0 Hz)	39,26		40,49
5		138,76		141,48
6	5,57 (d, <i>J</i> =8,0Hz)	120,40	5,58 (dd)	120,12
7	5,37 (d, <i>J</i> = 8,0Hz)	116,05		116,28
8		141,67		139,48
9	2,07 (m)	46,28		46,01
10		37,31		36,83
11	1,74 e 1,67 (m)	21,24		21,00
12	1,25 e 2,08 (m)	38,12		39,00
13		43,04		43,25
14	2,01 (m)	54,73		54,50
15	1,76 e 1,37 (m)	23,17		22,97
16	1,26 e 1,91 (m)	29,86		28,27
17	1,26 (m)	55,99		55,90
18	0,63 (s)	12,23	0,64 (s)	12,04
19	0,96 (s)	16,36	0,95 (s)	16,16
20	2,08 (m)	40,53		40,43
21	1,04 (d, <i>J</i> =6,64 Hz)	21,24	1,03 (d, <i>J</i> =6,6 Hz)	19,63
22	5,21 (m)	135,75		131,95
23	5,21 (m)	132,26		135,65
24	1,87 (m)	43,04		42,79
25	0,92 (d)	17,75		33,07
26	1,47 (m)	33,29	0,92 (d, <i>J</i> =6,7Hz)	19,94
27	0,84 (m)	19,80		21,09
28	0,84 (m)	20,09		17,59
29		170,68		
30	2,03 (s)	21,27		22,68

* δ_H e δ_C (CDCl₃, RMN de ¹H a 500 MHz, RMN de ¹³C a 125 MHz) conforme VAZIRIAN et al., 2014.

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1 Antioxidantes Totais

O estudo dos compostos fenólicos totais possibilitou avaliar o potencial antioxidante da espécie *Phellinotus piptadeniae*.

Embora o metabolismo de fungos seja diferente do das plantas, e sendo a espécie *Phellinotus piptadeniae* saprofítica, ou seja, requer matéria orgânica em decomposição como

fonte de energia, a variação da produção dos metabólitos secundários sob influência do solo e hospedeiro é pequena, sendo assim, optou-se em estudar separadamente as frações coletadas em locais diferentes (RS e SC). Os ensaios foram realizados com as frações: FAcOEt RS e SC e FMeOH RS e SC nas concentrações 500, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$ como pode ser visualizado na Tabela 15.

Tabela 15 – Antioxidantes totais de *Phellinotus piptadeniae*

[] $\mu\text{g/mL}$	500	100	10
FAct RS	112,06 \pm 15,46	109,09 \pm 9,20	102,24 \pm 0,1
FMeOH RS	66,67 \pm 17,08	62,98 \pm 1,89	36,04 \pm 0,1
FAct SC	152,38 \pm 11,25	123,93 \pm 5,44	98,45 \pm 0,9
FMeOH SC	64,58 \pm 8,54	45,32 \pm 13,77	40,69 \pm 0,1

Diante dos testes, pode-se verificar que as frações acetato RS e SC foram as que apresentaram maior porcentagem de compostos fenólicos totais nas concentrações de 500, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$, considerando o padrão (BHT) como 100%. As frações metanólicas também apresentaram resultados satisfatórios.

4.8.2 Redução DPPH

O objetivo dessa técnica foi avaliar a ação antioxidante da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente a um radical específico DDPH, para isso fez-se um ensaio quantitativo (Tabela 16). O ensaio foi realizado com as frações FAcOEt RS, FMeOH RS, FAcOEt SC e FMeOH SC, uma vez que essas contêm os metabólitos potencialmente ativos (compostos fenólicos), os quais foram possíveis verificar através de análises de cromatografia líquida.

Através dos valores apresentados na Tabela 16, pode-se concluir que a espécie apresenta potencial antioxidante relevante, pois quando comparado ao padrão BHT, nota-se que as porcentagens de inibição das frações estão próximas ao do padrão. Sendo assim, foi possível determinar o cálculo do CI_{50} , onde esse representa a concentração exata em que as frações inibem 50% da atividade do radical DPPH. Dentre as frações testadas, as frações metanólicas foram as mais promissoras com valores de CI_{50} de 12,8 $\mu\text{g/mL}$ (FMeOH RS) e 13,5 $\mu\text{g/mL}$ (FMeOH SC) quando comparado ao valor 8,9 $\mu\text{g/mL}$ do padrão (BHT), os quais podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 16 – Atividade antioxidante da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente ao DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% inibição das Frações				BHT
	FACOEt RS	FMeOH RS	FACOEt SC	FMeOH SC	
1000	96,6	99,9	89,9	99,9	96,3
500	90,5	95,2	91,2	94,4	94,9
250	94,7	92,4	92,4	96,5	95,9
125	89,0	90,0	89,4	95,7	95,4
62,5	74,2	89,1	86,1	92,3	94,9
31,2	53,1	83,2	63,1	79,9	89,4
15,6	35,8	64,5	40,6	56,3	71,9
7,8	45,3	41,6	26,7	38,5	50,3
3,9	16,2	25,7	19,9	25,8	30,1
1,9	7,8	15,7	11,7	14,0	16,9
0,9	6,5	7,8	4,1	6,7	14,2

Tabela 17 – Concentração inibitória (CI_{50}) das frações da espécie *Phellinotus piptadeniae*

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
FACOEt RS	19,8
FMeOH RS	12,8
FACOEt SC	25,4
FMeOH SC	13,5
BHT	8,9

Estudos realizados com as espécies *P. linteus* e *I. xeranticus* demonstram o bom potencial antioxidante devido a presença de compostos fenólicos. Testes relacionados a citotoxicidade também foram aplicados, os quais apontam para resultados satisfatórios. Sendo assim, essas espécies poderiam ser indicadas para Farmacopéia Brasileira e seus metabólitos utilizados no tratamento de doenças causadoras pela produção de radicais livres (JUNG et al., 2008; LIANG et al., 2009).

4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.9.1 Atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana das espécies *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius*, realizou-se um estudo bioguiado das frações obtidas. Para a realização deste teste, fez-se o uso do método de microdiluição em caldo.

As frações FHex RS *Pp*, FACOEt RS *Pp*, FMeOH RS *Pp*, FHex SC *Pp*, FACOEt SC *Pp*, FMeOH SC *Pp*, FHex *Pt* e FACOEt *Pt* foram testadas frente as bactérias Gram-positivas:

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* e Gram-negativas: *Enterobacter aerogenes*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e os fungos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Candida glabrata* e *Candida dubliensis*.

Após a realização dos ensaios antibacterianos e antifúngicos pode-se afirmar que todas as frações apresentaram potenciais antimicrobianos. De acordo com Simões e col. (2009) produtos fitoquímicos que apresentam CIM na faixa de 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ em testes de susceptibilidade *in vitro*, podem ser considerados como antimicrobianos.

A efetividade antimicrobiana das espécies foi apresentada em termos de CIM e CLM, os quais podem ser visualizados na Tabela 18, Tabela 19, Tabela 20 e Tabela 21.

De acordo com a Tabela 18, quando testadas as frações neutras obtidas da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente as bactérias, obteve-se alguns resultados promissores. Dentre esses, destacam-se: frente a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* as frações FHex SC, FAcOEt SC e FMeOH SC foram as mais ativas com CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$. A fração MeOH RS foi mais efetiva para a cepa *Bacillus cereus* apresentando o CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$. *Enterococcus* spp teve seu crescimento inibido pelas frações FHex RS, FAcOEt RS e FMeOH RS na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, além disso, frente a cepa *Enterococcus faecalis* a FHex RS também foi efetiva na mesma concentração.

Com relação as bactérias Gram-negativas, as frações FHex SC, FAcOEt SC e FMeOH SC foram melhores inibidores frente as cepas *Morganella Morganii* (125 $\mu\text{g/mL}$), *Enterobacter aerogenes* (62,5 $\mu\text{g/mL}$) e *Shigella flexneri* (62,5; 31,2; 62,5 $\mu\text{g/mL}$). Já para FHex RS, FAcOEt RS e FMeOH RS obteve-se resultados promissores frente a *Shigella flexneri* (125; 62,5 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$) e *Burkholderia cepacia* (62,5; 31,2 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$).

Os valores de CLM foram entre 250 - >500 $\mu\text{g/mL}$, com ênfase das frações FHex, FAcOEt e FMeOH RS que apresentaram CLM 250 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepa *Enterococcus* spp.

Esses resultados prévios das frações evidenciam o maior potencial bacteriostático do que bactericida da espécie.

Podemos observar na Tabela 19 que as frações FMeOH RS, FAcOEt SC e FMeOH SC foram mais suscetíveis a inibição do fungo *Candida krusei*, com valores de CIM 15,6 $\mu\text{g/mL}$ e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, onde a fração MeOH SC apresentou o mesmo potencial de inibição do padrão testado. As frações FAcOEt RS e FAcOEt SC foram as mais suscetíveis

frente a *Cryptococcus neoformans* com CIM 125 $\mu\text{g/mL}$. *Cryptococcus gattii* teve seu crescimento inibido por todas as frações, com valores de CIM 125 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da FHex RS (CIM 250 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, as frações FHex, FAcOEt e FMeOH SC apresentaram CLM 250 $\mu\text{g/mL}$. Podemos afirmar através dessas análises, que a espécie também tem potencial fugiostático e fungicida, o que instiga o estudo antimicrobiano dos compostos puros.

O estudo da atividade antimicrobiana da espécie *Pisolithus tinctorius* evidenciou o potencial antibacteriano e antifúngico da espécie (Tabela 20 e Tabela 21). As frações hexânica (FHex) e acetato de etila (FAcOEt) mostraram resultados promissores frente a bactéria Gram-positiva *Enterococcus* spp apresentando CIM 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e CLM 250 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, a fração FHex também apresentou bom potencial de inibição frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (CIM 125 $\mu\text{g/mL}$). Com relação as bactérias Gram-negativas, *Shigella sonnei* e *S.flexneri* foram mais suscetíveis a inibição.

As frações Hex e AcOEt também demonstraram potenciais antifúngicos apresentando inibições em menores concentrações frente a *C. gattii* (125 $\mu\text{g/mL}$), *C. neoformans* (CIM 125 $\mu\text{g/mL}$) e *C. krusei* (CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$). As frações não apresentaram CLM nas concentrações testadas, com exceção da FHex frente a *C. albicans* (CLM 500 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 18 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal mínima (CLM) das frações da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente a bactérias

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)															
	FHex RS		FAcOEt RS		FMeOH RS		FHex SC		FAcOEt SC		FMeOH SC		Cloranfenicol		Ampicilina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Bactérias Gram-positivas																
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	>500	500	>500	125	>500	62,5	>500	62,5	>500	62,5	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>500	500	>500	500	500	500	>500	500	>500	500	>500	6,25	50	100	>200
<i>Bacillus cereus</i>	250	>500	250	>500	62,5	>500	125	>500	125	>500	500	>500	1,56	12,5	200	>200
<i>Enterococcus spp.</i>	125	250	125	250	125	250	250	>500	125	>500	250	>500	1,56	1,56	25	50
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	>500	250	>500	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	3,12	12,5	1,56	12,5
Bactérias Gram-negativas																
<i>Escherichia coli</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	3,12	100	200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	>500	500	>500	250	>500	250	>500	125	>500	500	>500	3,12	12,5	50	>200
<i>Proteus mirabilis</i>	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	500	>500	500	>500	6,25	100	25	200
<i>Shigella sonnei</i>	125	500	500	500	500	500	250	500	250	500	125	>500	6,25	25	25	200
<i>Salmonella typhimurium</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Morganella morganii</i>	250	>500	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	6,25	50	200	>200
<i>Shigella flexneri</i>	125	>500	62,5	>500	31,2	>500	62,5	>500	31,2	>500	62,5	>500	1,56	3,12	12,5	200
<i>Salmonella enteritidis</i>	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	1,56	12,5	3,12	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	>500	500	>500	125	>500	62,5	500	62,5	>500	62,5	>500	1,56	12,5	200	>200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250	>500	250	>500	125	>500	250	>500	125	>500	250	>500	6,25	200	100	>200
<i>Burkholderia cepacia</i>	62,5	>500	31,2	>500	62,5	>500	NT	NT	NT	NT	NT	NT	3,12	12,5	50	50

NT = Não testado

Tabela 19 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente a fungos

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)													
	FHex RS		FAcOEt RS		FMeOH RS		FHex SC		FAcOEt SC		FMeOH SC		Fluconazol	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	500	>500	250	>500	250	>500	250	500	250	>500	500	>500	3,12	200
<i>Candida tropicalis</i>	500	500	500	>500	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	50	>200
<i>Candida krusei</i>	500	>500	250	>500	15,6	>500	250	>500	15,6	>500	3,12	>500	3,12	100
<i>Candida parapslosis</i>	500	>500	250	>500	250	>500	250	500	250	>500	250	>500	3,12	25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	250	>500	125	>500	250	>500	250	500	125	>500	250	>500	6,25	25
<i>Cryptococcus gattii</i>	250	>500	125	>500	125	>500	125	250	125	250	125	250	6,25	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500	500	500	>500	500	>500	500	500	250	>500	500	>500	6,25	50
<i>Candida glabrata</i>	500	500	250	>500	125	>500	500	>500	500	>500	250	>500	25	200
<i>Candida dublienses</i>	500	>500	500	>500	500	>500	250	500	250	>500	250	>500	25	200

Tabela 20 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie *Pisolithus Tinctorius* frente a bactérias

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)							
	FHex		FAcOEt		Cloranfenicol		Ampicilina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Bactérias Gram-positivas								
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	>500	250	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Bacillus subtilis</i>	250	500	250	>500	6,25	50	100	>200
<i>Bacillus cereus</i>	125	>500	250	>500	1,56	12,5	200	>200
<i>Enterococcus spp.</i>	125	250	62,5	250	1,56	1,56	25	50
<i>Enterococcus faecalis</i>	500	>500	250	>500	3,12	12,5	1,56	12,5
Bactérias Gram-negativas								
<i>Escherichia coli</i>	250	>500	250	>500	3,12	100	200	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	>500	250	>500	3,12	12,5	50	>200
<i>Proteus mirabilis</i>	500	>500	500	>500	6,25	100	25	200
<i>Shigella sonnei</i>	125	>500	125	500	6,25	25	25	200
<i>Salmonella typhimurium</i>	250	>500	250	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Morganella morganii</i>	500	>500	250	>500	6,25	50	200	>200
<i>Shigella flexneri</i>	125	>500	250	>500	1,56	3,12	12,5	200
<i>Salmonella enteritidis</i>	250	>500	250	>500	1,56	12,5	3,12	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	250	250	250	250	1,56	12,5	200	>200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250	>500	250	500	6,25	200	100	>200
<i>Burkholderia cepacia</i>	NT	NT	NT	NT	3,12	12,5	50	50

NT = Não testado

Tabela 21 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das frações da espécie *Pisolithus Tinctorius* frente a fungos

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)					
	FHex		FAcOEt		Fluconazol	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	250	500	250	>500	3,12	200
<i>Candida tropicalis</i>	500	>500	250	>500	50	>200
<i>Candida krusei</i>	62,5	>500	62,5	>500	3,12	100
<i>Candida parapslosis</i>	250	>500	250	>500	3,12	25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	>500	125	>500	6,25	25
<i>Cryptococcus gattii</i>	125	>500	125	>500	6,25	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500	>500	250	>500	6,25	50
<i>Candida glabrata</i>	500	>500	250	>500	25	200
<i>Candida dublienses</i>	500	>500	250	>500	25	200

Devido ao potencial antimicrobiano das frações das espécies *P. piptadeniae* e *P. tinctorius* testou-se os compostos isolados para investigar a relação e a influência destes nas atividades apresentadas.

Os testes realizados permitiram afirmar que todos os isolados de *P. piptadeniae* e *P. tinctorius* apresentaram potenciais antimicrobianos.

O composto peróxido do ergosterol mostrou-se suscetível a inibição de *B. subtilis*, *S. sonnei* e *K. pneumoniae* (CIM 50 μ g/mL), e concentração letal de 200 μ g/mL frente a *K. pneumoniae*. Enquanto que o ergosterol e o acetato do ergosterol foram mais ativos frente a um número maior de cepas, dentre elas as Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis* (CIM 50 μ g/mL) e as Gram-negativas *S. sonnei* (CIM 50 e 25 μ g/mL), *K. pneumoniae* (CIM 50 μ g/mL), entre outras, conforme pode ser visualizado na Tabela 22. Com relação ao potencial bactericida, ergosterol e o acetato do ergosterol apresentaram CLM de 200 μ g/mL para *S. sonnei*.

Os ácidos 2-hidróxi-pentadecanoato de etila e 2-hidróxi-tetracosanoato de metila demonstraram-se ativos frente a *S. sonnei* e *S. flexneri* apresentando valores de concentração mínima inibitória na concentração de 50 μ g/mL. Para as demais cepas os valores de CIM variou entre 100 e 200 μ g/mL.

O composto fenólico D9 mostrou-se promissor frente a *S. sonnei* e *K. pneumoniae* com CIM 50 μ g/mL e CLM 200 μ g/mL.

Com relação a atividade antifúngica (Tabela 24), todos os compostos isolados apresentaram potenciais fungistático frente a *C. krusei* com valores de CIM 1,56 μ g/mL, no entanto, somente o 2-hidróxi-tetracosanoato de metila e o fenólico D9 apresentaram potencial fungicida na concentração de 200 μ g/mL.

C. glabrata também se demonstrou mais sensível a ação dos compostos isolados, que apresentaram CIM 1,56 μ g/mL.

Ergosterol também foi ativo frente a *C. neofarmans* com valores de CIM 25 μ g/mL e CLM 50 μ g/mL, enquanto que os demais isolados foram ativos com valores de CIM 50 μ g/mL.

Os compostos também evidenciaram potenciais fungistático e fungicida frente a *C. gattii*, descartando-se o ergosterol, acetato do ergosterol e o 2-hidróxi-pentadecanoato de etila, que exibiram concentrações inibitórias e letais na mesma concentração (50 μ g/mL).

Com relação a espécie *P. tinctorius*, o lanostano pisolactona foi mais ativo frente a bactéria Gram-negativa *S. sonnei* com valores de CIM e CLM 50 e 200 μ g/mL respectivamente. Ao passo que, o lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil exibiu potencial bacteriostático frente as Gram-negativas *M. morgani*, *S. sonnei*, *S. flexneri* e *K. pneumoniae* (CIM 50 μ g/mL). O potencial bactericida pode ser atribuído somente a *S. sonnei* (200 μ g/mL) (Tabela 23).

Foi possível observar também o potencial bacteriostático e bactericida do ácido hexadec-5-enóico. Este, foi ativo frente as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis* (CIM 12,5 e 50 μ g/mL) e Gram-negativas *E. aerogenes*, *S. sonnei* (CIM 25 μ g/mL), *M. morgani*, *S.*

flexneri, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (CIM 50 $\mu\text{g/mL}$). Ao passo que, a ceramida (P56) foi mais ativa frente a *S. sonnei* e *S. flexneri* (CIM 50 $\mu\text{g/mL}$), onde P56 também apresentou CLM na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ para *S. sonnei*.

Para as demais cepas, os compostos também causaram inibição, no entanto em maiores concentrações.

O potencial antifúngico (Tabela 25) de *P.tinctorius* também pode ser atribuído. Os lanostanos pisolactona e o lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil exibiram resultados promissores de CIM com valores de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. tropicalis*. Enquanto que o padrão fluconazol apresentou CIM 50 $\mu\text{g/mL}$.

C. krusei também mostrou-se sensível aos lanostanos e a ceramida, onde os compostos apresentaram CIM 1,56 $\mu\text{g/mL}$, igualmente ao padrão nistatina. Destaca-se também o potencial fungicida frente a *C. glabrata*. Esses exibiram valores de CIM 1,56 $\mu\text{g/mL}$, apresentando CIM igual ou próximo aos padrões fluconazol e nistatina (CIM 3,12 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

Para finalizar, todos os compostos isolados da espécie *P.tinctorius* foram suscetíveis aos fungos *C.gattii* e *C.neofarmans*, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (CIM). Além disso, esses também apresentaram potenciais fungicidas nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (CLM).

Através dos testes realizados (antibacteriano e antifúngico) é possível concluir que, tanto as frações, como os compostos, apresentaram bons resultados, quando comparados aos padrões testados. Além disso, pode-se perceber que os metabólitos isolados têm influência sobre os valores exibidos de CIM e CLM das frações obtidas das respectivas espécies.

Todos os valores estão apresentados na Tabelas 22, 23, 24 e 25.

Tabela 22 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente a bactérias

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)															
	D1		D2		D2a		D6		D11		D09		AMP		CL	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Bactérias Gram-positivas																
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>200	50	>200	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	200	1,56	25
<i>Bacillus subtilis</i>	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	25	>200	12,5	100
<i>Bacillus cereus</i>	100	>200	50	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	100	100	3,12	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	100	>200	50	>200	50	>200	200	>200	200	>200	100	>200	25	>200	3,12	25
Bactérias Gram-negativas																
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	>200	50	>200	100	>200	200	>200	200	>200	200	>200	100	200	1,56	12,5
<i>Escherichia coli</i>	100	>200	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	12,5	200	3,12	50
<i>Morganella morgani</i>	100	>200	50	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	3,12	12,5
<i>Proteus mirabilis</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	200	>200	200	>200	1,56	200	3,12	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	>200	100	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	100	200	1,56	25
<i>Shigella sonnei</i>	50	200	25	200	50	200	50	200	50	200	50	200	12,5	200	3,12	25
<i>Shigella flexneri</i>	100	>200	100	>200	50	>200	50	>200	50	>200	200	>200	6,25	200	1,56	6,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	>200	50	>200	100	>200	200	>200	100	>200	200	>200	200	200	3,12	25
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	3,12	50	1,56	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	200	50	200	50	>200	100	>200	100	200	50	200	25	200	3,12	100

D1 = Peróxido do ergosterol; D2 = Ergosterol; D2a = Acetato do ergosterol; D6 = 2-hidróxi-pentadecanoato de etila; D11= 2-hidróxi-tetracosanoato de metila; AMP = ampicilina; CL= cloranfenicol.

Tabela 23 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie *Pisolithus tinctorius* frente a bactérias

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)											
	P180		P65		P1		P56		AMP		CL	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Bactérias Gram-positivas												
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>200	100	>200	12,5	>200	100	>200	100	200	1,56	25
<i>Bacillus subtilis</i>	100	>200	100	>200	50	>200	100	>200	25	>200	12,5	100
<i>Bacillus cereus</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	100	100	3,12	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	200	>200	200	>200	100	>200	200	>200	25	>200	3,12	25
Bactérias Gram-negativas												
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	>200	100	>200	25	>200	200	>200	100	200	1,56	12,5
<i>Escherichia coli</i>	200	>200	100	>200	200	>200	200	>200	12,5	200	3,12	50
<i>Morganella morgani</i>	100	>200	50	>200	50	>200	100	>200	100	>200	3,12	12,5
<i>Proteus mirabilis</i>	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	1,56	200	3,12	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	>200	200	>200	50	>200	200	>200	100	200	1,56	25
<i>Shigella sonnei</i>	50	200	50	200	25	200	50	200	12,5	200	3,12	25
<i>Shigella flexneri</i>	200	>200	50	>200	50	>200	50	>200	6,25	200	1,56	6,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	>200	200	>200	100	>200	200	>200	200	200	3,12	25
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	3,12	50	1,56	12,5
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	100	200	50	>200	50	200	100	200	25	200	3,12	100

P180 = Pisolactona; P65 = Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil; P1= Ácido hexadec-5-enóico; P56= ceramida; AMP= ampicilina; CL= cloranfenicol.

Tabela 24 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie *Phellinotus piptadeniae* frente a fungos

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)															
	D1		D2		D2a		D6		D11		D9		Fluconazol		Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	100	>200	200	200	200	200	200	>200	100	>200	200	200	50	200	1,56	100
<i>Candida tropicalis</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	100	>200	200	>200	50	200	1,56	1,56
<i>Candida krusei</i>	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	200	1,56	200	25	100	1,56	12,5
<i>Candida parapslosis</i>	100	>200	200	>200	50	>200	100	>200	100	>200	200	>200	1,56	6,25	1,56	100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50	50	25	50	50	50	50	50	50	100	50	100	6,25	25	1,56	1,56
<i>Cryptococcus gattii</i>	50	100	50	50	50	50	50	50	50	100	50	100	6,25	12,5	1,56	25
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	200	>200	200	>200	200	>200	100	>200	100	>200	200	>200	1,56	25	1,56	3,12
<i>Candida dublienses</i>	100	200	100	200	100	>200	100	>200	100	>200	200	200	1,56	100	3,12	25
<i>Candida glabrata</i>	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	3,12	100	1,56	6,25

D1 = Peróxido do ergosterol; D2 = Ergosterol; D2a = Acetato do ergosterol; D6 = 2-hidróxi-pentadecanoato de etila; D11= 2-hidróxi-tetracosanoato de metila.

Tabela 25 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) dos metabólitos isolados da espécie *Pisolithus tinctorius* frente a fungos

Micro-organismos	CIM 50/CLM ($\mu\text{g/mL}$)											
	P180		P65		P1		P56		Fluconazol		Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	100	>200	200	>200	100	200	200	>200	50	200	1,56	100
<i>Candida tropicalis</i>	6,25	>200	6,25	>200	50	200	200	>200	50	200	1,56	1,56
<i>Candida krusei</i>	1,56	>200	1,56	>200	100	>200	1,56	>200	25	100	1,56	12,5
<i>Candida parapslosis</i>	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	1,56	6,25	1,56	100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50	100	50	50	25	25	50	100	6,25	25	1,56	1,56
<i>Cryptococcus gattii</i>	50	100	50	100	50	50	50	100	6,25	12,5	1,56	25
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	200	>200	100	>200	100	>200	200	>200	1,56	25	1,56	3,12
<i>Candida dublienses</i>	100	>200	100	>200	200	200	200	>200	1,56	100	3,12	25
<i>Candida glabrata</i>	1,56	>200	1,56	>200	1,56	>200	1,56	200	3,12	100	1,56	6,25

P180 = Pisolactona; P65 = Lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil; P1= Ácido 5-hexadecenóico; P56= ceramida

4.9.2 Atividade antimicobacteriana

O estudo antimicobacteriano das frações das espécies *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius* apresentou resultados promissores. De acordo com Ayres e col. (2008), os valores de CIM classificam-se como moderados.

Como pode ser visualizado na Tabela 26, as frações Hex RS *Pp* e SC *Pp* foram as mais ativas com valores de CIM 312,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a todas as cepas testadas. As frações metanólicas *Pp* também apresentaram inibições, porém em concentrações mais altas (625 e 1250 $\mu\text{g/mL}$). Enquanto a espécie *Pisolithus tinctorius* apresentou suscetibilidade de inibição na fração acetato (FAcOEt *Pt*), com valores de CIM 312,5 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas *M. abcessus* e *M. massiliense*, e 625 $\mu\text{g/mL}$ para *M. fortuitum*. Os valores apresentados de CIM demonstram o potencial de inibição das espécies. Sendo assim, testou-se alguns dos compostos isolados das respectivas frações.

Tabela 26 – Atividade antimicobacteriana das diferentes frações proveniente das extrações dos fungos *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius*

Frações	CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>M. abcessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. fortuitum</i>
FHex RS <i>Pp</i>	312,5	312,5	312,5
FAcOEt RS <i>Pp</i>	NI	NI	NI
FMeOH RS <i>Pp</i>	625	625	1250
FHex SC <i>Pp</i>	312,5	312,5	312,5
FAcOEt SC <i>Pp</i>	NI	NI	NI
FMeOH SC <i>Pp</i>	625	625	625
FHex <i>Pt</i>	NI	NI	NI
FAcOEt <i>Pt</i>	312,5	312,5	625
Claritromicina	16	32	1
Sulfametoxazol	8	128	32

NI = Não identificado

Os compostos ergosterol, acetato do ergosterol e D9 mostraram-se ativos frente as cepas *M. abcessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*. O triterpeno exibiu valores de CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a *M. abcessus* e *M. massiliense* e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *M. fortuitum*. Enquanto, o acetato de ergosterol apresentou uma melhora nos valores de CIM para as micobactérias *M. abcessus* e *M. massiliense* (CIM 31,25 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, frente *M. fortuitum* o valor de CIM foi aumentado (CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$). Ademais, o triterpeno ergosterol apresentou o mesmo valor de CIM do

padrão sulfametoxazol para *M. fortuitum*, ao passo que, o acetato de ergosterol exibiu a mesma concentração de inibição do padrão claritromicina frente a *M. massiliense*.

O composto fenólico D9 exibiu o mesmo CIM (62,5 $\mu\text{g/mL}$) para as três cepas testadas.

Com relação a espécie *P. tinctorius*, o lanostano pisolactona e a ceramida (P56) foram mais efetivos frente a *M. abcessus*, exibindo valores de CIM 31,25 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Além disso, P56 apresentou o mesmo valor de inibição do padrão claritromicina (CIM 16 $\mu\text{g/mL}$). *M. massiliense* também foi inibido pelos compostos, no entanto em uma concentração maior 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, os testes realizados com as frações e os compostos isolados evidenciam o potencial antimicobacteriano das espécies estudadas. Os dados estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Atividade antimicobacteriana dos compostos isolados dos fungos *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius*

Frações	CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>M. abcessus</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. fortuitum</i>
Ergosterol	62,5	62,5	31,25
Acetato do ergosterol	31,25	31,25	62,5
D9	62,5	62,5	62,5
Pisolactona	31,25	62,5	62,5
P56	15,625	62,5	31,25
Claritromicina	16	32	1
Sulfametoxazol	8	128	32

P56 = ceramida

5. CONCLUSÃO

O estudo químico e biológico das espécies *Phellinotus piptadeniae* e *Pisolithus tinctorius* permitiram concluir que:

- As espécies apresentaram constituintes químicos diferentes, mas classes de metabólitos secundários em comum, como exemplo triterpenos (derivados do ergosterol e lanostanos). Ergosterol, Peróxido do ergosterol, os ésteres: 2-hidróxi-pentadecanoato de etila e 2-hidróxi-tetracosanoato de metila, e o composto fenólico D9, ainda não relatado na literatura, foram identificados em *P. piptadeniae*.

- O estudo químico de *Phellinotus piptadeniae* permitiu ainda, confirmar a presença de compostos altamente polares, mas que não foram possíveis de isolar utilizando CC sistema fase normal.

- O estudo biológico de *Phellinotus piptadeniae* mostrou o potencial antimicrobiano (fungos, bactérias e micobactérias), bem como antioxidante. O acetato do ergosterol, obtido através da reação de acetilação do ergosterol com anidrido acético, melhorou a atividade antimicobacteriana frente as cepas *M. abscessus* e *M. massiliense*.

- A investigação química e biológica de *Phellinotus piptadeniae* coopera com dados científicos para a espécie e família Hymenochaetaceae, uma vez que, até o presente momento, não há estudos realizados dessa espécie nesse âmbito.

- Como perspectivas futuras, sugere-se a investigação, isolamento e identificação dos compostos polares presentes no extrato metanólico de *P. piptadeniae*, a relação estrutura-atividade e a execução de outra metodologia de fracionamento que permita facilitar o isolamento dos compostos fenólicos. Além disso, é importante mencionar que ainda serão realizados testes citotóxicos e atividades fotoprotetora do DNA das frações obtidas de *Phellinotus piptadeniae*.

- Os lanostanos pisolactona e lanostano, 7,22-dien-3-ol, 24-metil, ainda não relatado na literatura, um ácido hexadec-5-enóico e uma fitoceramida (P56) foram identificados em *P. tinctorius*. Ademais, foi possível determinar a estereoquímica absoluta do triterpeno Pisolactona.

- O potencial antifúngico e antibacteriano pode ser atribuído a espécie. Até o momento, pela primeira vez, não há relatos na literatura referente testes antimicobacterianos, os quais nesse trabalho demonstraram bons potenciais frente as cepas testadas.

-Como perspectivas futuras, sugere-se estudos mais aprofundados da espécie *P. tinctorius*, tanto químico como biológico, devido aos poucos dados encontrados na literatura referente a esses aspectos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAO, M. C.; GUGLIOTTA, A. D. M. A new species of *Inonotus* (Hymenochaetaceae) and *Trametes cingulata* (Polyporaceae) newly recorded from Brazil. **Mycotaxon**, v. 120, p. 35-41, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Nota Técnica - SVS/MS e ANVISA Nº 08**. Micobactérias, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. **Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no brasil no período de 1998 a 2009**. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos, 2011.

ALCAIDE, F. et al. Methods for determining the antimicrobial susceptibility of mycobacteria. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 35, p. 527-533, 2017.

ALI, N. A. A. et al. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 483-485, 2003.

AMERI, A.; VAIDYA, J. G.; DEOKULE, S. S. *In vitro* evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* and *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 328-333, 2011a.

AMERI, A.; VAIDYA, J. G.; DEOKULE, S. S. Anti-Staphylococcus aureus activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 4, p. 527-532, 2011b.

ANNANG, F. et al. Antiprotozoan sesterterpenes and triterpenes isolated from two Ghanaian mushrooms. **Fitoterapia**, v. 127, p. 341-348, 2018.

AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BAE, K. G.; MIN, T. J. The structure and antibiotic activities of hydroxy acid of lanosterol compound in *Daedalea dickinsii*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, p. 1199-1201, 2000.

BALTAZAR, J. M.; RYVARDEN, L.; GIBERTONI, T. B. The genus *Coltricia* in Brazil: new records and two new species. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1253-1262, 2010.

BALTAZAR, J. M. et al. Santa Catarina Island mangroves 3: a new species of *Fuscoporia*. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 859-863, 2009.

BARBOSA et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUNDRETT, M. C. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**, v. 79, p. 473-495, 2004.

CARDOSO, A. M. **Surto de Infecção após videoscopias causado por *Mycobacterium massiliense* em Goiânia: Análise molecular e determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos.** Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

CAUSAPÉ, C. L. et al. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

CERCENADO, E. *Enterococcus*: resistências fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, p. 59-65, 2011.

CHANG, H. S. et al. Chemical Constituents of the Fungus *Mycocleptodiscus* sp. 09F0149. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 2, p. 396-398, 2018.

CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. G. *Pisolithus*. In: CAIRNEY, J. W. G., CHAMBERS, S.M. **Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile.** Springer-Verlag, Berlin-Germany, 1999. p. 1-31.

CHEN, L. et al. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 454-473, 2014.

CHOI, H. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolideresistant *Mycobacterium massiliense* lung disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 1-10, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Perform. Stand. Antimicrob. susceptibility Test., 22th informational supplement. M100 e S23, Clinical and laboratory standards Institute, Wayne, PA, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard - Second edition.

CORTEZ, V. G.; BASEIA, I. G.; SILVEIRA, R. M. B. Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 4, p. 44-52, 2011.

CUI, Y.; KIM, D. S.; PARK, K. C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 79-85, 2005.

DAI, Y. C. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. **Fungal Diversity**, v. 45, n. 1, p. 131-343, 2010.

DE MELLO, A. H. et al. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, p. 293-301, 2006.

DE SILVA, D. D. et al. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. **Fungal Diversity**, v. 62, n. 1, p. 1-40, 2013.

DE SILVA, D. D. et al. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. **Fungal Diversity**, v. 55, n. 1, p. 1-35, 2012.

DE SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 612-618, 2006.

DIDUKH, M. Y., WASSER, S. P., NEVO, E. Medicinal value of species of the family Agaricaceae Cohn (higher Basidiomycetes): current stage of knowledge and future perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 2, p. 2003.

DUPORT, C.; JOBIN, M.; SCHIMITT, P. Adaptation in *Bacillus cereus*: from stress to disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-18, 2016.

ESPINEL-INGROFF, A.; KIDD, S. E. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 89-97, 2015.

ESSER, K. **The Mycota. In:** Anke, T.; Weber, D. Volume XV: **Physiology and genetics: selected basic and applied aspects**. 1^a ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

FALAGAS, M. E. et al. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. **Infection**, v. 34, n. 6, p. 315-321, 2006.

FOSTER, T. *Staphylococcus*. **In:** Baron, S. **Medical Microbiology**. 4^a ed. Univ of Texas Medical Branch, 1996.

FUJIMOTO, H. et al. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 694-697, 1994.

FANGKRATHOK, N. et al. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1611-1619, 2012.

GANESHPURKAR, A.; KOHLI, S.; RAI, G. Antidiabetic potential of polysaccharides from the white oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus florida* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 3, p. 207-217, 2014.

GAONA-FLORES, V. A. et al. The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: a 10-year retrospective review. **Sabouraudia**, v. 54, n. 6, p. 600-604, 2016.

GILL, M.; KIEFEL, M. J. Pigments of fungi. XXXVII. Pseudoquinone, a new naphthalenoid pulvinic acid from the fungus *Pisolithus arhizus*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1967-1977, 1994.

GILL, M.; LALLY, D. A. A naphthalenoid pulvinic acid derivative from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1351-1354, 1985.

GOMES, E. A. et al. ITS sequences and mitochondrial DNA polymorphism in *Pisolithus* isolates. **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 911-918, 2000.

GOMES-SILVA, A. C.; BALTAZAR, J. M.; GIBERTONI, T. B. Coltricia and Hymenochaete (Hymenochaetaceae) from the Amazonia and the Atlantic Forest, Brazil: one new combination and new records. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 139, n. 4, p. 428-436, 2012.

GOMES-SILVA, A. C.; RYVARDEN, L.; GIBERTONI, T. B. New and interesting species of Hymenochaetaceae from the Brazilian Amazonia. **Mycological Progress**, v. 8, n. 4, p. 273-279, 2009.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.

GUENTZEL, M. N. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: Baron, S. **Medical Microbiology**. 4^a ed. Univ of Texas Medical Branch, 1996.

HEMMERLIN, A. et al. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666-26676, 2003.

HINRICHSEN, S. L. Micobactéria de crescimento rápido – MCR. **Prática Hospitalar**. n. 53, p. 106-111, 2007.

HUANG, H et al. Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorate*. **Phytochemistry**, v. 84, p. 177-183, 2012.

HUR, J. M. et al. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 6, p. 603-605, 2004.

ISAKA, M. et al. Alliacane sesquiterpenoids from submerged cultures of the basidiomycete *Inonotus sp.* BCC 22670. **Phytochemistry**, v. 136, p. 175-181, 2017.

JIN-MING, G. New biologically active metabolites from Chinese higher fungi. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 849-871, 2006.

JUNG, J. Y. et al. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1824-1832, 2008.

JUNIOR, D. J. E., EVANS, D. G. *Escherichia coli* in diarrheal disease. In: Baron, S. **Medical Microbiology**. 4^a ed. Univ of Texas Medical Branch, 1996.

KAMO, T. et al. Anti-inflammatory lanostene-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. **Journal Natural Product**, v. 66, n. 8, p. 1104-1106, 2003.

KANG, H. S. et al. Cyathusals A, B, and C, antioxidants from the fermented mushroom *Cyathus stercoreus*. **Journal of natural products**, v.70, n.6, p.1043-1045, 2007.

KANOKMEDHAKUL, S. et al. A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. **Planta medica**, v. 69, n. 6, p. 568-571, 2003.

KASUYA, M. C. M. et al. Morphological and molecular characterization of *Pisolithus* in soil under eucalyptus plantations in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1891-1898, 2010.

KHADHRI, A.; AOUADHI, C.; ASCHI-SMITI, S. Screening of bioactive compounds of medicinal mushrooms collected on Tunisian territory. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 2, p-127-135, 2017.

KIM, Y. J. et al. Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 287-294, 2011.

KIM, D. S. et al. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. **Archives of pharmacal research**, v. 20, n. 3, p. 201-205, 1997.

KINGE, T. R.; MIH, A. M. Secondary metabolites of oil palm isolates of *Ganoderma zonatum* Murill. from Cameroon and their cytotoxicity against five human tumour cell lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8440-8447, 2011.

KLOSTY, M.; BERGMANN, W. Sterols of Algae. III. 1 The Occurrence of Ergosterol in *Chlorella pyranoidosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 6, p. 1601-1601, 1952.

KOPE, H. H. et al. p-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-p-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 258-264, 1991.

KOVACS, B. et al. Investigation of antimicrobial, antioxidant, and xanthine oxidase-inhibitory activities of *Phellinus* (Agaricomycetes) mushroom species native to Central Europe. **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, v. 19, n. 5, p. 387-394, 2017.

KUKLEV, D. V., DEMBITSKY, V. M. Chemistry, origin, antitumor and other activities of fungal homo-dimeric alkaloids. **Medicinal Journal Pharma**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2016.

LEE, I. K., YUN, B. S. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2376-2379, 2006.

LEE, I. K., YUN, B. S. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3309-3314, 2007.

- LEE, I. K; YUN, B. S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus spp.*, and their medicinal importance. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 349-359, 2011.
- LEE, I. S. et al. Inhibition of human neutrophil elastase by ergosterol derivatives from the mycelium of *Phellinus linteus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 437-440, 2012.
- LEE, M. S. et al. Chemical constituents of the culture broth of *Phellinus linteus* and their antioxidant activity. **Mycobiology**, v. 43, n. 1, p. 43-48, 2015.
- LEE, S. et al. Anti-Inflammatory phenolic metabolites from the edible fungus *Phellinus baumii* in LPS-stimulated RAW264. 7 cells. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1-10, 2017.
- LEHTINEN, J. et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 381–389, 2006.
- LEMIESZEK, M.; RZESKI, W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. **Contemporary Oncology (Pozn)**, v. 16, n. 4, p. 285-289, 2012.
- LI, H.Y. et al. Anti-AIDS agentes, 9. Subersol, a new C31 lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia suberosa*. **Journal Natural Product**, v. 56, n. 7, p. 1130-1133, 1993.
- LI, Y et al. Pecipamide, a New Sphingosine Derivative from the Cultures of *Polyporus picipes* (Basidiomycetes). **Lipids**, v. 45, p. 457-461, 2010.
- LIANG, C. H., SYU, J. L., MAU, J. L. Antioxidant properties of solid-state fermented adlay and rice by *Phellinus linteus*. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 841-845, 2009.
- LIU, CHAO; ZHAO, F.; CHEN, R. Y. A novel alkaloid from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 2, p. 197-199, 2010.
- LIU, H. K. et al. Lanostane-triterpenoids from the fungus *Phellinus gilvus*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 558-563, 2009.
- LIU, J. Q. et al. New alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 93-96, 2011.
- LIU, XIU-TING et al. Antibacterial compounds from mushrooms I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*, **Planta Medica**, v. 76, n. 2, p. 182–185, 2010.
- LOBO, A. M. et al. Novel triterpenoids from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 21, p. 2589-2592, 1985.
- LOBO, A. M. et al. Pisolactone, a novel triterpenoid isolated from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 21, p. 2205-2208, 1983.

LOPES, V. F. et al. *Phylloporia spathulata* sensu stricto and two new South American stipitate species of Phylloporia (Hymenochaetaceae). **Phytotaxa**, v. 257, n. 2, p. 133-148, 2016.

LOUTET, S. A.; VALVANO, M. A. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research. **Infection and immunity**, v. 78, n. 10, p. 4088-4100, 2010.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAHMOOD, Z. A. et al. Bioactive alkaloids produced by fungii. Updates on alkaloids from the species of the genera *boletus*, *fusarium* and *psilocybe*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 3, p. 349-357, 2010.

MANTADAKIS, E. et al. Susceptibility patterns of uropathogens identified in hospitalised children with community-acquired urinary tract infections in Thrace, Greece. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 85-90, 2015.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Fitoterapia**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MONTENEGRO, R. C. et al. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-457, 2008.

MORANDINI, L. M. B. et al. Lanostane-type triterpenes from the fungal endophyte *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon) Fries. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 4, p. 1173-1176, 2016.

NAGABUSHAN, H. et al. Retapamulin: a novel topical antibiotic. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 76, n. 1, p. 77-79, 2010.

NAKATA, T. et al. New lanostane triterpenoids inonotsutriols D, and E from *Inonotus Obliquus*. **Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 53-64, 2009.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NASCIMENTO, M. S. et al. Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-inflammatory potential modulate cytokine levels and the expression of nuclear factor kB. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 60-68, 2012.

National Committee for Clinical Laboratory. **NCCL**: manual of antimicrobial susceptibility testing, 2005.

_____. **NCCL**: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts; approved standard, 2th ed. Ed. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 81-89, 2012.

NEU, H. C., GOOTZ, T. D. **Antimicrobial chemotherapy**. In: Baron, S. **Medical Microbiology**. 4^a ed. Univ of Texas Medical Branch, 1996.

NOGUEIRA, R. C., DE CERQUEIRA, H. F., SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 2, p. 145-157, 2010.

NOMURA, M. et al. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. **Anticancer Research**, v. 28, p. 2691-2696, 2008.

OKAMORI, S. et al. Natural history of *Mycobacterium fortuitum* pulmonary infection presenting with migratory infiltrates: a case report with microbiological analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2018.

OLENNIKOV, D. N.; TANKHAEVA, L. M.; AGAFONOVA, S. V. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 419-425, 2011.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTEO, J.; ARACIL, M. B. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, p. 27-33, 2015.

OU, Y. X. et al. Guanacastane-type diterpenoids from *Coprinus radians*. **Phytochemistry**, v. 78, p. 190-196, 2012.

PADOVEZE, M. C. et al. Outbreak of surgical infection caused by nontuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. **Journal Hospital Infectious**, v. 67, n. 2, p. 161-167, 2007.

PARK, In-Hye et al. A β -secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. **Planta Medica**, v. 70, n. 02, p. 143-146, 2004a.

PARK, In-Hye et al. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 6, p. 615-618, 2004b.

PARK, Y. M. et al. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 120-128, 2005.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário** (Apostila). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - lazaropp@esalq.usp.br, 2004.

- POLEMIS, E.; DIMOU, D. M.; ZERVAKIS, G. I. The family Hymenochaetaceae (Agaricomycetes, Basidiomycota) in the islands of the Aegean Archipelago (Greece). **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 147, n. 2, p. 306-314, 2013.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- RAO, M.; SILVEIRA, F. P. Non-tuberculous mycobacterial infections in thoracic transplant candidates and recipients. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, p. 1-6, 2018.
- REGLI, A. D.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-10, 2015.
- RINCÓN, S. et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. **Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 34, n. 1, p. 191-208, 2014.
- ROSA, L. H. et al. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.
- ROTHER, M. S.; DA SILVEIRA, R. M. B. Família Agaricaceae (Agaricales, Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 259-268, 2008.
- SALVADOR-MONTOYA, C. A. et al. *Phellinus piptadeniae* (Hymenochaetales: Hymenochaetaceae): taxonomy and host range of a species with disjunct distribution in South American seasonally dry forests. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 7, p. 1887-1896, 2015.
- SANCHEZ, C. Mini-review: modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 756-762, 2004.
- SCHOTT, E. **Efeito de cogumelos desidratados sobre o crescimento de bactérias probióticas**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Universidade Da Região De Joinville – Univille, 2012.
- SCHÜFFLER, A. et al. **Secondary metabolites of Basidiomycetes**. In: Esser, K. (ed). **The Mycota**. Volume XV, Cap. 10. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- SHEENA, N. et al. Antibacterial activity of three macrofungi, *Ganoderma lucidum*, *Navesporus floccosa* and *Phellinus rimosus* occurring in South India. **Pharmaceutical biology**, v. 41, n. 8, p. 564-567, 2003.
- SHON, M. Y.; KIM, T. H.; SUNG, N. J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. **Food chemistry**, v. 82, n. 4, p. 593-597, 2003.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, F. H. A. et al. Infecção por *Saccharomyces cerevisiae*: uma infecção atípica em UTI. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 108-111, 2011.

SIMÕES, C. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999.

SIMÕES, M., RICHARD, N. B., ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemical against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Naturals Products Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009.

SMITH, S. I.; SERIKI, A.; AJAYI, A. Typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 12, p. 1913-1922, 2016.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2016.

STANIKUNAITE, R. et al. Lanostane-type triterpenes from the mushroom *Astraeus pteridis* with antituberculosis activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 12, p. 2077-2079, 2008.

SUTELA, S. et al. Phenolic compounds in ectomycorrhizal interaction of lignin modified silver birch. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2009.

TALBOT, J. M. et al. Functional guild classification predicts the enzymatic role of fungi in litter and soil biogeochemistry. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 441-456, 2015.

TAMRAKAR, S. et al. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-11, 2016.

TEPLYAKOVA, T. V. et al. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, n. 1, p. 37-45, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª edição. Porto Alegre, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. Ed Atheneu, 2008.

TURKEKUL, I., ELMASTAS, M., TÜZEN, M. Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 389-392, 2004.

TURNBULL, P. C. B. *Bacillus*. In: Baron, S. **Medical Microbiology**. 4ª ed. Univ of Texas Medical Branch, 1996.

VAZIRIAN, M. et al. Antimicrobial effect of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes) and its main compounds. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 1, p 77-84, 2014.

VARGHESE, B. et al. Emergence of rare species of non-tuberculous mycobacteria as potential pathogens in Saudi Arabian clinical setting. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p.1-9, 2017.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

VUUREN, S. V.; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: a review from a South African perspective for the years 2009–2016. **Journal of ethnopharmacology**, v. 208, p. 236-252, 2017.

WAGNER, T.; FISCHER, M. Natural groups and a revised system for the European poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. **Mycological Research**, v. 105, n. 7, p. 773-782, 2001.

WAGNER, T.; FISCHER, M. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* sl and *Inonotus* sl, and phylogenetic relationships of allied genera. **Mycologia**, v. 94, n. 6, p. 998-1016, 2002.

WALKER, J.R.; POULTER, C.D. Synthesis and evaluation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 9955-9959, 2005.

WANG, B.; QIU, Y. L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 299–363, 2006.

WANG, G. J. et al. Lanostanes from *Phellinus igniarius* and their iNOS inhibitory activities. **Planta Medica**, v. 75, n. 15, p. 1602-1607, 2009.

WANG, M. et al. Anti-Gastric ulcer activity of polysaccharide fraction isolated from mycelium culture of Lion's Mane Medicinal Mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 11, p. 1055-1060, 2015.

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.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014.

WU, U. I.; HOLLAND, S. M. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 968-980, 2015.

XU, X. H. et al. A Novel Lanostanoid Lactone From the Alga *Hypnea cerricornis*. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 702-704, 2001.

YANG, J. et al. A new sesquiterpene from the medicinal fungus *Inonotus vaninii*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 2, p. 261-263, 2013.

YANG, Y. et al. Structural analysis of a bioactive polysaccharide, PISP1, from the medicinal mushroom *Phellinus igniarius*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 134-139, 2009.

YEH, C. T. et al. Cytotoxic triterpenes from *Antrodia camphorata* and their mode of action in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 285, n. 1, p. 73-79, 2009.

YING, Y. M. et al. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. **Phytochemistry**, v. 108, p. 171-176, 2014.

ZAMUNER, M. et al. Lanostane triterpenes from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 863-867, 2005.

ZHANG, L. Secondary Metabolites and bioactivities from higher fungi in China. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 157-177, 2015.

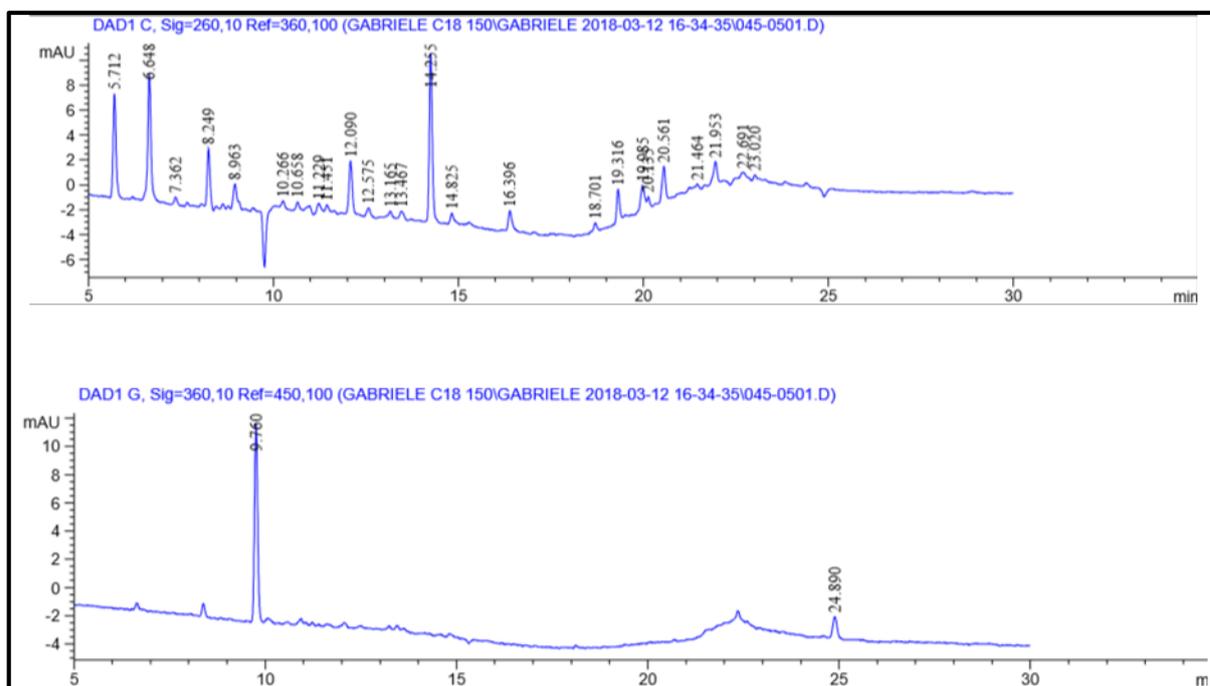
ZHAO, Z. Z. et al. Lucidimine AD, four new alkaloids from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 17, n. 12, p. 1160-1165, 2015.

ZHENG, W. et al. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1237-1254, 2010.

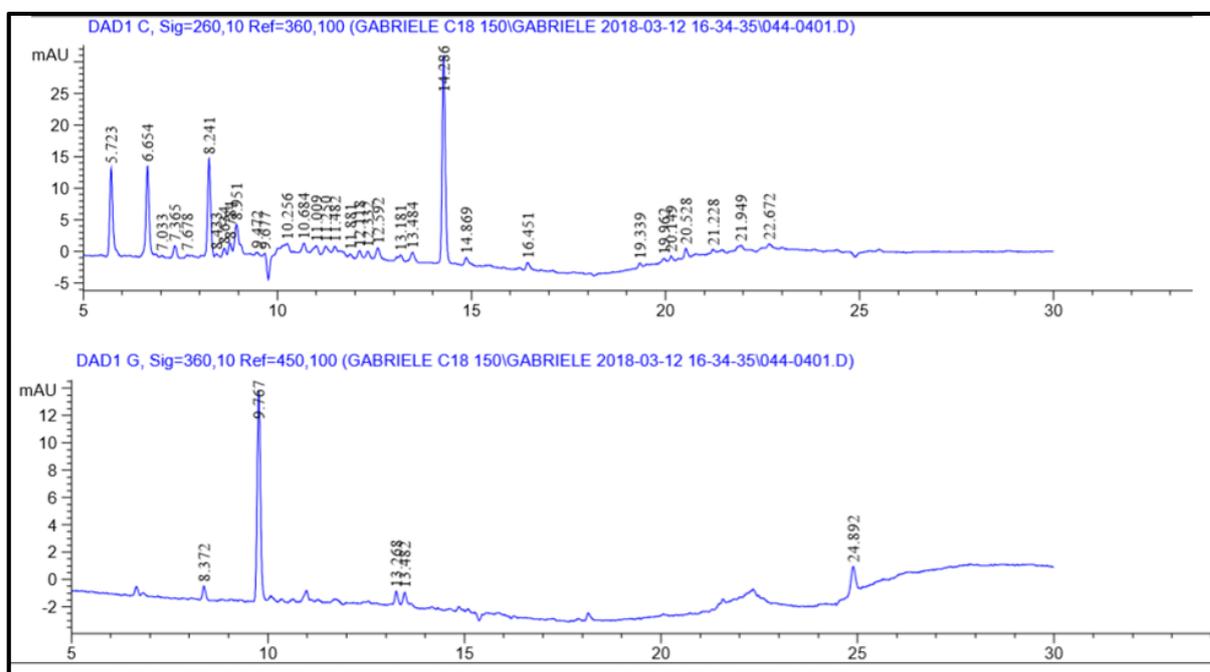
ZHU, Y. C. et al. Agrocybone, a novel bis-sesquiterpene with a spirodienone structure from basidiomycete *Agrocybe salicicola*. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 26, p. 3443-3445, 2010.

APÊNDICES

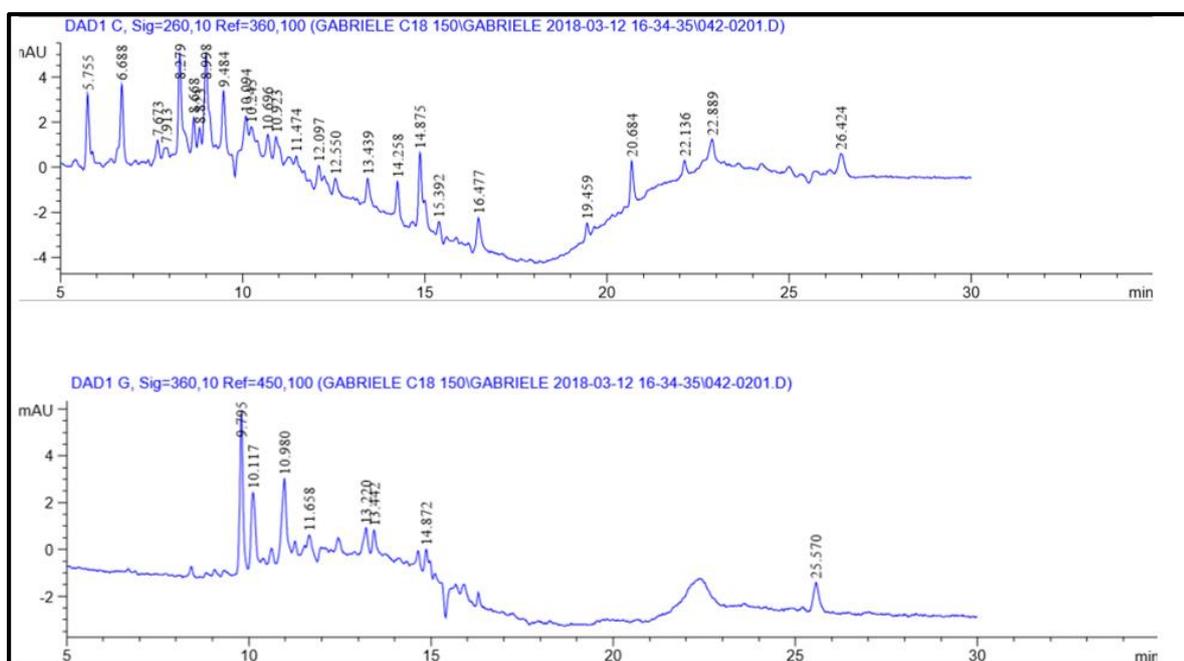
APÊNDICE A – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA RS
DE *Phellinotus piptadeniae*



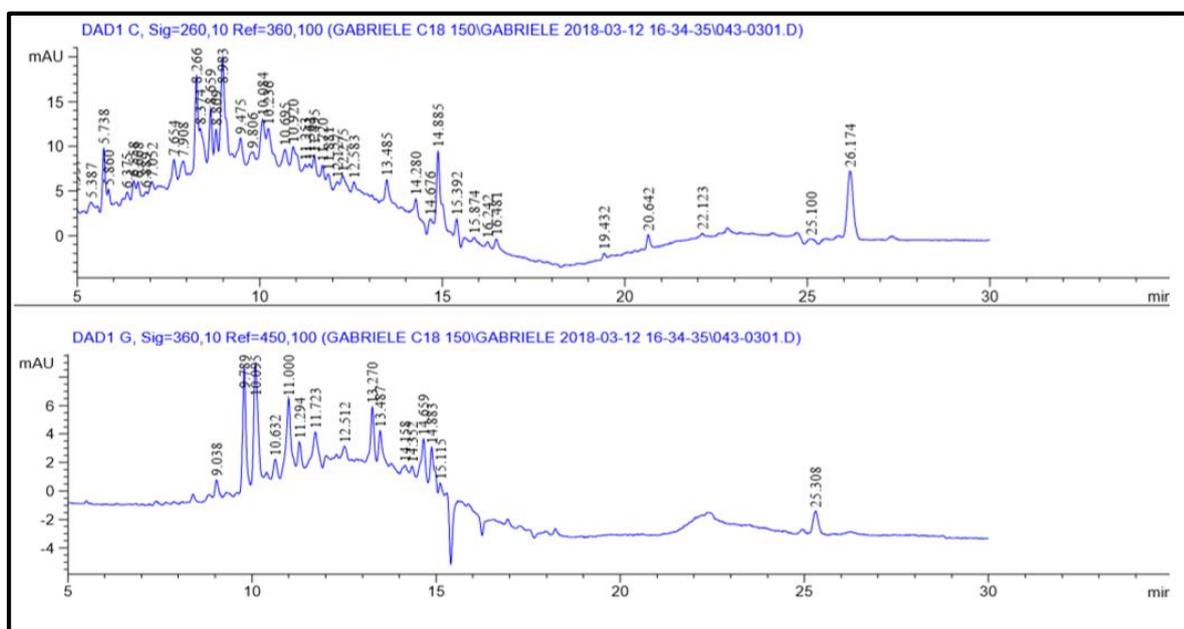
APÊNDICE B – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA SC
DE *Phellinotus piptadeniae*



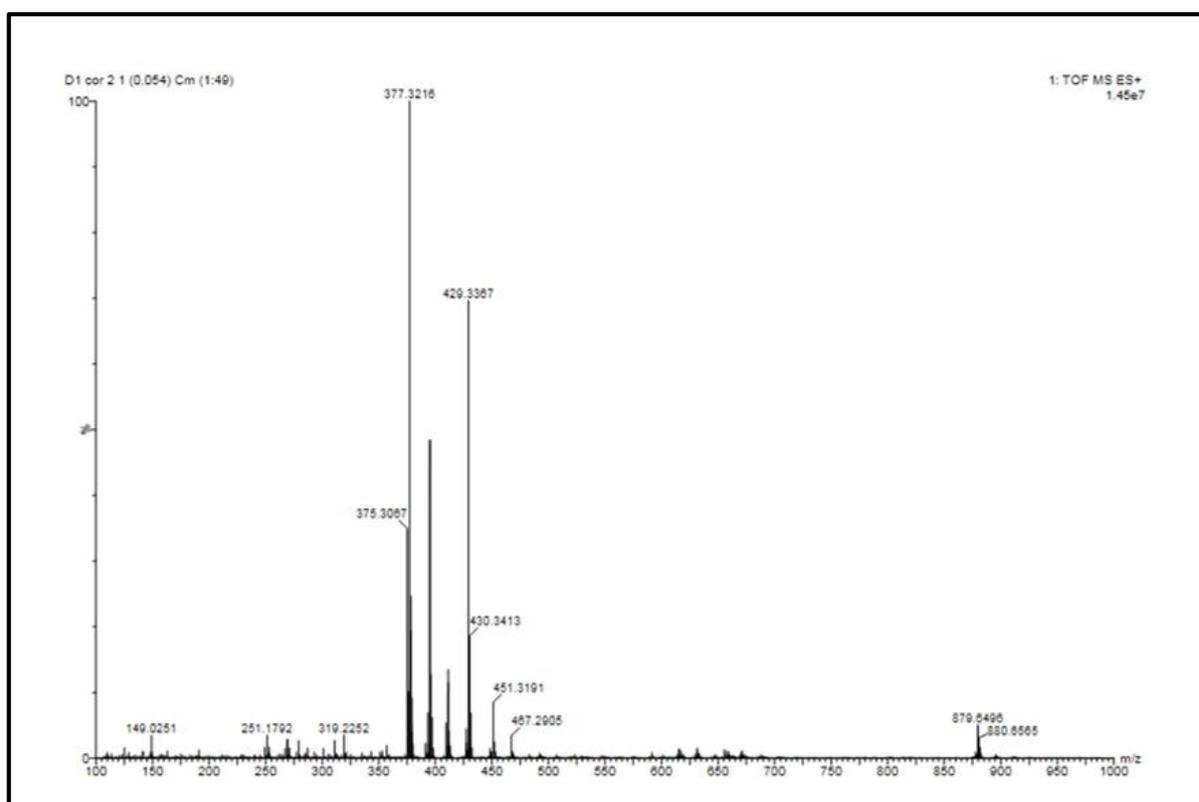
APÊNDICE C – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO METANÓLICA RS DE *Phellinotus piptadeniae*



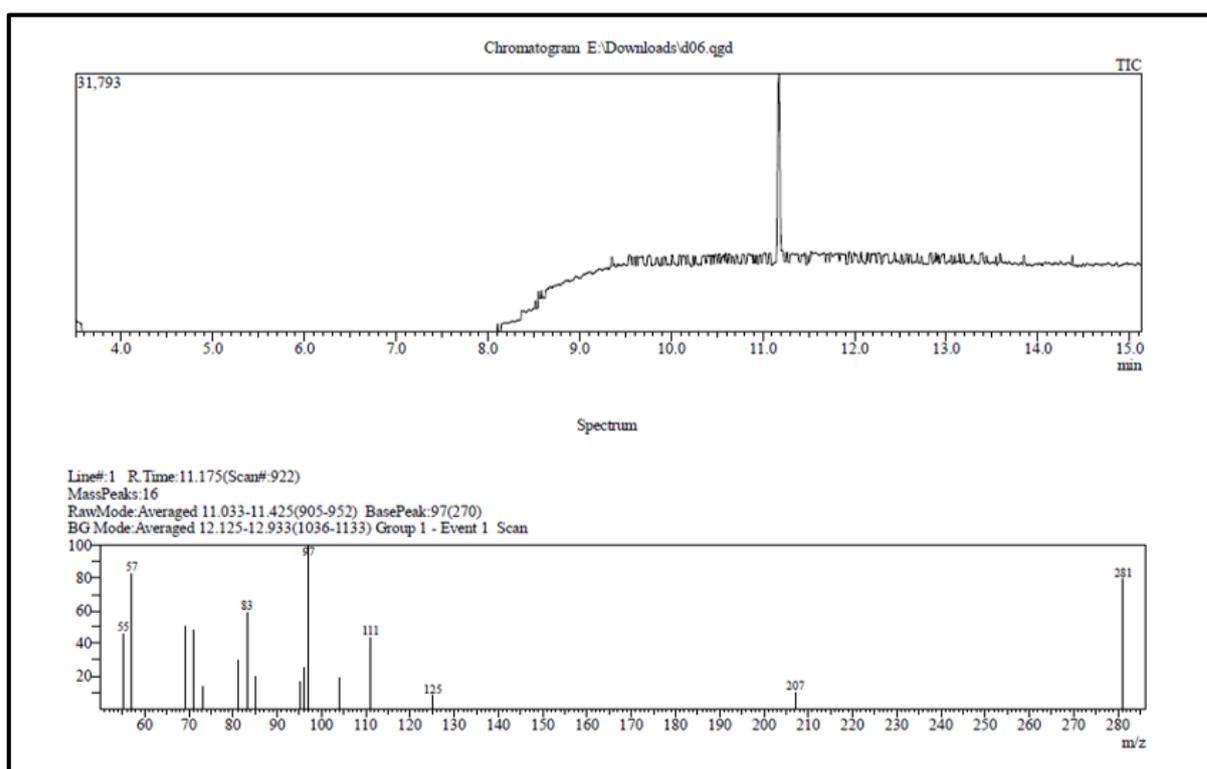
APÊNDICE D – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA FRAÇÃO METANÓLICA SC DE *Phellinotus piptadeniae*



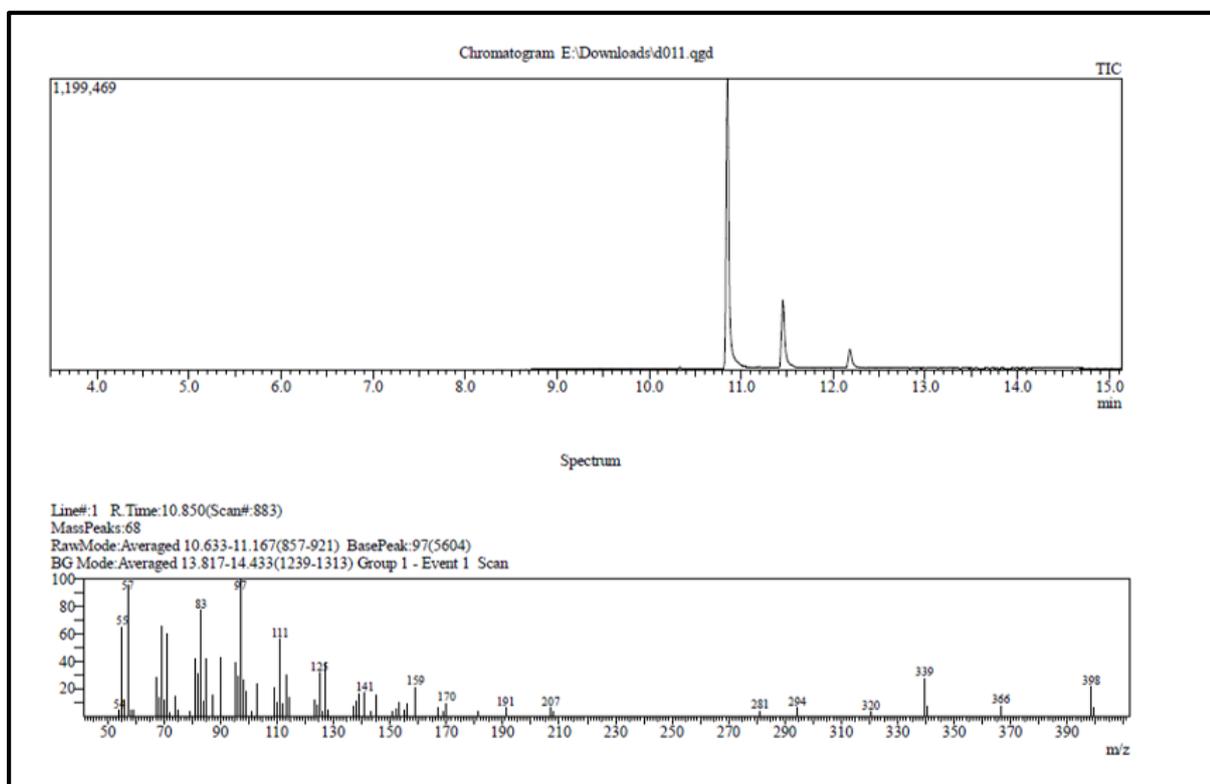
APÊNDICE E – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1)



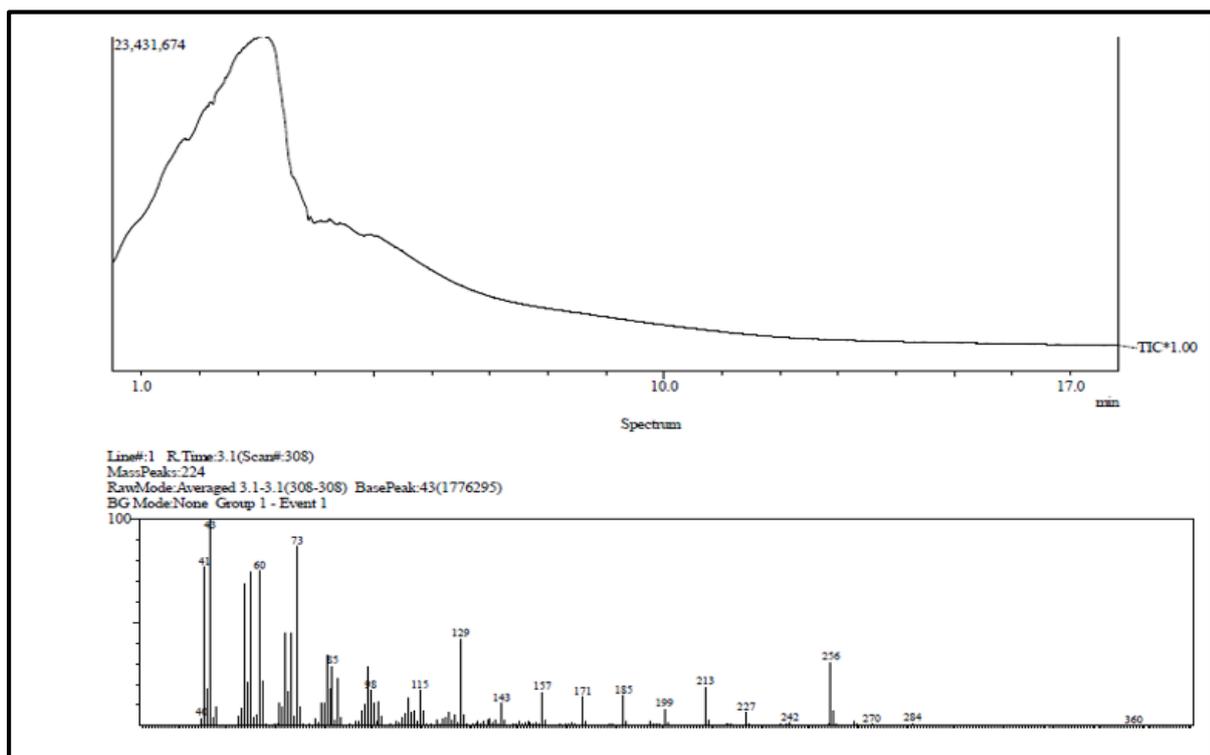
APÊNDICE F – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO 2-HIDRÓXI-PENTADECANOATO DE ETILA (D6)



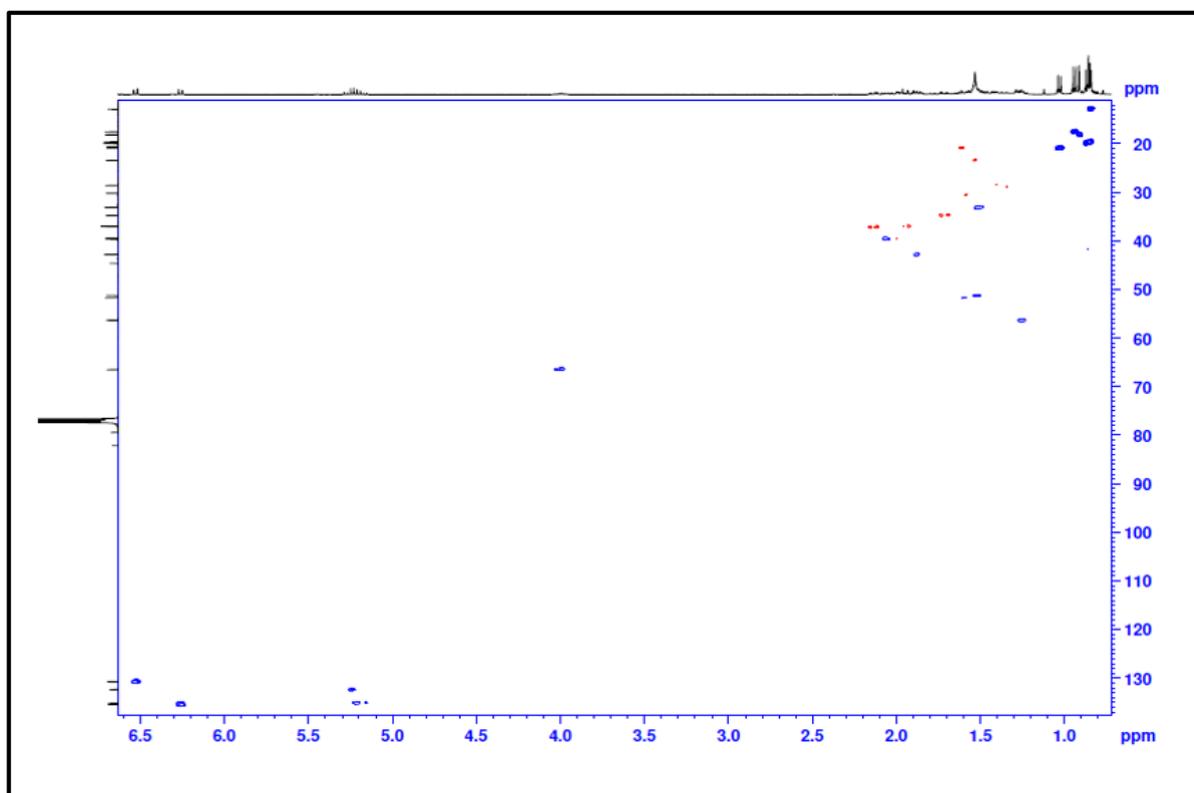
APÊNDICE G – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO 2-HIDRÓXI-TETRACOSANOATO DE METILA (D11)



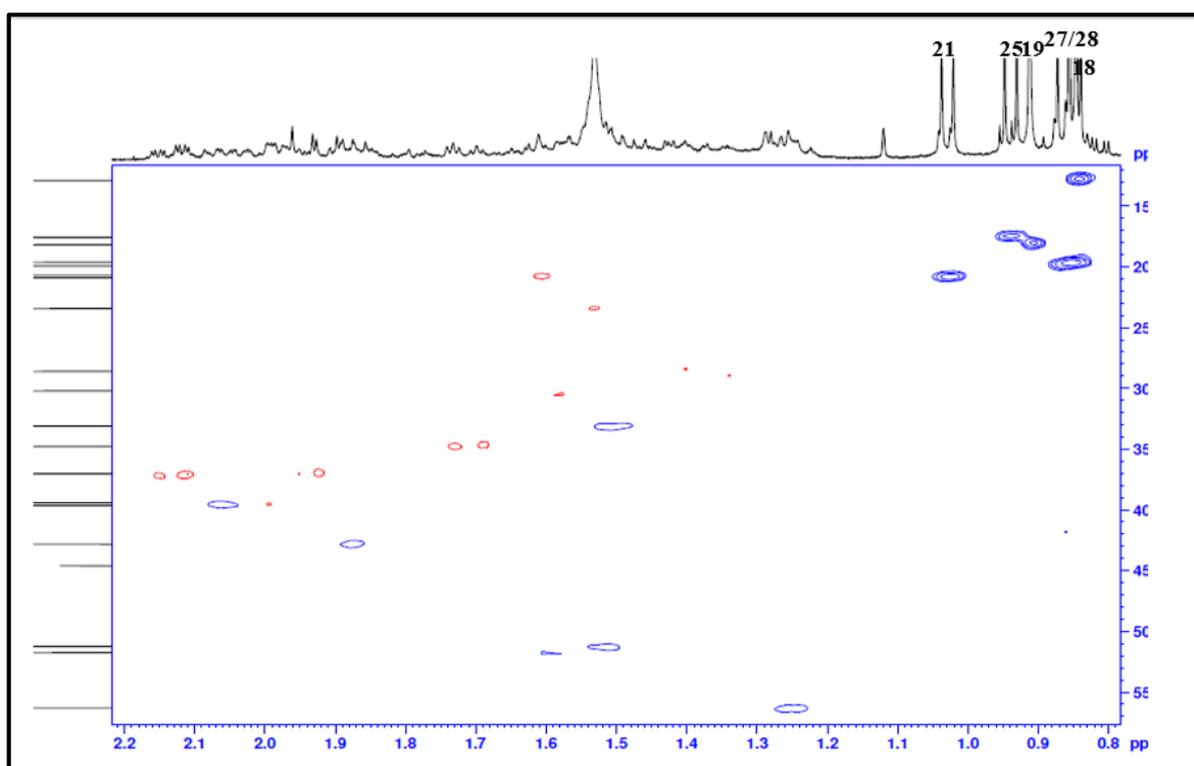
APÊNDICE H – ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO COMPOSTO ÁCIDO HEXADEC-5-ENÓICO (P1)



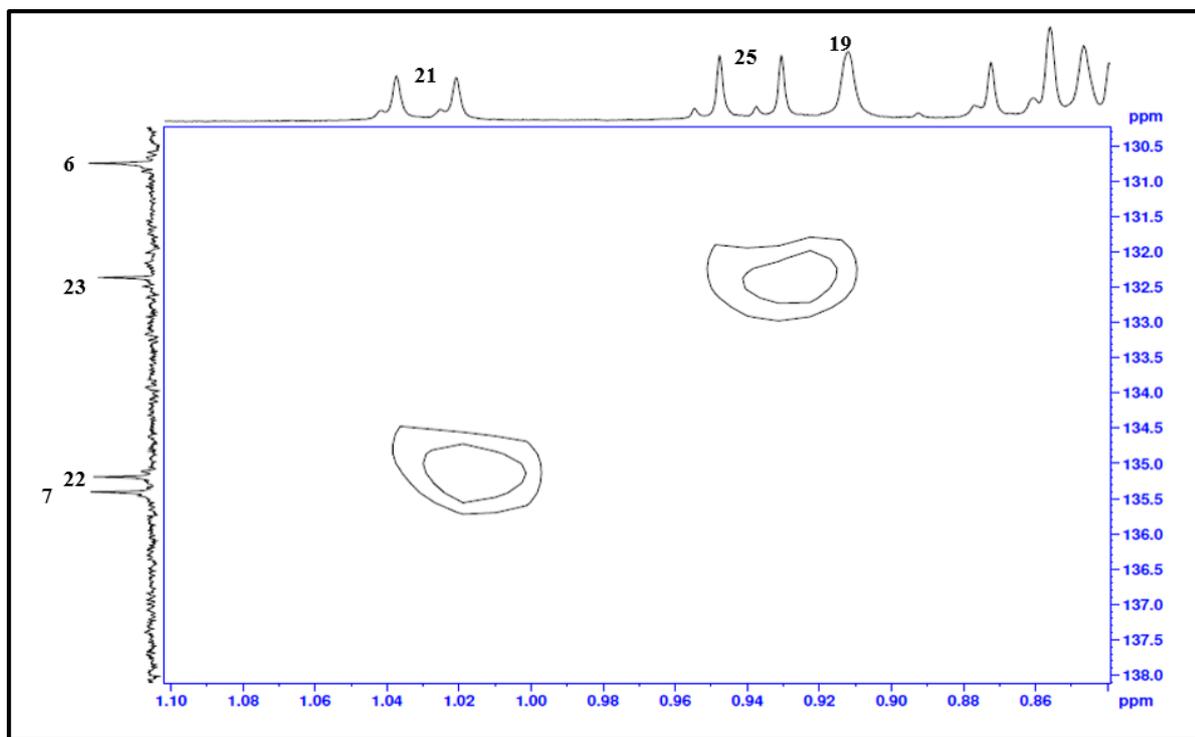
APÊNDICE I – ESPECTRO DE HSQC DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl_3 A 400 MHZ



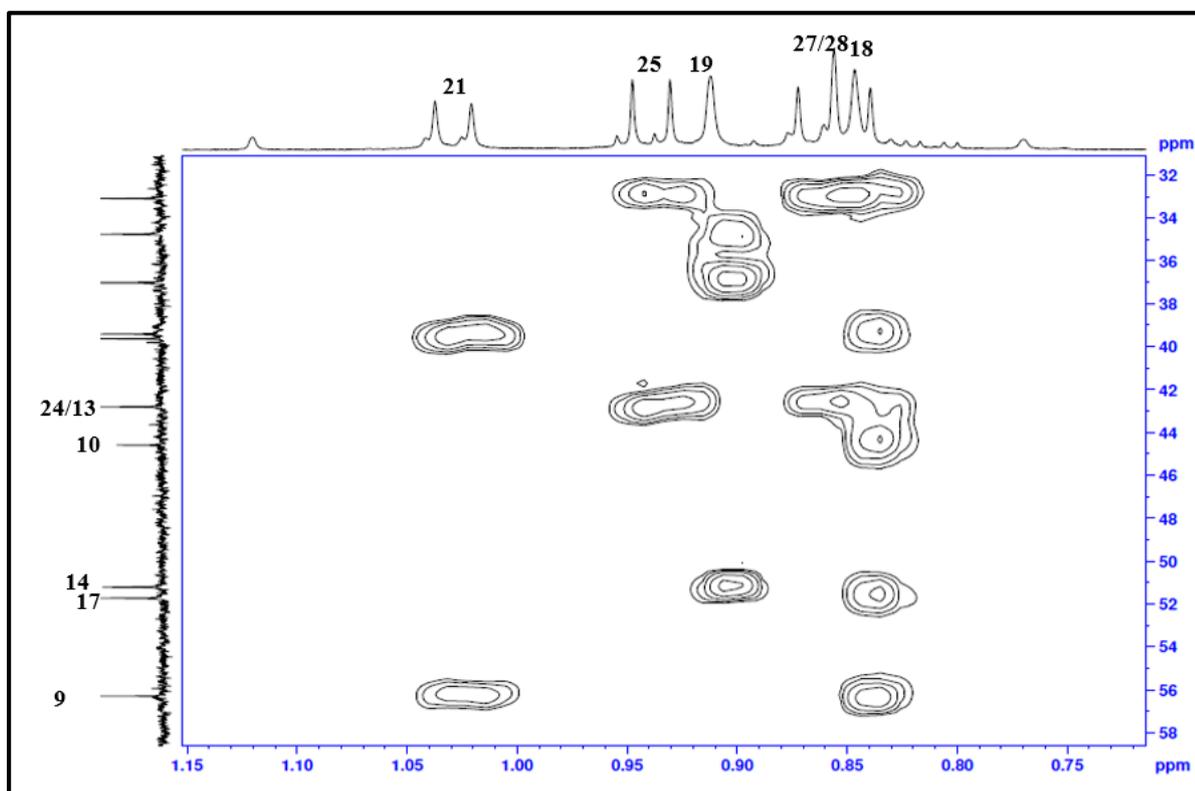
APÊNDICE J – ESPECTRO DE HSQC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl_3 A 400 MHZ



APÊNDICE K – ESPECTRO DE HMBC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl_3 A 400 MHZ



APÊNDICE L – ESPECTRO DE HMBC EXPANDIDO DO PERÓXIDO DO ERGOSTEROL (D1) EM CDCl_3 A 400 MHZ



APÊNDICE M – ESPECTRO DE COSY DO ERGOSTEROL (D2) EM CDCl₃ A 400MHZ