UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

JOSÉ RIVALDO DOS SANTOS FILHO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DE METABÓLITOS NATURAIS OBTIDOS A PARTIR DOS COGUMELOS *Lentinus crinitus* **e** *Ganoderma stipitatum*

MARINGÁ

2024

JOSÉ RIVALDO DOS SANTOS FILHO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DE METABÓLITOS NATURAIS OBTIDOS A PARTIR DOS COGUMELOS *Lentinus crinitus* **e** *Ganoderma stipitatum*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves

MARINGÁ

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Santos Filho, José Rivaldo dos

S237c Caracterização química, atividade biológica e aplicações de metabólitos naturais obtidos a partir dos cogumelos *Lentinus crinitus e Ganoderma stipitatum* / José Rivaldo dos Santos Filho. -- Maringá, PR, 2024.

188 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira.
Coorientador: Prof. Dr. Regina Aparecida Correia Gonçalves.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Cogumelos. 2. Compostos bioativos. 3. Caracterização química. 4. Atividade biológica. I. Oliveira, Arildo José Braz de, orient. II. Gonçalves, Regina Aparecida Correia, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.952

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065

JOSÉ RIVALDO DOS SANTOS FILHO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS NATURAIS OBTIDOS A PARTIR DOS COGUMELOS *Lentinus crinitus* E *Ganoderma stipitatum*

152ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24 de novembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Arildo José Bráz de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Cristina Giatti Marques de Souza
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Jane Martha Graton Mikcha
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Juliana Cristina Castro
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Juliana Silveira do Valle
Universidade Paranaense

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LABIPROS)** bloco K80, sala 10**; Laboratório de Análises Químicas Aplicadas à Biotecnologia (LABIOTEC)**, bloco K80, sala 06, Universidade Estadual de Maringá (UEM); no **Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas (LIABQ)** Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR); na **Central de Produtos Naturais** (CPN) do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), bloco B09, Universidade Estadual de Maringá; **Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA-UEM); Laboratório de Citogenética e Mutagênese**, Universidade Estadual de Maringá e **Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos** , Universidade Estadual de Maringá

LABIPROS - UEM

Dedico este trabalho a Deus por sua presença constante em minha vida. Tenho a completa convicção que jamais alcançaria tal feito sem a presença marcante do arquiteto do universo ao meu lado.

A minha querida esposa, Ana Claudia Hernandes, que não há palavras que possam descrever a sua importância e amor ao longo desta jornada. A minha querida filha Sarah dos Santos Hernandes, que é o maior presente que Deus me deu.

A toda a minha família, que de maneira incansável me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Ao soberano e inefável Deus, ao que era ontem, que é hoje, e que há de vir, pela graça e capacidade advinda "totalmente dEle". Pela força e sabedoria provida de sua majestade. Por ser o autor sublime da minha vida, o condutor da minha história, amigo e consolador nos momentos tenebrosos. Tenho a completa convicção que jamais alcançaria tal feito sem a presença marcante do arquiteto do universo ao meu lado.

A minha querida esposa Ana Claudia Hernandes, presente outorgado por Deus a minha vida, que não mediu esforços para que esta conquista pudesse ser concretizada. Ao apoio constante, compreensão, companheirismo e amor incondicional. "Te amo infinitamente"

A minha filha Sarah dos Santos Hernandes, que me concedeu o maior título, ser PAI. "Te amo minha filha, e tudo que o papai faz é para te dar orgulho"

Aos meus pais, José Rivaldo e Rosângela, que abdicaram de si mesmos para que nada me faltasse.

Ao meu sogro (Francisco) e minha sogra (Luzia), que se tornaram meus pais e foram fundamentais durante este árduo caminho.

Aos meus irmãos, Tiago e Talita, aos meus avós, Alziro e Irma, por servir de base a minha vida, sendo exemplos de caráter e ensinar-me o que realmente significa amor fraterno.

Ao meu querido orientador, Prof º Dr. Arildo José Braz de Oliveira, por me dar a honra de ser seu orientando, que ao longo deste árduo caminho transmitiu-me seus conhecimentos de forma magnifica. Agradeço não somente pelas palavras de sabedoria, ser exemplo de dedicação, honestidade, comprometimento e integridade, mas também por se tornar um grande amigo. Posso dizer que minha vida acadêmica não seria a mesma sem o seu conhecimento.

A minha querida coorientadora, Prof. Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves, que é um exemplo de Professora, pesquisadora e mãe. Obrigado por todo o aprendizado, palavras de incentivo, fortalecimento e carinho, comigo e minha família.

Aos meus amigos de laboratório e da Pós-graduação que a UEM me forneceu, em especial a Thaila Fernandes Silva, Susana Tavares Cotrim Ribeiro, Everton da Silva Santos, Juliana Cristina Castro, Raul Aguera, Arthur Ferrarezi, Laura Mardigan, Maria Amélia, Aline Savam, Blendon, Hevelyn e Gabriela, e os demais que passaram um pouquinho do conhecimento e compartilharam momentos de risadas e de amizade nesses 4 anos. Obrigada pelo companheirismo e amizade. Muito obrigado a todos, sem exceção!

Aos professores da Pós graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF) por todo ensinamento ao longo desses quatro anos.

Aos professores Dr. Celso Vataru Nakamura, Dr. José Eduardo Correia Gonçalves e Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini, por ceder os materiais e disponibilidade de seus respectivos laboratórios, meu mais sincero obrigado.

À melhor secretária de todas, Franscisca Helena Mesquita de Carvalho. Obrigado por toda a ajuda e cuidado. Você é incrível.

Agradeço à bolsa de estudos fornecida pelo órgão estatal de fomento a esta pesquisa, financiada pela CAPES.

A todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa a minha mais singela e profunda gratidão.

A Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela estrutura, apoio e incentivo fornecido para a realização deste trabalho.

Aos professores que prontamente aceitaram o convite a compor a banca examinadora deste trabalho e contribuir prestativamente com o mesmo.

MEU MAIS SINCERO AGRADECIMENTO, DO FUNDO DO CORAÇÃO, VOCÊS FIZERAM A DIFERENÇA!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **20**
OBJETIVOS GERAIS **21**
CAPÍTULO 1..... 22
REVISÃO DA LITERATURA **23**
1.1 Características de *Lentinus crinitus* 23
1.2. Valor nutricional 25
1.3 Biocompostos e bioatividades 26
1.4 Cultivo *in vitro* 34
1.5. Produção de enzimas 36
1.6. Uso em biorremediação 41
1.7. Uso em bioacumulação 42
1.8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS **43**
REFERÊNCIAS **45**
CAPÍTULO 2 ..... **52**
1 INTRODUÇÃO **54**
2. MATERIAIS E MÉTODOS **55**
2.1 PRODUÇÃO DOS COGUMELOS 55
2.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 55
2.3 COMPOSTOS HIDROFÍLICOS 56
2.3.1 Extrações de compostos hidrofílicos 56
2.3.2 *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*) 56
2.4 ÁCIDOS GRAXOS 57
2.4.1 Extração lipídica total 57
2.4.2 Fracionamento das classes lipídicas por cromatografia em coluna 57
2.4.3 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) 58
2.4.4 Análise por Cromatografia Gasosa 58
2.4.5 Ressonância Magnética Nuclear 60
2.5 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS 61
2.5.1 Extrações 61
2.5.2 Fracionamento e isolamento 61
2.5.3 Determinação de açúcares totais 62
2.5.4 Determinação de polifenóis totais 63

2.5.5 Determinação de proteínas totais 63
2.5.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 63
2.5.7 Análise da fração sobrenadante aquosa por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* 64
2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 64
2.6.1 Ensaios antileishmania e citotoxicidade 64
2.6.2 Atividade antiproliferativa em células tumorais 66
2.6.3 Atividade prébiotica 67
2.7 Análise estatística 69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 69
3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 69
3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR *UPLC-ESI-QTOF-MS/MS* 71
3.3 ÁCIDOS GRAXOS 75
3.3.1 Análise do perfil lipídico por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 75
3.3.2 Identificação dos ácidos graxos por CG/EM 81
3.3.4 Atividade antileishmania do EBL e frações 88
3.3.5 Atividade antiproliferativa 91
3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS 99
3.4.1 Extração, purificação e rendimento 99
3.4.2.1 Doseamento de açúcares totais 100
3.4.2.2. Doseamento de polifenóis totais 101
3.4.2.3 Doseamento de proteínas totais 102
3.4.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 103
3.5 ANÁLISE DA FRAÇÃO SOBRENADANTE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* 109
3.6 ATIVIDADE PREBIÓTICA 114
CONCLUSÃO 118
REFERÊNCIAS 119
CAPÍTULO 3 **..... 138**
1. INTRODUÇÃO 140
2 MATERIAL E MÉTODOS 141
2.1 MATERIAL FÚNGICO 141
2.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 141
2.2 ÁCIDOS GRAXOS 142
2.2.2 Extração por Bligh e Dyer 142
2.2.3 Extração total de lipídios por maceração 142

2.2.4 Fracionamento das classes lipídicas por cromatografia em coluna 143
2.2.5 Preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos por derivatização 143
2.2.6 Análise por Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC)..... 143
2.3 COMPOSTOS HIDROFÍLICOS..... 144
2.3.1 Extrações de compostos hidrofílicos 144
2.3.2 *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass* spectrometry (*UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*) 145
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA 145
2.4.1 Cultura de células 145
2.4.2 Determinação da atividade antiproliferativa de extratos e frações em formas promastigotas de *Leishmania* 146
2.4.3 Avaliação da atividade de extratos e frações na viabilidade de formas amastigotas de *Leishmania*..... 146
2.4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos 147
2.5. OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS 147
2.5.1. Extrações..... 147
2.5.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 148
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 148
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 149
3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL..... 149
3.2 ÁCIDOS GRAXOS 150
3.2.1 Rendimento..... 150
3.2.2 Quantificação absoluta (CG/DIC) 151
3.2.2.3 Atividade antileishmania dos extratos lipídicos e frações. 157
3.3 Identificação dos compostos por *UPLC-ESI/QTOF/MS/MS*..... 159
3.3.1 Atividade antileishmania dos extratos hidrofílicos..... 161
3.4 POLISSACARÍDEOS 162
3.4.1 Obtenção 162
3.4.2 Análise dos polissacarídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 165
CONCLUSÃO..... 173
REFERÊNCIAS 174

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG	Ácido Graxo
AGS	Acido Graxo Saturado
AGI	Ácido Graxo Insaturado
AGMI	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
A_{EMAG}	Área do pico do éster metílico do ácido graxo analisado
BD – C	Bligh e Dyer/clorofórmio
BD - DC	Bligh e Dyer/diclorometano
CFT	Conteúdo Fenólico Total
CG/EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG/DIC	Cromatografia em fase Gasosa por Detector de Ionização de Chama
CC_{50}	Concentração citotóxica de 50% das células
CI_{50}	Concentração Inibitória de 50%
CLAE/PDA	Cromatografia Líquida com Detector de Matriz de Fotodiodos
CLAE/EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CTR	Absorbância do controle
DP	Desvio Padrão
EBL	Extrato bruto lipídico
EBML	Extrato bruto metanólico – *L. crinitus*
EBMGAN	Extrato bruto metanólico – *G. stipitatum*
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EMAG	Éster metílico de ácido graxo
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
F.A.M.E.	*Fatty Acid Methyl Esters*
FaqGA	Fração aquosa - *G. stipitatum*
FalcGA	Fração alcalina - *G. stipitatum*
FaqLC–PPD	Fração precipitada aquosa após diálise - *L. crinitus*
FalcLC–PPD	Fração precipitada alcalina após diálise - *L. crinitus*
FaqLC–PPGD	Fração solúvel aquosa após gelo-degelo - *L. crinitus*
FalLC– PPGD	Fração solúvel alcalina após gelo-degelo - *L. crinitus*
FaqLC-SP	Fração sobrenadante aquosa – *L. crinitus*
FDCL	Fração diclorometano – *L. crinitus*
FDCGAN	Fração diclorometano – *G. stipitatum*
FHML	Fração hidrometanólica – *L. crinitus*
FHMGAN	Fração hidrometanólica – *G. stipitatum*
HMDB	*Human Metabolome Database*
HepG2/C3A	Linhagem de célula tumoral de fígado
IS	Índice de seletividade
LC/MS	*Liquid chromatography/Mass spectrometry*
LN	Lipídios neutros
Mass Bank	*MassBank Europe Mass Spectral DataBase*
M-C	Maceração/Clorofórmio
M-DC	Maceração/Diclorometano
MCF-7	Linhagem de célula tumoral de mama
MeOH	Metanol
MoNA	*MassBank of North America*
MT	Massa Teórica
MEE	Massa Exata Experimental

MET	Massa Exata Teórica
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
m/z	Razão Massa Carga
NIST	*National Institute of Standards*
PUFAS	*Polyunsaturated Fatty Acids*
QAEMAGs	Quantificação absoluta dos EMAG
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
QA_{EMAG}	Quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS	*Ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight-mass spectrometry*
µmol	Micromol
$\mu gEAG.mg^{-1}$	Equivalentes de ácido gálico
δ	Deslocamento Químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das estruturas do micélio reprodutor de *L. crinitus*; **A)** Corpo de frutificação; **B)** Basidiósporos; **C)** Sistema de hifas generativas e esqueleto-ligadoras. 24
Figura 2. Distribuição geográfica do cogumelo *L. crinitus*: **A)** Mundial (27 países); e **B)** Brasil (5 regiões brasileiras). 25
Figura 3. Representação (%) das principais áreas de estudo do cogumelo *L. crinitus*, segundo publicações sobre esta espécie. 44
Figura 4. Esquema geral de obtenção de polissacarídeos a partir de *L. crinitus.* 62
Figura 5. Compostos fenólicos presentes no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus* 73
Figura 6. Ácido orgânicos presentes no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*..... 74
Figura 7. Cromononas e composto sesquiterpênico encontrados na FDCL de *L. crinitus* 74
Figura 8. Aminoácidos e derivados do ácido linoleico encontrados no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*..... 75
Figura 9. Estrutura de triglicerídeo modelo 76
Figura 10. Espectros de RMN ^{1}H (300,05 MHz) do extrato bruto lipídico de *L. crinitus* em $CDCl_3$.. 76
Figura 11. Ampliação da região de δ 4,10- 5,25 ppm, para demonstrar os sinais correspondentes aos hidrogênios glicerínicos ($H_{19, 20}$ e $_{21}$). 78
Figura 12. Integração de sinais para cálculo da porcentagem relativa de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), ácidos graxos mono insaturados (AGMI) e ácidos graxos saturados (AGS).. 80
Figura 13. Estruturas dos ácidos graxos identificados no EBL e frações LN, GL e FL em comparação com a mistura de padrão EMAG (C4-C24) e com auxílio da biblioteca NIST..... 83
Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG, Padrão EMAG (C4-C24) por CG/EM; **EBL**) Extrato bruto lipídico; **LN**) Lipídios Neutros; **GL**) Glicolipídios; **FL**) Fosfolipídios por CG/EM 84
Figura 15. Proporções de ácidos graxos saturados **(AGS)**, monoinsaturados **(AGMI)** e poli-insaturados **(AGPI)** no extrato lipídico bruto **(EBL)**, lipídios neutros **(LN),** glicolipídios **(GL)** e fosfolipídios **(FL)** do basidiocarpo de *L. crinitus* por CG/DIC 88
Figura 16. Absorbância média (barras), Viabilidade celular (linhas) (%) e desvio padrão dos grupos controle (Co), tratamento com Doxorrubicina (DOX) e extratos de ácidos graxos de *L. crinitus* nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/L, por 24, 48 e 72 horas, nas linhagem celular de câncer de fígado (HepG2/C3A) *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$).. 95
Figura 17. Absorbância média (barras), Viabilidade celular (linhas) (%) e desvio padrão dos grupos controle (Co), tratamento com Doxorrubicina (DOX) e extratos de ácidos graxos de *L. crinitus* nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/L, por 24, 48 e 72 horas, na linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$). 96
Figura 18. Frações aquosas obtidas a partir de *L. crinitus*. Fração sobrenadante aquosa – FaqLC-SP **(A)**, fração precipitada aquosa após diálise – FaqLC-PPD **(B)**, fração solúvel aquosa após gelo-degelo – FaqLC - PPGD **(C).** 99
Figura 19. Frações alcalina obtidas a partir de *L. crinitus*. Fração precipitado alcalina após diálise – FalcLC-PPD **(A)**, fração solúvel alcalina após gelo-degelo – FalcLC-PPGD **(B)**. 100
Figura 20. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica de FalcLC-PPGD após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica. 104
Figura 21. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica de FalcLC-PPGD. 106
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de FalcLC-PPGD. 107
Figura 23.Espectro de RMN ^{1}H da fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP). Região aromática **(A)**; região anomérica **(B)**; região dos aminoácidos aromáticos **(C)**; região dos aminoácidos alifáticos **(D)**..... 110

Figura 24. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP) após hidrólise para determinação da composição monossacarídica. 111
Figura 25. Compostos fenólicos presentes na fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC– SP) 114
Figura 26. Fermentabilidade de extratos de *L. crinitus* por cepas de lactobacilos e *B. coagulans* 115
Figura 27. Mensuração do pH dos meios de culturas após o cultivo cepas de lactobacilos e *B. coagulans* com os extratos de *L. crinitus*..... 116
Figura 28. Corpo de frutificação do *Ganoderma stipitatum* 141
Figura 29. Frações aquosas obtidas a partir de *G. stipitatum*. Fração sobrenadante aquosa – FaqGA-SP **(A)**, fração precipitada aquosa após diálise – FaqGA **(B)**, fração precipitada alcalina após a diálise – FalcGA **(C)**..... 163
Figura 30. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica da fração alcalina após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica..... 166
Figura 31. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica da fração aquosa após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica. 166
Figura 32. Espectro de RMN ^{1}H da fração alcalina de *G. stipitatum*..... 168
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C da fração alcalina de *G. stipitatum*..... 168
Figura 34. Espectro de RMN ^{1}H da fração aquosa de *G. stipitatum*..... 169
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C da fração aquosa de *G. stipitatum*..... 169
Figura 36. Mapa de correlação do tipo HSQC da fração alcalina de *G. stipitatum* 172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos açúcares, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos de *L. crinitus*..... 30
Tabela 2. Composição química dos ácidos graxos do *L. crinitus* em porcentagem relativa por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC 31
Tabela 3. Fitoquímicos identificados e/ou detectados em *L. crinitus*. 32
Tabela 4. Condições ótimas de atividade enzimática para o cultivo de *L. crinitus*..... 40
Tabela 5. Corantes degradados por *L. crinitus*..... 41
Tabela 6. Ácidos graxos presentes na mistura de padrão C4-C24, e identificados com auxílio da biblioteca NIST. 59
Tabela 7. Composição centesimal de *L. crinitus*..... 70
Tabela 8. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*. 72
Tabela 9. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{1}H do EBL em comparação com dados da literatura. 79
Tabela 10. Porcentagem relativa de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), de ácidos graxos mono insaturados (AGMI) e ácidos graxos saturados (AGS) no extrato bruto lipídico (EBL) de *L. crinitus*. 80
Tabela 11. Ácidos graxos identificados no EBL e frações LN, GL e FL em comparação com a mistura de padrão C4-C24 e com auxílio da biblioteca NIST. 81
Tabela 12. Quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos (QAEMAG) do extrato bruto e frações de *L. crinitus* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra.....85
Tabela 13. Proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados do extrato bruto lipídico (EBL), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) do basidiocarpo de *L. crinitus* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra..... 87
Tabela 14. Atividade antiproliferativa do extrato bruto lipídico de *L. crinitus* (EBL) e frações contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1. 89
Tabela 15. Absorbância média e viabilidade celular referente ao ensaio de citotoxicidade MTT em células HepG2/C3A, expostas aos extratos de ácidos graxos de *L. crinitus*. 97
Tabela 16. Absorbância média e viabilidade celular referente ao ensaio de citotoxicidade MTT em células MCF-7, expostas aos extratos de ácidos graxos de *L. crinitus*..... 98
Tabela 17. Rendimento das frações aquosas e hemicelulósicas de *L. crinitus*..... 99
Tabela 18. Resultados dos doseamentos de açúcares totais. 101
Tabela 19. Resultados dos doseamentos de polifenóis totais das frações de *L. crinitus*. 101
Tabela 20. Resultados dos doseamentos de proteínas das frações de *L. crinitus*.. 103
Tabela 21. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da fração hemicelulósica de *L. crinitus* após processo de gelo-degelo (FHLC-PPGD) em comparação com β-glucana isolada de *A. pullulans*..... 108
Tabela 22. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* na fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP). 112
Tabela 23. Composição centesimal de *G. stipitatum* 149
Tabela 24. Rendimento das extrações lipídicas de *G. stipitatum*. 151
Tabela 25. Quantificação (%) dos ésteres metílicos de ácidos graxos por CG/DIC dos extratos BD-C, BD-D, M-C e M-D de *G. stipitatum*... 152
Tabela 26. Porcentagem de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) dos extratos BD-C, BD-D, M-C e M-D por CG/DIC..... 153
Tabela 27. Quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos (QAEMAG) do extrato bruto e frações de *G. stipitatum* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra.....155

Tabela 28. Proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados do extrato bruto lipídico (M-C), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) do basidiocarpo de *G. stipitatum* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra..... 156
Tabela 29. Atividade antiproliferativa dos extratos e frações lipídicas de *G. stipitatum* contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1..... 157
Tabela 30. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* em extratos de *G. stipitatum.* 160
Tabela 31. Atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico e frações de *G. stipitatum* contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1..... 161
Tabela 32. Rendimento das frações aquosas e alcalinas de *Ganoderma*.....163
Tabela 33. Tabela 34. Dados de RMN de ^{1}H e 13C da fração aquosa e alcalina de *G. stipitatum* em comparação com β-glucana isolada de *Pleutorus djamor* e *Ganoderma lucidum* 172

RESUMO

SANTOS FILHO, J. R., 2024. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DE METABÓLITOS NATURAIS OBTIDOS DOS COGUMELOS *Lentinus crinitus* e *Ganoderma stipitatum*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 188 p.

Os cogumelos são utilizados para fins alimentares e medicinais há milhares de anos e sua atividade medicinal tem sido atribuída a numerosos metabólitos bioativos presentes no micélio vegetativo, mas principalmente nos basidiocarpos. Os efeitos biológicos dos cogumelos variam dependendo das espécies fúngicas e da natureza química dos metabólitos. O basidiomiceto *Lentinus crinitus* (L.) Fr é um fungo nativo brasileiro de ocorrência pantropical, que produz corpos de frutificação comestíveis com aplicações medicinais, nutricionais e biotecnológicas. *Ganoderma stipitatum* é um cogumelo que pertence à família Ganodermataceae, com distribuição em países como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Índia. Os objetivos do trabalho foram: Realizar o perfil e a caracterização de diferentes classes de compostos bioativos e avaliar o potencial biológico dos cogumelos de *L. crinitus* e *G. stipitatum*. Os extratos foram obtidos por macerações dos basidiocarpos, para obtenção de extratos lipídicos (Clorofórmio:metanol:isopropanol), para compostos hidrofílicos (Metanol; partição líquido-liquido), por Brigh e Dyer (ácidos graxos), e extrações sequenciais em autoclave e sob refluxo para obtenção de polissarídeos. As amostras foram analisadas quimicamente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para caracterização dos polissacarídeos e da composição monossacarídica; por *Ultra-high-Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry* (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*) para determinação do perfil putativo dos compostos hidrofílicos e por Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) e Ionização de Chama (DIC), para análise dos lipídios. Também foi realizada a análise de composição centesimal e a avaliação da atividade antileishmania contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, antiproliferativa contra linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de fígado (HepG2/C3A) e prebiótica contra cepas de *Lactobacillus* e *Bacillus coagulans*. A análise da composição centesimal revelou o predomínio de carboidratos e proteínas em ambos cogumelos. A caracterização dos ácidos graxos por CG e RMN, demonstrou uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), com a predominância do ácido graxo essencial linoleico (ω6) em ambos os cogumelos avaliados. Nas análises por *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*, em relação ao cogumelo *L. crinitus*, foram identificados aminoácidos, cromononas e compostos serquiterpênicos, mas principalmente compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Já para *G. stipitatum*, foram identificados vários compostos triterpênicos e fenólicos, bem como ácidos orgânicos. Através da análise de RMN foram identificadas β-glucanas de cadeia principal com ligações β-1→3 e com ramificações do tipo β-1→6 em ambos os cogumelos. A análise da composição monossacarídica demonstrou que a glicose é o principal monossacarídeo nos cogumelos estudados. Os extratos e frações lipídicas de *L. crinitus* apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e de fígado (HepG2/C3A), e antileismania contra as formas promastigostas e amastigotas de *L. amazonensis*, e seus polissacarídeos apresentaram atividade prebiótica. Os extratos, frações lipídicas e hidrofílicas de *G. stipitatum* apresentaram atividade antileishmania contra ambas as formas de *L. amazonensis*. Conclui-se que, os extratos e frações de *L. crinitus* e *G. stipitatum* são alternativas promissoras para obtenção de compostos bioativos com atividades antileishmania, antiproliferativa e prebiótica, além de serem valiosos do ponto de vista nutricional.

Palavras-chave: Compostos bioativos, compostos fenólicos, ácidos graxos, polissacarídeos, atividade biológica.

ABSTRACT

SANTOS FILHO, J. R., 2024. CHEMICAL CHARACTERIZATION, BIOLOGICAL ACTIVITY AND APPLICATIONS OF NATURAL METABOLITES OBTAINED FROM THE MUSHROOMS *Lentinus crinitus* and *Ganoderma stipitatum*. Ph.D. Thesis, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 188 p.

Mushrooms have been used for food and medicinal purposes for thousands of years, and their medicinal activity has been attributed to numerous bioactive metabolites present in the vegetative mycelium, but mainly in the basidiocarps. The biological effects of mushrooms vary depending on the fungal species and the chemical nature of the metabolites they contain. The basidiomycete *Lentinus crinitus* (L.) Fr is a native Brazilian fungus of pantropical occurrence, which produces edible fruiting bodies with medicinal, nutritional, and biotechnological applications. *Ganoderma stipitatum* is a mushroom belonging to the Ganodermataceae family, distributed in countries such as Brazil, Peru, Bolivia, Venezuela, and India. The objectives of the work were: To carry out the profile and characterization of different classes of bioactive compounds and evaluate the biological potential of the mushrooms of *L. crinitus* and *G. stipitatum*. The extracts were obtained by maceration of the basidiocarps, to obtain lipid extracts (Chloroform:methanol:isopropanol), for hydrophilic compounds (Methanol; liquid liquid partition), by Brigh and Dyer (fatty acids), and sequential extractions under reflux to obtain polysaccharides. The samples were chemically analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), to characterize the polysaccharides and monosaccharide composition by Ultra-high-Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) to determine the putative profile of hydrophilic compounds and, by Gas Chromatography (GC) coupled to Mass Spectrometry (MS) and Flame Ionization (FID), for lipid analysis. Proximate composition analysis and evaluation of antileishmanial activity against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*, antiproliferative activity against breast cancer cell lines (MCF-7) and liver cancer (HepG2/C3A) and prebiotic against strains of *Lactobacillus* and *Bacillus coagulans*. The proximate composition analysis revealed the predominance of carbohydrates and proteins in both mushrooms. The characterization of fatty acids by gas GC and NMR demonstrated a significant a amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAS), with the predominance of the essential fatty acid linoleic acid (ω6) in both mushrooms evaluated. In analyzes by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, concerning to the *L. crinitus* mushroom, amino acids, chromones, and sesquiterpene compounds were identified, but mainly phenolic compounds and organic acids. For *G. stipitatum*, several triterpene, phenolic compounds, and organic acids were identified. Through NMR analysis, β-glucans with a main chain with β-1→3 bonds and a branched chain with glucose units with a β-1→6 bond were identified in both mushrooms. T the monosaccharide composition demonstrated that glucose is the main monosaccharide in the mushrooms studied. The extracts and lipid fractions of *L. crinitus* showed antiproliferative activity against breast (MCF-7) and liver (HepG2/C3A) cancer cell lines and antileismania against the promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, and its polysaccharides showed prebiotic activity. The extracts, lipid, and hydrophilic fractions of *G. stipitatum* showed antileishmanial activity against both forms of *L. amazonensis*. It is concluded that extracts and fractions of *L. crinitus* and *G. stipitatum* are promising alternatives for obtaining bioactive compounds with antileishmanial, antiproliferative, and prebiotic activities, in addition to being valuable from a nutritional point of view.

Keywords: Bioactive compounds, phenolic compounds, fatty acids, polysaccharides, biological activity.

INTRODUÇÃO

Antropologicamente, os cogumelos fazem parte da dieta humana desde o tempo em que grupos humanos eram caçadores e coletores de alimentos, de acordo com a cronologia da evolução cultural (WANI, 2010). Estima-se que a domesticação de cogumelos silvestres tenha se iniciado na China em 600 a. C. com o cogumelo *Auricularia auricula* em toras, e que o cultivo em substrato composto se iniciou na França em meados de 1600 (MILES; CHANG, 2004). Utilizados desde a antiguidade como fonte de alimento, os fungos são considerados atualmente como um dos maiores produtores de metabólitos com atuação na prevenção e cura de várias doenças (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2012).

O uso de cogumelos expandiu-se amplamente e tem despertado o interesse da área científica, não só como alimento, mas também na área de produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosmecêuticos devido a seus efeitos benéficos sobre a saúde humana (FERREIRA et al., 2010, WANG et al., 2016). A presença de compostos bioativos específicos torna esses cogumelos valiosos terapeuticamente, apresentando atividades desde o fortalecimento do sistema imunológico até a cura e prevenção de doenças que ameaçam a vida (WASSER; WEIS, 1999; WASSER, 2014).

Entre os cogumelos, *Lentinus crinitus* (L.) Fr. é um basidiomiceto comestível (Polyporaceae), com aplicações medicinais, nutricionais e biotecnológicas (NIEBISCH et al., 2010). Apresenta distribuição pantropical e neotropical (SILVA; GIBERTONI, 2006), ocorrendo principalmente no Brasil (GROPOSO; LOGUERCIO-LEITE, 2005; GOMES-SILVA; GIBERTONI, 2009).

Os cogumelos pertencentes ao gênero *Ganoderma* P. Karst. (Ganodermataceae, Polyporales), podem ser considerados os que apresentam registros mais antigos para uso medicinal, sendo usados por asiáticos, principalmente pelos chineses, há mais de 2000 anos (CHANG; BUSWELL, 1996). Segundo Zjawiony (2004), muitos autores consideram os fungos Polyporales como uma das principais fontes de produtos naturais farmacologicamente ativos.

O uso medicinal de espécies de *Ganoderma* é muito antigo e extremamente representativo na Ásia, mas devido a sua textura e sabor, várias espécies do gênero não são consideradas comestíveis, mas são usadas na forma de decoctos, concentrados, licores ou em pó, usados em tônicos, tinturas, chás, sopas e fórmulas à base de plantas (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002).

A experiência no uso etnomedicinal de cogumelos, a necessidade ecológica para que os fungos produzam metabólitos secundários bioativos e as possibilidades de melhoramento

genético, análises químicas e farmacológicas, é suposto que os cogumelos tenham um grande potencial a ser investigado por bioprospecção (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005). O interesse pelos compostos bioativos de origem natural tem crescido nas últimas duas décadas, de acordo com a eficácia de tais compostos contra várias doenças (DALETOS et al., 2018).

OBJETIVOS GERAIS

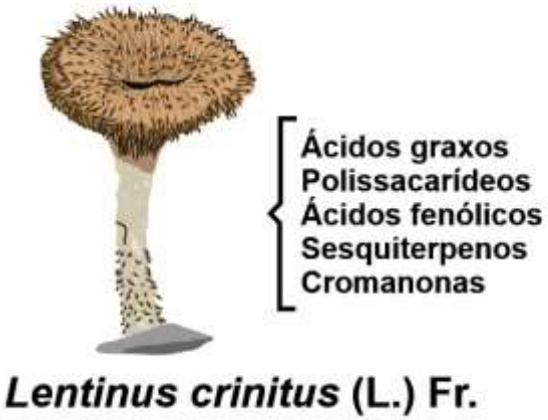
Capítulo 1. Realizar um levantamento bibliográfico aprofundado sobre a espécie *Lentinus crinitus* nos principais bancos de dados (ScienceDirect, Google Acadêmico, PubMed, Scielo, Scifinder, MEDLINE, LILACS).

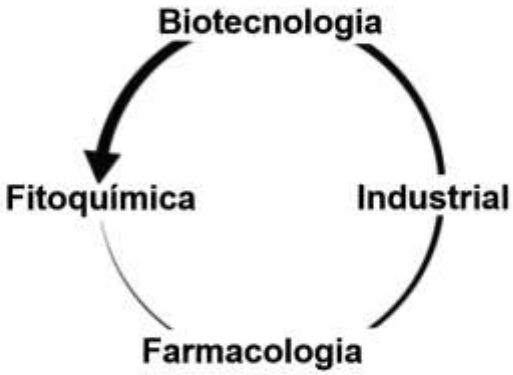
Capítulo 2. Caracterização química, atividade biológica e aplicações de metabólitos naturais obtidos de *Lentinus crinitus*

Capítulo 3. Caracterização química e atividade biológica de metabólitos naturais obtidos do cogumelo *Ganoderma stipitatum.*

CAPÍTULO 1

Lentinus crinitus: uso tradicional, micoquímico, atividades farmacológicas, aplicações industriais e biotecnológicas





REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Características de *Lentinus crinitus*

Lentinus crinitus (L.) Fr. foi descrito por Linnaeus e relatado e identificado por Friesé em 1825. Possui vários sinônimos e combinações de nomes como *Agaricus essequeboensis* G. Mey., *Lentinus chaetoloma* Fr., *Lentinus crinitus* var. *denudatus* Pilát, *Lentinus crinitus* var. *escamulo* Pilát, *Lentinus crinitus* var. *subcervinus* (Berk. & MA Curtis) Pilát, *Lentinus crinitus* var. *subcrinitus* Pilát, *Lentinus crinitus* var. subviloso Pilát, *Lentinus essequeboensis* (G. Mey) Fr., *Lentinus microloma* Pat. & R. Heim, *Lentinus rigidulus* Berk. & MA Curtis, *Lentinus subcervino* Berk. & MA Curtis, *Lentinus wrightii* Berk. & MA Curtis, *Panus crinitus* (L.) Cantor, *Panus wrightii* Berk. & MA Curtis, *Polyporus phyllostipes* D. Krüger e *Agaricus crinitus* L. (ambíguo) (BÁNKI et al., 2022). Esta espécie pertence ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Polyporaceae e gênero *Lentinus*. O nome *Lentinus* é derivado do latim "*lent*" (flexível) e "*inus*" (semelhante) (ARYA; RUSEVSKA, 2022), e o gênero contém 113 espécies (THE CATALOG OF LIFE PARTNERSHIP, 2022), ocorrendo em todo o mundo, enquanto nove espécies são encontradas distribuídas pelo Brasil.

Embora usados como sinônimos, os gêneros *Lentinus* e *Panus* diferem na classificação botânica quanto ao sistema de hifas dimíticas, com hifas esqueleto-ligante para *Lentinus* spp. e hifas esqueléticas para *Panus* spp., conexões de fixação de hifas para *Lentinus* spp. e ausência destes para *Panus* spp., e pleurocistídios ausentes para *Lentinus* spp. e presentes (gloeocistídios ou esclerocistídios) para *Panus* spp. (NJOUONKOU et al., 2013).

L. crinitus é um fungo da podridão branca e a principal característica do basidiocarpo (corpo de frutificação) é um píleo com 2,5–7,5 cm de largura, forma convexa com centro deprimido a funil, margem geralmente voltada para baixo, superfície seca coberta por pelos pálidos radiantes densos (marrom amarelado a marrom avermelhado escuro), sedoso no centro, e a superfície do píleo abaixo dos pelos é esbranquiçada quando jovem, tornando-se marrom amarelado pálido com a idade (Figura 1**A**) (BESSETTE et al., 2021; ELLIOTT; STEPHENSON, 2018) .

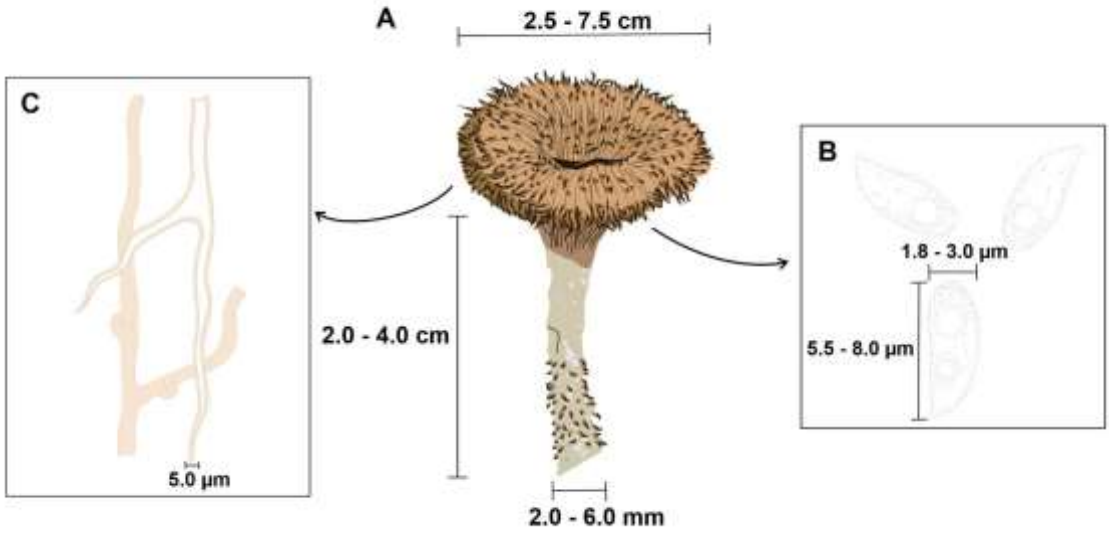


Figura 1. Representação das estruturas do micélio reprodutor de *L. crinitus*; **A)** Corpo de frutificação; **B)** Basidiósporos; **C)** Sistema de hifas generativas e esqueleto-ligadoras. Fonte: O autor, 2023.

Anexado ao píleo está um estipe de 2,0 a 4,0 cm de comprimento e 2,0 a 6,0 mm de espessura, geralmente com um pequeno bulbo na base. O estipe não é oco, tem textura coriácea, superfície ligeiramente rugosa e é colorido como o píleo, mas geralmente mais claro (Figura 1**A**). Além disso, possui basidiósporos brancos de 5,5–8,0 × 1,8–3,0 µm, arredondados, lisos, não amilóides (Figura 1**B**) e um sistema de hifas monomíticas, com grampos de conexão presentes, generativas e ligadoras de esqueleto (Figura 1**C**) (BESSETTE et al., 2019; BESSETTE et al., 2021).

O basidiomiceto saprofítico *L. crinitus* tem ocorrência pantropical, estando distribuído em 27 países. Na América do Sul: Brasil (CARLOS JR; WELCH, 2018), Colômbia (LÓPEZ-LEGARDA et al., 2020), Peru (UIO , 2022), Equador, Venezuela (RAMIREZ et al., 2021), Guiana Francesa (SCHIMANN et al., 2019), Guiana (ORRELL; HOLLOWELL, 2020) e Argentina (GRANT et al., 2021); na América do Norte: Estados Unidos e México (BESSETTE et al., 2019; SINGH et al., 2021); na América Central: República Dominicana, Belize (TENNESSEE, 2022), Costa Rica (DUKE, 2021), Bahamas, Jamaica, Cuba, Haiti (RAMIREZ et al., 2022), Martinica, Guatemala, Panamá, Honduras, Nicarágua, Trinidad e Tobago e Ilhas Cayman (GRANT et al., 2021); na África: Congo (BR, 2022) e Etiópia (ABATE; ABRAHAM, 1994); e na Ásia: Filipinas (GRANT et al., 2021) (Figura 2**A**).

No Brasil, a ocorrência de *L. crinitus* ocorre nas regiões Norte (Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia), Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo e São Paulo) e Sul

(Paraná e Santa Catarina), abrangendo quatro biomas **(**Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal) (Figura 2**B**) (REFLORA, 2022). Eles se desenvolvem naturalmente ao longo do ano, e estão espalhados em grupos ou aglomerados em troncos de árvores (decompositor de madeira) e folhas largas em decomposição expostas ao sol e ao solo da floresta (ELLIOTT; STEPHENSON, 2018).

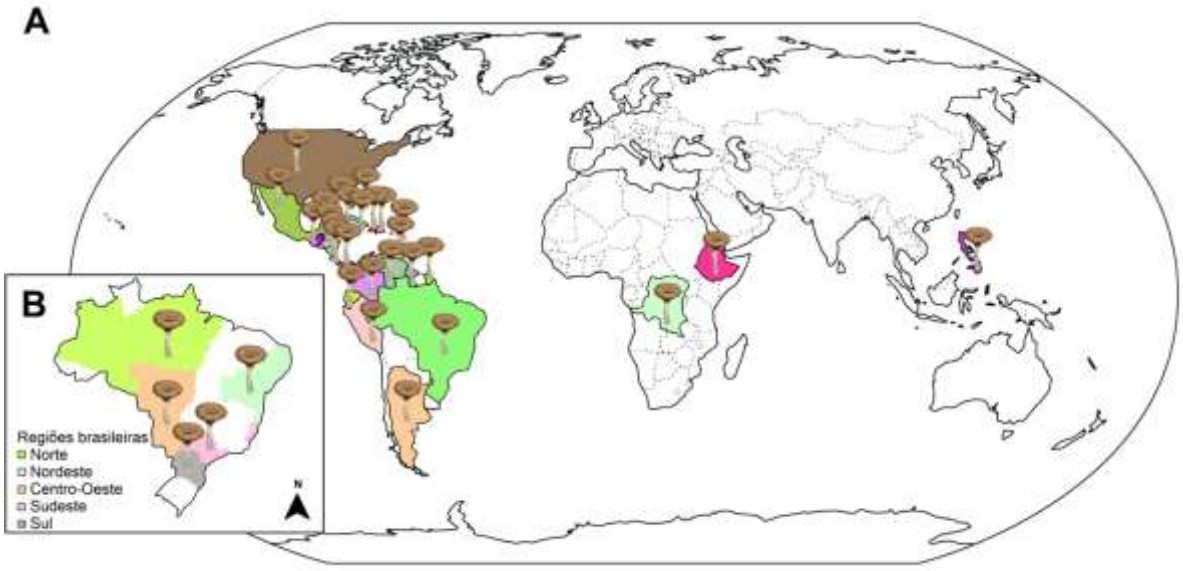


Figura 2. Distribuição geográfica do cogumelo *L. crinitus*: **A)** Mundial (27 países); e **B)** Brasil (5 regiões brasileiras). Fonte: O autor, 2023.

1.2. Valor nutricional

Os cogumelos possuem grande valor nutricional, pois são ricos em proteínas e pobres em gordura, e possuem um teor significativo de aminoácidos e fibras essenciais, além de serem fonte de vitaminas (B1, B2, B12, C, D e E) (MATTILA et al., 2001; HELENO et al., 2010). De acordo com Sharma e Atri (2014), *Lentinus* spp. têm grande potencial para desenvolvimento industrial como produtos nutracêuticos, porque os espécimes selvagens geralmente possuem aminoácidos, ácidos graxos poli-insaturados, compostos fenólicos e polissacarídeos.

Machado et al. (2016) avaliaram a composição nutricional do basidiocarpo de *L. crinitus* cultivado em substrato à base de exocarpo de *Theobroma grandiflorum* e relataram um conteúdo variando de 10,9 a 11,8% de umidade, 25,9 a 27,0% de proteína, 3,3 a 4,5% de gordura, 4,9 % de cinzas, 41,1 a 53,5% de carboidratos, 6,3 a 11,3% de fibra, 4,6 a 6,3% de nitrogênio e um conteúdo energético de 314,14 a 324,33 kcal/100 g. Para o basidiocarpo de *L. crinitus* cultivado em bagaço de cana e casca de arroz o teor foi de 13% de proteína, 0,5% de

gordura, 4,2% de cinzas, 82,4% de carboidratos e valor energético de 385,4 kcal/100 g (BERTÉLI et al., 2021a).

O basidiocarpo de *L. crinitus selvagem* coletado no bioma Cerrado brasileiro foi relatado como tendo 61% de umidade, 14% de proteína, 1,5% de gordura, 26% de fibra e 3,4% de minerais (SILVA NETO et al., 2019). Bertéli et al. (2022) analisaram o píleo e o estipe de *L. crinitus* cultivados em bagaço de cana e casca de arroz, e relataram os valores respectivos de 14,4 e 9,5% de proteínas, 0,5% de gordura, 4,2 e 2,6% de cinzas e 80,8 e 87,3% de carboidratos, com valores energéticos de 385,5 e 392,15 kcal/100 g.

1.3 Biocompostos e bioatividades

Figueiredo e Silva (2014) relataram atividade antifúngica do extrato hidroetanólico de *L. crinitus* contra *Fusarium* sp. com 92% de inibição da esporulação de conídios e 25% de inibição de escleródios (aglomerados de hifas). Segundo Abate e Abraham (1994), dois compostos isolados do extrato de acetato de etila de *L. crinitus*, 1-desoxihipnofilina (**1**) e 6,7-epoxi-4(15)-hirsuteno-5-ol (**3**), exibiram atividade antimicrobiana contra 11 espécies de microrganismos, com maior atividade contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Mucor rouxii*.

Segundo Bertéli et al. (2021a), o extrato de basidiocarpos inteiros de *L. crinitus* apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Penicillium ochrochloron*, *Aspergillus ochraceus* e *Trichoderma viride*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato variaram de 0,12 a 0,49 mg/mL e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) variaram de 0,24 a 0,60 mg/mL contra bactérias, enquanto contra fungos, os valores de CIM variaram de 0,03 a 0,49 mg/mL e as concentrações mínimas de fungicidas (CFM) variaram de 0,06 a 0,60 mg/mL. No geral, o extrato de basidiocarpo apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra todas as bactérias estudadas com melhores valores de CIM e CBM do que a maioria dos controles, bem como atividade fungistática e fungicida contra todos os fungos testados, com melhores valores de CIM e CFM do que a maioria dos controles. Portanto, o extrato de basidiocarpo *de L. crinitus* tem potencial de utilização para o controle de microrganismos importantes na alimentação e saúde.

Na sequência, Bertéli et al. (2021b) prepararam extratos de píleo e estipe de basidiocarpo de *L. crinitus* e os testaram contra microrganismos (fungos e bactérias) associados à deterioração de alimentos. Os extratos hidrometanólicos de píleo e estipe demonstraram efeito

bacteriostático, com valores de CIM de 0,20 a 0,40 mg/mL (pileus) e de 0,12 a 0,40 mg/mL (estipe), com maior efeito observado contra *Pseudomonas aeruginosa e* S. *enterica*. Um efeito fungistático também foi relatado; os valores de MIC para o píleo e estipe variaram de 0,03 a 0,50 mg/mL, sendo *A. niger* e *Trichoderma virens* os mais suscetíveis.

Segundo Bertéli et al. (2022), extratos do píleo e estipe do basidiocarpo de *L. crinitus* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias como *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. enterica*, *Bacillus cereus*, e *Enterobacter cloacae*; e fungos como *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Aspergillus versicolor*, *P. ochrochloron*, *Talaromyces funiculoso*, e *T. virens*, e dois fungos isolados de alimentos, *A. ochraceus* e *Penicillium aurantiogriseum*. Os extratos do píleo e estipe apresentaram atividade bacteriostática e bactericida contra todas as bactérias avaliadas, com valores de MIC variando de 0,20 a 0,40 mg/mL (pileus) e de 0,12 a 0,40 mg/mL (estipe), e valores de MBC variando de 0,40 a 0,50 mg/ mL para ambos os extratos. Contra os fungos, os extratos de píleo e estipe apresentaram atividade fungistática e fungicida, com valores de MIC variando de 0,03 a 0,50 mg/mL e valores de MFC variando de 0,06 a 0,60 mg/mL.

O cultivo de *L. crinitus* U9-1 sob luzes verde e vermelha aumentou a concentração dos ácidos benzóico (950 µg/g) e gálico (85,2 µg/g), respectivamente, nos extratos hidroalcoólicos. A biomassa micelial cultivada sob luz vermelha apresentou maior atividade antioxidante nos ensaios DPPH (metade da concentração inibitória máxima, IC_{50} de 76,7 mg/mL) e FRAP (IC_{50} de 23,0 mg/mL). Além disso, os resultados do ensaio de co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico (BCLA) indicaram que a atividade antioxidante dos extratos foi afetada pelo cultivo com luz. A biomassa micelial cultivada em todas as condições exibiu atividades antibacteriana (valores de CIM variando de 0,5 a 4 mg/mL) e antifúngica (0,5 a 1 mg/mL) (HALABURA et al., 2023).

Bertéli et al. (2021b) verificaram que a atividade antioxidante dos extratos de basidiocarpo piloso e estipe, avaliada pelo método DPPH, foi de 99,1 mg/mL e 197 mg/mL, respectivamente. Esses resultados indicam que ambos os extratos possuem propriedades antioxidantes, embora com maior potência observada no extrato de píleo em relação ao extrato de estipe. Usando o método pelo radical FRAP, os autores demonstraram que o extrato de píleo exibiu uma atividade antioxidante 3,4 vezes maior (IC_{50} de 35,1 mg/mL) em comparação com o composto de controle Trolox (análogo solúvel em água da vitamina E), enquanto o extrato de estipe apresentou uma atividade antioxidante 2,5 vezes maior (IC_{50} de 26,1 mg/mL) do que o Trolox. Essas descobertas sugerem que os extratos de píleo e estipe possuem um potencial antioxidante substancial.

Além disso, foram avaliados os efeitos protetores dos extratos na oxidação do β-caroteno. Na concentração de 100 mg/mL, os extratos de píleo e estipe protegeram 56% e 42% do β-caroteno da oxidação, respectivamente, enfatizando ainda mais suas propriedades antioxidantes. Essa atividade observada nos extratos do basidiocarpo piloso e estipe, determinadas pelos ensaios FRAP e BCLA, foram comparáveis as exibidas por antioxidantes naturais, ácidos fenólicos e ácidos polares orgânicos, presentes em *L. crinitus*, bem como o tocoferol, sugerindo seu potencial como fonte natural de antioxidantes (BERTÉLI et al., 2021b).

Segundo Fonseca et al. (2021), o extrato metanólico de *L. crinitus* apresentou efeito atóxico no teste de ecotoxicidade contra *Artemia salina*, com dose letal mediana (DL_{50}) >1000 μg /mL em 24 h. Por simulações *in silico* de *docking* molecular, os autores também sugeriram que o extrato poderia inibir o vírus Zika. Além disso, os autores relataram atividade antioxidante de 62,4%, avaliada pelo ensaio DPPH. Segundo Umeo et al. (2015), o exopolissacarídeo extraído do basidiocarpo de *L. crinitus* também apresentou atividade antioxidante contra o radical DPPH, com 5,8 ± 0,2% de quercetina/mg de exopolissacarídeo.

Polissacarídeos isolados de basidiocarpos de *L. crinitus* coletados em floresta tropical apresentaram atividade antiproliferativa em células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), com valores de IC_{50} superiores a 200 μg /mL. Além disso, esses polissacarídeos poderiam ativar macrófagos J774, conforme determinado por um aumento na produção de óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa (TNFα), que são indutores de apoptose de células tumorais, após o tratamento. Os autores levantam a hipótese de que os compostos poderiam ativar a resposta inata levando a uma melhor atividade antitumoral *in vivo* (LÓPEZ-LEGARDA et al., 2020). Neste trabalho, foi confirmada a presença de α e β-glucanas nos extratos de *L. crinitus,* sendo que quase 10% dos polissacarídeos extraídos de *L. crinitus* eram glucanos, sendo 90% deles β-glucanos.

De acordo com Erkel et al. (1996), o composto panepoxidona (**8**) isolado do extrato de acetato de etila da cepa 9325 de *L. crinitus* inibiu 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e TNFα, e o fator nuclear kappa β mediado pelo ácido okadaico (OA) (NF- κ B) em células COS-7 e HeLa S3 com IC_{50} de 1,5–2 μg/mL. A panepoxidona inibiu a ativação do NF- κ B impedindo a fosforilação do IκB proteína, interrompendo assim a via de sinalização.

A biossíntese de nanopartículas de prata com extrato aquoso de *L. crinitus* demonstrou ação antimicrobiana contra *Candida tropicalis* (CIM de 1,88 μg/mL), *C. albicans* (CIM de 30,09 μg/mL) e *E. coli* e *S. aureus* (CIM de 7,52 μg/mL). Para os autores, *L. crinitus* constitui

um biorrecurso promissor para a síntese biológica de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas relevantes (MAGALHÃES et al., 2022).

Segundo Flórez-Sampedro et al. (2016), o extrato enzimático em lacase de *Lentinus* sp. inibiu a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1; células U373-MAGI) em 86,4% a uma concentração de 2466 U/L e o índice de seletividade (SI) foi de 8,3, demonstrando a potencial atividade anti-HIV e possível exploração de uma terapia alternativa contra a infecção pelo HIV-1.

No estudo de Bertéli et al. (2021a), foram quantificados os açúcares, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos em *L. crinitus*, cujos resultados são apresentados na Tabela 1. Os autores verificaram que o açúcar solúvel predominante nos basidiocarpos de *L. crinitus* era a trealose, responsável por aproximadamente 80% do conteúdo total. A sacarose constituiu aproximadamente 16% dos açúcares solúveis, enquanto o manitol representou aproximadamente 4%. Dentre os ácidos orgânicos analisados, o ácido málico foi o mais abundante, respondendo por aproximadamente 84% do teor total de ácidos orgânicos. Isto foi seguido por ácido oxálico em aproximadamente 15% e ácido fumárico em menos de 1%. O principal ácidos fenólico identificado foi o ácido *p*-hidroxibenzóico e um precursor complexo de compostos fenólicos denominado ácido cinâmico.

Em outro estudo realizado por Bertéli et al. (2021b), foi feita uma comparação entre os ácidos orgânicos e os açúcares solúveis presentes no píleo e estipe de *L. crinitus*. Verificou-se que o píleo contém níveis mais elevados de ácidos orgânicos em comparação com o estipe, sendo os ácidos málico e oxálico os predominantes. O ácido málico era mais abundante no píleo do que no estipe, enquanto o estipe continha pequenas quantidades de ácido oxálico. De fato, o ácido málico representou 83% e 100% do total de ácidos orgânicos no píleo e no estipe, respectivamente. O estipe também exibiu maiores teores de ácidos fenólicos em relação ao píleo, sendo o ácido *p*-hidroxibenzóico e o ácido cinâmico os componentes majoritários. Notavelmente, o ácido *p*-hidroxibenzóico constituiu quase 100% dos ácidos fenólicos tanto no píleo quanto no estipe. O ácido cinâmico, por outro lado, serve como precursor de outros compostos fenólicos complexos e é conhecido por suas várias atividades biológicas, incluindo anticancerígena, antituberculose, antimalárica, antifúngica, antibacteriana, antiaterosclerótica e antioxidante (BERTÉLI et al., 2021b)

Além disso, o estipe apresentou maiores teores de açúcares solúveis totais em relação ao píleo, principalmente devido à maior concentração de sacarose. No entanto, o estipe apresentou níveis mais baixos de manitol em comparação com o píleo. A trealose representou aproximadamente 88% e 82% do teor total de açúcares solúveis no píleo e no estipe,

respectivamente. Vale ressaltar que o basidiocarpo *L. crinitus*, já consumido pelo povo Yanomami, representa uma fonte potencial de trealose.

Tabela 1. Composição química dos açúcares, ácidos orgânicos e ácidos fenólicos de *L. crinitus*

	BERTÉLI et al. (2021a)	BERTÉLI et al. (2021b)	
Compostos	**Basidiocarpo**	**Píleo**	**Estipe**
Açúcares (g por 100 g)			
Manitol	0,18	0,18	0,08
Sacarose	0,73	0,26	0,69
Trealose	3,50	3.13	3.20
Açúcares solúveis totais	4,40	3.57	3,97
Ácidos orgânicos (mg por 100 g)			
Ácido oxálico	132	165	Tr
ácido málico	730	801	137
Ácido fumárico	0,03	0,04	Tr
Ácidos orgânicos totais	863	966	137
Ácidos fenólicos (µg por 100 g)			
ácido *p* -hidroxibenzóico	724	537	791
ácido cinâmico	105,50	81.20	38.20
Ácidos fenólicos totais	724	537	791

tr: traços; g: gramas; mg: miligramas.

Em relação aos compostos lipofílicos presentes no basidiocarpo, observou-se que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) constituíram o grupo predominante, superando tanto os ácidos graxos saturados (AGS) quanto os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) em abundância, conforme indicado na Tabela 2. Análise de a fração lipídica levou à identificação de um total de 21 ácidos graxos no basidiocarpo, sendo o ácido linoleico o mais destacado, respondendo por 66,4% da composição total. O ácido palmítico seguiu com uma contribuição de 11,2%, enquanto o ácido oleico constituiu 9,8% do teor total de ácidos graxos (BERTÉLI et al., 2021a).

Bertéli et al. (2021b) mostraram que as frações lipídicas do píleo do basidiocarpo e estipe exibiram composições semelhantes, conforme determinado por análises de cromatografia gasosa (GC), com um total de 21 ácidos graxos identificados. Dentre esses ácidos graxos, os AGPIs constituíram a classe predominante, respondendo por aproximadamente 63% do total, seguidos pelos AGSs com aproximadamente 23% e os AGMIs com aproximadamente 14%. Vale ressaltar que o píleo e o estipe apresentaram quantidades comparáveis de cada ácido lipofílico (Tabela 2).

Os compostos primários encontrados tanto no píleo quanto no estipe eram da série C18, incluindo ácido linoleico (~60%) e ácido oleico (~13%), e da série C16, como o ácido palmítico (~13%). Além destes, o píleo e o estipe do basidiocarpo continham proporções significativas de ácidos graxos insaturados, como os ácidos araquídico, eicosenóico, *cis*-11,14-

eicosadienóico, *cis*-11,14,17-eicosatrienóico e heneicosanóico, cada um representando aproximadamente 0,2% da série C20. Além disso, também estava presente o ácido behênico (~2,5%) da série C22:0, que, apesar de estar presente em pequenas quantidades, tem importância como ácido graxo essencial (Tabela 2).

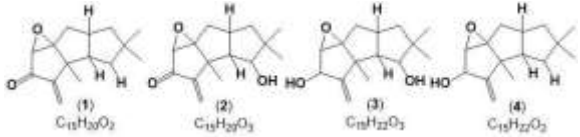
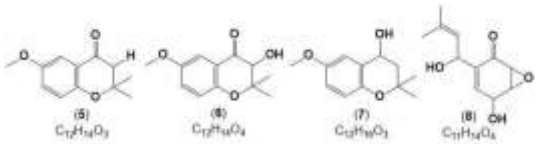
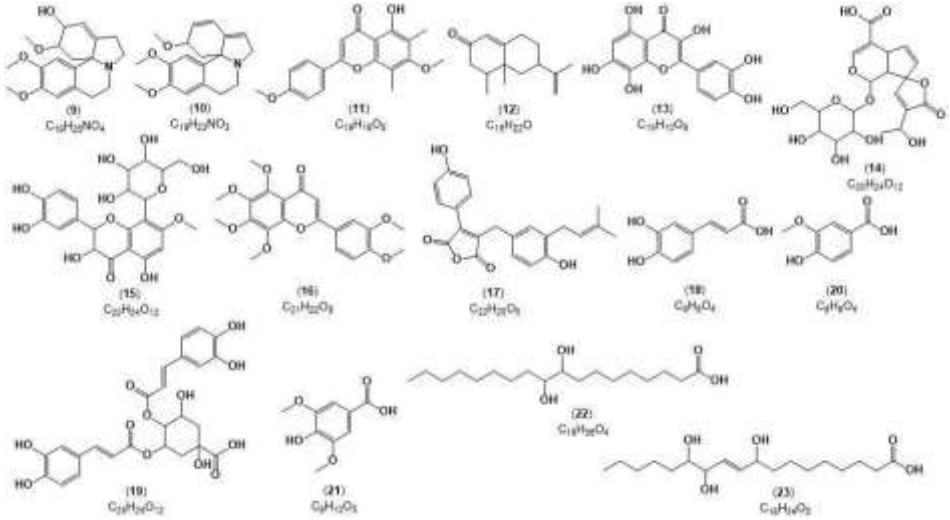
Tabela 2. Composição química dos ácidos graxos do *L. crinitus* em porcentagem relativa por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC)

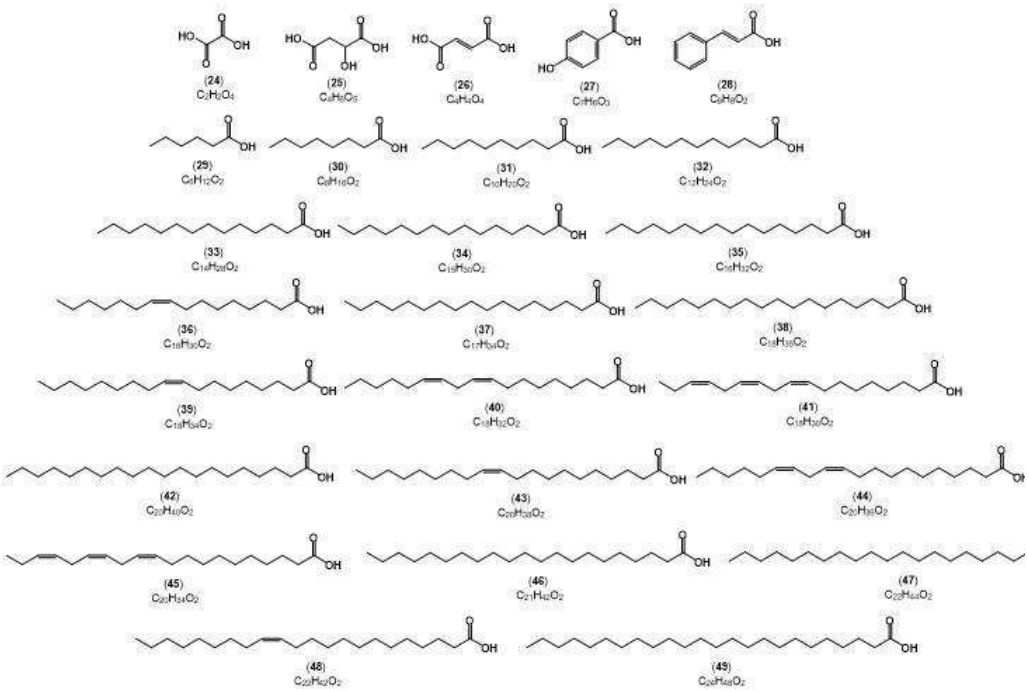
	BERTÉLI et al. (2021a)	BERTÉLI et al. (2021b)	
Ácido graxo (%)	**Basidiocarpo**	**Píleo**	**Estipe**
Ácido capróico (C6:0)	0,116	0,264	0,317
Ácido caprílico (C8:0)	0,143	0,317	0,189
Ácido cáprico (C10:0)	0,205	0,660	0,123
Ácido láurico (C12:0)	0,390	0,546	0,463
Ácido mirístico (C14:0)	1.05	1.23	1.33
Ácido pentadecanóico (C15:0)	1.27	0,919	1,77
Ácido palmítico (C16:0)	11.23	13.40	12.80
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,32	0,216	0,360
Ácido heptadecanóico (C17:0)	0,65	0,420	0,77
Ácido esteárico (C18:0)	2.38	2,94	2.23
Ácido oleico (C18:1n-9)	9.8	13.5	12.65
Ácido Linoleico (C18:2n-6)	66,4	59,9	61,80
α - Linolênico ácido (C18:3n-3)	1,80	2.04	1.20
Ácido araquídico (C20:0)	0,253	0,244	0,197
eicosenóico (C20:1)	0,072	0,297	0,118
cis -11,14-eicosadienóico (C20:2)	0,46	0,326	0,28
cis -11,14,17-eicosatrienóico e ácido heneicosanóico (C20:3n-3 + C21:0)	0,55	0,271	0,51
Ácido beénico (C22:0)	2.3	2.31	2.452
Ácido erúcico (C22:1n-9)	0,082	0,053	0,058
Ácido lignocérico (C24:0)	0,52	ND	0,393
Ácidos graxos saturados totais (% dos ácidos graxos totais)	20,5	23.23	23,0
Ácidos graxos monoinsaturados totais (% dos ácidos graxos totais)	10.29	14.3	13.18
Ácidos graxos poli-insaturados totais (% dos ácidos graxos totais)	69.2	62,5	63,74

ND: não detectado

Alguns metabólitos já foram identificados (**1** – **49**) nos extratos de *L. crinitus* e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Fitoquímicos identificados e/ou detectados em *L. crinitus.*

Metabólitos	**Metodologia analítica**	**Estrutura química**	**Referência**
1-desoxihipnofilina (**1**), hipnofilina (**2**), 6,7-epoxi-4(15)-hirsuteno-5-ol (**3**), dihidrohiponfilina (**4**)	EMAR e RMN (^{13}C)		ABATE et al. (1994)
2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**5**), 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona (**6**), 2,2-dimetil-6-metoxi-4- cromomol (**7**) e panepoxidona (**8**)	EMAR e RMN (^{1}H e ^{13}C)		ABRAHAM; ABATE (1995)
Eritratidina (**9**), erisotrina (**10**), eucaliptina (**11**), (+)-nookatone (**12**), gossipetina (**13**), 15-demetilplmerida (**14**), noidesol (**15**), nobiletina (**16**), asperterona (**17**) , cafeico (**18**), 3,4-di-O-cafeoilquínico (**19**), vanílico (**20**), siringico (**21**), 9,10-diidroxiestearato (**22**) e ácidos pinelico (**23)**	CLAE/EM		FONSECA et al. (2021)

Oxálico (**24**), málico (**25**), fumárico (**26**), p-hidroxibenzóico (**27**), cinâmico (**28**), capróico (**29**), caprílico (**30**), cáprico (**31**), láurico (**32**), mirístico (**33**), pentadecanóico (**34**), palmítico (**35**), palmitoleico (**36**), heptadecanóico (**37**), esteárico (**38**), oleico (**39**), linoleico (**40**), *α*- linolênico (**41**), araquídico (**42**), eicosenoico (**43**), *cis* -11,14-eicosadienóico (**44**), *cis* - 11,14,17-eicosatrienóico (**45**), heneicosanóico (**46**), behênico (**47**), erúcico (**48**) e lignocérico (**49**)	CLAE/PDA; CG/DIC		BERTÉLI et al. (2021a)

CLAE/PDA: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Matriz de Fotodiodos; CLAE/EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas; CG/DIC: Cromatografia Gasosa com Detecção de Ionização de Chama; EMAR: Espectrometria de Massas de Alta Resolução; RMN: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^{1}H) e carbono (^{13}C).

1.4 Cultivo *in vitro*

Maior controle e otimização da bioprodução de biomassa micelial fúngica (micélio vegetativo) e basidiocarpo (micélio reprodutivo) podem ser obtidos por meio de métodos biotecnológicos, devido à padronização da composição do meio de cultura e das condições de cultivo. Esses métodos superam as variações ambientais experimentadas no cultivo *in natura* de fungos (COLLA et al., 2020).

A biomassa de *L. crinitus* já foi avaliada por meio de cultivo *in vitro* em diversas condições. Abate e Abraham (1994) utilizaram pela primeira vez um sistema submerso em um agitador rotativo a 150 rpm, cultivando *L. crinitus* em frascos contendo meio de cultura com fonte de carbono de maltose e glicose (com adição de micronutrientes e macronutrientes) por um período de 14 dias, apresentando maior crescimento micelial. Posteriormente, foi testado outro sistema com meio de cultura contendo manose e lactose, além de ácido cítrico monohidratado em pH 4,5 (ABRAHANR; ABATE, 1995). Niebisch et al. (2010) cultivaram a cepa *de L. crinitus* IOC 4579 em placas de meio mínimo sólido (SMM) contendo glicose e ágar bacteriológico a um pH de 6,8 e a 28 ± 2 °C por 7 a 10 dias no escuro.

Meniqueti et al (2021) e Tavares et al. (2020) cultivaram *L. crinitus* em frascos cônicos com bagaço de cana-de-açúcar umedecido com solução nutritiva (contendo glicose e micronutrientes) e solução de nitrogênio a 28 ± 1 °C por 21 dias no escuro. Valle et al. (2014) cultivaram a cepa *L. crinitus* U9-1 em frascos contendo meio líquido constituído por uma fonte de carbono glicose e uma solução de nitrogênio. O meio líquido foi inoculado com meio de ágar extrato de malte (ME) contendo micélios e incubado a 28 °C no escuro. Os resultados mostraram um maior crescimento micelial.

Marim et al. (2018) realizaram a bioprodução de biomassa micelial de *L. crinitus* (U9-1 e U15-9) em meio ME, com pH 5, 6 ou 7; e temperaturas de 22, 25, 28 ou 37 °C por 15 dias sem agitação. O pH inicial afetou linearmente a produção de biomassa micelial. Com relação à temperatura, ocorreu aumento da biomassa micelial para U9-1 quando a temperatura aumentou de 25 para 28 °C, enquanto para U15-9 a biomassa aumentou quando a temperatura aumentou de 28 para 37 °C. Almeida et al. (2018), por outro lado, cultivou *L. crinitu*s U9-1 em ME e ágar incubado a 25 ± 1 °C no escuro por 7 dias. Santana et al. (2018) utilizaram vinhaça de cana-de-açúcar com ureia e suplementada com sulfato de cobre e compostos aromáticos (guaiacol, álcool veratrílico ou 2,5-xilidina) em seu protocolo de cultivo, depois incubados a 28 ± 1 °C no escuro.

Bertéli et al. (2021a), Bertéli et al. (2021b), e Bertéli et al. (2022) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar de usina processadora e casca de arroz de engenho de arroz na proporção de 1:1 (volume:volume) para compor o substrato de cultivo para produção de basidiocarpos *L. crinitus* U9-1, e culturas incubadas a 25 ± 1 °C no escuro por 7 dias.

Davila et al. (2020) avaliaram o crescimento micelial de *L. crinitus* utilizando diferentes agro-resíduos nos meios de cultura (farelo, casca de laranja e casca de arroz em diferentes combinações). Os meios foram preparados com substrato e ágar, pH 6, e esterilizados a 15 psi e 121 °C por 20 min, em seguida, dispensados em placas de Petri estéreis. Em seguida, as placas foram inoculadas com um disco de micélio de 5 mm e incubadas a 28 °C no escuro por 7 dias.

Araújo Conceição et al. (2017) cultivaram basidiocarpos da cepa *L. crinitus* CCMB 553 em meio de batata-dextrose ágar suplementado com extrato de levedura, cevada e resíduos agroindustriais de mandioca. Matos Brito et al. (2019) cultivaram *L. crinitus* em mistura de farelo de arroz e semente de tucumã por 15 dias a 25 °C. *L. crinitus* também foi cultivado usando resíduos de banana (MEJÍA et al., 2005) e endocarpo de manga (VILLANUEVA et al., 2020). Machado et al. (2016) cultivaram *L. crinitus* da linhagem THC 5 em exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) misturado com serapilheira ou farelo de arroz (*Oryza sativa*) na proporção de 2:1 (massa:massa).

No estudo de Bertéli et al. (2021b), o micélio da linhagem *L. crinitus* U9-1, com ramificação homogênea e sem setorização, foi utilizado como inóculo. Para a produção de cogumelos (basidiocarpo), o substrato de cultivo foi bagaço de cana e casca de arroz (1:1) e a relação carbono-nitrogênio (C/N) foi de 48. O cultivo foi mantido a 28 °C até a completa colonização (30 dias), sem ventilação ambiente. A tampa da bolsa de cultura foi então aberta, a temperatura ambiente reduzida para 18 °C por 24 h (choque térmico) e a ventilação foi iniciada para reduzir o dióxido de carbono, enquanto a umidade relativa foi mantida em 80% durante todo o período de cultivo.

Bertéli et al. (2022) avaliaram o impacto das relações C/N e do teor de nitrogênio em formulações de substratos de bagaço de cana e farelo de soja no crescimento micelial e na produção de cogumelos para a cepa *L. crinitus* U9-1 cultivada em estado sólido. Segundo os autores, crescimento micelial, produção e número de cogumelos, eficiência e relação eficiência biológica-tempo (BE/CT) de *L. crinitus* foram maiores quando cultivados em substrato com 1,2% de nitrogênio (relação C/N de 36,6), enquanto a massa do cogumelo permaneceu a mesma, independentemente do teor de nitrogênio do substrato. A colonização do substrato durou 19 dias e a colheita do cogumelo ocorreu após 17 dias, incluindo a formação do primórdio. O teor

de nitrogênio ≥1,8% (relação C/N ≤23,7) no substrato reduziu o crescimento micelial e inibiu completamente a produção de cogumelos.

1.5. Produção de enzimas

O sistema enzimático eficaz dos basidiomicetos da podridão branca, que depende da liberação de oxidases extracelulares como lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e peroxidases multifuncionais, é bem conhecido (ALMEIDA et al., 2018).

Fatores como pH, temperatura e composição do meio são importantes para obtenção de enzimas com interesse industrial (ABIDI et al., 2011). A variação da relação C/N no meio de cultivo, presença de íons metálicos, aeração, entre outros fatores físicos, também podem afetar a produção (JOO; CHANG, 2006).

Na tentativa de estimular a síntese de enzimas ligninolíticas, subprodutos agroindustriais têm sido utilizados em cultivo fúngico submerso durante o processo de produção. Almeida et al. (2018) cultivaram *L. crinitus* em meio líquido com casca de café ou polpa cítrica como única fonte de carbono, juntamente com uréia, relataram produção de lacase, mas não de LiP e MnP. Esses achados concordam com os de Tavares et al. (2020), que relataram que *L. crinitus* U9-1 em cultivo em estado sólido (CES) utilizando bagaço de cana-de-açúcar não resultou na produção de MnP.

A produção máxima de lacase relatada por Valle et al. (2014), que cultivou *L. crinitus* submerso em meios de cultura sintéticos (10 g/L glicose, 2,8 g/L nitrogênio de uréia com etanol e guaiacol como indutores), foi de 15.000 U/L no 12º dia de cultivo. No entanto, Tavares et al. (2020) relataram que CES utilizando bagaço de cana melhorou a produção de lacase em *L. crinitus* em 4,4 vezes mais que o meio de cultura sintético.

MnP e LiP, da mesma forma, não foram observadas quando o *L. crinitus* foi cultivado em um meio líquido sintético com glicose ou frutose adicionada junto com diferentes fontes de nitrogênio (NIEBISCH et al., 2010). Por outro lado, MnP, mas não lacase, foi observada quando *L. crinitus* foi cultivado em CES em uma mistura de resíduos de cevada e mandioca, segundo Araújo Conceição et al. (2017). A combinação de maltose e ureia mostrou ser a que mais induziu a produção de perfis proteicos mais complexos, quando Cambri et al. (2016) cultivaram *L. crinitus* em meios com fontes e concentrações variadas de carbono e nitrogênio.

O pH do meio de cultura é um dos parâmetros mais estudados em processos para determinar as condições ótimas para a produção de enzimas, pois afeta diretamente a atividade de biocatalisadores essenciais para o transporte de nutrientes, bem como para o crescimento e

manutenção da estrutura morfológica de fungos filamentosos (PRIYANKA; JAYA RAJU, 2013; RAJPUT et al., 2016).

Mejía et al. (2005) mostraram que em pH ácido, proteases de *L. crinitus* THC 5 apresentaram o melhor desempenho em pH 5,0. Em pH variando de neutro a alcalino, foi observada uma redução na atividade proteolítica. Moreira Neto et al. (2009) demonstraram que o pH do meio afeta tanto o crescimento quanto a produção de lacase de *L. crinitus* CCB274. Araújo Conceição et al. (2017) mostraram que a atividade enzimática de MnP de *L. crinitus* CCMB 553 teve bom desempenho em uma ampla faixa de pH, que variou de 4 a 8, com a melhor atividade observada em pH 5 (18,65 U/L).

Marim et al. (2018) avaliaram o efeito do pH na produção de lacase em duas linhagens de *L. crinitus* (U9-1 e U15-9). À medida que o pH aumentou, houve uma redução na produção de lacase para a cepa U15-9, mas um aumento para a cepa U9-1. A maior produção de lacase foi em pH 6 para U15-9 com 39 U/mL, enquanto U9-1 produziu 71% menos lacase no mesmo pH. À medida que o pH aumentou de 6 para 7, a produção de lacase em U15-9 e U9-1 diminuiu.

Matos Brito et al. (2019) relataram que *L. crinitus* DPUA 1693 sintetizou a quantidade máxima de proteases quando cultivada em pH 8 (65,78 U/mL); no entanto, as proteases tiveram atividade catalítica máxima em pH 6,0 (77,64 U/mL), mantendo estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 6,0, e com diminuição da atividade em pH mais elevado. Silva Magalhães et al. (2019) avaliaram o efeito do pH na atividade enzimática na faixa de 5 a 10. Em pH ácido, proteases de *L. crinitus* 1825 DPUA 1693 apresentaram o melhor desempenho. Em pH variando de neutro a alcalino, foi observada uma redução na atividade proteolítica.

Segundo Araújo Conceição et al. (2017), a maior taxa de atividade enzimática de *L. crinitus* CCMB 553 foi observada a uma temperatura de 40°C para a enzima MnP, embora a atividade tenha sido observada em uma ampla faixa de temperatura (20 a 50°C). Marim et al. (2018) avaliaram o impacto da temperatura na produção de lacase em duas cepas de *L. crinitus* (U9-1 e U15-9), a maior produção de lacase ocorreu a 28°C tanto para U15-9 (50,0 U/mL) quanto para U9-1 (41,5 U/mL). Comparativamente, U15-9 produziu mais lacase que U9-1 a 22, 25 e 28°C, mas quando a temperatura aumentou de 28 para 37 °C, a produção de U9-1 e U15-9 foi reduzida, indicando uma grande inibição da atividade enzimática do U15-9 em temperaturas mais elevadas.

Matos Brito e et al. (2019) avaliaram o impacto da temperatura na produção e atividade de proteases de *L. crinitus* 1825 DPUA 1693. Os autores relataram que a atividade catalítica máxima foi observada a 50 °C (152 U/mL), com 30% e 33 % de diminuição da atividade a 60 e 70 °C, respectivamente, com estabilidade sendo obtida na faixa de temperatura de 30–50°C.

Silva Magalhães et al. (2019) produziram e caracterizaram enzimas proteolíticas de *L. crinitus* 1825 DPUA 1693. A melhor atividade das proteases de *L. crinitus* foi observada na temperatura de 50°C, enquanto a melhor estabilidade foi a 60°C. Colla et al. (2020) relataram a capacidade de crescimento micelial de *L. crinitus* em meio de cultura de 19 a 40°C, indicando um sistema enzimático operando em condições extremas.

Uma das abordagens mais eficazes para aumentar o rendimento das enzimas ligninolíticas é suplementar o meio nutriente com um indutor apropriado, como cobre e compostos fenólicos (PISCITELLI et al., 2011). A concentração de nitrogênio é outro fator que interfere fortemente na lacase (KACHLISHVILI et al., 2014).

Quando cultivado com cobre (150 ou 250 μM), a atividade da lacase de *L. crinitus* foi aumentada. Quando o guaiacol foi adicionado ao meio de cultura sozinho, não teve efeito significativo, enquanto o álcool veratrílico e a xilidina aumentaram a atividade da lacase. No entanto, a adição simultânea de guaiacol com cobre aumentou a atividade da lacase. A adição simultânea de álcool veratrílico com cobre, da mesma forma, aumentou a atividade da lacase, quando comparada apenas com a adição de cobre, demonstrando sinergismo entre as variáveis guaiacol ou álcool veratrílico e cobre (SANTANA et al., 2018).

Valle et al. (2014) mostraram que a concentração de nitrogênio e $CuSO_4$ no meio de cultura afeta a produção de lacase da cepa *L. crinitus* U9-1. O pico da atividade enzimática (11.977 U/L) ocorreu nas maiores concentrações de nitrogênio (2,8 g/L de nitrogênio). A adição de cobre aumentou ainda mais a atividade da lacase, com atividade máxima da lacase (14.320 U/L) observada na maior concentração de nitrogênio combinado com 150 mM $CuSO_4$. Também foi demonstrado que a adição de compostos fenólicos e aromáticos no meio de cultura afetou a atividade da lacase. Etanol (0,5 e 1,0 mM) e guaiacol (1,5 mM) induziram a atividade da lacase, enquanto pirogalol, álcool veratrílico, xilidina e vanilina não foram efetivos.

Foi relatado que a adição de uma fonte de proteína (peptona) e uma fonte de nitrogênio não proteica (uréia) ao meio de crescimento estimula a produção de lacase de *L. crinitus*. Esta espécie exibiu aumento da síntese de lacase em meio líquido contendo uréia (TAVARES et al., 2020). Segundo Valle et al. (2014) e Almeida et al. (2018), a uréia aumentou a produção de lacase da cepa *L. crinitus* U9-1 em comparação com a produção na presença de outras fontes proteicas e não proteicas.

Segundo Bezerra e Castro (2022), *L. crinitus* demonstrou atividade enzimática da ß-xilosidase em condições estacionárias (8,3 U/mL) e sob agitação de 180 rpm (44 U/mL). O estudo revelou que os fungos apresentam grande atividade lignocelulolítica.

A combinação de maltose e ureia 100 mM induziu a expressão de perfis proteicos mais complexos do que a combinação de glicerol e ureia 100 mM quando *L. crinitus* foi cultivado em meio de cultura líquido com maltose ou glicerol (20 g/L) e várias concentrações de ureia (4, 20 ou 100 mM) (CAMBRI et al., 2016).

Colla et al. (2022) mostraram que o aumento de nitrogênio no substrato utilizado para cultivo de *L. crinitus* U9-1 elevou a atividade da lacase para mais de 2.000 U/g em relação ao controle (606 U/g; 0,9%) em cinco dias de cultivo. As condições ótimas de atividade enzimática de *L. crinitus* são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições ótimas de atividade enzimática para o cultivo de *L. crinitus*

Enzima	***L. crinitus* (Cepa)**	**Condições ideais de atividade**	**Referência**
Lacase	CCB274	pH 3,5	MOREIRA NETO et al. (2009)
	U9-1	2,8 g/L de ureia, 150 mM de $CuSO_4$,0,5 mM e 1,5 mM de guaiacol	VALLE et al. (2014)
	U9-1	Composição do substrato: casca de café, 0,7 g/L de nitrogênio; 11 dias	ALMEIDA et al. (2018)
	U9-1	$CuSO_4$ 250 µM e guaiacol 1 mM ou álcool veratrílico 1 Mm	SANTANA et al. (2018)
	U9-1	pH 7, 28°C	MARIM et al. (2018)
	U15-9	pH 6, 28°C	MARIM et al. (2018)
	U9-1	Adição de 1,0 g/LN de mistura (peptona e uréia) com bagaço de cana-de-açúcar; 10 dias	TAVARES et al. (2020)
peroxidase de manganês	THC 5	Composição do substrato: folha/caule de bananeira; 11 dias	MEJÍA et al. (2005)
	CCMB 553	Composição do substrato: 50% cevada e 50% mandioca, pH 7, 28 °C; 28 dias	ARAÚJO CONCEIÇÃO et al. (2017)
lignina peroxidase	THC 5	Composição do substrato: folha de bananeira; 16 dias	MEJÍA et al. (2005)
protease aspártica	1825 DPUA 1693	pH ótimo: 6,0 e 50 °C; estabilidade: pH 5,0–6,0 e 30–50 °C	MATOS BRITO et al. (2019)
	1825 DPUA 1693	Glicose 2% (massa/volume) + gelatina 0,5% (massa/volume) + extrato de levedura 0,5% (massa/volume), pH 5,0, 50 °C	SILVA MAGALHÃES et al. (2019)
β- xilosidase	-	pH 4,8, 50 °C	BEZERRA; CASTRO (2022)

1.6. Uso em biorremediação

A biorremediação consiste na utilização de microrganismos ou plantas para limpar ou descontaminar áreas ambientais afetadas por diversos poluentes. Devido às suas características fisiológicas, os fungos da podridão branca estão entre as espécies mais eficazes na degradação de corantes artificiais e contaminantes (KAUSHIK & MALIK, 2009). *L. crinitus* é um fungo específico da podridão branca usado para processos de biorremediação, conhecido por sua capacidade de produzir enzimas como celulase e xilanase (CAMBRI et al., 2016; MARIM et al., 2018), lacase (ALMEIDA et al., 2018; ARAÚJO CONCEIÇÃO et al., 2017; MARIM et al., 2018; SANTANA et al., 2018; TAVARES et al., 2020; VALLE et al., 2014), pectinase (MARIM et al., 2018), lignina peroxidase (ARAÚJO CONCEIÇÃO et al., 2017; MEJÍA et al., 2005) e manganês peroxidase (ARAÚJO CONCEIÇÃO et al., 2017; MEJÍA et al., 2005). Além disso, essa espécie tem sido descrita como capaz de degradar diversos corantes, que podem ser poluentes da indústria têxtil e de outros setores industriais, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Corantes e contaminantes degradados por *L. crinitus*

***L. crinitus* (Cepa)**	**Corantes ou contaminantes**	**Referência**
U9-1	Azul reativo 220 (RB220)	TAVARES et al. (2020)
COI 4579	Azul reativo 220 (RB220)	NIEBISCHE et al. (2010)
U9-1	Remazol azul brilhante R (RBBR)	ALMEIDA et al. (2018); TAVARES et al. (2020)
CCB217	Pentaclorofenol e hexaclorobenzeno	MACHADO et al. (2005)
CCB356	Pentaclorofenol e hexaclorobenzeno	MACHADO et al. (2005)
CCB274	H exaclorobenzeno	MACHADO et al. (2006)
U9-1	Preto reativo 5 (RB5)	TAVARES et al. (2020)
MUCL 41620	Azul ácido 62 (AB 62)	SÁNCHEZ-LÓPEZ et al. (2008)

Segundo Tavares et al. (2020), o corante azo reativo azul 220 (RB220) sofreu um rápido processo de descoloração, após 24 h de cultivo com *L. crinitus*, atingindo seu pico entre o 6º e o 10º dia de cultivo. O preto reativo 5 (RB5) só apresentou descoloração significativa a partir do 6º dia de cultivo e máxima descoloração no 10º dia de cultivo, onde houve 95% de descoloração. Niebisch et al. (2010) também observaram 94% de descoloração do corante azo RB220 quando cultivado com *L. crinitus* (IOC 4579*)*. Este resultado foi obtido após a otimização do teste *in vitro* em condições de cultivo como meio sólido com 10 g/L de oxalato de amônio e glicose a 28 °C e pH 5,5 e 15 dias de cultivo.

As moléculas dos corantes podem ter um impacto nas taxas de descoloração. Taxas maiores de perda de cor podem ser observadas em corantes com estruturas mais simples e massas moleculares mais baixas, enquanto corantes com massas moleculares mais altas e, estruturas densamente substituídas, podem descolorir em uma taxa mais lenta (KACHLISHVILI et al., 2014).

Segundo Tavares et al. (2020), o corante de antraquinona remazol brilhante azul R (RBBR) foi significativamente descolorido por *L. crinitus* U9-1 a partir do 5º dia de cultivo e em grau máximo no 9º dia, embora menos efetivamente do que os corantes azo (RB220). O RBBR apresentou degradação de apenas 77% no 9º dia, enquanto os corantes azo apresentaram descoloração de mais de 90%. Almeida et al. (2018) demonstraram descoloração de RBBR em 74 e 76%, respectivamente, utilizando o extrato obtido do cultivo submerso de *L. crinitus* U9-1 com casca de café (6º dia de cultivo) ou polpa cítrica (12º dia de cultivo). Sánchez-López et al. (2008) relataram que *L. crinitus* MUCL 41620 tem a capacidade de descolorir o corante industrial antraquinona ácido azul 62 (AB 62) com 40,3% de inibição.

Machado et al. (2005) demonstraram que *L. crinitus* CCB217 e *L. crinitus* CCB356 apresentaram maior descoloração de RBBR quando cultivado na presença de solo contaminado com compostos organoclorados (pentaclorofenol e hexaclorobenzeno) do que em solo não contaminado. Machado et al. (2006) também demonstraram a capacidade de biorremediação de *L. crinitus* CCB274 para solos contaminados com hexaclorobenzeno.

1.7. Uso em bioacumulação

Basidiomicetos naturalmente bioacumulam metais do ambiente (SCHEID et al., 2020). Além disso, a biomassa micelial de basidiomicetos pode bioacumular metais em níveis mais elevados, como o ferro para *Pleurotus ostreatus* (ALMEIDA ET AL., 2018; MENIQUETI et al., 2022) e *Agaricus subrufescens* (UMEO et al., 2015; MENIQUETI et al., 2022), *Schizophyllum commune* e *Ganoderma lucidum* (MENIQUETI et al., 2022); lítio para *P. ostreatus* (FARIA et al., 2018); e zinco para *A. subrufescens* (UMEO et al., 2015).

A capacidade de fungos da podridão branca, como *Lentinus* spp. adsorver e acumular metais é uma propriedade interessante dos micélios fúngicos que pode ser aplicada à sorção seletiva de íons metálicos de águas poluídas (BALDRIAN, 2003).

Faria et al. (2019) investigaram a capacidade de bioacumulação da biomassa micelial de *L. crinitus* U9-1 para lítio (LiCl ou Li_2CO_3) em meio líquido a pH 6,5. A produção máxima de biomassa micelial foi de 7.218,89 mg/L no meio de cultura suplementado com 5 mg/L de LiCl e de 4.800 mg/L quando se utilizou 10 mg/L de Li_2CO_3 no meio de cultura. As concentrações de 100 mg/L de LiCl e 30 mg/L de Li_2CO_3 inibiram completamente a produção de biomassa de *L. crinitus.* Embora o Li_2CO_3 tenha reduzido fortemente a produção de biomassa micelial, ele permitiu uma maior bioacumulação de lítio do que o LiCl, bioacumulando 574

mg/g de lítio a uma concentração de 25 mg/L de Li_2CO_3, e um maior rendimento de translocação de lítio (28%).

Faria et al. (2022) avaliaram o efeito do pH do meio de cultura e da fonte de lítio (LiCl ou Li_2CO_3) na bioacumulação de lítio em *L. crinitus* U9-1. Foi demonstrado que o pH inicial do meio afetou a capacidade do fungo de bioacumular Li_2CO_3, pois um pH inicial abaixo de 6 favoreceu a bioacumulação de lítio na biomassa micelial, e em pH 5,5 ocorreu a maior bioacumulação de lítio. A transferência de lítio do meio de cultura para a biomassa micelial foi maior nas culturas suplementadas com Li_2CO_3 em pH 4,5. Portanto, os resultados mostraram que o pH afeta a produção de biomassa micelial, a bioacumulação de lítio na biomassa micelial e a transferência de lítio do meio de cultura para a biomassa micelial.

Meniqueti et al. (2021) avaliaram a bioacumulação de ferro na biomassa micelial de *L. crinitus* U9-1, analisando o impacto do ferro no crescimento micelial e na transferência de ferro do meio de cultura para a biomassa micelial. A adição de 90 mg/L de ferro ao meio de cultura resultou em 15,07 ± 1,44 dg/kg de bioacumulação de ferro micelial, um aumento de 9.000 vezes em relação ao controle (0,116 mg/L de ferro). Os autores então cultivaram o fungo em subprodutos agroindustriais, melaço de cana-de-açúcar (SCM) ou soja (SBM) suplementado com 90 mg/L de ferro e 0,9 mg/L de manganês. As concentrações de ferro na biomassa micelial cultivada em SCM ou SBM foram 20,78 ± 2,28 ou 34,71 ± 4,31 dg/kg, respectivamente. A transferência de ferro aos 21 dias de cultivo foi 10,5 vezes maior para SCM+Fe+Mg e 25 vezes maior para SBM+Fe+Mg do que os controles SCM e SBM, respectivamente.

Rosa et al. (2022) demonstraram que *L. crinitus* foi capaz de remover metais de efluentes industriais, como efluentes de curtume, reduzindo as concentrações de alumínio de 204,1 para 3,7 mg/L (≅ 98% de remoção), cromo de 1.199,6 para 20,4 mg/L (≅ 98 % de remoção) e ferro de 22,6 mg/L para uma quantidade abaixo do limite de detecção (100% de remoção).

1.8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A presente revisão buscou ilustrar o cenário atual e as perspectivas futuras com *L. crinitus*. A espécie apresenta grande potencial para aplicações em diversas áreas, como biotecnologia cultural, indústria e nutrição, processos de bioacumulação e biorremediação e bioatividade (Figura 3).

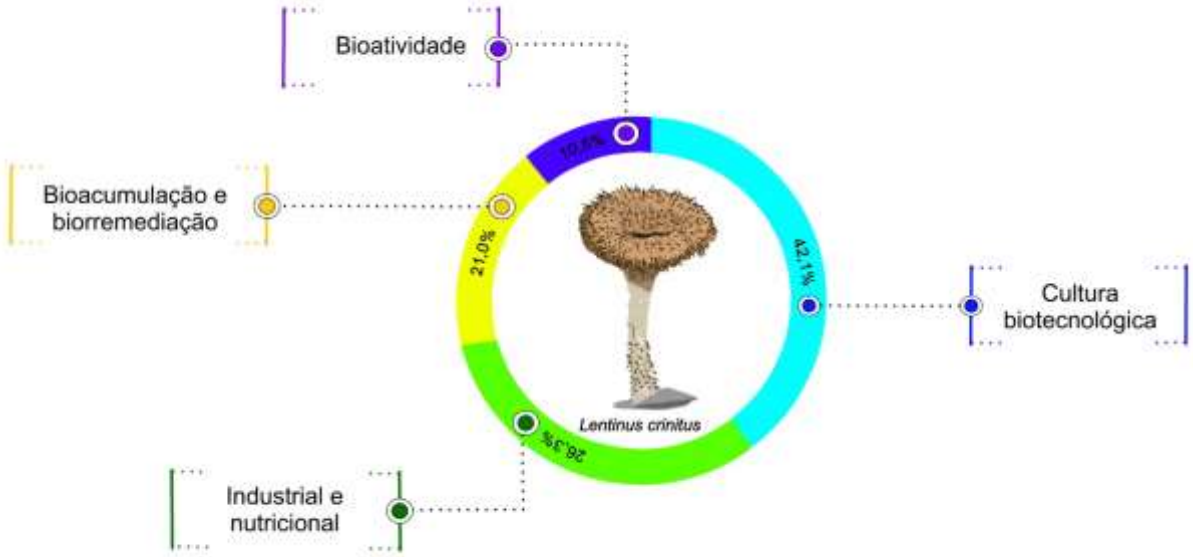


Figura 3. Representação (%) das principais áreas de estudo do cogumelo *L. crinitus*, segundo publicações sobre esta espécie. Fonte, o autor (2023).

A crescente necessidade de cogumelos medicinais e seus compostos bioativos é impulsionada por seus benefícios nutricionais e potencial farmacêutico. Consequentemente, é crucial aumentar a produção dessas substâncias bioativas, a fim de reduzir os custos de produção e atender às altas demandas de operações comerciais e ensaios clínicos em larga escala.

A maioria dos estudos com *L. crinitus* foi focada nas áreas biotecnológicas e enfocou no cultivo biotecnológico *in vitro de L. crinitus*, por ser uma alternativa promissora para obtenção de biomassa micelial em larga escala e em curto período de tempo, podendo assim preservar a espécie *in natura*.

Outra área que tem sido bastante estudada e tem gerado resultados positivos foi o uso alternativo de *L. crinitus* para fins de bioacumulação e biorremediação, bem como estudos de otimização para produção de enzimas. Além disso, *L. crinitus* contém vários compostos bioativos como proteínas, compostos fenólicos, terpenos, sesquiterpenóides, alcaloides, ácidos graxos (poli-insaturados e saturados), polissacarídeos, fibras alimentares, aminoácidos, e possui atividades essenciais relacionadas à saúde, como antitumoral, atividades antimicrobiana e imunomoduladora. O potencial farmacológico desta espécie deve, portanto, ser mais explorado. Com base nos compostos já identificados em *L. crinitus*, as perspectivas futuras serão as aplicações antioxidantes, antiparasitárias, prebióticas e sequestradoras de ferro desta espécie.

Esta revisão sobre *L. crinitus* é de imensa importância para a divulgação do conhecimento científico, com grande aplicabilidade como espelho para espécies de uma mesma família. As propriedades de *L. crinitus* destacadas nesta revisão fornecem informações para estudos futuros, exploração comercial e desenvolvimento de produtos.

REFERÊNCIAS

ABATE, DAWIT; ABRAHAM, WOLF-RAINER. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1348-1350, 1994.

ABIDI, Ferid et al. Purificação e caracterização bioquímica da protease alcalina estável Prot de *Botrytis cinerea*. **Bioquímica de Processos**, v. 46, n. 12, p. 2301-2310, 2011.

ABRAHANR, Wolf-Rainer; ABATE, Dawit. Chromanones from *Lentinus crinitus* (basidiomycetes). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 11-12, p. 748-750, 1995.

ALMEIDA, P. H.; OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, G. P. D.; FRIEDRICH, J. C.; LINDE, G. A., COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. (2018). Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3463-3473, 2018.

ARAÚJO CONCEIÇÃO, T.; KOBLITZ, M. G. B.; KAMIDA, H. M.; GÓES-NETO, A. (2017). Study of the production of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. lignolytic enzymes grown on agro-industrial waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 8, n. 08, p. 259-272, 2017.

ARYA, A.; RUSEVSKA, K. Biology, **Cultivation and Applications of Mushrooms**. Springer, 2022.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial technology**, v. 32, n. 1, p. 78-91, 2003.

BERTÉLI, M. B. D.; BARROS, L.; REIS, F. S.; FERREIRA, I. C.; GLAMOČLIJA, J.; SOKOVIĆ, M.; COLAUTO, N. B. (2021b). Antimicrobial activity, chemical composition and cytotoxicity of *Lentinus crinitus* basidiocarp. Food & Function, v. 12, n. 15, p. 6780-6792, 2021.

BERTÉLI, M. B. D.; DE SOUZA, M. M. M.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C.; GLAMOČLIJA, J.; SOKOVIĆ, M.; PINTO, L. C. Basidiocarp structures of *Lentinus crinitus*: an antimicrobial source against foodborne pathogens and food spoilage microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 74, 2022.

BERTÉLI, M. B. D.; OLIVEIRA FILHO, O. B.; FREITAS, J. D.; BORTOLUCCI, W. C.; SILVA, G. R.; GAZIM, Z. C.; LINDE, G. A. (2021a). *Lentinus crinitus* basidiocarp stipe and pileus: chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activity. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 1355-1366, 2021.

BESSETTE, A. E.; BESSETTE, A. F.; LEWIS, D. P. **Mushrooms of the Gulf Coast States: A field guide to Texas, Louisiana, Mississippi, Alabama, and Florida**. University of Texas Press, 2019. 1477318151.

BESSETTE, A. E.; SMITH, D.; BESSETTE, A. R. **Polypores and Similar Fungi of Eastern and Central North America**. University of Texas Press, 2021. 1477322744.

BEZERRA, C. C.; CASTRO, A. (2022). Atividade β-xilosidase de cepas amazônicas dos fungos *Pycnoporus sanguineus* (LF) Murr e *Lentinus crinitus* (L.) Fr. **Marupiara| Revista Científica do CESP/UEA**, n. 10, p. 40-49, 2022.

BEULAH, G. H.; MARGRET, A. A.; NELSON, J. **Marvelous medicinal mushrooms**. 2013.

CAMBRI, G.; DE SOUSA, M. M. L.; FONSECA, D. d. M.; MARCHINI, F. K. *et al.* Analysis of the biotechnological potential of a *Lentinus crinitus* isolate in the light of its secretome. **J. Proteome Res.**, 15, n. 12, p. 4557-4568, 2016.

CARLOS JR, E.; WELCH, J. R. **Enciclopédia dos alimentos Yanomami (Sanöma): cogumelos.**: JSTOR 2018.

COLAUTO, N. B.; FERMOR, T. R.; EIRA, A. F.; LINDE, G. A. *Pseudomonas putida* stimulates primordia on *Agaricus bitorquis*. Curr. Microbiol., 72, n. 4, p. 482-488, 2016.

COLLA, I., FILHO, O.; BERTÉLI, M.; DE FREITAS, J.; AVELINO, K.; RUIZ, S.; COLAUTO, N. Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitu*s. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 3941-3952, 2023.

COLLA, I.; OLIVEIRA FILHO, O. B. Q. D.; FREITAS, J. D. S. D.; BERTÉLI, M. B. D.; LINDE, G. A.; VALLE, J. S. D.; COLAUTO, N. B. (2020). Mycelial biomass cultivation of *Lentinus crinitus*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 6, 2020.

DAVILA L. R. G.; MURILLO, W. A.; ZAMBRANO, C.J.F.; SUÁREZ, H.S.; MENDEZ, J, J. A. Avaliação dos valores nutricionais de cogumelos silvestres e substrato esgotado de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. Helião 6: e03502. 2020

DUKE, D.U. H. **Duke University, Herbarium Fungal Collection**. https://www.gbif.org/occurrence/2028394077. Acesso em: 6 maio 2022.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S. N. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 37, n. 10, p. 1091-1096, 2010.

ELLIOTT, T. F.; STEPHENSON, S. L. **Mushrooms of the Southeast**. Timber Press, 2018. 1604698373.

ERKEL, G.; ANKE, T.; STERNER, O. Inibição da ativação do NF-κB pela panepoxidona. Inhibition of NF-κB activation by panepoxydone. **Biochemical and biophysical research communications,** v. 226, n. 1, p. 214-221, 1996.

FARIA, M. G. I.; AVELINO, K. V.; DO VALLE, J. S.; DA SILVA, G. J. *et al.* Lithium bioaccumulation in *Lentinus crinitus* mycelial biomass as a potential functional food. **Chemosphere**, 235, p. 538-542, 2019.

FARIA, M. G. I.; DO VALLE, J. S.; LOPES, A. D.; GONÇALVES JR, A. C. *et al.* Bioaccumulation of lithium (Li_2CO_3) in mycelia of the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes). **Int. J. Med. Mushrooms**, 20, n. 9, 2018.

FIGUEIREDO, Á.; SILVA, A. C. Atividade "*in vitro*" de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. **Acta Amaz.**, 44, p. 1-8, 2014.

FONSECA, A. M.; SOARES, N. B.; COLARES, R. P.; DE LIMA COELHO, E. *et al.* In Silico Study of The Potential of Naturally Caffeoylquinic Acids From *Lentinus Crinitus* Basidiocarp With Zika Virus Inhibition Targets. **Res. Sq.**, 2021.

FLÓREZ-SAMPEDRO, L.; ZAPATA, W.; OROZCO, L. P.; MEJÍA, A. I.; ARBOLEDA, C.; RUGELES, M. T. In vitro anti-HIV-1 activity of the enzymatic extract enriched with laccase produced by the fungi *Ganoderma* sp. and *Lentinus* sp. ***Vitae**, v. 23, n. 2, p. 109-118, 2016.*

HALABURA, M. I. W.; AVELINO, K. V.; ARAÚJO, N. L.; KASSEM, A. S. S.; SEIXAS, F. A. V.; BARROS, L.; DO VALLE, J. S. Light conditions affect the growth, chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the white-rot fungus *Lentinus crinitus* mycelial biomass. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 669-686, 2023.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A. *et al.* Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chem.**, 119, n. 4, p. 1443-1450, 2010.

JOO, H.-S.; CHANG, C.-S. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. **Enzyme Microb. Technol.**, 38, n. 1-2, p. 176-183, 2006.

KACHLISHVILI, E.; METREVELI, E.; ELISASHVILI, V. Modulation of *Cerrena unicolor* laccase and manganese peroxidase production. **SpringerPlus**, 3, n. 1, p. 1-7, 2014.

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

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environ. Int.**, 35, n. 1, p. 127-141, 2009.

LÓPEZ-LEGARDA, X.; ARBOLEDA-ECHAVARRÍA, C.; PARRA-SALDÍVAR, R.; ROSTRO-ALANIS, M. *et al.* Biotechnological production, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from a native strain of *Lentinus crinitus*. **Int. J. Biol. Macromol.**, 164, p. 3133-3144, 2020.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE SOUZA KIRSCH, L.; CAMPELO, M. d. C. L. *et al.* Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi J. Biol. Sci.**, 23, n. 5, p. 621-627, 2016.

MACHADO, F.; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A.; GONÇALVES, R.; ZAMUNER, M.; MANGOLIN, C.; MACHADO, M. Alkaloid production and isozymes expression from cell suspension culture of Cereus peruvianus Mill. **Cactaceae). J Plant Sci**, v. 1, p. 324-331, 2006.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; MONTEIRO, R. T. R.; BONONI, V. L. R. Biodegradation of pentachorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 21, n. 3, p. 297-301, 2005.

MAGALHÃES, A. A. S.; AMORIM SILVA, T.; SILVA, S. D.; TEIXEIRA, M. F. S.; SEABRA, A. B.; MAGALHÃES JUNIOR, P. F. C.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of silver nanoparticles by Lentinus *crinitus*: characterization and antimicrobial activity. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e429111436261-e429111436261, 2022.

MARIM, R., AVELINO, K., LINDE, G., COLAUTO, N., & VALLE, J. Lentinus crinitus strains respond differently to cultivation pH and temperature. **Genet Mol Res**, v. 17, n. 10.4238, 2018.

MATOS BRITO, E. C.; DA SILVA BRAGA, R.; TEIXEIRA, M. F. S.; MARTIM, S. R. Produção e caracterização parcial de proteases aspárticas sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Ciênc. Nat.**, 14, n. 3, p. 463-472, 2019.

MATTILA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J.-M. *et al.* Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **J. Agric. Food Chem.**, 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

MEJÍA, A. I.; JIMÉNEZ, G. A.; GRANDA, D. M. Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. **Vitae**, 12, n. 2, p. 13-20, 2005.

MENIQUETI, A. B.; RUIZ, S. P.; FARIA, M. G. I.; DO VALLE, J. S. *et al.* Iron Bioaccumulation in *Lentinus Crinitus* Mycelia Cultivated in Agroindustrial Byproducts. **Waste Biomass Valorization**, 12, n. 9, p. 4965-4974, 2021.

MENIQUETI, A. B.; RUIZ, S. P.; FARIA, M. G. I.; DO VALLE, J. S. *et al.* Iron-enriched mycelia of edible and medicinal basidiomycetes. **Environ. Technol.**, 43, n. 8, p. 1248-1254, 2022.

MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Braz Arch Biol Technol**, 52, p. 1075-1082, 2009.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. A. *et al.* Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **J. Hazard. Mater.**, 180, n. 1-3, p. 316-322, 2010.

NJOUONKOU, A.-L.; MOSSEBO, D. C.; AKOA, A. The genera Lentinus and Panus in the Dja Biosphere Reserve and its periphery, Cameroon. **Kew Bull.**, 68, n. 3, p. 517-521, 2013.

ORRELL, T.; HOLLOWELL, T. NMNH extant specimen records. : Version 2020.

PISCITELLI, A.; GIARDINA, P.; LETTERA, V.; PEZZELLA, C. *et al.* Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Curr. Genomics**, 12, n. 2, p. 104-112, 2011.

PRIYANKA, P.; AYA RAJU, K. Neutral protease production by Rhizopus oligosporus NCIM 1215 under solid state fermentation using mixed substrates of agro industrial residues. International Journal of Chemical Sciences, v. 11, n. 1, p. 291-305, 2013.

RAJPUT, K.; CHANYAL, S.; AGRAWAL, P. K. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree-*Cupressus torulosa* D Don. **World J. Pharm. Pharmaceut. Sci**, v. 5, p. 1034-1054, 2016.

RAMIREZ, J.; TULIG, M.; WATSON, K.; THIERS, B. The New York Botanical Garden Herbarium (NY). 1, 2021. https://www.gbif.org/occurrence/1928180663

RATHEE, S.; RATHEE, D.; RATHEE, D.; KUMAR, V. *et al.* Mushrooms as therapeutic agents. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 22, n. 2, p. 459-474, 2012.

REFLORA, ***Polyporales* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB92500. Acesso: 25 Maio 2022.

ROSA, L. O.; POLETO, L.; RODRIGUES, L. F.; FONTANA, R. C. *et al.* Mycotechnology to remove of metals from tannery and galvanic effluents-Fungal species from the Amazon and Atlantic Forest show high efficiency. **J. Environ. Manage.**, 319, p. 115677, 2022.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, M. I.; VANHULLE, S. F.; MERTENS, V.; GUERRA, G. *et al.* Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. **Afr. J. Biotechnol.**, 7, n. 12, 2008.

SANTANA, T. T.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; DO VALLE, J. S. Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis agricultural biotechnology**, 16, p. 625-630, 2018.

SCHIMANN, H.; ROY, M.; JAOUEN, G. Fungi of French Guiana. **The Global Biodiversity Information Facility**, 2019. https://www.gbif.org/occurrence/1989863889. Acesso: 27 Maio 2022.

SILVA MAGALHÃES, A. A.; DE AMORIM SILVA, T.; TEIXEIRA, M. F. S.; CRUZ FILHO, R. F. *et al.* Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Sér. Ciênc. Nat.**, 14, n. 3, p. 453-462, 2019

SILVA NETO, C. D. M.; PINTO, D. D. S.; SANTOS, L. A. C.; CALAÇA, F. J. S. Aspectos bromatológicos do cogumelo *Lentinus crinitus* (Basidiomycota: Polyporaceae) em sistemas agroflorestais no Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 40, p. 659-664, 2019.

SINGH, R. K.; TURNER, N. J.; REYES-GARCÍA, V.; PRETTY, J. **Social-ecological Diversity and Traditional Food Systems: Opportunities from the Biocultural World.** CRC Press, 2021.

SHARMA, S. K.; ATRI, N. S. Nutraceutical composition of wild species of genus *Lentinus* Fr. from Nothern India. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 4, n. 1, p. 11-32, 2014.

TAVARES, M. F. Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 99-106, 2020.

THE CATALOGUE OF LIFE PARTNERSHIP. **Catalogue of Life**. https://doi.org/10.15468/rffz4x. Acesso: 30 Maio 2022.

UIO, University of Oslo. **Fungarium.** https://www.gbif.org/occurrence/2872782303. Acesso: 27 Maio 2022

UMEO, S.; SOUZA, G.; RAPACHI, P.; GARCIA, D.; PACCOLA-MEIRELLES, L.; VALLE, J.; LINDE, G. Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 9907-9914, 2015Valle, J.,

VALLE, J. S. et al. Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8544-8551, 2014.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K. Condições ótimas de crescimento micelial in vitro de *Lentinus strigosus*, um cogumelo comestível isolado na Amazônia brasileira. **Micociência**, v. 49, n. 3, pág. 215-219, 2008.

VENTURELLA, G.; FERRARO, V.; CIRLINCIONE, F.; GARGANO, M. L. Medicinal mushrooms: bioactive compounds, use, and clinical trials. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 634, 2021.

VIJAYALAXMI, S.; JAYALAKSHMI, S.; SREERAMULU, K. Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. **Journal of food science and technology**, v. 52, p. 2761-2769, 2015.

VILLANUEVA, P. X.; AVILA, Y. C.; DAVILA, L. R.; MÉNDEZ, J. J.; ARANGO, W. M. Characterization and use of *Mangifera indica* L. seeds from four varieties. **BioResources**, v. 15, n. 3, p. 5264-5280, 2020.

WANG, Q.; WANG, F.; XU, Z.; DING, Z. Bioactive mushroom polysaccharides: a review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 955, 2017.

ANEXO CAP. 1

A1. Este capítulo foi publicado na revista "*Food Research International*", Qualis A1.

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Review

Lentinus crinitus: Traditional use, phytochemical and pharmacological activities, and industrial and biotechnological applications

José Rivaldo dos Santos Filho [a], Éverton da Silva Santos [a], Giani Andrea Linde [b], Nelson Barros Colauto [c], Regina Aparecida Correia Gonçalves [a], Arildo José Braz de Oliveira [a,*]

[a] Graduate Program in Pharmaceutical Sciences - Department of Pharmacy, State University of Maringá, Maringá 87020-900, Paraná, Brazil
[b] Graduate Program in Food, Nutrition, and Health - School of Nutrition, Federal University of Bahia, Canela Campus, Salvador 40110-907, Bahia, Brazil
[c] Graduate Program in Food Science - Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador 40110-115, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Biotechnological
Foods
Lentinus crinitus
Phytochemistry
Pharmacological properties

ABSTRACT

The saprophytic basidiomycete *Lentinus crinitus* (L.) Fr is a Brazilian native fungus with pantropical occurrence. *L. crinitus* produces edible fruiting bodies with medicinal, nutritional, and biotechnological applications. The compounds from fungal fruiting bodies can be applied to the preparation of products in the food, cosmetic, biomedical, and pharmaceutical industries. Our aim was to review the literature on *L. crinitus* concerning its botanical description, geographical distribution, phytochemistry, pharmacological properties, nutritional value, and biotechnology potential (*in vitro* cultivation and enzyme production). Scientific search engines, including ScienceDirect, CAPES Journals Portal, Google Scholar, PubMed, SciELO, MEDLINE, LILACS, and SciFinder, were consulted to gather data on *L. crinitus*. The present review is an up-to-date and comprehensive analysis of the phytochemical compounds, phytopharmacological activities, and biotechnological value of *L. crinitus*. Extracts from *L. crinitus* have been reported to exhibit numerous *in vitro* pharmacological activities such as antioxidant, antifungal, antibacterial, antiviral, and anticancer. The substances in these extracts belong to different classes of chemical compounds such as polysaccharides, fatty acids, terpenes, phenolic acids, and flavonoids. Reviews on Brazilian native fungi are of great importance for scientific knowledge, with great applicability as a mirror for species of the same family. The ethnobotanical, phytochemical, pharmacological, ethnomedicinal, and biotechnological properties of *L. crinitus* highlighted in this review provide information for future studies and commercial exploitation, and reveal that this fungus has enormous potential for pharmaceutical, nutraceutical, biotechnological, and ecological applications.

1. Introduction

Mushrooms have been consumed for centuries as a food source owing to their chemical and sensory characteristics. The term "mushroom" is used for a fruiting body, mainly above ground, which is formed from reproductive mycelium, organized for spore dispersion (Kalač, 2013), with an outermost oriented mycelial mass surrounding an internal non-oriented (Colauto, Fermor, Elia, & Linde, 2016).

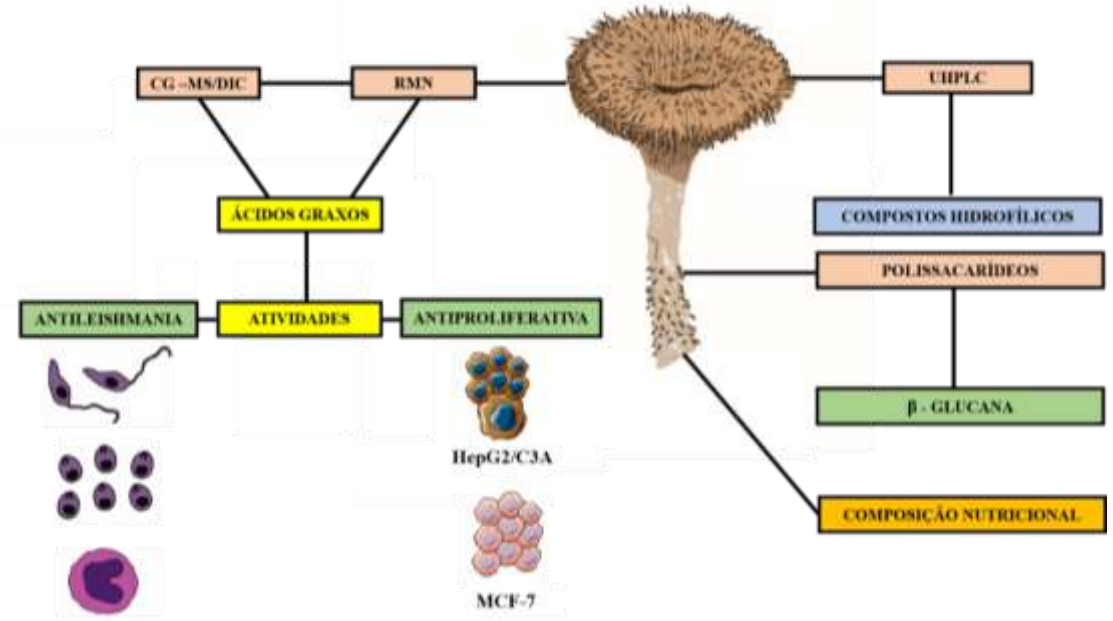
Mushrooms have also been used for medicinal purposes owing to the numerous bioactive metabolites that can be found in the vegetative mycelium (Venturella et al., 2021). The biological activity of mushrooms depends on the fungal species and the chemical nature of the metabolites. This source of compounds can further be altered by environmental conditions, which occurs as a mechanism to withstand external stresses including diseases (Ruthes et al., 2012).

There are an estimated 12,000 species of mushroom-producing fungi worldwide; however, only 2,000 species are reported to be edible, 35 are commercially cultivated, and 200 (considered non-domesticated or wild) are used for medicinal purposes (Beulah et al., 2013). Mushroom consumption is a reflection of the diffusion of ethnomycology - the biological, social, historical, and economic context of the use of fungi by different ethnicities and nationalities. The *Yanomami* and *Tzicó* in Brazil, *Uitoto*, *Muinane*, and *Andoke* (Caquetá) in Colombia, the rural population of Loreto in Peru, and *Hoti* in Venezuela are communities from the Amazon biome that regularly use mushrooms in their diet, which includes *Lentinus crinitus* (L.) Fr. (Vargas-Isla & Ishikawa, 2008).

The use of mushrooms has expanded and attracted interest in the pharmaceutical, nutraceutical, and cosmetic fields owing to their

CAPÍTULO 2

Caracterização química, atividade biológica e aplicações de metabólitos naturais obtidos a partir do cultivo de *Lentinus crinitus*



RESUMO

Lentinus crinitus (L.) Fr é um fungo nativo brasileiro comestível de ocorrência pantropical com aplicações medicinais, nutricionais e biotecnológicas. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil químico, realizar a caracterização de diferentes classes de compostos bioativos e avaliar o potencial biológico e nutricional do cogumelo *L. crinitus*. O extrato lipídico bruto (LCE) foi obtido por maceração (clorofórmio:metanol:isopropanol), e os lipídios foram separados em lipídios neutros (NL), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (PL) por cromatografia em coluna. Os extratos hidrofílicos foram obtidos por maceração com metanol seguida de partição com diclorometano. Com o objetivo de extrair e isolar as glucanas presentes em *L. crinitus*, o cogumelo foi submetido a duas extrações sequenciais sob refluxo (aquosa e alcalina com hidróxido de sódio), desseguidas de precipitação, diálise e gelo-degelo para purificação das amostras. A precipitação da extração aquosa resultou em uma fração precipitada e sobrenadante. As amostras foram analisadas quimicamente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), *Ultra-high-Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry* (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)*, e Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM) e Ionização de Chama (DIC). Foram realizadas análises colorimétricas (carboidratos totais, proteínas e compostos fenólicos), determinada a composição centesimal e as atividades antileishmania contra *Leismania amazonensis*, antiproliferativa e prebiótica. A análise da composição centesimal revelou o predomínio de carboidratos (76,8%) e proteínas (22,9%). Os extratos e frações lipídicas de *L. crinitus* apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) e fígado (HepG2/C3A) e antileismania contra as formas promastigota (IC_{50} = 96,57-146,49 µg/mL) e amastigota (IC_{50} = 22,40-77,67 µg/mL) de *L. amazonensis*, sobretudo a fração LN (IC_{50} = 22,40 µg/mL). Em relação aos polissacarídeos, a caracterização química da última fração por RMN revelou a presença de β-glucana com cadeia principal com ligações β-1→3 e ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6, demonstrando atividade prebiótica. A análise da fração sobrenadante por RMN e *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*, demonstrou que essa fração é rica em proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e aminoácidos, sendo seis aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina,

triptofano e valina). Além disto, essa fração também demonstrou uma atividade prebiótica. A caracterização dos ácidos graxos por cromatografia gasosa e RMN, demonstrou o predomínio de ácidos graxos poli-insaturados em relação aos ácidos graxos monoinsaturados e saturados, com a predominância do ácido graxo essencial linoleico (ω6), seguido do ácido palmítico e o ácido oleico. Nas análises por *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS* dos extratos hidrofílicos, foram identificados compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, cromononas e compostos sesquiterpênicos. Conclui-se que os extratos e frações de *L. crinitus* são fontes importantes para obtenção de compostos bioativos com potencial biológico e nutricional.

Palavras-chave: *Lentinus crinitus*, ácidos graxos, compostos fenólicos, polissacarídeos, atividades biológicas.

ABSTRACT

Lentinus crinitus (L.) Fr is a native Brazilian fungus with pantropical occurrence. *L. crinitus* produces edible fruiting bodies with medicinal, nutritional and biotechnological applications. The objective of the work was to evaluate the profile and characterize different classes of bioactive compounds and evaluate the biological and nutritional potential of the *L. crinitus* mushroom. The lipids were extracted by maceration (chloroform:methanol:isopropanol), to obtain the crude lipid extract (LCE), then separated into neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL) by column chromatography. The hydrophilic extracts were obtained by maceration with methanol followed by partition with dichloromethane. With the aim of extracting and isolating the glucans present in *L. crinitus*, the mushroom was subjected to two sequential extractions under reflux: aqueous and alkaline with sodium hydroxide (KOH). After extraction, the precipitation, dialysis and freeze-thaw process was carried out to purify the samples. Precipitation from the aqueous extraction resulted in a precipitated and supernatant fraction. The samples were chemically analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Ultra-high-Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-ToF-MS/MS) and Chromatography in Gas Phase (GC) coupled to Mass Spectrometry (MS); and Flame Ionization (FID). Colorimetric analyzes were carried out (total carbohydrates, proteins and phenolic compounds), evaluating the proximate composition, and the antileishmanial activities against *Leismania amazonensis*, antiproliferative and prebiotic. The analysis of the proximate composition revealed the predominance of carbohydrates (76,8%) and proteins (22,9%). The extracts and lipid fractions of *L. crinitus* showed antiproliferative activity against breast (MCF-7) and liver (HepG2/C3A) cancer cell lines and antileismania against forms promastigote (CI_{50} = 96,57-146,49 µg/mL) and amastigote (IC_{50} = 22,40-77,67 µg/mL), especially LN fraction (CI_{50} = 22,40 µg/mL). Regarding polysaccharides, chemical characterization of the last fraction by NMR revealed the presence of β-glucan with a main chain with β-1→3 bonds and a branched chain with glucose units with β-1→6 bonds, demonstrating prebiotic activity. Analysis of the supernatant fraction by NMR and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS demonstrated that this fraction is rich in proteins, carbohydrates, phenolic compounds and amino acids, of which 6 amino acids are considered essential (histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan and valine). Furthermore, this fraction also demonstrated good prebiotic activity. The characterization of fatty acids by gas chromatography and NMR demonstrated a great predominance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in relation to monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (AGS), with the predominance of the essential fatty acid linoleic acid (ω6), followed by palmitic acid and oleic acid. In analyzes by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS of hydrophilic extracts, phenolic compounds, organic acids, amino acids, fatty acids, chromones and sesquiterpene compounds were identified. It is concluded that extracts and fractions of *L. crinitus* are important sources for obtaining bioactive compounds with biological and nutritional potential.

Keywords: *Lentinus crinitus*, fatty acids, phenolic compounds, polysaccharides, biological activities.

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos têm sido utilizados para fins alimentares e medicinais, sendo as atividades medicinais atribuíveis a numerosos metabólitos bioativos do micélio vegetativo, mas principalmente do basidiocarpo (VENTURELLA et al., 2021). Os efeitos biológicos dos cogumelos variam de acordo com as espécies fúngicas e a natureza química dos metabólitos que possuem. Os cogumelos têm assim chamado a atenção como fonte de compostos com novos mecanismos de ação ou atividades potenciais contra doenças que ameaçam a saúde (RATHEE et al., 2012).

Durante o cultivo, os cogumelos produzem metabólitos secundários valiosos, como por exemplo, compostos fenólicos com propriedades benéficas, como atividade antioxidante antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-mutagênica, antialérgica e cardioprotetora (AHMAD et al., 2014; NEDELKOSKA et al. 2013). Além dos compostos fenólicos, os cogumelos produzem ácidos orgânicos, terpenóides, sesquiterpenos, alcalóides, lactonas, esteróis, agentes quelantes, análogos de nucleotídeos e vitaminas, glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente β-glucanos (ERJAVEC et al., 2012)

O consumo e a produção de cogumelos comestíveis são importantes devido ao seu conteúdo nutricional e na reciclagem de resíduos agroindustriais com efeitos positivos na economia e no ambiente (CHANG et al., 2004). Esse consumo também é reflexo da difusão da etnomicologia que relaciona o contexto biológico, social, histórico e econômico do uso de fungos por diferentes etnias e nacionalidades, como no Brasil, onde diversos grupos étnicos da Amazônia, como os Yanomami (Sanuma-Roraima) e Txicó no Brasil, Uitoto, Muinane e Andoke (Caqueta) na Colômbia, a população rural de Loreto no Peru e Hotï na área legal da Amazônia na Venezuela, utilizam cogumelos na dieta alimentar, dentre estes o *Lentinus crinitus* (VARGAS-ISLA et al., 2013).

L. crinitus (L.) Fr. (Basidiomycota: Polyporales) é um basidiomiceto comestível com aplicações medicinais, nutricionais e biotecnológicas (NIEBISCH et al., 2010). É um fungo saprofítico com distribuição pantropical e neotropical, comumente encontrado em troncos em decomposição (ABATE; ABRAHAM, 1994). Há relatos de sua atividade antimicrobiana (ABATE; ABRAHAM, 1994; BERTÉLI et al., 2021a), antioxidante (BERTÉLI et al., 2021a; BERTÉLI et al., 2021b; UMEO et al., 2015) e antitumoral (BERTÉLI et al., 2015; BERTÉLI et al., 2021b; BERTÉLI et al., 2021a; ERKEL et al., 1996), bem como sua capacidade de bioacumular metais (FARIA et al., 2019; FARIA et al., 2018; MENIQUETI et al., 2021). Durante o cultivo, esta espécie produz metabólitos como sesquiterpenos (ABATE;

ABRAHAM, 1994), cromanonas (ABRAHANR; ABATE, 1995), carboidratos, açúcares solúveis, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e lipídios (BERTÉLI et al., 2021a).

Considerando que o *L. crinitus* é um comegulo comestível que produz uma grande variedades de compostos bioativos e possui potencial biológico a ser explorado, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização química de metabólitos presentes no cogumelo *L. crinitus* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), *ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*), Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e acoplada a um Detector de Ionização de Chama (CG/DIC), determinar a composição centesimal e realizar a avaliação de suas atividades antileishmania, antiproliferativa e prebiótica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DOS COGUMELOS

Os basidiocarpos de *Lentinus crinitus* (L.) Fr., cepa U9-1, foram cultivados segundo Colla et al. (2022). O fungo foi registrado no Brasil (A04E776) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e na base de dados GenBank (MG211674) (MARIM et al., 2018).

O fungo, criopreservado pela técnica do grão de trigo (ZAGHI JUNIOR et al., 2020), foi recuperado (TANAKA et al., 2019) e cultivado em ágar extrato de malte (MEA) 2% a 25 ± 1°C. Colônias, com vigor e sem setorização, foram utilizadas como inóculo para cultivo de cogumelos (basidiocarpo) (TANAKA et al., 2013).

O cogumelo foi cultivado em substrato constituído por bagaço de cana e casca de arroz (1:1), conforme Colla et al. (2022), com relação carbono/nitrogênio (C/N) de 48 (COLLA et al., 2020). Os basidiocarpos colhidos foram desidratados em estufa com circulação de ar a 60 °C até massa constante, triturados em liquidificador industrial, homogeneizados manualmente e mantidos a -20°C.

2.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O valor nutricional do cogumelo *L. crinitus* foi avaliado pela determinação de proteína bruta, lipídios, matéria seca, material mineral, fibra bruta e carboidratos, conforme metodologia da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1975). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA-UEM), sob a

coordenação do Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha, e supervisão do químico Dr. Osvaldo Pezoti Junior.

A determinação da proteína bruta foi realizada a partir do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. O teor de lipídios das amostras foi determinado pela extração das amostras com éter de petróleo via Goldfish. O teor de matéria seca foi obtido por secagem das amostras pesadas em estufa a 105°C por até que o peso constante fosse obtido. Determinou-se fibra bruta pelo método digestão ácida e básica.

O teor de minerais foi determinado pela combustão das amostras em forno mufla a 600°C por 4 h. Os carboidratos foram determinados subtraindo-se a proteína bruta, lipídios, matéria seca e material mineral do peso seco total (100 g). A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação:

Energia (kcal) = 4 × (g proteína + g carboidratos) + 9 × (g gordura)

2.3 COMPOSTOS HIDROFÍLICOS

2.3.1 Extrações de compostos hidrofílicos

A amostra de *L. crinitus* (5 g) foi exaustivamente extraída por maceração durante 8 dias, com metanol (MeOH), na proporção de 1:20 (p/v), sendo substituído a cada 2 dias (4 ciclos), à temperatura ambiente e foi obtido o extrato bruto metanólico (EBM). Uma parte do extrato bruto foi suspensa em MeOH:H_2O (1:1, V/V), e sucessivamente particionada com *n*-hexano e diclorometano (DCM) em funil de separação. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida a uma temperatura de 35°C, obtendo as frações: hexânica, diclorometânica (DCM) e hidrometanólica residual (HM). As frações foram denominadas: extrato bruto metanólico (EBM); fração diclorometano (FDC) e fração hidrometanólica (FHM). Em seguida, os extratos e frações foram liofilizados e armazenados a -80 ºC em ultra freezer.

2.3.2 *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*)

As amostras (5 mg/mL) foram ressuspendidas em 1,0 mL de metanol (grau HPLC) e 3,0 µL de cada extrato foram injetados e analisados por *UHPLC* acoplado a HRMS (*QTOF*) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. A tensão capilar foi operada no modo de ionização negativa e positiva, definida em 4500 V, e com um potencial de deslocamento da placa final de -500 V. Os parâmetros de gás seco foram definidos em 8 L/min a 200 °C com uma pressão de gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram coletados de *m/z* 50-1300 com uma taxa de aquisição de 5 espectros por segundo, e os íons de interesse foram selecionados

por fragmentação de varredura de MS/MS automática. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna C18 (75×2,0 mm d.i.; 1,6 μm). O gradiente da mistura de solventes **A** (H_2O) e **B** (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; V/V) foi a seguinte: 5% **B** 0-1 min, 30% **B** 1-3 min, 95% **B** 3-12 min, mantida a 95% **B** 12-15 min, e 5% **B** 15-17 min, a 40 ° C. Os cromatogramas e os espectros de MS e MS/MS foram comparados com a literatura, identificados por meio de banco de dados de espectrometria de massas, MoNA *(MassBank of North America),* HMDB *(Human Metabolome Database)* e Mass Bank *(MassBank Europe Mass Spectral DataBase)*, e partir do cálculo do erro, utilizando a Equação **2**. O *software* Data Analysis 4.3 (Bruker) foi utilizado para tratamento dos dados.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{MET-MEE}}{\text{MET}} x1.000.000 \qquad \text{Equação } \mathbf{2}$$

Onde: MET é a massa exata teórica, e MEE é a massa exata observada.

2.4 ÁCIDOS GRAXOS

2.4.1 Extração lipídica total

A extração lipídica foi realizada por maceração de 5 g de basidiocarpo seco com 100 mL de isopropanol em agitador orbital a 115 rpm e 28°C por 24 h, seguido de reextração por maceração por 24 h com 100 mL de solução de clorofórmio:metanol (2:1, base de volume). Ambas as frações foram reunidas e os solventes foram evaporados em rotaevaporador à 40 ºC (MACHADO et al., 2006), resultando no extrato bruto lipídico (EBL).

2.4.2 Fracionamento das classes lipídicas por cromatografia em coluna

O EBL foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) (Jacomini et al., 2015; RAMADAN; EL-SHAMY, 2013) usando uma coluna de vidro (20 cm × 1,25 cm de diâmetro interno) que continha 20 g de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como adsorvente. As eluições foram realizadas com 200 mL de clorofórmio, acetona e metanol para produzir as três frações: lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL). Após, os solventes de todas as frações foram evaporados em rotaevaporador a 40°C.

2.4.3 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs)

Os ácidos graxos foram convertidos em seus EMAGs por transesterificação de amostras (LCE, NL, GL e PL; 10 mg) com 1 mL de hidróxido de sódio a 1% (NaOH) em metanol seguido de aquecimento a 55°C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 5% em metanol e aquecidos a 55°C durante 15 min e depois foi adicionado 1 mL de água ultrapura (água Milli-Q). Depois disso, os EMAGs foram extraídos com hexano (3 x 1 mL) e evaporados até a secura em evaporador rotativo. As amostras foram armazenadas a -4°C em frascos *vials* até a análise por CG. Após, foram redissolvidos em 1 mL de hexano e análisados por CG.

2.4.4 Análise por Cromatografia em fase Gasosa

2.4.4.1 Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os EMAGs foram identificados por meio da análise de Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) no LIABQ, pelo professor Dr. José Eduardo Gonçalves na Universidade Cesumar – UNICESUMAR. As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) equipado com coluna capilar Agilent HP-5MS-UI com fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 μm d.i. x 0,25 μm de espessura do filme), com injetor automático (CTC PAL Control) e o espectrômetro de massas (Agilent 5977A MSD). A Tabela 6 mostra os ácidos graxos presentes na mistura de padrão e os tempos de retenção obtidos pelas análises de CG/EM e CG/DIC.

Para a separação adequada dos analitos no sistema CG-EM, 1 μL da amostra foi injetado na coluna usando o modo de injeção *Split* na razão 1:20, nas seguintes condições do forno: para a análise foram injetados 2 μL da amostra foi injetado na coluna usando o modo de injeção Split na razão 1:71, nas seguintes condições do forno: temperatura inicial de 65 ºC mantida por 4 min, em seguida rampa de 16°C/min até 185°C mantida por 12 min, aquecimento de 20 °C/min até 235 mantida por 14 min e rampa de 35 °C/min até 300 °C e mantida por 1 min. As demais condições do método de análise foram: fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,0 mL/min e temperatura do injetor e linha de transferência de 235 °C.

Os espectros de massas foram obtidos no modo *scan* na razão massa/carga (*m/z)* de 50 à 600, por meio da ionização por impacto eletrônico (70 eV), com temperatura da fonte de ionização de 230°C e do quadrupolo de 150 °C. Os EMAG foram identificados por comparação com espectros de massas da base de dados "*National Institute of Standards and Technology*"

(*NIST* 11.0) e por uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos padrões de C4-C24, Supelco TM 37, sob o número de catálogo 18919 (Sigma-Aldrich).

2.4.4.2 Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC)

Os EMAG foram analisados por CG utilizando o cromatógrafo a gás (Agilent 7890B), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Agilent HP5 com fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 μm d.i. x 0,25 μm de espessura do filme). Para a análise foram injetados 2 μL da amostra foi injetado na coluna usando o modo de injeção Split na razão 1:71, nas seguintes condições do forno: temperatura inicial de 65 ºC mantida por 4 min, em seguida rampa de 16 °C/min até 185°C mantida por 12 min, aquecimento de 20 °C/min até 235 mantida por 14 min e rampa de 35 °C/min até 300 °C e mantida por 1 min. As demais condições do método de análise foram: fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,4 mL/min, temperatura do injetor de 235 °C e temperatura do detector de 350 ºC com fluxo de H_2 de 35 mL/min, fluxo de ar sintético de 300 mL/min e fluxo reposição de N_2 de 25 mL/min.

EMAGs foram identificados por comparação com um padrão de EMAGs, previamente identificado por CG/EM. Através da integração dos picos e do cálculo com base na área correspondente no cromatograma para cada ácido graxo, foi possível realizar a quantificação absoluta dos EMAGs (QAEMAGs) dos basidiocarpos de *L. crinitus* utilizando o software MSD ChemStation (versão F 01.00. 1903, Agilent Technologies, Inc.). Inicialmente, a área do cromatograma dos ácidos graxos foi calculada nas corridas dos padrões EMAG em diferentes concentrações (62,5; 125,0; 250,0; 500,0; 1.000,0 e 5.000,0 μg/mL) e curvas analíticas foram construídas para cada FAME. Após as EMAGs as áreas de cada componente das amostras foram inseridas nas curvas analíticas (EMAGs das amostras; EMAGa). As injeções foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg/100 g (base seca).

Na Tabela 6, são apresentados os tempos de retenções dos EMAG padrões por CG/EM e CG/DIC que foram utilizados na dentificação dos ácidos graxos presentes nas amostras de interesse.

Tabela 6. Ácidos graxos presentes na mistura de padrão C4-C24, e identificados com auxílio da biblioteca NIST.

Ácido graxo	#	Número de carbonos	FM	t_R (CG/EM)	t_R (CG/DIC)
Ác. Caproico	**1**	C6:0	$C_6H_{12}O_2$	4,35	5,78
Ác. Caprílico	**2**	C8:0	$C_8H_{16}O_2$	7,40	8,56
Ác. Cáprico	**3**	C10:0	$C_{10}H_{20}O_2$	9,60	10,55
Ác. Undecanóico	**4**	C11:0	$C_{11}H_{22}O_2$	10,51	11,39
Ác. Láurico	**5**	C12:0	$C_{12}H_{24}O_2$	11,29	12,23
Ác. Tridecanóico	**6**	C13:0	$C_{13}H_{26}O_2$	12,74	13,23
Ác. Miristoleico	**7**	C14:1	$C_{14}H_{26}O_2$	12,92	14,51
Ác. Mirístico	**8**	C14:0	$C_{14}H_{28}O_2$	13,13	16,05
Ác. Pentadecanóico	**9**	C15:0	$C_{15}H_{30}O_2$	14,31	16,29
Ác. Palmitoleico	**10**	C16:1	$C_{16}H_{30}O_2$	15,81	18,21
Ác. Palmítico	**11**	C16:0	$C_{16}H_{32}O_2$	16,29	18,81
Ác. *cis*-10-heptadecanóico	**12**	C17:1	$C_{17}H_{32}O_2$	18,24	21,54
Ác. Heptadecanóico	**13**	C17:0	$C_{17}H_{34}O_2$	18,65	22,41
Ác. γ-linolênico	**14**	C18:3n6	$C_{18}H_{30}O_2$	20,34	23,37
Ác. Linoleico	**15**	C18:2n6c	$C_{18}H_{32}O_2$	21,54	24,80
Ác. α-linolênico	**16**	C18:3n3	$C_{18}H_{30}O_2$	21,70	24,95
Ác. Oleico	**17**	C18:1n9c	$C_{18}H_{34}O_2$	21,77	24,99
Ác. Elaídico	**18**	C18:1n9t	$C_{18}H_{34}O_2$	22,69	25,08
Ác. Esteárico	**19**	C18:0	$C_{18}H_{36}O_2$	23,16	25,43
Ác. araquidônico	**20**	C20:4n6	$C_{20}H_{32}O_2$	20,80	27,29
Ác. *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentanóico	**21**	C20:5n3	$C_{20}H_{30}O_2$	25,90	27,39
Ác. *cis*-8,11,14-eicosatrienóico	**22**	C20:3n6	$C_{20}H_{34}O_2$	26,03	27,57
Ác. *cis*-11,14-eicosadienóico	**23**	C20:2	$C_{20}H_{36}O_2$	26,30	27,87
Ác. *cis*-11-eicosanóico	**24**	C20:1n9c	$C_{20}H_{38}O_2$	26,38	27,97
Ác. *cis*-11,14,17-eicosatrienóico	**25**	C20:3n3	$C_{20}H_{34}O_2$	26,73	27,97
Ác. Araquídico	**26**	C20:0	$C_{20}H_{40}O_2$	26,74	28,39
Ác. Heneicosanóico	**27**	C21:0	$C_{21}H_{42}O_2$	28,19	30,21
Ác. *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	**28**	C22:6n3	$C_{22}H_{32}O_2$	28,56	30,68
Ác. *cis*-13,16-docosadienóico	**29**	C22:2	$C_{22}H_{40}O_2$	29,37	31,75
Ác, erúcico	**30**	C22:1n9	$C_{22}H_{42}O_2$	29,44	31,85
Ác. Beênico	**31**	C22:0	$C_{22}H_{44}O_2$	29,94	32,49
Ác. Tricosanóico	**32**	C23:0	$C_{23}H_{46}O_2$	32,15	35,39
Ác. Nervônico	**33**	C24:1	$C_{24}H_{46}O_2$	34,15	38,10
Ác. Lignocérico	**34**	C24:0	$C_{24}H_{48}O_2$	34,95	39,17

CG/DIC: Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama; CG/EM: Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas; Tr: Tempo de Retenção; FM: Fórmula Molecular.

2.4.5 Ressonância Magnética Nuclear

A análise de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) do EBL foi realizada a 298K em um Espectrômetro Varian (Mercury Plus, Varian Medical Systems, EUA) operando a 300,05 MHz para o núcleo 1H. As amostras foram dissolvidas em Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$; 0,6 mL), e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

2.5 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

2.5.1 Extrações

Partindo de 5 g do basidioma seco, foi realizada a extração sob refluxo das glucanas na proporção de 1: 15 (p/v) com água destilada a 80°C por 2 horas. Este processo foi repetido mais duas vezes, sendo que a cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente e concentrado em rotaevaporador até pequeno volume. Os materiais obtidos foram reunidos e precipitados com etanol (1:3, v/v). Após centrifugação (3.000 rpm/20 min), o precipitado foi separado, dialisado (MWCO= 10 KDa) por 5 dias e liofilizado, resultando na obtenção da fração precipitada aquosa após diálise (FaqLC-PPD).

O resíduo da extração aquosa foi submetido à extração alcalina sob refluxo, com uma solução contendo 4M KOH (hidróxido de potássio) e 0,02M de $NaBH_4$ (Borohidreto de sódio) na proporção de 1:20 (p/v) a 50°C por 2 horas, três vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente. O material foi reunido, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume e precipitado com etanol (1:3, v/v). A amostra foi então centrifugada e o precipitado foi dialisado (MWCO= 10 KDa) por 5 dias e liofilizado, obtendo-se a fração precipitada alcalina após diálise (FalcLC – PPD).

2.5.2 Fracionamento e isolamento

As frações (FaqLC - PPD e FacLC - PPD) foram solubilizadas em água destilada e submetidas ao processo gelo-degelo, que consiste no congelamento da amostra seguido do descongelamento em temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (8.000 rpm/20 min a 5°C) e este processo foi repetido diversas vezes até que, a partir do sobrenadante aquoso, não se formou mais precipitado após congelamento e descongelamento e que, a partir do resíduo aquoso, após tentativa de solubilização em água, foi obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram separados, concentrados e liofilizados para posterior avaliação química. A partir deste processo, obteve-se a a fração solúvel aquosa após gelo-degelo (FaqLC - PPGD) e a fração solúvel alcalina após gelo-degelo (FalLC - PPGD). As frações insolúveis obtidas no processo não foram analisadas.

Todos os procedimentos de extração e purificação das glucanas de *L. crinitus* estão ilustrados na Figura 4, juntamente com as siglas utilizadas para denominar cada fração.

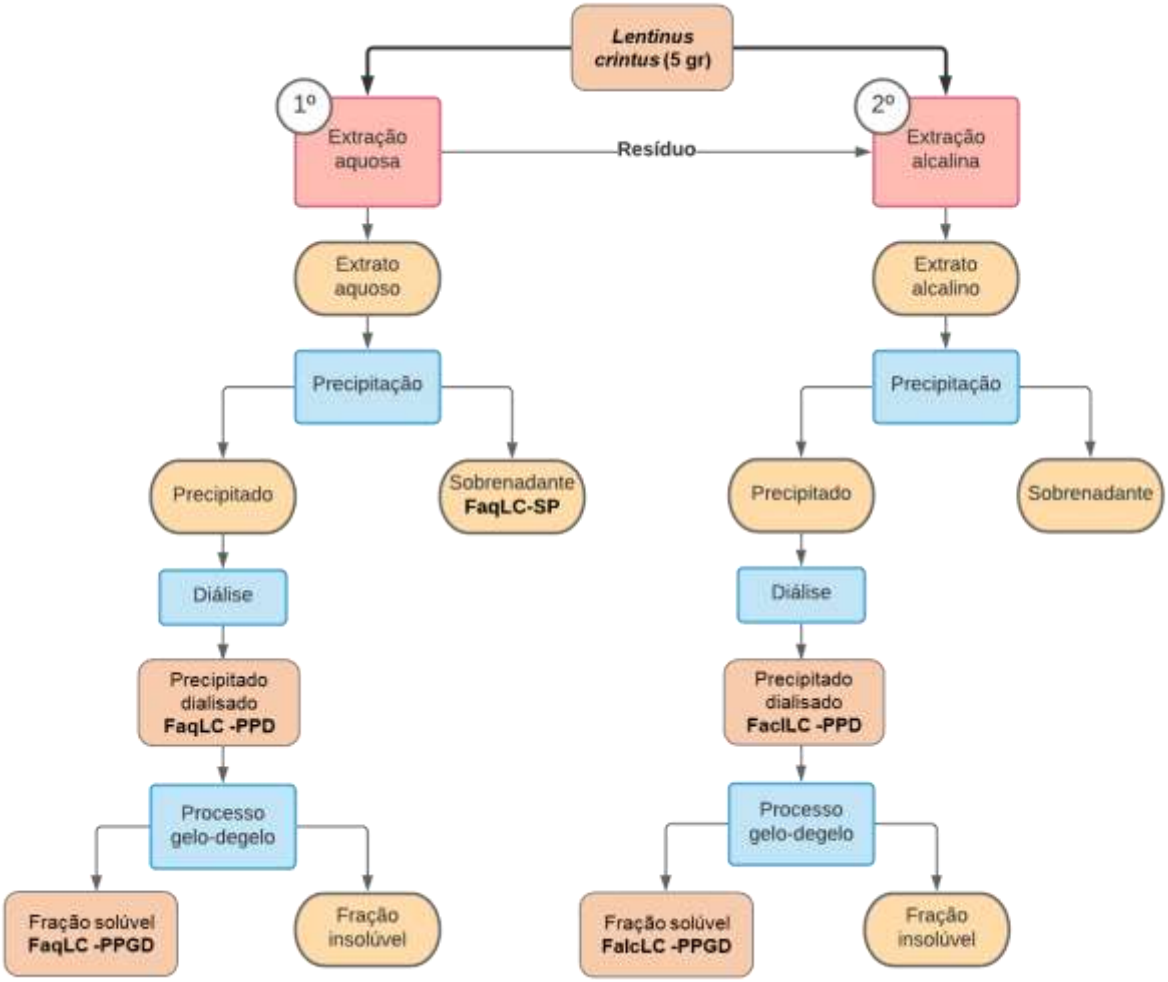


Figura 4. Esquema geral de obtenção de polissacarídeos a partir de *L. crinitus.*

2.5.3 Determinação de açúcares totais

A análise de açúcares totais foi realizada segundo o método Fenol-sulfúrico descrita por Dubois e colaboradores (1956), que se fundamenta na formação de coloração amarelo-alaranjado estável quando açúcares simples ou complexos e seus derivados são tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado. Portanto, o teor de açúcares totais foi determinado pela adição de 0,5 mL de fenol 5% (p/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em 1,0 mL de amostra (50 µg/mL), que foi posteriormente aquecida em banho-maria a 30 ºC por 15 minutos. As leituras das absorbâncias das amostras e do padrão (frutose) foram realizadas em comprimento de onda de 490 nm.

2.5.4 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu, conforme descrito anteriormente por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Sousa et al. (2007). Em tubos de ensaio, 40 µL das frações suspendidas em MeOH foram misturadas com 3,16 mL de H_2O deionizada e 600 µL de carbonato de sódio e, posteriormente, com 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Esta reação foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. Uma curva de calibração foi realizada com o ácido gálico padrão (50 a 250 µg/mL; R^2 =0,9992). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (µgEAG/mg peso seco do extrato).

2.5.5 Determinação de proteínas totais

A determinação do teor de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Hartree (1972), modificação do método tradicional descrito inicialmente por Lowry. Em tubos de ensaio, adicionou-se uma alíquota de 200 µL da solução da amostra a 180 µL do reagente A (0,1 g de tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$); 5 g de carbonato de sódio ($NaCO_3$); 25 mL de hidróxido de sódio 1N (NaOH); e água q.s.p. 50mL), que foi mantido em banho-maria a 50 °C durante 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 20 µL do reagente B (0,5 g de tartarato de sódio e potássio; 0,2 g de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$); 22,50 mL de água destilada e 2,5 mL de NaOH 1N), que foi mantido em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Passado este período de tempo, adicionou-se 3 mL do reagente C (1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em 15 mL de água destilada), e esta mistura foi mantida em banho-maria a 50 °C durante 10 minutos. Tanto a leitura da amostra quanto do padrão (soro albumina bovina) foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm.

2.5.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise por Ressonância Magnética Nuclear, 20 mg das frações foram dissolvidas em 700 µL de água deuterada (D_2O) 99,9%, colocadas em estufa a 45 °C durante 24 horas para troca do hidrogênio (^1H por ^2D) e em seguida, liofilizadas. O resíduo foi novamente solubilizado em 700 µL de D_2O e encaminhado para análise. Para avaliar os monossacarídeos, 5 mg das frações foram hidrolisadas com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1,0 mol/L a 100°C por 8 horas. Em seguida, esta mistura foi evaporada até remoção completa do TFA e o resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de D_2O, colocado em estufa a 45°C durante 24 horas e e liofilizada. O material foi novamente dissolvido em 700 µL de D_2O e encaminhado para análise.

Os espectros de RMN unidimensionais de ^{1}H e ^{13}C foram obtidos a 298 K utilizando um espectrômetro Bruker Avance HD III operado a 300,0 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,5 MHz para o núcleo de carbono, utilizando as sequências de pulso padrões que estão disponíveis no software Bruker. As análises foram realizadas a temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m.

2.5.7 Análise da fração sobrenadante aquosa por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*

A fração sobrenadante aquosa (FaqLC-SP) foi analisada por *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*), seguindo o procedimento descrito no tópico 2.3.2.

2.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.6.1 Ensaios antileishmania e citotoxicidade

A avaliação da atividade antileishmania foi realizada com o extrato bruto lipídico (EBL) e as frações dos lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL).

A atividade antileishmania foi realizada no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá, sob a supervisão do professor Dr. Celso Vataru Nakamura e pelo Me. Rodolfo Bento Balbinot.

2.6.1.1 Cultura de células

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw (IFLA/BR/1967/PH8 transfectadas com pIR1SAT-LUC(a)DsRed2(b) [cepa B5947] gerada como relatado em Rocha et al. (2013)) foram cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração, hemina e ácido fólico; pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e incubado a 25 °C. Macrófagos J774A.1 foram mantidos em meio RPMI 1640 (pH 7,2), suplementado com L-glutamina e 10% de SFB, e incubados a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2.

2.6.1.2 Determinação da atividade antiproliferativa de extratos e em formas promastigotas de *Leishmania*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitas/mL), em fase de crescimento logarítmico (72 h de cultivo), foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços, na ausência ou presença de extratos diluídos em dimetil sulfóxido 1% (DMSO), então incubado por 72 h a 25 °C. Os tratamentos foram realizados nas concentrações finais de 1,5625 - 200 μg/mL e, em seguida, o ensaio de viabilidade celular foi realizado através da redução de XTT (MESHULAM, 1995). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tetrazólio hidrossolúvel (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) em uma substância alaranjada, derivada do formazan. Deste modo, após o período de tratamento, adicionou-se a solução de XTT (0,5 mg/mL aos poços da placa, que foi incubada por 4 h. A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm no espectrofotômetro de placas (Power Wave XS – BioTek). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle e as concentrações inibitórias para 50% dos parasitos (CI_{50}) foi obtida por regressão não linear dos valores plotados. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.6.1.3 Avaliação da atividade de extratos na viabilidade de formas amastigotas de *Leishmania*

Para avaliar a atividade antiproliferativa contra as formas amastigotas, 5×10^5 macrófagos/mL foram adicionados juntamente com 5×10^6/mL promastigotas (proporção 1:10), na fase estacionária de crescimento, em placas brancas de 96 poços. As placas foram incubadas a 34°C com 5% de CO_2 por 24 h para internalização e diferenciação dos parasitas em formas amastigotas. As células foram então lavadas para remover parasitas não internalizados e tratadas com concentrações crescentes de extratos (1 – 100 μg/mL) e incubadas por mais 48 horas. Miltefosina (0,3125 – 5 μg/mL) foi utilizada como medicamento padrão de referência. Após este período de incubação, o kit *Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay* foi adicionado de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi quantificada em um luminômetro SpectraMax L (Molecular Devices) com λ em = 570 nm e tempo de integração de 1 s. A porcentagem de inibição foi calculada com base na luminescência do controle não tratado, os valores foram plotados e as concentrações de IC_{50} foram calculadas por regressão não linear (MICHEL et al., 2011). Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.6.1.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos J774A.1, utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (MOSSMANN, 1983). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tretazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) hidrossolúvel em uma substância púrpura insolúvel, denominada formazan.

Para isso, células J774A.1 (5 x 10^5 células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, as substâncias foram adicionadas em concentrações crescentes de 7,8125 – 1.000 μg/mL e a placa incubada durante 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (pH 7,2) e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL) por 4 h. O sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em espectrofotômetro de placas (Power Wave XS – BioTek). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. Os valores de CC_{50} (concentração citotóxica em 50%) foram determinados por análise de regressão não linear. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.6.2 Atividade antiproliferativa em células tumorais

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada com o extrato bruto lipídico (EBL) e as frações dos lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL).

2.6.2.1 Linhagens celulares

As culturas celulares tumorais de fígado (HepG2/C3A) e mama (MCF-7) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), livres de contaminação por micoplasma. Essas células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2, contendo meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1 mL/L de solução antibiótica/antimicótica. Os frascos foram mantidos em incubadora à 37 ºC, em atmosfera de 5% de CO_2.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese e Monitoramento Ambiental (LMMA), do departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá, sob a supervisão da professora Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini.

2.6.2.2 Ensaios de citotoxidade em células tumorais humanas (MTT)

A avaliação do efeito citotóxico dos lipídios de *L. crinitus* foi realizado através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), realizado de acordo com o protocolo de Mosmann (1983), com modificações. Este teste é baseado na capacidade da enzima do ciclo de Krebs succinato desidrogenase ativa nas mitocôndrias de células viáveis em converter o sal tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. É um ensaio quantitativo *in vitro* para estimar proliferação e sobrevivência celular. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo então bastante útil na avaliação da citotoxicidade.

Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço serão semeadas 10^4 células, com exceção dos poços controle sem células (branco). As células serão cultivadas por 24 horas com 100 μL de meio de cultura suplementado com 10% de SBF (*simulated body fluid*). Após este período, o meio de cultura da placa foi descartado e adicionado 100 μL de meio novo com os tratamentos: Controle (100 μL meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*) suplementado com 10% de SBF e álcool absoluto (0,01%)), tratamento com o agente citotóxico MMS (150μM) e tratamentos com os lipídios de *L. crinitus* (10, 50, 100, 150, 200, e 250 μg/mL).

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio livre de soro, acrescido de MTT (0,167 mg/mL). As placas foram incubadas por 4 horas, e na sequência, o meio contendo MTT foi descartado e aos poços adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), para a diluição dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas *Labtech Microplate Reader* (Modelo: LT-4000) a 550 nm e os dados expressos pelas médias das absorbâncias obtidas nas três repetições biológicas. A viabilidade celular média foi expressa como percentagem em relação às células do grupo Controle (não tratadas-100% de viabilidade) (MOSMAM, 1983).

2.6.3 Atividade prébiotica

A avaliação do efeito prebiótico foi avaliada com o sobrenadante aquoso de *L. crinitus* (FaqLC-SP), precitado aquoso após diálise (FaqLC-PPD) e o precipitado alcalino após a diálise (FalcLC-PPD).

2.6.3.1 Microrganismos e condições de cultura

A avaliação preliminar da atividade prebiótica foi realizada com as cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271, *Lactobacillus paracasei* ATCC 335, *Lactobacillus brevis (*ATCC 367) e *Bacillus coagulans* disponibilizadas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, RJ, Brasil). Como meio basal, o caldo Man, Rogosa e Sharpe (CMRS), foi composto por peptona (10 g/L), extrato de carne (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), citrato de amônio (2 g/L), acetato de sódio (5 g/L), sulfato de magnésio (0,1 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L), fosfato de potássio dibásico (2 g/L), e cisteína (0,05 g/L), o pH do meio foi ajustado até 6,5 ± 0,2 com HCl (0,1M) (LI et al., 2015) para cultivo das cepas. Culturas estoques das cepas probióticas são mantidas em CMRS contendo 2% (p/v) de glicose e 20% (v/v) de glicerol para preservação das células a -20°C.

2.6.3.2 Padronização do inóculo para o ensaio prebiótico

As culturas estoques das cepas probióticas foram descongeladas à temperatura ambiente, repicadas por três vezes consecutivas em CMRS com 2% (p/v) de glicose, e incubadas à 37 ºC por 24 h em condições de microaerofilia. A suspensão bacteriana (reativada em meio MRS) foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 min à 25 ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o "*pellet*" de células foi ressuspenso em solução salina 0,9%. A densidade ótica (DO) do inóculo foi determinada em Espectrômetro Varian Cary Modelo 1E UV-VIS, do LAFQ-MED (UEM), e ajustada para aproximadamente 0,3 que corresponde a 10^6 UFC/mL em escala de McFarland, em um comprimento de onda de 600 nm.

2.6.3.3 Ensaio prebiótico

A avaliação preliminar da atividade prebiótica foi realizada de acordo com (RUBEL et al., 2014) com modificações. O caldo MRS foi empregado substituindo a glicose pela fração sobrenadante aquoso de *L. crinitus* (FaqLC-SP), precitado aquoso após diálise (FaqLC-PPD), precipitado alacalino após diálise (FalcLC-PPD) na concentração de 1% (p/v). O caldo MRS contendo 1% (p/v) de glicose, FOS e inulina foram utilizados como controle positivo. A suspensão bacteriana foi ajustada na DO de 0,3, e inoculada à 1% (v/v) em tubos contendo 3 mL dos meios e, em seguida, incubadas à 37 ºC por 24 h em condições de microaerofilia. O teste foi realizado em triplicata.

A avaliação do crescimento das bactérias foi realizada por leitura espectrofotométrica dos meios de cultivo em um comprimento de onda de 600 nm. O valor real do crescimento dos microrganismos foi calculado pelos valores de absorbância após 24 h, utilizando como branco o meio de cultura isento do inóculo.

2.6.3.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Após a mensuração da atividade prebiótica, foi determinado o potencial hidrogeoniônico (pH) dos meios de cultivo já fermentados com a presença dos microrganismos e fonte de carbono (amostras e controles positivos), onde o mesmo foi medido por leitura direta em pHmetro PG 1800 (Labstore).

2.7 Análise estatística

Para os dados relacionados a quantificação dos ácidos graxos e atividade prebiótica, os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p<0,05$) que foi utilizado para comparar as médias, utilizando o software SISVAR versão 5.3. Os gráficos foram gerados pelo software Origin versão 9.5.1 e Microsoft Excel (Microsoft 365). Para as demais análises, os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP)

Para a atividade antiproliferativa, os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido pelo teste, seguido do Teste de Dunnet ($p<0,05$)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

L. crinitus apresentou 22,9% de proteína, 0,3% de lipídios, 2,9% de cinzas e 76,8% de carboidratos, sendo que 13,3% destes são fibras. Os valores da composição centesimal de *L. crinitus* em comparação com outros trabalhos é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Composição centesimal de *L. crinitus*

Referências	**Composição centesimal**					
	Matéria mineral (%)	Proteína Bruta (%)	Lipídios (%)	Fibra bruta (%)	Carboidratos (%)	Energia (kcal/100 g)
Experimental	2,9	22,9	0,3	13,3	76,8	397,5
MACHADO et al. (2016)	4,9	25,9-27,0	3,3-4,5	6,3-11,3	41,1-53,5	314,14 - 324,33
BERTÉLI et al.(2021a)	4,2	13	0,5	ND	82,4	385,4

SILVA NETO et al. (2019)	3,4	14	1,5	26	ND	ND
BERTÉLI et al. (2021b)	2,6-4,2	9,5-14,4	0,5	ND	80,8 e 87,3	385,5-392,15

Machado et al. (2016) avaliaram a composição nutricional do basidiocarpo de *L. crinitus* cultivado em substrato à base de exocarpo de *Theobroma grandiflorum* e relataram teores variando de 10,9-11,8% de umidade, 25,9-27,0% de proteína, 3,3-4,5% de gordura, 4,9% cinzas, 41,1-53,5% de carboidratos, 6,3-11,3% de fibra, 4,6-6,3% de nitrogênio e teor energético de 314,14 a 324,33 kcal/100 g. Para o basidiocarpo de *L. crinitus* cultivado em bagaço de cana e casca de arroz o teor foi de 13% de proteína, 0,5% de gordura, 4,2% de cinzas, 82,4% de carboidratos e valor energético de 385,4 kcal/100 g (BERTÉLI et al., 2021a). Cabe destacar que a metodologia de determinação e as condições de cultivo (substrato, umidade, CO_2, luminosidade, entre outras) afetam a composição de *L. crinitus* e outros cogumelos e isso torna a comparação mais limitada.

O basidiocarpo de *L. crinitus* silvestre coletado no bioma Cerrado apresentou 61% de umidade, 14% de proteína, 1,5% de gordura, 26% de fibra e 3,4% de mineral (SILVA NETO et al., 2019). Bertéli et al. (2021b) analisaram o píleo e o estipe de *L. crinitus* cultivados em bagaço de cana e casca de arroz, e relataram os valores respectivos de 14,4 e 9,5% de proteínas, 0,5% de gordura, 4,2 e 2,6% de cinzas e 80,8 e 87,3% de carboidratos, com valores energéticos de 385,5 e 392,15 kcal/100 g.

Sobre o teor de proteínas é importante ressaltar que Chang e Miles (2004) relataram que cogumelos comestíveis normalmente contêm 19,0 a 35,0 g por 100 g de proteína (base seca), enquanto Kalač (2013) relatou que cogumelos silvestres variam de 13,2 a 62,8 g por 100 g. Portanto, o conteúdo de proteína obtido para os cogumelos *L. crinitus* está dentro da faixa relatada na literatura para esse tipo de alimento. Ao comparar os níveis de proteína dos cogumelos *L. crinitus* com outros alimentos, eles são semelhantes aos ovos (13,0 g por 100 g) e até mesmo superiores ao arroz cru (7,3 g por 100 g). Isso sugere que os cogumelos de *L. crinitus* podem ser considerados uma boa fonte de proteína quando comparados a esses alimentos específicos.

Os teores de gordura de cogumelos comestíveis foram relatados de 1,1 a 8,3 g por 100 g (CHANG; MILES, 2004). No trabalho de Machado et al. (2016), o teor de gordura em *L. crinitus* variou de 3,3-4,5% e foi de 1,5% para *L. crinitus* silvestre coletado no Cerrado brasileiro. Em nosso estudo, o teor de gordura (0,3%) foi menor em comparação com o basidiocarpo de *L. crinitus* selvagem e cultivado ou outros cogumelos.

Embora a quantidade de lipídios seja baixa nos cogumelos, segundo Kalac (2013), a quantidade de ácidos graxos insaturados é maior que a de saturados, sendo que os ácidos palmítico, oléico e linoléico representaram quase a totalidade dos ácidos graxos estudados (KALAC, 2013).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS POR *UPLC-ESI/QTOF/MS/MS*

A investigação química de extratos e frações de *L. crinitus* resultou na identificação total de vinte e quatro compostos. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução e, a identificação desses compostos foi proposta após uma revisão da espécie *L. crinitus* (ABATE e ABRAHAM, 1994; ABRAHAM e ABATE, 1995; BERTÉLI et al., 2021b; BERTÉLI et al., 2021a; FONSECA et al., 2021) e gênero *Lentinus* (ÇAYAN et al., 2020; NAM et al., 2021), além do valor do erro de massa. Também foram utilizadas as bases de dados de compostos, MoNA (*MassBank of North America*), HMDB (*Human Metabolome Database*) e Mass Bank (*MassBank Europe Mass Spectral DataBase*).

Foram identificados nos extratos e frações, 17 ácidos fenólicos, orgânicos e derivados, 2 aminoácidos, 1 terpenóide, 2 cromonas, e 2 ácidos graxos. O estudo comparativo por *UPLC-ESI/QTOF/MS/MS* das amostras mostrou uma excelente produção de compostos (extrato bruto metanólico (EBML; 11), fração diclorometano (FDCL; 17), e fração hidrometanólica (FHML; 7 compostos). No entanto, é possível destacar as substâncias que foram identificadas apenas em frações específicas. No EBML (Ácido alfa-hidroxi-glutárico (**41**), ácido caféico (**47**) e tirosina (**48**); na fração FDCL (ácido lático **(35)**, ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico (**37**), ácido benzoico (**38**), ácido pimélico (**44**), ácido fenil-láctico (**46**), ácido ferúlico (**51)** ácido siríngico (**52**), ácido sebático (**53**), 6-metoxi-2,2-dimetilcroman-4-ol (**54**), 3-hidroxi-6-metoxi-2,2-dimetil-4-cromanona (**55**), hipnofilina (**56**), ácido 13-hidroxioctadecadienóico (**58**) e ácido corcorifático F (**59**)). Os compostos identificados são apresentados na Tabela 8 e dados das análises (erro, fragmentos e referências) dos compostos são apresentados na Tabela S1 (material suplementar). Os espectros estão apresentandos na Figura S2 (material suplementar)

Tabela 8. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus.*

Substâncias	**#**	**FM**	**MT (*m/z*)**	**Extratos**			**Classe química**
				EBML	**FDCL**	**FHML**	
Ácido lático	**35**	$C_3H_6O_3$	90,0311		✓		Ácido orgânico
Ácido succínico	**36**	$C_4H_4O_4$	116,0723	✓		✓	Ácido orgânico
Ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico	**37**	$C_5H_{10}O_3$	118,0624		✓		Ácido orgânico
Ácido benzoico	**38**	$C_7H_6O_2$	122,0384		✓		Composto fenólico
Ácido málico	**39**	$C_4H_6O_5$	134,0215	✓		✓	Ácido orgânico
Ácido *p*-hidroxibenzoico	**40**	$C_7H_6O_3$	138,1220	✓	✓		Composto fenólico
Ácido alfa-hidroxi-glutárico	**41**	$C_5H_80_5$	148,1142	✓			Ácido orgânico
2,4 - Ácido dihidroxi metoxi butanóico	**42**	$C_5H_{10}O_5$	150,0528	✓		✓	Ácido orgânico
Histidina	**43**	$C_6H_9N_3O_2$	155,157	✓		✓	Aminoácido
Ácido pimélico	**44**	$C_7H_{12}O_4$	160,0730		✓		Ácido orgânico
Ácido *p*-cumárico	**45**	$C_9H_8O_3$	164,0468	✓	✓	✓	Composto fenólico
Ácido fenil-láctico	**46**	$C_9H_{10}O_3$	166,0624		✓		Composto fenólico
Ácido caféico	**47**	$C_9H_8O_4$	180,1590		✓		Composto fenólico
Tirosina	**48**	$C_9H_{11}NO_3$	182,0573	✓			Aminoácido
Ácido azelaico	**49**	$C_9H_{16}O_4$	188,1043	✓	✓	✓	Ácido orgânico
Ácido cítrico	**50**	$C_6H_8O_7$	192,1237	✓			Ácido orgânico
Ácido ferúlico	**51**	$C_{10}H_{10}O_4$	194,1860		✓		Composto fenólico
Ácido siríngico	**52**	$C_9H_{10}O_5$	198,0522		✓		Composto fenólico
Ácido sebático	**53**	$C_{10}H_{18}O_4$	202,1199		✓		Ácido orgânico
6-metoxi-2,2-dimetilcroman-4-ol	**54**	$C_{12}H_{16}O_3$	208,1094		✓		Cromanona
3-Hidroxi-6-metoxi-2,2-dimetil-4-cromanona	**55**	$C_{12}H_{14}O_4$	222,0887		✓		Cromanona
Hipnofilina	**56**	$C_{15}H_{20}O_3$	248,1407		✓		Sesquiterpênico
Ácido 13-hidroxioctadecadienóico	**57**	$C_{18}H_{32}O_3$	296,2351		✓		Ácido graxo
Ácido corcorifático F	**58**	$C_{18}H_{32}O_5$	328,2244		✓		Ácido graxo
Número total de compostos				**11**	**17**	**6**	

FM: Fórmula molecular; MT: Massa teórica; ✓: presença; **EBML**: Extrato bruto metanólico; **FDCL**: Fração diclorometano; **FHML**: Fração hidrometanólica.

Segundo Kalac (2013), os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais: derivados hidroxi do ácido benzóico e ácido trans-cinâmico, sendo que, dentro do primeiro grupo, os ácidos *p*-hidroxibenzóico (**40**), protocatecuico, gálico, gentísico, vanílico e siringico (**50**) são geralmente detectados em cogumelos, enquanto os ácidos *p*-cumárico (**45**), cafeico (**47**) e ferúlico (**51**) representam o último grupo (Figura 5).

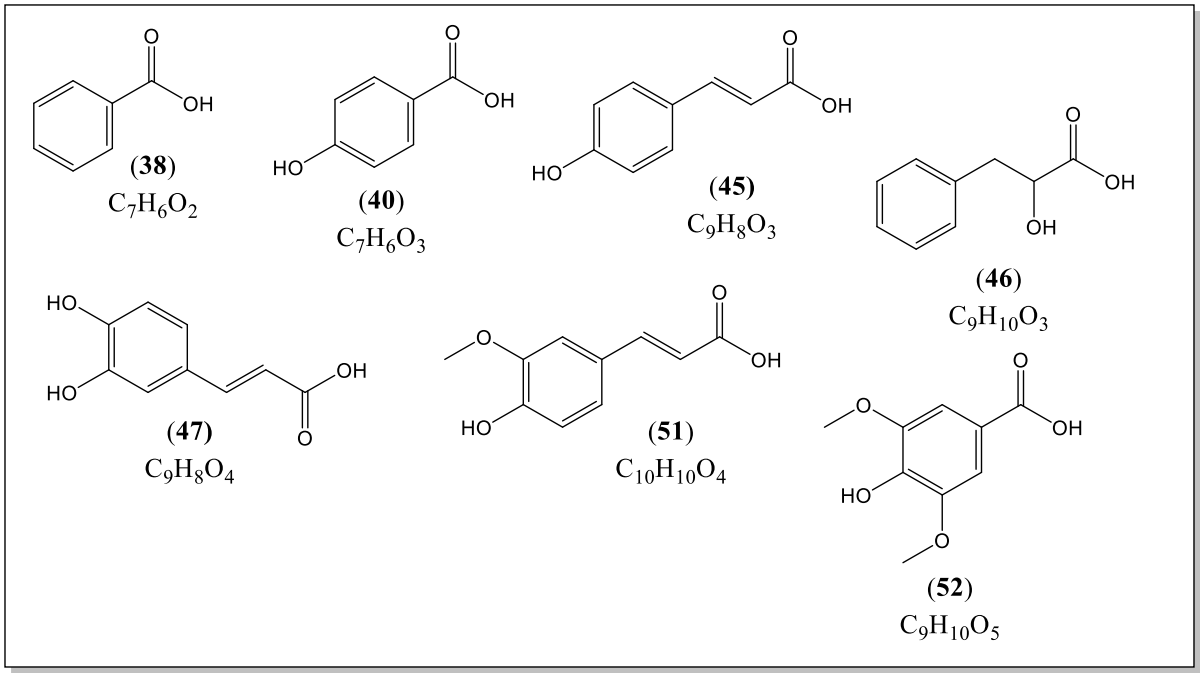


Figura 5. Compostos fenólicos presentes no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*

Bertélli et al. (2021), também relataram os ácidos orgânicos (málico) e o ácido fenólico (*p*-hidroxibenzóico) no basidiocarpo de *L. crinitus*. Os autores mostraram que o ácido málico é o ácido orgânico majoritário no píleo do basidiocarpo de *L. crinitus* (801 mg/100g), destacando que os ácidos orgânicos nos basidiocarpos são relacionados com o sabor e a formação do aroma. Os mesmos autores demonstraram que o principal ácido fenólico encontrado no basidiocarpo foi o ácido *p*-hidroxibenzóico, sendo encontrado no píleo (537 µg/100 g) e no estipe (791 µg/100 g). Fonseca et al. (2021), também encontraram no extrato metanólico de *L. crinitus* o ácido caféico (**47**) e o ácido siringíco (**52**). Nam et al. (2021), encontraram no extrato de *L. edodes*, os ácidos benzóico, gálico, caféico, ferúlico, siríngico.

Em relação aos ácidos orgânicos, além do ácido málico, foram encontrados o ácido lático (**35**), ácido succínico (**36**), ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico (**37**), ácido alfa-hidroxi-glutárico (**41**), 2,4 - ácido dihidroxi metoxi butanóico (**42**), ácido pimélico (**44**), ácido azeláico (**49**), ácido cítrico (**50**), ácido sebático (**53**) e ácido piscídico (**57**). Todos esses ácidos orgânicos

citados foram identificados pela primeira vez na espécie. A figura 6 apresenta os ácidos orgânicos identificados no EBML, FDCL e FHML.

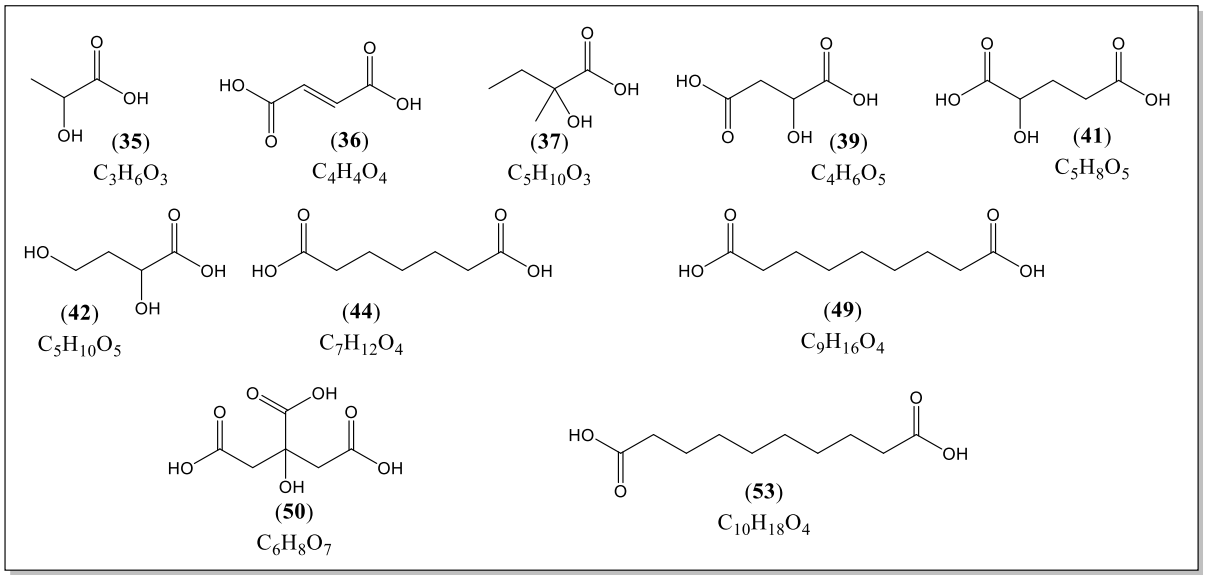


Figura 6. Ácido orgânicos presentes no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*

Dentre os compostos encontrados, cabe destacar a presença do 6-metoxi-2,2-dimetilcroman-4-ol **(54)**, 3-Hidroxi-6-metoxi-2,2-dimetil-4-cromanona **(55)**, hipnofilina **(56)**. Estes compostos são característicos do gênero *Lentinus*, e também já foram reportados para a espécie *L. crinitus* (ABATE e ABRAHAM, 1994; ABRAHAM e ABATE, 1995). Esses compostos foram encontrados somente na fração FDCL (Figura 7).

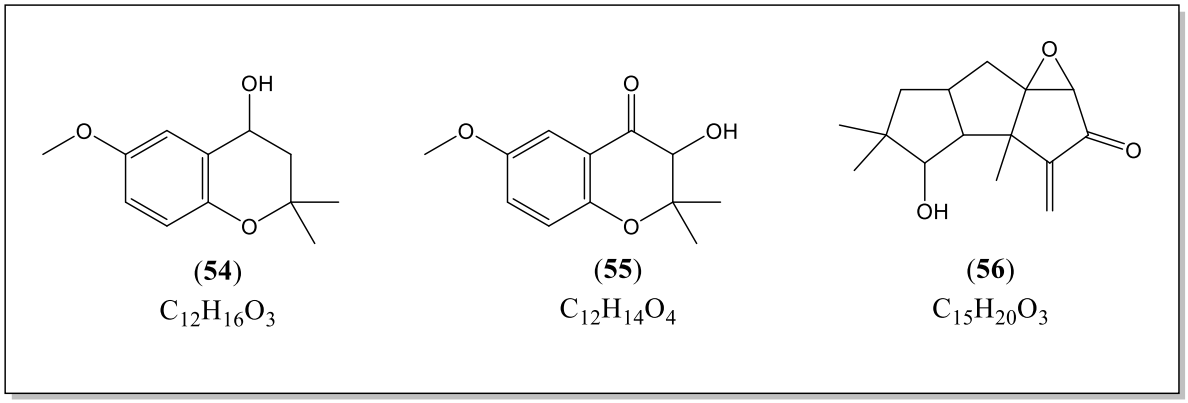


Figura 7. Cromononas e composto sesquiterpênico encontrados na FDCL de *L. crinitus*

Em relação aos aminoácidos encontrados, Machado et al. (2016) também encontraram os aminoácidos histidina **(43)** e tirosina **(48)** em *L. crinitus*. Além dos aminoácidos, foram encontrados ácidos graxos derivados do ácido linoleico (ácido 13-hidroxioctadecadienóico e o ácido corcorifático F) (Figura 8).

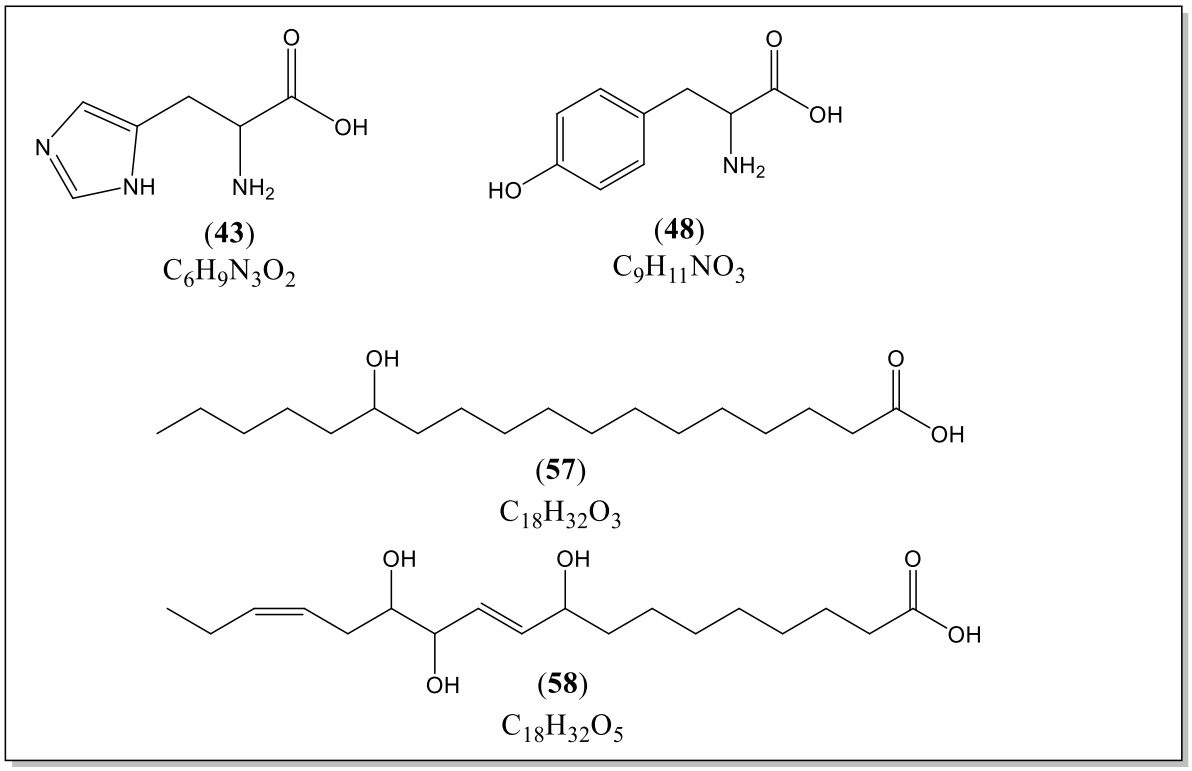


Figura 8. Aminoácidos e derivados do ácido linoleico encontrados no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*

3.3 ÁCIDOS GRAXOS

3.3.1 Análise do perfil lipídico por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O uso da espectroscopia por RMN se mostra uma alternativa interessante em relação aos demais métodos analíticos, pois requer pouca preparação da amostra, não há necessidade de derivatização, é uma técnica rápida, simples e confiável. O espectro resultante permite obter parâmetros, informações de interesse e de imediata comparação. Por meio desta técnica confirmou-se o perfil olefínico das amostras e identificou-se as ligações duplas referentes aos ácidos graxos insaturados, (COLZATO et al., 2008; GARCIA, 2006; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

A Figura 9 apresenta a estrutura de um triglicerídeo modelo, com ácidos graxos mono, di- e poli-insaturados (GARCIA, 2006). Essa representação estrutural do triglicerídeo será utilizada para facilitar a compreensão dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C.

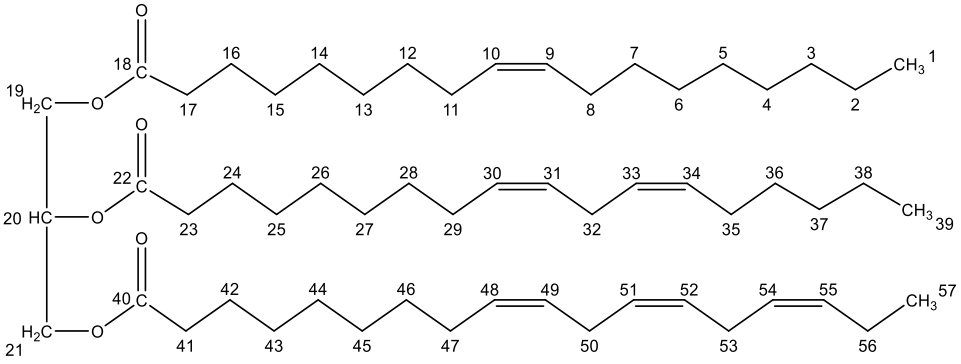


Figura 9. Estrutura de triglicerídeo modelo
Fonte: Adaptado de Garcia (2006)

O espectro de RMN de ^{1}H obtido para o extrato bruto lipídico (EBL) está ilustrado na Figura 10. Os espectros de RMN de ^{1}H do EBL apresentaram sinais e deslocamentos químicos similares, que foram atribuídos por comparação com dados da literatura. A Tabela 4 mostra a comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da amostra e os descritos na literatura por Garcia et al. (2006), Colzato et al. (2008) e Jacomini et al. (2013).

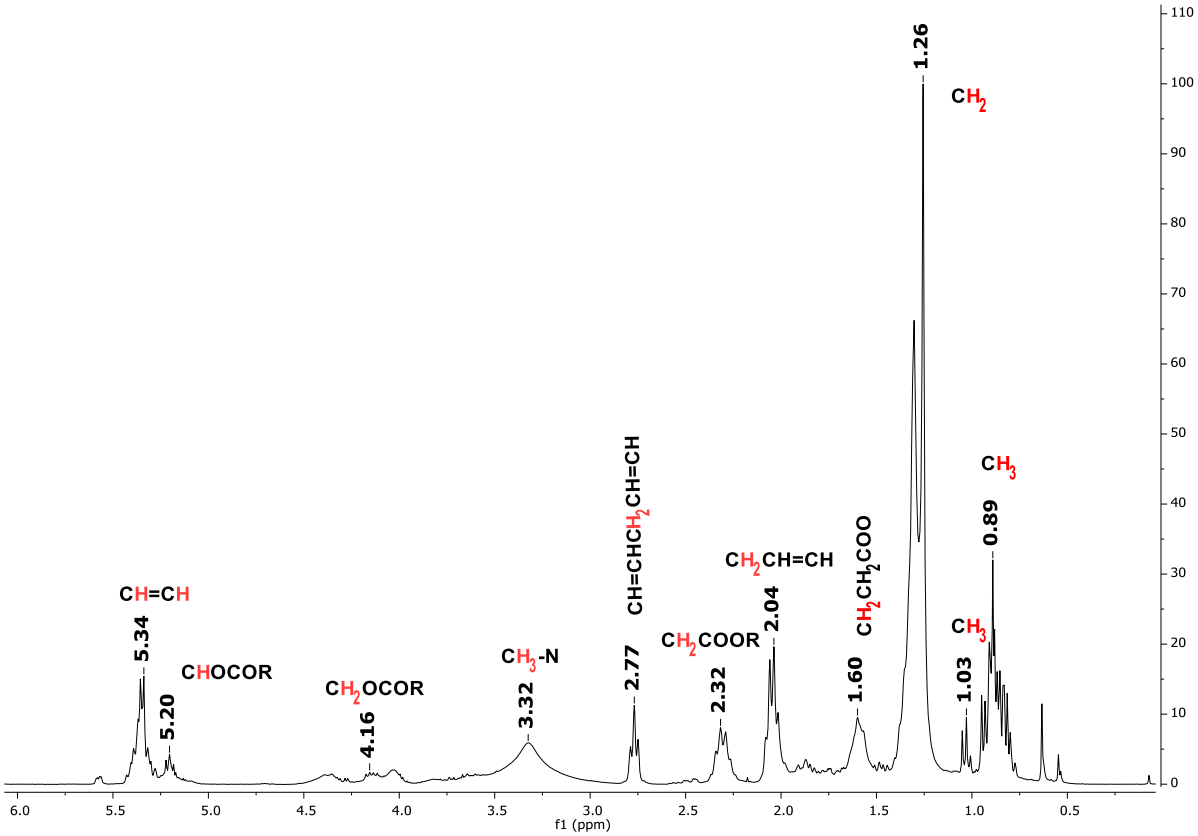


Figura 10. Espectros de RMN ^{1}H (300,05 MHz) do extrato bruto lipídico de *L. crinitus* em $CDCl_3$

Os hidrogênios metílicos (H_1, $_{39}$ e $_{57}$) apresentaram deslocamentos químicos de 0,79-0,91 ppm. Os hidrogênios α- metílicos (H_{56}) tiveram deslocamentos químicos de 0,93-96 ppm.

O sinal no espectro de RMN de ^{1}H dos hidrogênios metílicos e dos α-metílicos foi um multipleto, devido a superposição do acoplamento com hidrogênios vizinhos.

O sinal mais intenso no espectro de RMN ^{1}H foi um multipleto nos deslocamentos químicos entre 1,25-1,30 ppm. Este sinal evidente é específico dos hidrogênios metilênicos (-CH2-), pois a cadeia de hidrocarbonetos dos ácidos graxos saturados é formada somente por hidrogênicos metilênicos e a cadeia carbônica dos insaturados, onde não há ligações duplas, também é formada por estes hidrogênios. Desta forma, o deslocamento químico com maior intensidade está de acordo com os hidrogênios mais abundantes das moléculas graxas identificadas.

Os hidrogênios β-carbonílicos ($H_{16,\ 24\ e\ 42}$) foram identificados em um multipleto com deslocamentos químicos entre 1,51-1,71 ppm. O próximo sinal no espectro de RMN de ^{1}H foi dos hidrogênios alílicos ($H_{8,\ 11,\ 29,\ 35,\ 47\ e\ 56}$) com deslocamentos químicos entre 1,98-2,05 ppm na forma de multipleto. O hidrogênio alílico está localizado em um carbono vizinho ao da dupla ligação, sendo assim, seu sinal é característico de ácidos graxos insaturados.

Os deslocamentos químicos de 2,21-2,40 ppm é característico dos hidrogênios α-carbonílicos ($H_{17,\ 23\ e\ 41}$). Os hidrogênios bisalílicos ($H_{32,\ 50\ e\ 53}$) apresentam deslocamentos químicos entre 2,75-2,79 ppm. Estes hidrogênios estão localizados entre duplas ligações, por isso acoplam apenas com os dois hidrogênios vizinhos, formando um tripleto, sinal característico de ácidos graxos poli-insaturados.

Os hidrogênios glicerínicos ($H_{19,\ 20\ e\ 21}$), hidrogênios ligados a molécula do glicerol, apresentam sinais pouco intensos com deslocamento químico entre δ 4,10-5,25 ppm. O sinal em δ 5,25 ppm ocorrendo como um multipleto é atribuído ao H-2 do esqueleto do glicerol dos TAGs. O sinal atribuído ao H-1 e H-3 do esqueleto de glicerol na molécula dos TAGs aparece no espectro como um dd em δ 4,15 e no δ 4,30 ppm. Para melhor visualização dos sinais, o espectro de hidrogênio das amostras foi ampliado na região de δ 4,10-5,25 ppm (Figura 11). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios glicerínicos das amostras estão de acordo com os descritos na literatura

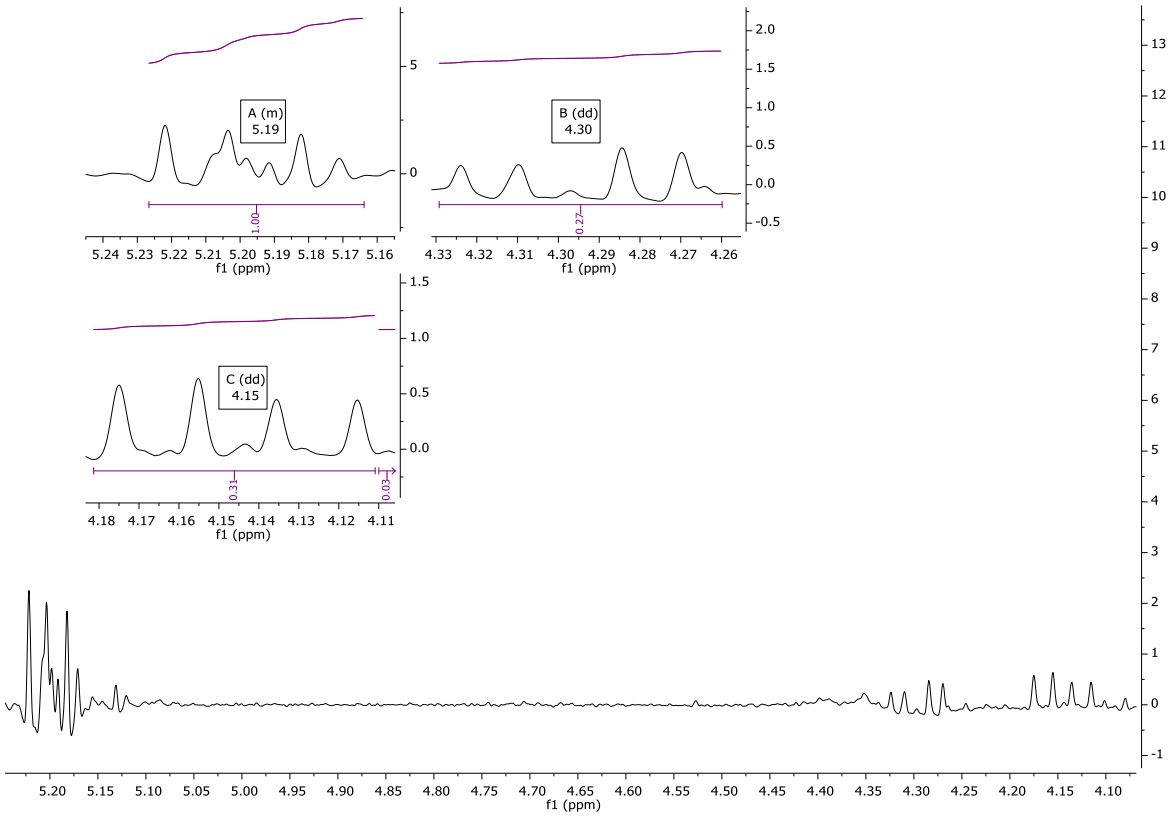


Figura 11. Ampliação da região de δ 4,10- 5,25 ppm, para demonstrar os sinais correspondentes aos hidrogênios glicerínicos ($H_{19, 20}$ e $_{21}$).

Os hidrogênios vinílicos ($H_{9,10}$, $_{30, 31, 33, 34, 48, 49, 51, 52, 54,55}$) (Figura 20), aparecem como um multipleto no deslocamento químico entre δ 5,26-5,43 ppm.

Segundo Garcia (2006) ainda pôde se observar no espectro de RMN de ^{1}H para ácidos graxos um deslocamento químico característico dos hidrogênios metoxílicos. Estes hidrogênios são provenientes da quebra da molécula de triacilgliceróis com liberação de ésteres metílicos de ácidos graxos. Pavia e colaboradores (2001) afirmam que o hidrogênio da metoxila é fácil de reconhecer, pois aparece no espectro como um simpleto com sinal intenso próximo a 4,0 ppm. No presente trabalho estes hidrogênios tiveram deslocamentos químicos de 3,32 ppm.

Foi possível observar também na faixa de 3,0 a 4,5 ppm vários sinais de baixa intensidade. Segundo Araújo e colaboradores (2013) os sinais com deslocamentos químicos de 3,2 a 4,0 ppm são típicos de hidrogênios de carboidratos. Dessa forma, conclui-se que estes sinais são referentes aos açúcares ligados na forma de mono ou oligossacarídeos à uma cadeia lipídica (MOTTA, 2011).

Tabela 9. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{1}H do EBL em comparação com dados da literatura.

Deslocamento químico δ (ppm)	Atribuição			Referência		
	Prótons	**Grupo funcional**	**Composto**	**COLZATO *et al.*, 2008**	**GARCIA et al., 2006**	**JACOMINI et. al, 2013**
0,68–1,02	C**H**$_3$	Metilas	Colesterol	ND	0,68–1,02	ND
0,79-0,91	C**H**$_3$	Prótons metílicos do grupo acil	ω3 grupos acil poli-insaturados	0,79-0,91	0,85	0,88
0,93-0,96	C**H**$_3$	Prótons metílicos do grupo acil (α – metílico)	todos os grupos acil exceto ω3 AGPI	ND	0,95	0,97
1,23-1,41	(C**H**$_2$)n	prótons metilênicos do grupo acil	todas as cadeias de acil	1,15-1,40	1,25–1,70	1,30-1,25
1,51-1,71	C**H**$_2$CH$_2$COO	prótons metilênicos na posição β ao grupo carbonila	todas as cadeias de acil	1,50-1,70	1,62	1,60-1,61
2,02–2,09	C**H**$_2$CH=CH	prótons metilênicos na posição α da dupla ligação	Ácido graxos insaturados	1,90-2,10	2,02–2,09	2,03-2,04
2,21-2,38	C**H**$_2$COOR	prótons metilênicos na posição α ao grupo carbonila	todas as cadeias de acil	2,35-2,20	2,32	2,31-2,34
2,75-2,79	CH=CHC**H**$_2$CH=CH	Protons bis-alílicos	Ácidos graxos poli-insaturados	2,70-2,80	2,85	2,78-2,80
3,32	C**H**$_3$-N	Prótons metílicos	Fosfatidilcolina	ND	3,25	ND
4,15-4,30	C**H**$_2$OCOR	Próton do grupo gliceril em C1 e C3	Triglicerídeos	4,10-4,32	4,10–4,25	4,17-4,19
5,17-5,52	C**H**OCOR	Próton do grupo gliceril em C2	Triglicerídeos	ND	5,20–5,26	ND
5,29-5,43	C**H**=C**H**	Prótons olefínicos grupo acil	Ácido graxos insaturados	5,26-5,40	5,30–5,35	5,36-5,37

Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{1}H do extrato bruto lipídico em comparação com dados da literatura; ND: não determinado.

A porcentagem relativa de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos gracos mono-insaturados (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), foi calculada a partir da integração do grupo α-carbonílicos em (δH 2,37), próton ligado a carbonos alílicos e bis-alílicos localizados em posição (δH 2,02) e (δH 2,74), como é mostrada na Tabela 10 e Figura 12. Os resultados indicaram que os ácidos graxos predominantes são AGPI, seguido por AGMI e depois AGS.

Tabela 10. Porcentagem relativa de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), ácidos graxos mono insaturados (AGMI) e ácidos graxos saturados (AGS) no extrato bruto lipídico (EBL) de *L. crinitus.*

EBL	AGPI (%)	AGMI (%)	AGS (%)
Composição	61,79	22,48	15,73

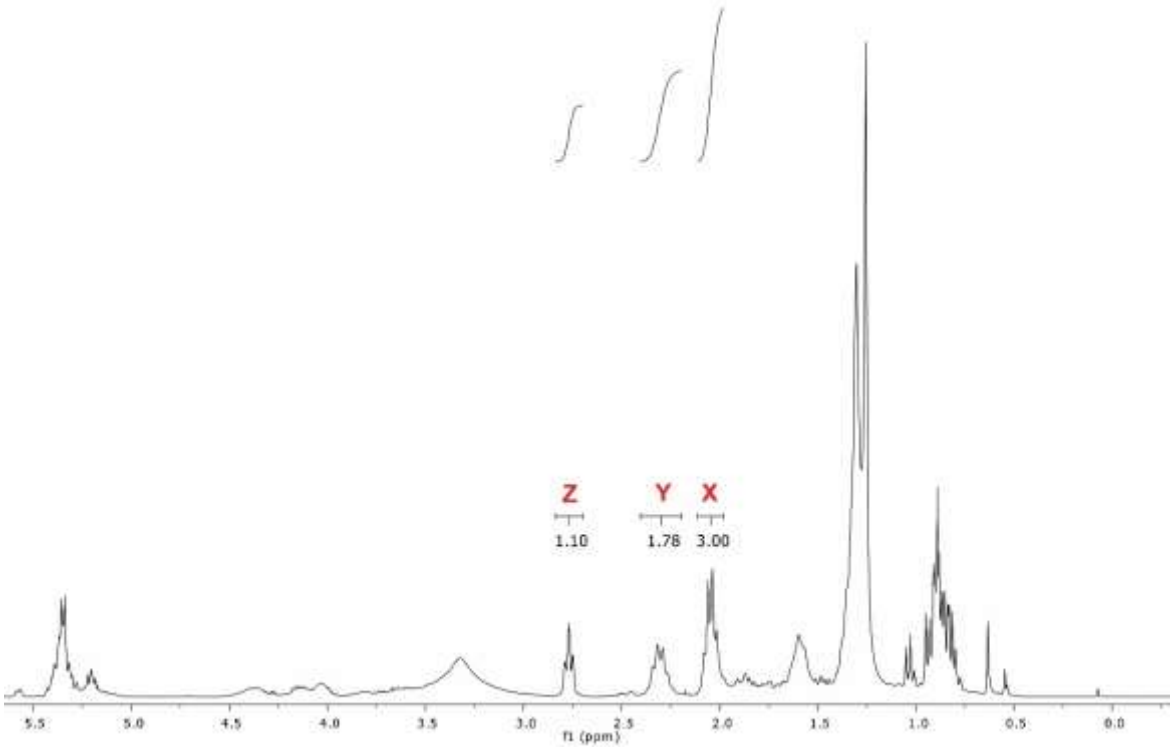


Figura 12. Integração de sinais para cálculo da porcentagem relativa de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), ácidos graxos mono insaturados (AGMI) e ácidos graxos saturados (AGS).

Como será abordado nas seções posteriores, as porcentagens encontradas para AGS, AGMI e AGPI são próximas as porcentagens observadas pela quantificação de ácidos graxos usando a Cromatografia em fase Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC) na seção 3.3.3. Como será demonstrado, pela cromatografia gasosa foi encontrado 25,12% (AGS), 14,36% (AGMI) e 60,52% (AGPI). Como observado, principalmente para os AGPI, os valores são praticamente idênticos, 61,79% (RMN) e 60,52% (CG). Essa similaridade além de

confirmar os percentuais encontrados, demonstra a excelente correlação existente entre as técnicas utilizadas, evidenciando a importância do uso das mesmas para a análise, caracterização e quantificação de ácidos graxos.

3.3.2 Identificação dos ácidos graxos por CG/EM

Na identificação dos ácidos do extrato bruto lipídico (EBL), lipídios neutros (LN), glicolipídos (GL) e fosfolipídios (FL) de *L. crinitus*, com auxílio da mistura de padrão (Tabela 6) e com as bibliotecas *NIST* foram caracterizados 25 ácidos graxos pelo CG/EM (14 saturados: caproico (C6:0) (**1**), caprílico (**2**), cáprico (C10:0) (**3**), tridecanoico (C13:0) (**6**), (mirístico (C14:0) (**8**), pentadecanóico (C15:0) (**9**), palmítico (C16:0) (**11**), heptadecanóico (C17:0) (**13**), esteárico (C18:0) (**19**), araquídico (C20:0) (**26**), heneicosanóico (C21:0) (**27**), beênico (C22:0) (**31**), tricosanóico (C23:0) (32), lignocérico (C24:0) (**34**); 11 insaturados: palmitoleico (C16:1) (**10**), *cis*-10-heptadecanóico (16:1) (**12**), linoleico (C18:2n6c) (**15**), oleico (C18:1n9c) (**17**), *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentanóico (C20:5n3) (**21**), *cis*-8,11,14-eicosatrienoico (C20:3) (**22**), *cis*-11,14-eicosadienóico (C20:2) (**23**), *cis*-11-eicosanóico (C20:1n9c) (**24**), *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (C22:6n3) (**28**), *cis*-13,16-docosadienóico (C22:2) (**29**), erúcico (C22:1n9) (**30**), Tabela 11 e Figura 13.

Tabela 11. Ácidos graxos identificados no EBL e frações LN, GL e FL em comparação com a mistura de padrão C4-C24 e com auxílio da biblioteca NIST por CG/EM.

Ácidos graxos	**#**	**EBL**	**LN**	**GLP**	**FLP**
Ác. Caproico	**1**	✓	✓	✓	✓
Ác. Caprílico	**2**	✓	✓	✓	✓
Ác. Cáprico	**3**	✓	✓	✓	✓
Ác. Undecanóico	**4**	-	-	-	-
Ác. Láurico	**5**	-	-	-	-
Ác. Tridecanóico	**6**	✓	✓	-	-
Ác. Miristoleico	**7**	-	-	-	-
Ác. Mirístico	**8**	✓	✓	✓	✓
Ác. Pentadecanóico	**9**	✓	✓	✓	✓
Ác. Palmitoleico	**10**	✓	✓	✓	✓
Ác. Palmítico	**11**	✓	✓	✓	✓
Ác. *cis*-10-heptadecanóico	**12**	✓		✓	✓
Ác. Heptadecanóico	**13**	✓	✓	✓	✓
Ác. γ-linolênico	**14**	-	-	-	-
Ác. Linoleico	**15**	✓	✓	✓	✓
Ác. α-linolênico	**16**	-	-	-	-
Ác. Oleico	**17**	✓	✓	✓	✓
Ác. Elaídico	**18**	-	-	-	-
Ác. Esteárico	**19**	✓	✓	✓	✓
Ác. araquidônico	**20**	-	-	-	-
Ác. *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentanóico	**21**	-	✓	-	-

Ác. *cis*-8,11,14-eicosatrienóico	**22**	✓	-	-	-
Ác. *cis*-11,14-eicosadienóico	**23**	✓	-	✓	✓
Ác. *cis*-11-eicosanóico	**24**	✓	✓	✓	-
Ác. *cis*-11,14,17-eicosatrienóico	**25**	-	-	-	-
Ác. Araquídico	**26**	-	✓	-	-
Ác. Heneicosanóico	**27**	✓	✓	✓	-
Ác. *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	**28**	✓	✓	-	-
Ác. *cis*-13,16-docosadienóico	**29**	✓	✓	-	-
Ác, erúcico	**30**	✓	✓	-	-
Ác. Beênico	**31**	✓	✓	✓	-
Ác. Tricosanóico	**32**	✓	✓	✓	-
Ác. Nervônico	**33**	-	-	-	-
Ác. Lignocérico	**34**	✓	✓	✓	-

Extrato bruto lipídico (**EBL**); lipídios neutros (**LN**); glicolipídos (GL); fosfolipídios (**FL**); ✓: presença.

Ácidos graxos (AG) em geral são responsáveis pela manutenção celular, atuam como componentes estruturais das membranas, e como moléculas precursoras de outros metabólitos (OREŠIČ; HÄNNINEN; VIDAL-PUIG, 2008). Uma estimativa aproximada é que o número teórico de lipídios é próximo a 200.000, e as principais classes encontradas nas membranas eucarióticas são glicerofosfolipídios, esfingolipídios e colesterol. Como foi observado pela caracterização por CG/EM, houve um equilíbrio qualitativo entre compostos saturados (14) e insaturados (11), no entanto, como será observado na próxima seção, em termos quantitativos há um predomínio de ácidos graxos insaturados, sendo este resultado extremamente importante, uma vez que são substâncias que apresentam um maior espectro de ações farmacológicas, são mais raros, não são produzidos em todas as plantas e organismos.

As estruturas dos ácidos graxos identificados (Figura 13) e os cromatogramas do padrão EMAG (C4-24), do EBL e frações LN, GL e FL (Figura 14) são apresentados a seguir.

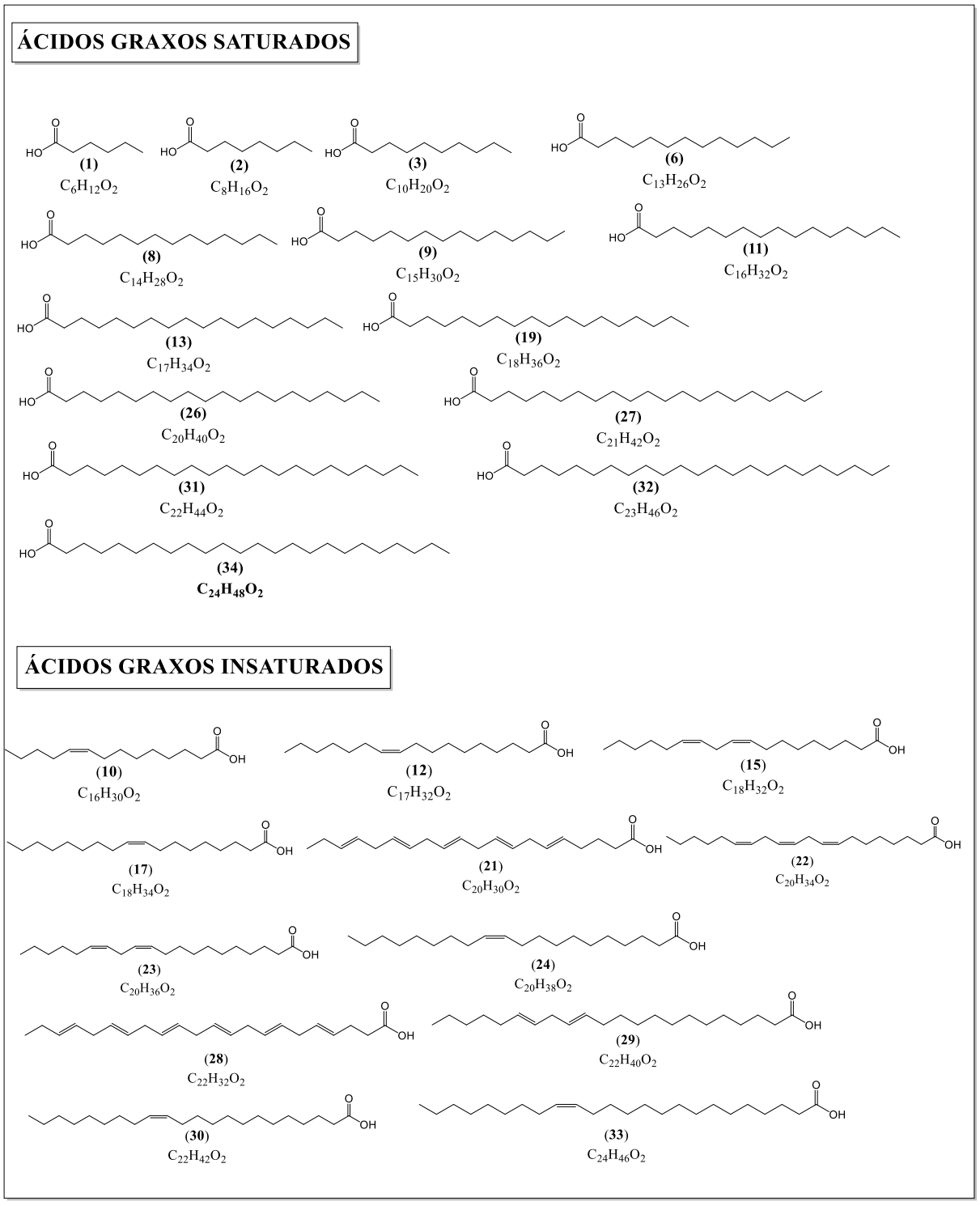


Figura 13. Estruturas dos ácidos graxos identificados no EBL e frações LN, GL e FL em comparação com a mistura de padrão EMAG (C4-C24) e com auxílio da biblioteca NIST. Ácidos graxos saturados: caproico (**1**), caprílico (**2**), capríco (**3**), tridecanóico (**6**), mirístico (**8**), pentadecanóico (**9**), palmítico (**11**), heptadecanpoico (**13**), esteárico (**19**), araquídico (**26**), heneicosanóico (**27**), beênico (31), tricosanóico (**32**) e lignocérico (**34**). Ácidos graxos insaturados: palmitoleico (**10**), *cis*-10-heptadecanóico (**12**), acido linoleico (**15**), oleico (**17**), *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentanóico (**21**), *cis*-8,11,14-eicosatrienóico (**22**), *cis*-11,14-eicosadienóico (**23**), *cis*-11-eicosanóico (**24**), *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (**28**), *cis*-13,16-docosadienóico (**29**), erúcico (**30**) e nervônico (**33**).

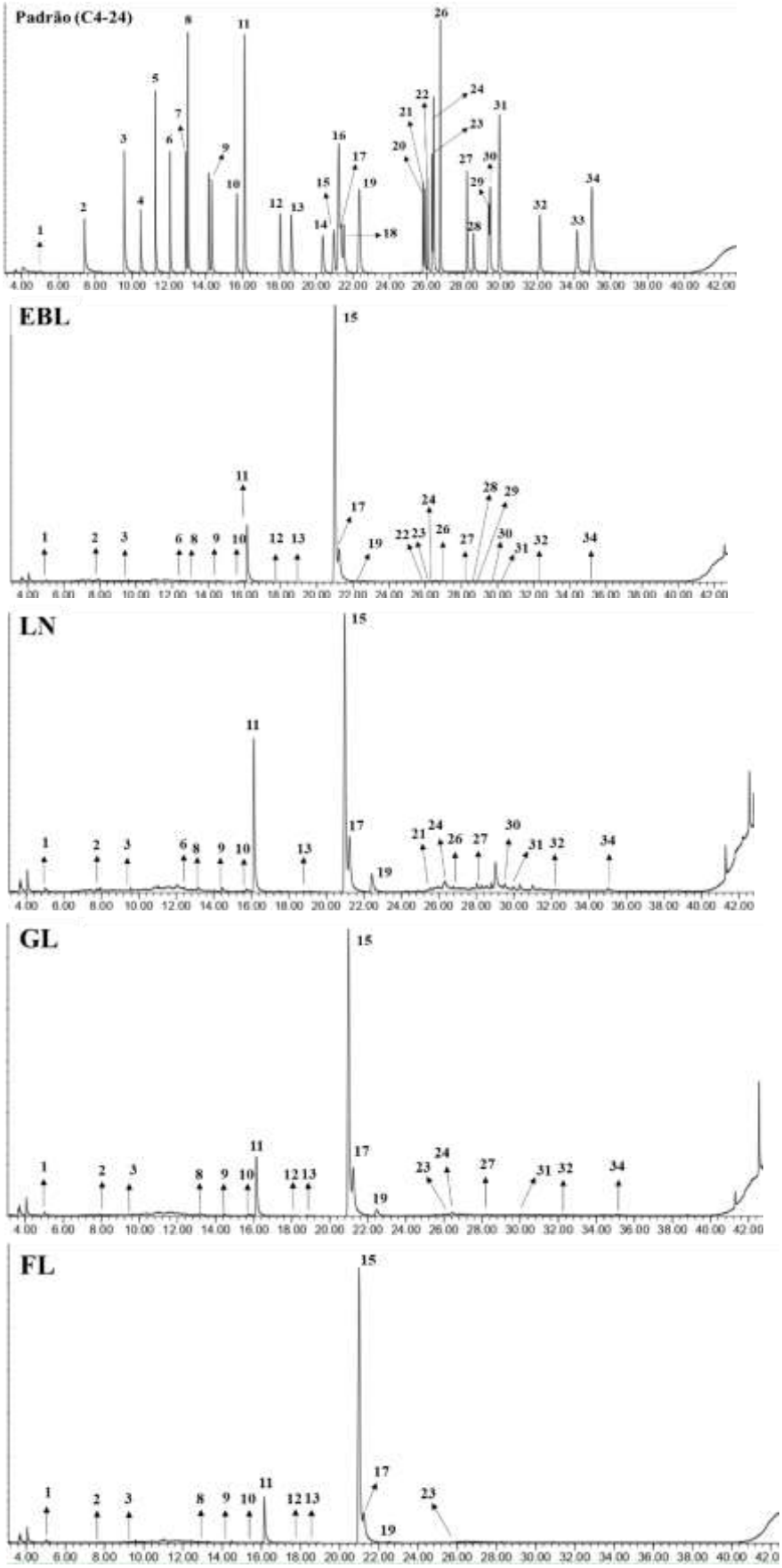


Figura 14. Cromatogramas obtidos por CG/EM, Padrão EMAG (C4-C24) por CG/EM; Extrato bruto lipídico (**EBL**); Lipídios Neutros (**LN**); Glicolipídios (**GL**); Fosfolipídios (**FL**).

3.3.3 Quantificação absoluta (CG/DIC)

A Tabela 12 resume a composição de ácidos graxos em mg/100 g do extrato bruto (EBL) e frações (LN, GL e FL) de basidiocarpos de *L. crinitus*, e os espectros estão apresentados na Figura S1 (material suplementar). Trinta e um ácidos graxos foram identificados, variando de C6-C24. Dentre estes, oito ácidos graxos foram observados pela primeira vez nesta espécie, a saber: undecanóico (C11:0), tridecanóico (C13:0), miristoleico (C15:1), *cis*-10-heptadecanóico (C17:1), ácido araquidônico (C20:4), eicosapentaenóico (C20:5), tricosanóico (C23:0) e nervônico (C24:1).

O principal ácido graxo no EBL e frações foi o ácido linoléico (C18:2n6c) variando de 174,66 a 838,24 mg/100 g. Os próximos quatro ácidos graxos principais foram o ácido palmítico (C16:0, 48,16-189,78 mg/100 g), ácido oleico (C18:1n9c, 21,85-125,25 mg/100 g), ácido esteárico (C18:0, 5,98-46,68 mg /100 g) e ácido pentadecanóico (C15:0, 9,54-36,45 mg/100 g). Comportamento semelhante foi descrito por Bertéli et al. (2021a) para o basidiocarpo de *L. crinitus*.

Ácido docosahexaenóico (C22:6n3) e ácido α-linolênico (C18:3n3) não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. O ácido eicosapentaenóico (C20:5n3), que também faz parte da família ômega-3, foi observado em pequenas quantidades na fração LN (1,48 mg/100 g). Em um estudo de seis espécies de cogumelos, Günç et al. (2013) encontraram esses três ácidos graxos, embora em quantidades muito pequenas. Isso sugere que os cogumelos não são uma fonte ideal desses ácidos graxos e é necessário obtê-los de outra fonte alimentar. O ácido γ-linolênico (C18:3n6) foi identificado em todas as amostras, mas também em pequenas quantidades (1,05-5,45 mg/100 g).

Uma observação interessante foi a presença de ácidos graxos de número ímpar de carbonos em todas as amostras, como ácido pentadecanóico (C15:0, 9,54-36,45 mg/100 g), ácido heptadecanóico (C17:0, 1,50-5,66 mg/100 g), ácido cis-10-heptadecanóico (1,65-6,79 mg/100 g) e ácido heneicosanóico (C21:0, 0,50-13,66 mg/100 g). Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono ocorrem com menor frequência e sua biossíntese resulta da incorporação de uma unidade inicial diferente do acetato (DEWICK, 2009). Outro achado importante foi a presença de ácido elaídico (C18:1n9t, 7,15-28,40 mg/100 g), uma vez que a ocorrência de ácidos graxos trans em cogumelos não é comum (KALAČ, 2009).

Tabela 12. Quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos (QA_{EMAG}) do extrato bruto e frações de *L. crinitus* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra

Ácido graxos	EBL	LN	GL	FL
Ácido capróico (C6:0)	10.93 ± 0.09^{a}	9.31 ± 0.08^{b}	3.88 ± 0.04^{c}	2.18 ± 0.06^{d}
Ácido caprílico (C8:0)	2.66 ± 0.02^{b}	3.68 ± 0.01^{a}	2.17 ± 0.03^{c}	2.60 ± 0.04^{b}
Ácido cáprico (C10:0)	1.14 ± 0.01^{ab}	1.30 ± 0.01^{a}	0.93 ± 0.01^{b}	1.14 ± 0.02^{ab}
Àcido undecanóico (C11:0)	ND	2.23 ± 0.05^{a}	ND	ND
Ácido láurico (C12:0)	2.09 ± 0.08^{b}	2.90 ± 0.31^{a}	2.17 ± 0.06^{b}	1.90 ± 0.07^{b}
Ácido tridecanóico (C13:0)	1.01 ± 0.03^{b}	1.42 ± 0.15^{a}	ND	ND
Ácido mirístico (C14:0)	2.14 ± 0.34^{bc}	3.91 ± 0.61^{a}	2.94 ± 0.25^{ab}	1.28 ± 0.07^{c}
Ácido miristoleico (C14:1)	4.87 ± 1.10^{b}	7.11 ± 1.47^{ab}	3.03 ± 0.34^{a}	1.77 ± 0.19^{b}
Ácido pentadecanóico (C15:1)	14.64 ± 4.76^{bc}	36.45 ± 6.42^{a}	26.88 ± 3.02^{ab}	9.54 ± 0.19^{c}
Ácido palmítico (C16:0)	105.27 ± 27.39^{c}	189.78 ± 4.88^{a}	129.68 ± 15.47^{b}	48.16 ± 0.30^{d}
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.93 ± 0.21^{ab}	1.35 ± 0.28^{a}	0.58 ± 0.07^{bc}	0.34 ± 0.04^{c}
Ácido heptadecanóico (C17:0)	2.66 ± 0.52^{b}	5.66 ± 0.17^{a}	3.16 ± 0.25^{b}	1.50 ± 0.07^{c}
Ácido *cis*-10-heptadenóico (C17:1)	3.82 ± 0.80^{a}	6.79 ± 0.59^{b}	3.50 ± 2.12^{c}	1.65 ± 0.09^{c}
Ácido esteárico (C18:0)	18.21 ± 3.66^{b}	46.68 ± 0.63^{a}	23.33 ± 2.69^{b}	5.98 ± 0.34^{c}
Ácido oleico (C18:1n9c)	74.98 ± 18.29^{b}	125.25 ± 3.37^{a}	31.42 ± 5.44^{c}	21.85 ± 0.89^{c}
Ácido elaídico (C18:1n9t)	16.84 ± 3.86^{b}	28.40 ± 0.99^{a}	12.08 ± 2.18^{bc}	7.15 ± 0.36^{c}
Ácido linoleico (C18:2n6c)	591.29 ± 42.73^{b}	838.24 ± 3.50^{a}	229.32 ± 27.49^{c}	174.66 ± 1.25^{c}
Ácido γ -linolênico (C18:3)	1.84 ± 0.26^{b}	5.45 ± 0.27^{a}	1.66 ± 0.44^{b}	1.05 ± 0.06^{c}
Ácido araquídico (C20:0)	1.26 ± 0.13^{b}	2.45 ± 0.41^{a}	1.29 ± 0.04^{b}	0.99 ± 0.06^{b}
Ácido eicosanóico (C20:1n9c)	3.16 ± 0.55^{b}	8.02 ± 0.37^{a}	2.81 ± 0.84^{bc}	1.41 ± 0.13^{c}
Ácido eicosadienóico (C20:2)	5.72 ± 1.31^{b}	7.77 ± 0.20^{a}	1.97 ± 0.08^{c}	1.89 ± 0.03^{c}
Ácido eicosatrienóico (C20:3)	3.38 ± 0.90^{a}	2.28 ± 0.33^{a}	ND	ND
Ácido araquidônico (C20:4n6)	0.88 ± 0.02^{b}	1.28 ± 0.13^{a}	0.68 ± 0.14^{c}	0.69 ± 0.04^{c}
Ácido eicosapentaenóico (C20:5)	ND	1.48 ± 0.21^{a}	ND	ND
Ácido heneicosanóico (C21:0)	0.50 ± 0.05^{d}	13.66 ± 0.31^{a}	3.29 ± 0.29^{b}	1.80 ± 0.10^{c}
Ácido beênico (C22:0)	2.47 ± 0.63^{b}	6.19 ± 0.06^{a}	1.85 ± 0.30^{b}	0.81 ± 0.05^{c}
Ácido erúcico (C22:1n9)	5.29 ± 0.12^{b}	17.27 ± 1.53^{a}	4.82 ± 0.03^{b}	2.35 ± 0.22^{c}
Ácido docosadienóico C22:2)	3.16 ± 0.20^{b}	5.87 ± 0.25^{a}	ND	1.26 ± 0.07^{c}
Ácido tricosanóico (C23:0)	1.76 ± 0.35^{b}	11.97 ± 0.83^{a}	ND	ND
Ácido lignocérico (C24:0)	11.57 ± 2.25^{b}	20.36 ± 0.10^{a}	2.95 ± 1.10^{c}	1.66 ± 0.10^{c}
Ácido nervônico (C24:1)	4.61 ± 0.86^{a}	ND	4.32 ± 0.29^{a}	2.15 ± 0.06^{b}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); ND: não detectado. Extrato bruto lipídico (EBL), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL), e fosfolipídios (FL).

Segundo Kalač (2013), os ácidos linoleico, oleico e palmítico são os ácidos graxos mais predominantes encontrados no filo Basidiomycota, com o ácido linoleico e o ácido oleico representando dois terços ou mais da quantidade de ácidos graxos identificados, como foi observado no presente estudo. Os ácidos linoléico e palmítico foram os ácidos graxos predominantes no LN, GL e FL de *Pleurotus florida* (KWON; UHM, 1984).

A presença de ácido linoleico em *L. crinitus* pode ter importância econômica porque C18:3n3 e C18:3n6 têm sido usados para sintetizar ácido linoleico conjugado, que tem aplicações farmacêuticas e industriais (WANG et al., 2004). O ácido linoleico é um importante ácido graxo essencial, pois não pode ser biossintetizado pelo corpo humano, devido à falta de enzimas dessaturases necessárias para sua produção. Portanto, deve ser obtido da dieta e é originário da série de ácidos graxos ω6, que inclui o ácido γ-linolênico, ácido di-homo-γ-linolênico, ácido araquidônico e ácido docosapentaenóico. O ácido linoléico também é um

precursor do 1-octen-3-ol (um grupo alcoólico de cogumelos), o principal composto aromático que contribui para o sabor do cogumelo (MAGA, 1981).

O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado (AGMI) incluído na família ω9. É conhecida pela sua eficácia na redução dos níveis de colesterol (PUIGGROS et al., 2002; TOMÁS et al., 2001), podendo reduzir o risco de doenças arteriais coronárias (Pacheco et al., 2008). Os mamíferos utilizam o ácido oleico para produzir hidromel ácido (C20:3n9), por meio de processos de estiramento e dessaturação, diante de condições severas de privação de gorduras essenciais (VOET; VOET, 2010). Outros ácidos graxos ω9, como os ácidos erúcico, nervônico e *cis*-11-eicosenóico também foram identificados na *L. crinitus* analisada neste estudo.

O ácido palmítico, um ácido graxo saturado (AGS), foi detectado em altas quantidades no extrato de *L. crinitus* e em todas as frações. O ácido palmítico é o precursor de uma variedade de ácidos graxos de cadeia longa, como ácido esteárico, ácido palmitoleico (ω7) e ácido oleico (ω9), onde geralmente ocorre um alongamento ou, às vezes, uma etapa de dessaturação (MARZZOCO; TORRES, 2015).

Outro importante ácido graxo encontrado foi o ácido esteárico, com valores semelhantes aos encontrados por Bértelli et al. (2021). Sua importância está relacionada à capacidade dos mamíferos de converter o ácido esteárico saturado (C18:0) em ácido oleico monoinsaturado (ω9) (NAKAMURA; NARA, 2004).

A Tabela 13 resume a proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados nas amostras analisadas.

Tabela 13. Proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados (mg/100 g) do extrato bruto lipídico (EBL), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) do basidiocarpo de *L. crinitus* por CG/DIC.

	EBL	**LN**	**GL**	**FL**
Total AG	904.28 ± 84.21^{b}	1425.02 ± 19.59^{a}	502.25 ± 62.07^{c}	298.57 ± 3.16^{d}
Total AGS	183.33 ± 40.3^{b}	357.97 ± 15.49^{a}	204.53 ± 27.53^{b}	79.56 ± 3.75^{c}
Total AGI	720.95 ± 71.18^{b}	1067.05 ± 13.32^{a}	297.72 ± 39.92^{c}	219.01 ± 3.51^{c}
Total AGMI	114.69± 25.76^{b}	204.68 ± 8.43^{a}	64.09 ± 11.76^{c}	39.46 ± 2.06^{c}
Total AGPI	606.26± 45.42^{b}	862.38 ± 4.89^{a}	233.63 ± 28.15^{c}	179.55 ± 1.45^{c}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n = 3); AG: ácidos graxos, AGS: ácidos graxos saturados, AGI: ácidos graxos insaturados, AGMI: ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

O estudo mostrou que altos valores de ácidos graxos insaturados (AGI) (219,01–1067,05 mg/100 g) predominaram sobre ácidos graxos saturados (AGS) (79,56–357,97 mg/100 g). Dos AGI, foi possível observar que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (179,55–

862,38 mg/100g) predominaram sobre os AGS e AGMI. A concentração de AGS foi a mais baixa no LCE e em todas as frações (39,46–204,68 mg/100 g) (Tabela 8).

Em níveis percentuais, é possível observar ainda mais claramente a predominância de AGPI em todas as amostras analisadas, sobretudo, na fração dos LN. Já os GL, apresentam um maior equilíbrio entre AGS e AGPI, como demonstrado na figura 15.

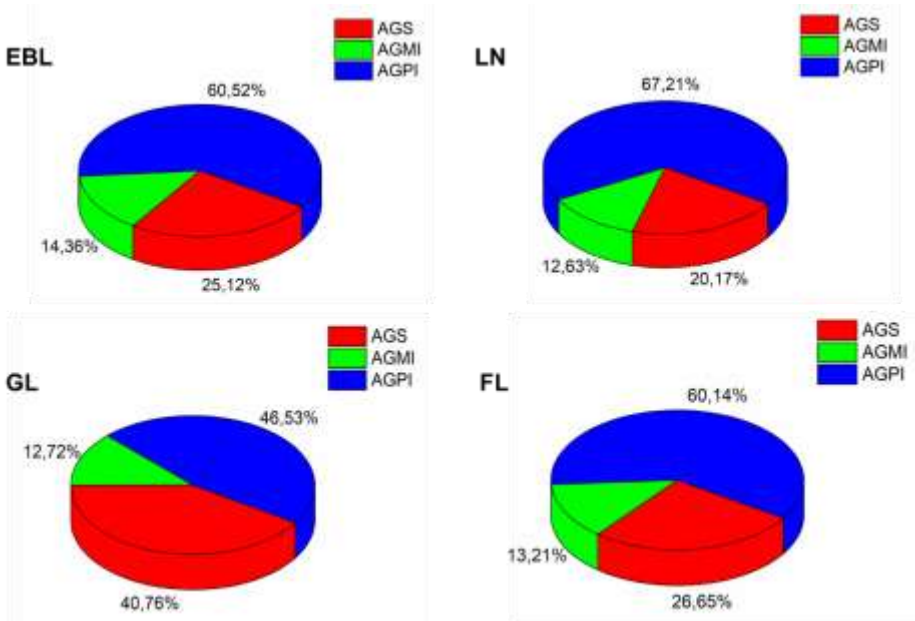


Figura 15. Proporções de ácidos graxos saturados **(AGS)**, monoinsaturados **(AGMI)** e poli-insaturados **(AGPI)** no extrato lipídico bruto **(EBL)**, lipídios neutros **(LN),** glicolipídios **(GL)** e fosfolipídios **(FL)** do basidiocarpo de *L. crinitus* por CG/DIC

Os resultados obtidos concordam com as observações de que os AGI predominam sobre os AGS nos cogumelos, especialmente o ácido linoléico (BERTÉLI et al., 2021a; HELENO et al., 2015; KALAČ, 2013). A predominância de AGI, especialmente AGPI, é particularmente boa, uma vez que os AGS estão associados a distúrbios cardiovasculares, enquanto uma alta ingestão de AGPI e AGMI está relacionada ao tratamento e prevenção desses distúrbios, bem como aqueles relacionados ao metabolismo da glicose, lipídios e fígado (SILVA FIGUEIREDO et al., 2017).

3.3.4 Atividade antileishmania do EBL e frações

As atividades antileishmania *in vitro* do EBL, LN, GL e FL estão resumidas na Tabela 14. O EBL, LN e GL foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas. A concentração inibitória de 50% (IC_{50}) contra formas promastigotas de *L. amazonensis* foi de 56,18, 96,57 e 146,49 µg/mL para LN, GL e EBL, respectivamente. Além disso, essas frações

foram mais ativas contra amastigotas do que promastigotas, apresentando valores de IC_{50} de 22,40, 38,63 e 77,67 µg/mL, respectivamente. A fração LN foi a que mais inibiu o crescimento de *L. amazonensis* em ambas as formas.

A citotoxicidade de EBL, LN, GL e FL foi avaliada contra macrófagos J774A.1 (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade antiproliferativa do extrato bruto lipídico de *L. crinitus* (EBL) e frações contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1.

Amostras	J774A.1	*L. amazonensis*			
		Promastigotas		Amastigotas	
	CC_{50} (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)	IS	IC_{50} (µg/mL)	IS
EBL	119.40 ± 15.70	146.49 ± 12.92	0.82	77.67 ± 5.43	1.54
LN	59.70 ± 1.86	56.18 ± 0.08	1.06	22.40 ± 3.20	2.67
GL	158.19 ± 8.06	96.57 ± 8.26	1.64	38.63 ± 2.92	4.10
FL	379.26 ± 7.74	>200	ND	>100	ND
Miltefosina	26.06 ± 4.43	9.63 ± 0,22	2.71	0.78 ± 0,04	33,41

Cada valor representa a média ± desvio padrão para três experimentos realizados em duplicata. **EBL**: extrato bruto lipídio; **LN**: lipídios neutros, **GL**: glicolipídios, **FL**: fosfolipídios; IC50: concentração inibitória para 50% dos parasitas, CC50: concentração citotóxica para 50% das células, IS índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50}); ND: não determinado

Os resultados mostraram baixa citotoxicidade do EBL e frações, com valores de CC50 variando de 59,70 a 379,26 µg/mL, sendo menos citotóxico que o antileishmania miltefosina.

Martins de Lima et al. (2006) demonstraram que os ácidos graxos (palmítico, esteárico, oleico, linoléico, araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico) induzem apoptose e necrose de macrófagos J774. A citotoxicidade dos ácidos graxos não foi estritamente relacionada ao número de ligações duplas nas moléculas, sendo sugerido o seguinte grau de toxicidade: palmítico > docosahexaenóico > esteárico = araquidônico = eicosapentaenóico > oleico > linoleico. No presente estudo, a fração LN foi a mais enriquecida em ácido palmítico (189,78 mg/100 g) e também a que apresentou maior atividade citotóxica em macrófagos J774.1. Por outro lado, a fração FL, que apresentou a menor quantidade de ácido palmítico (48,16 mg/100 g), também apresentou a menor citotoxicidade (379,26 µg/mL). Além disso, verificou-se que os mecanismos pelos quais os ácidos graxos induzem a morte celular envolvem alterações no potencial transmembrana mitocondrial e acúmulo intracelular de lipídios neutros (MARTINS DE LIMA et al. 2006), justificando a maior toxicidade na fração LN em relação às demais frações.

A relação entre citotoxicidade e atividade em promastigotas pode resultar no índice de seletividade (IS; CC_{50} J774A.1 células/IC_{50} em promastigotas ou amastigotas). Segundo Moreira et al. (2019), os compostos testados são considerados mais seletivos para atividade contra parasitas quando os valores são maiores que 1,0, e um valor menor que 1,0 é considerado

mais seletivo para atividade contra células de mamíferos hospedeiros. Em relação às formas promastigotas, os LN e GL foram mais seletivos para os parasitos do que os macrófagos com valores de 1,06 e 1,64, respectivamente. O EBL, no entanto, foi mais seletivo para atividade contra as células de mamíferos (0,86) e o FL não apresentou atividade para nenhum dos dois nas concentrações testadas. Com relação às formas amastigotas, o EBL, LN e GL foram mais seletivos para parasitas do que macrófagos com valores de 1,54, 2,67 e 4,10, respectivamente.

Esses são resultados promissores, visto que LN, GL e EBL se mostraram mais ativos contra amastigotas, a forma proliferativa do parasito encontrada no interior de células hospedeiras de mamíferos. Considerando os valores de IC_{50}, a fração LN mostrou-se a mais ativa contra as formas promastigota e amastigota, porém, ao avaliar o SI, a fração GL foi a mais seletiva contra ambas as formas avaliadas, principalmente contra amastigotas.

A atividade antileishmania do EBL, LN e GL pode estar associada à presença do ácido linoleico. Estudos recentes mostraram um duplo papel protetor do ácido linoléico na infecção por *L. donovani*. Saini e Rai (2020) mostraram que o ácido linoléico inibe a liberação de microvesículas derivadas de *L. donovani* da forma promastigota do parasita, contendo a infecção. No estudo de Saini et al. (2020), a resposta do ácido linoléico promoveu proteção pró-inflamatória e suprimiu a resposta anti-inflamatória. Os autores demonstraram o efeito preventivo e terapêutico do ácido linoléico na infecção por *L. donovani in vitro*, demonstrando que ambos os usos são igualmente eficazes na contenção da doença.

Os resultados do presente estudo mostraram maior atividade do EBL, LN e GL contra as formas amastigotas do que contra as formas promastigotas, sendo que a fração LN, que possui os maiores valores de ácido linoléico, apresentou a melhor atividade contra ambas as formas.

Existem vários mecanismos potenciais que poderiam explicar porque o EBL e suas frações lipídicas (LN e GL) exibiram maior atividade contra formas amastigotas de *L. amazonensis* em comparação com formas promastigotas. Uma possibilidade é que amastigotas e promastigotas tenham diferentes composições lipídicas, com amastigotas contendo níveis mais altos de ácidos graxos saturados e colesterol. Como resultado, o EBL e suas frações podem conter lipídios que visam especificamente a composição lipídica dos amastigotas, tornando-os mais eficazes contra esta forma (MESSAOUD, 2017). Diferenças na composição lipídica podem afetar a fluidez da membrana, o que pode afetar a atividade de proteínas e enzimas associadas à membrana. Os amastigotas têm menor fluidez de membrana do que os promastigotas, tornando-os mais suscetíveis à ruptura pelo EBL e suas frações (BIAGIOTTI, 2013; BOUABID, 2022; LEROUX, 2023).

Além disso, como os amastigotas residem nas células hospedeiras, é possível que os extratos tenham como alvo as vias das células hospedeiras que são importantes para a sobrevivência do parasita. Por exemplo, lipídios como esfingosina e ceramida demonstraram interromper o metabolismo lipídico nas células hospedeiras, inibindo as enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio. Essa interrupção pode levar à indução de apoptose em macrófagos infectados, que podem eliminar parasitas intracelulares (ROBERTS, 2003; DENNY, 2004; ZHANG, 2005; MAJUMDER, 2012; YAO, 2016; NYONDA, 2022; LEROUX, 2023).

Os achados de Saini et al. (2020) indicam que baixos níveis de ácido linoléico têm sido relatados no soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV) em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que esses pacientes podem ter uma chance maior de agravamento da doença, sendo a desnutrição considerada um fator de risco para o avanço da LV, e que dietas ricas em ácido linoléico podem ajudar a restaurar a resposta imune de indivíduos desnutridos

Embora Saini e Rai (2020) não tenham observado atividade leishmanicida direta do ácido linoléico contra promastigotas de *L. donovani*, o EBL e as frações foram ativos contra promastigotas de *L. amazonensis* e os ácidos graxos nessas amostras não estão na forma livre, mas sim nas formas de triacilglicerol, glicolipídio e fosfolipídio.

No geral, os mecanismos por trás da maior atividade do EBL e de suas frações lipídicas contra as amastigotas de *L. amazonensis* são provavelmente complexos e multifatoriais, envolvendo uma combinação de fatores relacionados à biologia do parasita e da célula hospedeira, bem como às propriedades químicas das frações lipídicas. Portanto, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar como essas amostras agem diretamente contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis.*

3.3.5 Atividade antiproliferativa

Foi observado que a citotoxicidade do EBL (extrato bruto lipídico), e das frações LN (lipídios neutros), GL (glicolipídios) e FP (fosfolipídios) é dependente do tempo e concentração. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do MTT, em linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7. A tabela 15 (HepG2/C3A) e 16 (MCF-7) apresentam as médias das absorbâncias e desvio padrão, bem como a viabilidade celular, estimada com base na absorbância do controle (CTR=100%). A correlação da citotoxicidade e viabilidade celular são apresentados nas figuras 16 e 17.

Com relação à absorbância, para o EBL, nenhuma das concentrações (10 a 250 µg/mL) foram citotóxicas para a linhagem tumoral HepG2/C3A, nos tempos de 24 h. Já no tempo de 48 h, as concentrações de 10 e 50 µg/mL foram citotóxicas, apresentando uma diferença estatisticamente significativa quando comparada ao CTR. No tempo de 72 h, todas as concentrações testadas apresentaram citotoxicidade. O mesmo perfil foi observado em relação a viabilidade celular, sendo observado uma redução inferior a 80% somente nas concentrações de 10 e 50 µg/mL (48 h) e em todas as concentrações testadas em 72 h. No tempo de 72 h, com 10 µg/mL, houve uma redução de 46,15%, no entanto, os menores valores de viabilidade celular foram observados nas concentrações de 50, 100, 150 µg/mL, com 36,85 %, 31,16 % e, 39,21 % de redução, respectivamente.

Para a fração LN, com relação à absorbância, todas das concentrações testadas (10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) foram citotóxicas para a linhagem tumoral HepG2/C3A, nos tempos de 24 h e 72 h. Já no tempo de 48 h, com exceção da concentração 10 µg/mL, todas as concentrações foram citotóxicas. A fração GL, só apresentou citotoxicidade nas concentrações de 100, 200 e 250 µg/mL em 24 h. A fração FL, apresentou citotoxicidade contra a linhagem tumoral HepG2/C3A nas concentrações de 10, 50, 100 µg/mL no tempo 48 h, e em todas as concentrações testadas no tempo de 72 h. Em relação a viabilidade celular, a fração LN apresentou uma redução abaixo de 80 % em todas concentrações e tempos testados, com exceção da concentração de 10 µg/mL no tempo 48 h. Por sua vez, a fração GL não apresentou redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações e tempos testados. Já a fração FL, apresentou uma redução abaixo de 80 % da viabilidade na concentração de 50 µg/mL em 48 h, e em todas as concentrações testadas no tempo de 72 h.

Analisando os valores de viabilidade celular, como já demonstrado, o extrato que apresentou maior potencial foi o EBL no tempo de 72 h, com valores de viabilidade celular chegando a 31,16 % na concentração de 100 µg/mL. No entanto, a fração LN foi a que apresentou os menores valores de viabilidade celular em menor tempo, pois em 24 h, todas as concentrações causaram uma redução da viabilidade celular abaixo de 80 %. Outro fato interessante é em relação a fração FL, pois no tempo de 72 h, ela apresentou um perfil de redução da viabilidade celular muito semelhante ao do EBL, com valores de viabilidade celular de 58,53 % (10 µg/mL), 49,74 % (50 µg/mL), 42,02 % (100 µg/mL), 48,90 % (150 µg/mL), 57,83 % (200 µg/mL), e 65, 13% (250 µg/mL). Como base na semelhança do perfil de atividade entre o EBL e os FL, é possível levantar a hipótese que esse efeito de redução de viabilidade celular tardio (72 h) é relacionado a presença dos FL.

Foi observado a citotoxicidade do EBL, e das frações LN, GL e FP contra linhagem celular tumoral MCF-7. Com relação à absorbância, para o EBL, todas as concentrações (10 a 250 µg/mL) foram citotóxicas para a linhagem tumoral MCF-7, nos tempos de 24, 48 e 72 h. Em relação a viabilidade celular, com exceção da concentração de 10 µg/mL em 72 h, em todas as concentrações e tempos testados houve uma redução da viabilidade celular inferior a 80%.

Para a fração LN, com relação à absorbância, todas das concentrações testadas (10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) foram citotóxicas para a linhagem tumoral MCF-7, nos tempos de 48 h e 72 h. Já no tempo de 24 h, com exceção da concentração 10 µg/mL, todas as concentrações foram citotóxicas. Em relação a viabilidade celular, nas concentrações de 100, 150, 200 e 250 µg/mL e em todos os tempos testados, houve redução da viabilidade celular abaixo de 80% em nenhum dos tempos testados. Já concentração de 10 µg/mL não houve redução da viabilidade celular abaixo de 80%, e na concentração de 50 µg/mL somente no tempo de 48 h houve redução da viabilidade.

A fração GL, não apresentou citotoxicidade na concentração de 50 µg/mL, na concentração de 10, 150, 200 e 250 µg/mL somente em 72 h. Já na concentração de 100 µg/mL, apresentou citotoxicidade nos tempos de 48 h e 72 h. Por sua vez, a fração GL não apresentou redução da viabilidade celular em nenhuma das concentrações e tempos testados. A fração FL, apresentou citotoxicidade contra a linhagem tumoral MCF-7 em 50, 100 e 150 µg/mL no tempo 48 e 72 h, e na concentração de 200 e 250 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 h. Já na concentração de 10 µg/mL, somente no tempo de 48 h. Em relação a viabilidade celular, a fração FL apresentou uma redução abaixo de 80 % na concentração de 100 e 150 µg/mL no tempo de 72 h, e nas concentrações de 200 e 250 µg/mL, nos tempos de 48 h e 72 h.

Os ácidos graxos são um grupo importante de metabólitos primários que demonstram ser eficazes contra células tumorais. A ação tumoricida dos ácidos graxos parece estar relacionada à sua capacidade de aumentar a geração de radicais livres e a peroxidação lipídica nas células tumorais. Tanto os radicais livres quanto os peróxidos lipídicos podem danificar uma variedade de enzimas, proteínas e DNA. Eles também podem esgotar os níveis de adenosina trifosfato (ATP) nas células e causar apoptose (NANO et al., 2003).

Dentre os ácidos graxos, destaca-se a atividade do miristoléico (IGUCHI et al., 2001), palmítico (ZHU et al., 2021), linoléico (CHEN et al., 2016), α-linolênico (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; ORTEA; GUIL-GUERRERO, 2020), oleico (CARRILLO PÉREZ; CAVIA CAMARERO; ALONSO DE LA TORRE, 2012) e ácidos araquidônicos (LIAU; KIM; FRUEHAUF, 2021).

Foi demonstrado que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (ω-6) exercem seus efeitos de proliferação anticancerígena, influenciando a expressão de genes e proteínas, interrompendo assim a progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose (XU; QIAN, 2014). A relação da ação antitumoral dos AGPI também está relacionada a sua capacidade em se dissolver nas membranas lipídicas e promover a peroxidação lipídica em células tumorais (SHIROTA et al., 2005).

De acordo com Shirota et al. (2005), os AGPIs com maior atividade antitumoral são ω-3 e ω-6, que parecem ter um efeito inibitório no processo carcinogênico, e os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, que retardam o crescimento e desenvolvimento de cânceres. Esses ácidos foram encontrados no EBL e frações em quantidades significativas e podem estar relacionados à atividade antitumoral de *L. crinitus.*

Evidências de pesquisas mostram uma alta dose de ácido linoleico inibe a proliferação da linha celular de câncer de cólon Caco-2 (DOMMELS et al., 2003), enquanto uma alta ingestão do ácido linoleico também mostra um efeito protetor contra o desenvolvimento do câncer (HORROBIN; ZIBOH, 1997). Além disto, o ácido linoleico pode ser dessaturado e convertido no ácido γ-linolênico (GLA), que é catalisado pela enzima Δ6-dessaturase. As evidências mostram que o GLA também está associado a atividades anticancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*. Por exemplo, o GLA inibiu o crescimento celular das linhas celulares de neuroblastoma humano GOTO, SK-N-DZ, NKP e NCG, uma linha celular de glioma C6 de rato e a célula de carcinossarcoma de rato linha LLC-WRC256 in vitro (FUJIWARA; TODO; IMASHUKU, 1986; COLQUHOUN; SCHUMACHER, 2001; LEAVER et al., 2002).

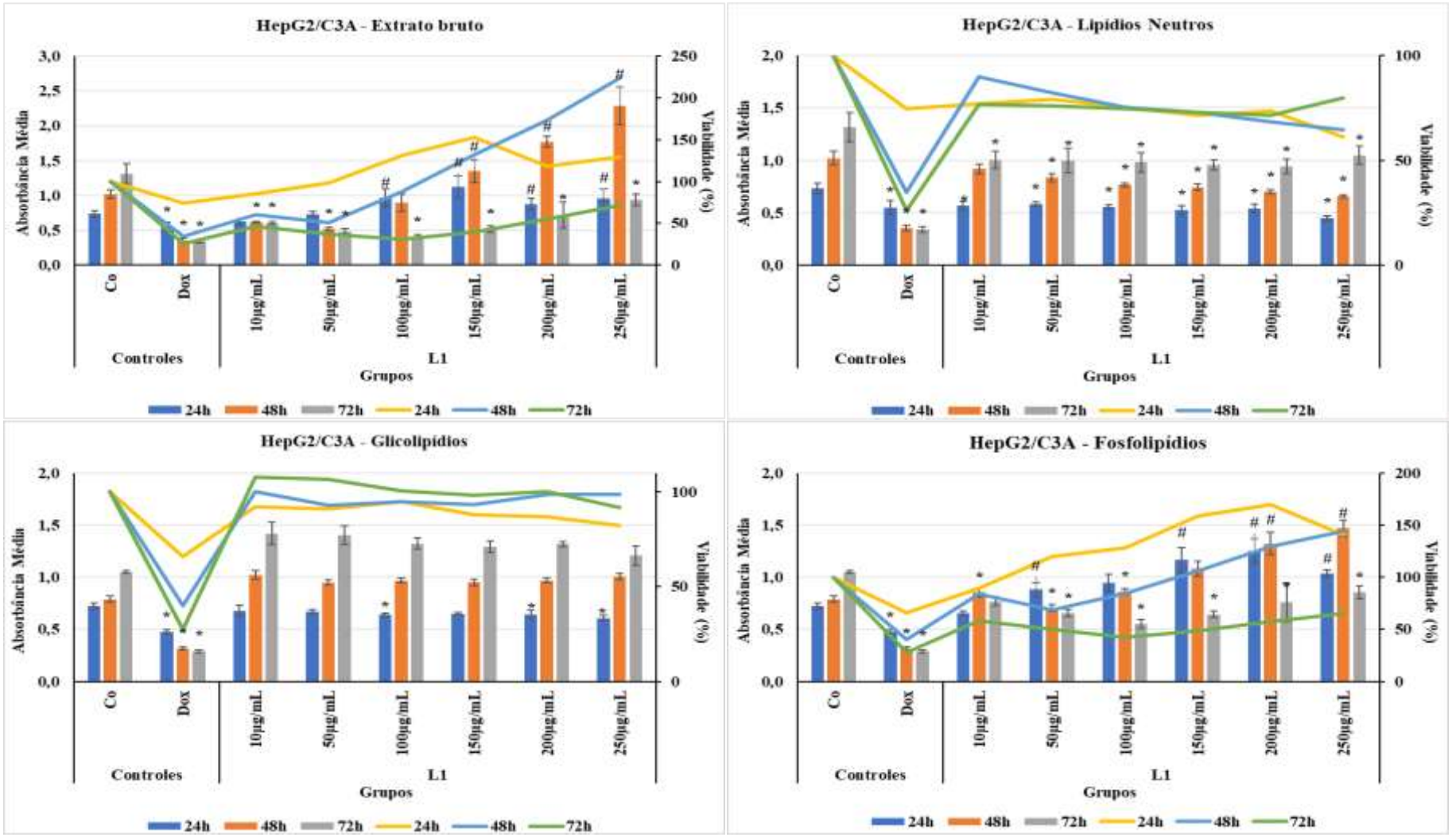


Figura 16. Absorbância média (barras), Viabilidade celular (linhas) (%) e desvio padrão dos grupos controle (Co), tratamento com Doxorrubicina (DOX) e extratos de ácidos graxos de *L. crinitus* nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/L, por 24, 48 e 72 horas, na linhagem celular de câncer de fígado (HepG2/C3A) *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

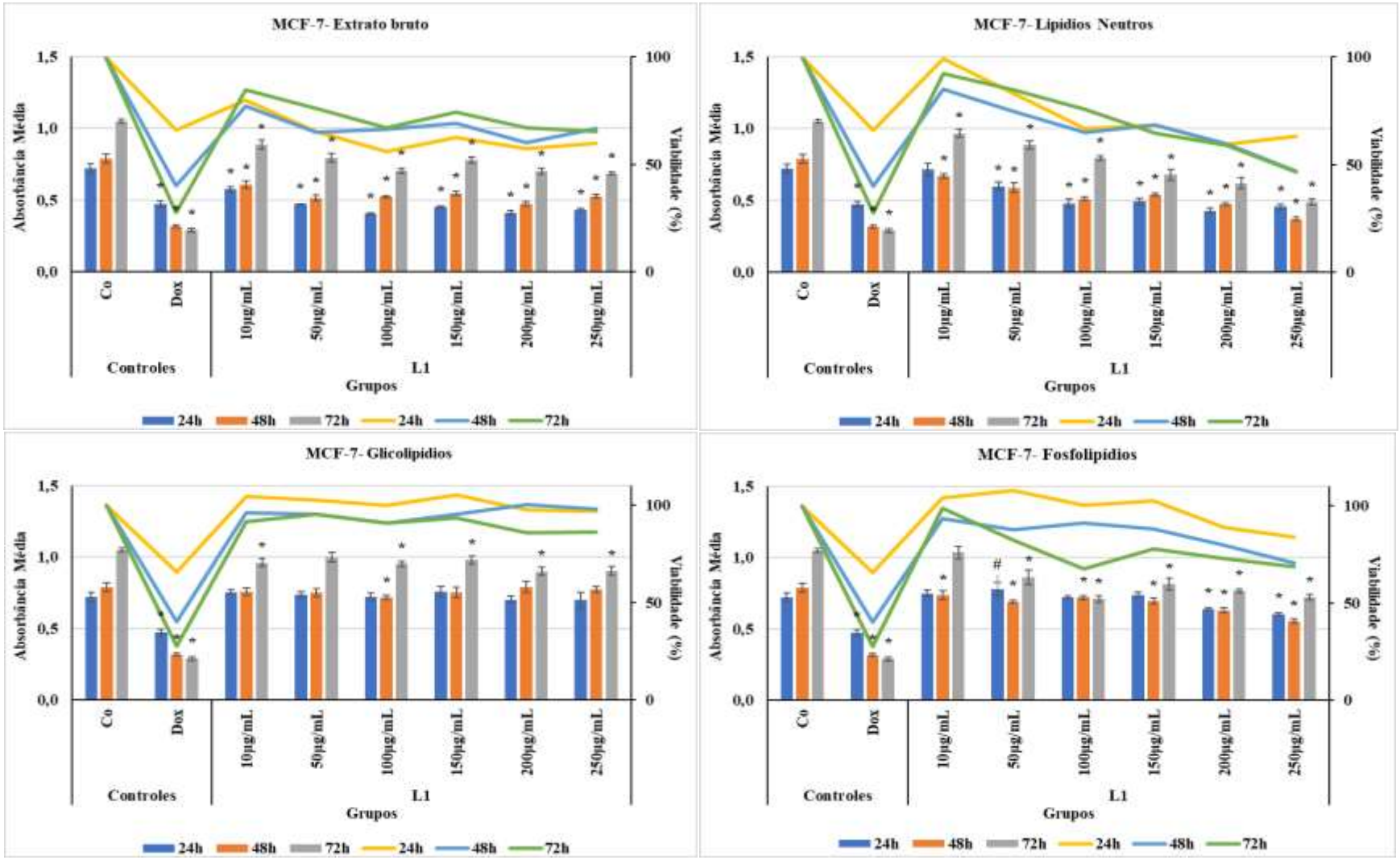


Figura 17. Absorbância média (barras), Viabilidade celular (linhas) (%) e desvio padrão dos grupos controle (Co), tratamento com Doxorrubicina (DOX) e extratos de ácidos graxos de *L. crinitus* nas concentrações de 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/L, por 24, 48 e 72 horas, na linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

Tabela 15. Absorbância média e viabilidade celular referente ao ensaio de citotoxicidade MTT em linhagem celular de câncer de fígado (HepG2/C3A), expostas aos extratos de ácidos graxos de *L. crinitus.*

HepG2/C3A - Ácidos Graxos							
Tratamentos	**Grupos**	**Absorbância Média**			**Viabilidade Celular (%)**		
		24 horas	**48 horas**	**72 horas**	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
Controles	Co	0,736 ± 0,050	1,021 ± 0,063	1,315 ± 0,141	100,000 ± 5,050	100,000 ± 6,383	100,000 ± 14,195
	Dox	0,549 ± 0,066*	0,355 ± 0,029*	0,343 ± 0,028*	74,523 ± 6,611*	34,800 ± 2,902*	26,142 ± 2,878*
Extrato Bruto	10µg/mL	0,626 ± 0,0422	0,613 ± 0,013*	0,607 ± 0,020*	85,014 ± 4,227	60,044 ± 1,386*	46,156 ± 2,068*
	50µg/mL	0,725 ± 0,049	0,517 ± 0,022*	0,484 ± 0,039*	98,450 ± 4,922	50,643 ± 2,206*	36,849 ± 3,975*
	100µg/mL	0,965 ± 0,124#	0,896 ± 0,128	0,409 ± 0,029*	130,995 ± 12,470#	87,735 ± 12,836	31,161 ± 2,926*
	150µg/mL	1,126 ± 0,158#	1,351 ± 0,160#	0,515 ± 0,045*	152,900 ± 15,827#	132,347 ± 16,047#	39,206 ± 4,563*
	200µg/mL	0,873 ± 0,081#	1,771 ± 0,081#	0,723 ± 0,186*	118,482 ± 8,142#	173,473 ± 8,108#	55,038 ± 18,658*
	250µg/mL	0,954 ± 0,138#	2,283 ± 0,272#	0,938 ± 0,084*	129,520 ± 13,846#	223,608 ± 27,231#	71,341 ± 8,493*
Lipídios Neutros	10µg/mL	0,566 ± 0,041*	0,918 ± 0,045	1,007 ± 0,083*	76,850 ± 4,193*	89,968 ± 4,522	76,618 ± 8,359*
	50µg/mL	0,582 ± 0,023*	0,838 ± 0,038*	0,997 ± 0,118*	79,090 ± 2,394*	82,115 ± 3,835*	75,858 ± 11,899*
	100µg/mL	0,554 ± 0,021*	0,768 ± 0,017*	0,980 ± 0,094*	75,222 ± 2,131*	75,201 ± 1,784*	74,535 ± 9,462*
	150µg/mL	0,525 ± 0,044*	0,743 ± 0,031*	0,956 ± 0,046*	71,342 ± 4,486*	72,773 ± 3,193*	72,710 ± 4,655*
	200µg/mL	0,541 ± 0,040*	0,698 ± 0,020*	0,940 ± 0,070*	73,423 ± 4,067*	68,347 ± 2,062*	71,478 ± 7,072*
	250µg/mL	0,450 ± 0,024*	0,658 ± 0,014*	1,049 ± 0,087*	61,175 ± 2,467*	64,470 ± 1,404*	79,812 ± 8,783*
Glicolipídios	10µg/mL	0,679 ± 0,049	1,021 ± 0,040	1,419 ± 0,108	92,152 ± 4,930	99,975 ± 4,008	107,932 ± 10,861
	50µg/mL	0,669 ± 0,021	0,949 ± 0,026	1,402 ± 0,088	90,877 ± 2,140	92,964 ± 2,613	106,609 ± 8,852
	100µg/mL	0,638 ± 0,015*	0,967 ± 0,024	1,320 ± 0,052	86,669 ± 1,551*	94,727 ± 2,452	100,419 ± 5,260
	150µg/mL	0,649 ± 0,010	0,951 ± 0,030	1,291 ± 0,058	88,162 ± 1,008	93,140 ± 3,017	98,199 ± 5,818
	200µg/mL	0,640 ± 0,042*	0,967 ± 0,024	1,316 ± 0,025	86,941 ± 4,259*	94,746 ± 2,414	100,130 ± 2,555
	250µg/mL	0,607 ± 0,029*	1,006 ± 0,031	1,207 ± 0,093	82,381 ± 2,930*	98,506 ± 3,152	91,811 ± 9,338
Fosfolipídios	10µg/mL	0,656 ± 0,021	0,854 ± 0,046*	0,769 ± 0,042*	89,140 ± 2,125	83,662 ± 4,651*	58,536 ± 4,209*
	50µg/mL	0,881 ± 0,064#	0,702 ± 0,033*	0,654 ± 0,033*	119,676 ± 6,442#	68,778 ± 3,340*	49,745 ± 3,347*
	100µg/mL	0,946 ± 0,080#	0,864 ± 0,029*	0,552 ± 0,043*	128,444 ± 8,079#	84,680 ± 2,946*	42,020 ± 4,384*
	150µg/mL	1,166 ± 0,120#	1,081 ± 0,073*	0,643 ± 0,031*	158,329 ± 12,091#	105,889 ± 7,339*	48,909 ± 3,133*
	200µg/mL	1,252 ± 0,118#	1,321 ± 0,106#	0,760 ± 0,189*	169,974 ± 11,896#	129,410 ± 10,686#	57,836 ± 18,996*
	250µg/mL	1,035 ± 0,033#	1,469 ± 0,077#	0,856 ± 0,061*	140,523 ± 3,317#	143,921 ± 7,764#	65,136 ± 6,110*

Grupos: Controle, DOX e ácido graxos (10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL), após 24, 48 e 72 horas de exposição. Análise estatística: ANOVA, seguido do Teste de Dunnet. Os valores correspondem a média ± desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$)

Tabela 16. Absorbância média e viabilidade celular referente ao ensaio de citotoxicidade MTT em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7), expostas aos extratos de ácidos graxos de *L. crinitus.*

MCF -7 -Ácidos Graxos							
Tratamentos	**Grupos**	**Absorbância Média**			**Viabilidade Celular (%)**		
		24 horas	**48 horas**	**72 horas**	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
Controles	Co	0,721 ± 0,030	0,789 ± 0,029	1,049 ± 0,012	**100,000 ± 3,00**	**100,000 ± 2,908**	**100,000 ± 1,290**
	Dox	0,474 ± 0,019*	0,317 ± 0,011*	0,290 ± 0,014*	**65,796 ± 1,973***	**40,169 ± 1,131***	**27,655 ± 1,414***
Extrato Bruto	10µg/mL	0,575 ± 0,017 *	0,608 ± 0,025 *	0,888 ± 0,032 *	79,704 ± 1,72 *	77,094 ± 2,468 *	84,620 ± 3,238 *
	50µg/mL	0,471 ± 0,002 *	0,513 ± 0,021 *	0,797 ± 0,031 *	65,283 ± 0,179 *	65,056 ± 2,077 *	75,946 ± 3,104 *
	100µg/mL	0,404 ± 0,009 *	0,523 ± 0,009 *	0,704 ± 0,018 *	55,993 ± 0,901 *	66,323 ± 0,868 *	67,101 ± 1,779 *
	150µg/mL	0,450 ± 0,008 *	0,546 ± 0,016 *	0,779 ± 0,021 *	62,371 ± 0,753 *	69,187 ± 1,570 *	74,268 ± 2,135 *
	200µg/mL	0,412 ± 0,013 *	0,473 ± 0,018 *	0,701 ± 0,020 *	57,157 ± 1,268 *	59,962 ± 1,770 *	66,815 ± 1,966 *
	250µg/mL	0,431 ± 0,011 *	0,527 ± 0,013 *	0,685 ± 0,011 *	59,737 ± 1,055*	66,729 ± 1,295 *	65,252 ± 1,060 *
Lipídios Neutros	10µg/mL	0,714 ± 0,043	0,670 ± 0,016 *	0,968 ± 0,027 *	99,062 ± 4,258	84,874 ± 1,551 *	92,245 ± 2,670 *
	50µg/mL	0,599 ± 0,029 *	0,588 ± 0,035 *	0,888 ± 0,028 *	83,060 ± 2,892 *	74,560 ± 3,485 *	84,600 ± 2,822 *
	100µg/mL	0,480 ± 0,027 *	0,511 ± 0,015 *	0,795 ± 0,016 *	66,614 ± 2,740 *	64,777 ± 1,455 *	75,774 ± 1,619 *
	150µg/mL	0,492 ± 0,022 *	0,540 ± 0,008 *	0,678 ± 0,037 *	68,278 ± 2,220 *	68,477 ± 0,844 *	64,623 ± 3,694 *
	200µg/mL	0,429 ± 0,016 *	0,472 ± 0,011 *	0,620 ± 0,040 *	59,459 ± 1,571 *	59,835 ± 1,130 *	59,095 ± 3,988 *
	250µg/mL	0,456 ± 0,018 *	0,370 ± 0,013 *	0,489 ± 0,022 *	63,231 ± 1,829 *	46,860 ± 1,348 *	46,583 ± 2,230 *
Glicolipídios	10µg/mL	0,754 ± 0,019	0,759 ± 0,027	0,962 ± 0,028 *	104,581 ± 1,873	96,152 ± 2,670	91,654 ± 2,79 *
	50µg/mL	0,739 ± 0,019	0,751 ± 0,028	0,999 ± 0,032	102,417 ± 1,920	95,214 ± 2,822	95,257 ± 3,249
	100µg/mL	0,722 ± 0,027	0,718 ± 0,016 *	0,953 ± 0,016 *	100,060 ± 2,682	90,957 ± 1,619 *	90,853 ± 1,645 *
	150µg/mL	0,759 ± 0,034	0,754 ± 0,037 *	0,981 ± 0,028	105,191 ± 3,428	95,493 ± 3,694	93,465 ± 2,779 *
	200µg/mL	0,704 ± 0,025	0,791 ± 0,040 *	0,901 ± 0,031	97,592 ± 2,541	100,182 ± 3,988	85,878 ± 3,083 *
	250µg/mL	0,699 ± 0,054	0,773 ± 0,022 *	0,904 ± 0,029	96,954 ± 5,412	97,951 ± 2,230	86,145 ± 2,883 *
Fosfolipídios	10µg/mL	0,750 ± 0,023	0,737 ± 0,031*	1,038 ± 0,045	103,970 ± 2,315	93,390 ± 3,105 *	98,936 ± 4,461
	50µg/mL	0,779 ± 0,045 #	0,693 ± 0,011 *	0,864 ± 0,051 *	108,075 ± 4,496 #	87,763 ± 1,056 *	82,351 ± 5,132 *
	100µg/mL	0,724 ± 0,011	0,720 ± 0,013 *	0,711 ± 0,024 *	100,365 ± 1,089	91,210 ± 1,261 *	67,749 ± 2,414 *
	150µg/mL	0,740 ± 0,020	0,695 ± 0,019 *	0,815 ± 0,040 *	102,612 ± 1,980	88,118 ± 1,948 *	77,719 ± 4,025 *
	200µg/mL	0,641 ± 0,010 *	0,631 ± 0,020 *	0,767 ± 0,012 *	88,856 ± 0,993 *	79,932 ± 1,986 *	73,068 ± 1,174 *
	250µg/mL	0,605 ± 0,011 *	0,556 ± 0,015 *	0,723 ± 0,020 *	83,864 ± 1,062 *	70,479 ± 1,453 *	68,893 ± 2,017 *

Grupos: Controle, DOX e ácido graxos (10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL), após 24, 48 e 72 horas de exposição. Análise estatística: ANOVA, seguido do Teste de Dunnet. Os valores correspondem a média ± desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$)

3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Extração, purificação e rendimento

A partir de 5g do material seco de *L. crinitus*, calculou-se os rendimentos das frações oriundas da extração e alcalina. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimento das frações aquosas e alcalinasde *L. crinitus.*

Fração		Rendimento		Figura
		Peso (mg)	Porcentagem (%, p/p)	
Aquosa (FaqLC)	Sobrenadante (SP)	1421,3	28,43	18**A**
	Precipitado após diálise (PPD)	109,1	2,18	18**B**
	Fração solúvel após gelo-degelo (PPGD)	74,73	1,49	18**C**
	Fração insolúvel após gelo-degelo	31,76	0,63	-
Alcalina (FalcLC)	Precipitado após diálise (PPD)	995,6	19,91	19**A**
	Fração solúvel após gelo-degelo (PPGD)	276,87	5,54	19**B**
	Fração insolúvel após gelo-degelo	704,14	14,08	-

p/p: peso por peso

O maior rendimento dentre todas as frações foi para o sobrenadante aquoso (FaqLC-SP), com rendimento bruto de 1421,3 mg (28,43%) (Figura 18**A**). Em seguida, destacam-se o precipitado alcalino após diálise (FalcLC-PPD) (Figura 19**A**), com rendimento de 19,91%, e a fração alcalina insolúvel após gelo-degelo, com 14,08%.

Figura 18. Frações aquosas obtidas a partir de *L. crinitus*. Fração sobrenadante aquosa – FaqLC-SP **(A)**, fração precipitada aquosa após diálise – FaqLC-PPD **(B)**, fração solúvel aquosa após gelo-degelo – FaqLC - PPGD **(C).** Fonte: O autor, 2021.

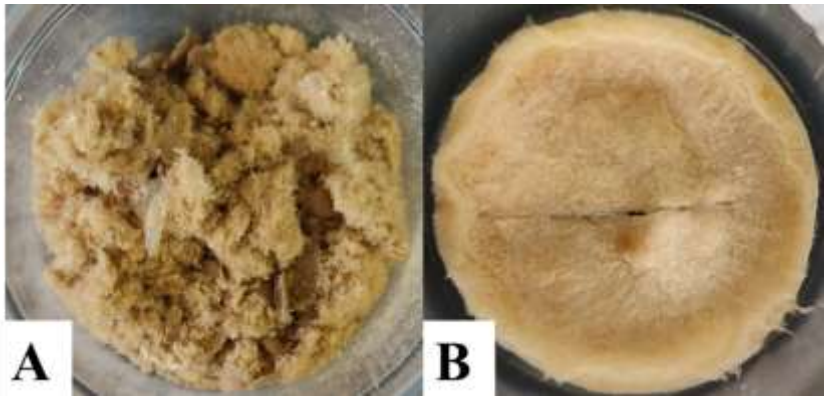


Figura 19. Frações alcalina obtidas a partir de *L. crinitus*. Fração precipitado alcalina após diálise – FalcLC-PPD **(A)**, fração solúvel alcalina após gelo-degelo – FalcLC-PPGD **(B)**. Fonte: O autor, 2021.

Em um estudo realizado por Bitencourt (2015) com os cogumelos da espécie *Grifola frondosa* ("Maitake"), os rendimentos obtidos nas extrações variaram de acordo com a linhagem; na extração aquosa a quente, para o precipitado, os valores variaram de 1,08% a 3,36% e, após o processo de gelo-degelo, as porcentagens obtidas variaram de 0,11% a 0,17%. Já para a extração alcalina, as porcentagens referentes ao precipitado foram de 2,92% a 5,64%, e após gelo-degelo, passaram a ser de 1,52% a 2,97%. Comparando os valores obtidos neste presente trabalho e no estudo apresentado, nota-se que, com exceção do precipitado aquoso que apresentou resultados semelhantes, as outras porcentagens foram superiores neste trabalho com *L. crinitus.*

3.4.2.1 Doseamento de açúcares totais

O conteúdo de carboidratos de cogumelos inclui tanto fibras, como glucanas, quitina, hemiceluloses e substâncias pécticas, quanto carboidratos não fibrosos, como açúcares. As unidades monossacarídicas presentes nos cogumelos são frutose, manitol, sacarose, trealose, glicose e mio-inositol (AGARWAL et al., 2019).

Os resultados do doseamento de açúcares totais estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados dos doseamentos de açúcares totais dasde frações de *L. crinitus.*

Frações	**Açúcares totais (%)**
FaqLC-SP	$8,98 \pm 0,04^{e}$
FaqLC-PPD	$14,40 \pm 0,01^{d}$
FaqLC-PPGD	$14,62 \pm 0,03^{c}$
FalcLC-PPD	$19,32 \pm 0,08^{b}$
FalcLC-PPGD	$23,55 \pm 0,04^{a}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, pelo teste Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); FaqLC-SP - sobrenadante aquoso de *L. crinitus*, FaqLC-PPD - precipitado aquoso após diálise, FaqLC-PPGD - precitado aquoso após gelo-degelo, FalcLC-PPD - precipitado alcalino após diálise, FalcLC-PPGD - precipitado alcalino após gelo-degelo.

Quanto à análise do teor de açúcares totais, a fração alcalina apresentou as maiores porcentagens, 23,55 ± 0,04% para FalcLC-PPGD e 19,32 ± 0,08% para FalcLC-PPD. Seguido destes valores, as frações aquosas FaqLC-PPGD e FaqLC-PPD apresentaram bom resultado, respectivamente, 14,62 ± 0,03% e 14,40 ± 0,01%. O menor teor de carboidratos foi expresso pela fração FaqLC-SP, com teor de 8,98 ± 0,04%.

3.4.2.2. Doseamento de polifenóis totais

Os compostos fenólicos são estruturas químicas aromáticas hidroxiladas que variam de moléculas simples até polímeros, e ainda podem estar presentes na natureza tanto na forma livre quanto ligados a açúcares e proteínas (SOARES, 2002). Devido ao grande número de combinações que ocorrem na natureza, uma grande variedade estrutural é gerada, sendo seus compostos resultantes denominados polifenóis. Os polifenóis incluem uma grande variedade de classes, como o dos flavonóides, ácidos hidroxibenzóico, ácidos hidroxicinâmicos, taninos e ácidos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007).

Os resultados da análise da dosagem de polifenóis totais das frações aquosas e alcalinas de *L. crinitus* estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados dos doseamentos de polifenóis totais das frações de *L. crinitus.*

Frações	**(µEAG.mg^{-1})**
FaqLC-SP	50,37 ± 0,40^{a}
FaqLC-PPD	15,07 ± 2,01^{c}
FaqLC-PPGD	6,80 ± 0,75^{d}
FalcLC-PPD	33,70 ± 3,61^{b}
FalcLC-PPGD	6,80 ± 0,79^{d}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, pelo teste Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); FaqLC-SP - sobrenadante aquoso de *L. crinitus*, FaqLC-PPD - precipitado aquoso após diálise, FaqLC-PPGD - precitado aquoso após gelo-degelo, FalcLC-PPD - precipitado alcalino após diálise, FalcLC-PPGD - precipitado alcalino após gelo-degelo; µEAG.mg^{-1} (micro equivalente de ácido gálico por miligramas de amostra).

O maior valor obtido entre todas as frações foi para o FaqLC-SP, de 50,37 ± 0,40 µEAG.mg^{-1}. Ainda para a fração aquosa, FaqLC-PPD apresentou 15,07 ± 2,01 µEAG.mg^{-1}, e FaqLC-PPGD, 6,80 ± 0,75 µEAG.mg^{-1}. Já para as frações alcalinas, FalcLC-PPD apresentou o segundo maior valor entre todas as amostras, de 33,70 ± 3,61 µEAG.mg^{-1}, e FalcLC-PPGD, de 6,80 ± 0,79 µEAG.mg^{-1}.

Os resultados obtidos neste estudo para *L. crinitus* foram superiores aos encontrados para outras espécies, como no estudo de Oke e Aslim (2011), que demonstrou valores de 1,42 ± 0,01 µEAG.mg^{-1} para *Pleurotus eryngii* e 13,61 ± 0,09 µEAG.mg^{-1} para *Auricularia auricula-*

judae; e no estudo de Cheung, Cheung e Ooi (2003), com resultados de 0,08 µEAG.mg^{-1} de extrato para *Lentinula edodes* e 0,10 µEAG.mg^{-1} de extrato para *Volvariella volvacea.* Em ambas pesquisas, utilizou-se o aparelho Soxhlet e água como solvente para a extração de polifenóis.

Outro estudo com 23 espécies de cogumelos, empregando metanol como solvente, mostrou resultados que variaram de 1,5 a 11,1 µgEAG.mg^{-1}, todos inferiores aos encontrados neste estudo com *L. crinitus* (MEŠIĆ et al., 2020).

Foi possível evidenciar também, tanto para a fração aquosa quanto para a fração alcalina, o processo de purificação da amostra para obtenção de glucanas, uma vez que a cada etapa, o teor de polifenóis diminuiu significativamente.

Durante a precipitação com etanol (1:3, v/v), a maioria dos polifenóis livres, por possuírem menor peso molecular, permaneceram no sobrenadante (FaqLC-SP), razão pelo qual a dosagem desta fração foi a maior entre todas. No precipitado, além dos polifenóis ligados aos açúcares, uma pequena parte dos polifenóis livres também se precipitam, mas são perdidos na próxima etapa, de diálise. Portanto, após este procedimento, a concentração de polifenóis diminui praticamente pela metade, já que apenas os polifenóis ligados aos polissacarídeos ficam retidos dentro da membrana de diálise (FaqLC-PPD e FalcLC-PPD).

Prosseguindo com a purificação, é possível observar a queda da dosagem de polifenóis após o método de gelo-degelo devido a separação de polissacarídeos solúveis e insolúveis. Como a próxima fração de interesse é a parte solúvel (FaqLC-PPGD e FalcLC-PPGD), os polifenóis contidos nesta amostra são apenas aqueles ligados aos polissacarídeos solúveis. Portanto, os polifenóis ligados aos polissacarídeos insolúveis são perdidos nesta etapa.

Desta maneira, pela observação da diminuição da concentração de polifenóis doseados após o final de cada processo, foi possível verificar e confirmar a purificação da amostra para obtenção das glucanas.

3.4.2.3 Doseamento de proteínas totais

A porcentagem de proteínas totais das frações aquosas e alcalinas de *L. crinitus* estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados dos doseamentos de proteínas das frações de *L. crinitus.*

Frações	Proteínas (%)
FaqLC-SP	22,38 ± 0,10[a]
FaqLC-PPD	15,67 ± 0,29[b]
FaqLC-PPGD	10,68 ± 0,29[c]
FalcC-PPD	6,32 ± 0,43[d]
FalcC-PPGD	5,38 ± 0,36[e]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes, pelo teste Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); FaqLC-SP - sobrenadante aquoso de *L. crinitus*, FaqLC-PPD - precipitado aquoso após diálise, FaqLC-PPGD - precitado aquoso após gelo-degelo, FalcLC-PPD - precipitado alcalino após diálise, FalcLC-PPGD - precipitado alcalino após gelo-degelo.

A porcentagem de proteínas totais foi maior para as frações aquosas, sendo FaqLC-SP a maior, com 22,38 ± 0,10%, seguido FaqLC-PPD (15,67 ± 0,29%), e FaqLC-PPGD (10,68 ± 0,29%). As frações alcalinas resultaram em menor porcentagem, de 6,32 ± 0,43% e 5,38 ± 0,36% para FalcLC-PPD e FalcLC-PPGD, respectivamente.

Estes resultados encontrados para os extratos de *L. crinitus* aproximam-se com o encontrado na literatura para a mesma espécie de cogumelo expressos em base seca, sendo que no estudo de Dávila et al. (2020), a dosagem foi de 14,42% de proteínas e no de Bertéli et al. (2021), de 13,3%. O mesmo pode ser observado em outro estudo com a espécie *Pleurotus pulmonarius*, que resultou em valores de 14,7% (SMIDERLE, 2008).

Assim como para a dosagem de polifenóis totais, a partir dos resultados obtidos dos extratos sequenciais para proteínas totais, pode-se observar a eficiência do processo de purificação para obtenção das glucanas, uma vez que os valores diminuem a cada etapa.

3.4.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que se baseia na existência da interação entre o núcleo atômico e os campos eletromagnéticos de origem externa, resultando na excitação deste núcleo e irradiação de energia quando os mesmos voltam ao estado fundamental. A partir destes dados, pode-se realizar um estudo da estrutura e propriedades da amostra analisada, constituindo-se, portanto, como uma das ferramentas mais essenciais e úteis na caracterização química de polissacarídeos (YAO et al., 2021).

Após as análises preliminares por RMN exploratória, a fração que apresentou os melhores resultados foi a FalcLC-PPGD e, por esse motivo, será a única fração em que serão discutidas as análises por RMN, além de ser a fração que apresentou o maior percentual de acúcares totais (23,55%).

A primeira análise realizada foi da composição monossacarídica de FalcLC-PPGD (Figura 20), revelando se tratar de uma glucana, uma vez que a composição mostrou grande proporção de glicose (87,0%) seguido de menores quantidades de ramnose (7,0%) e xilose (6,0%).

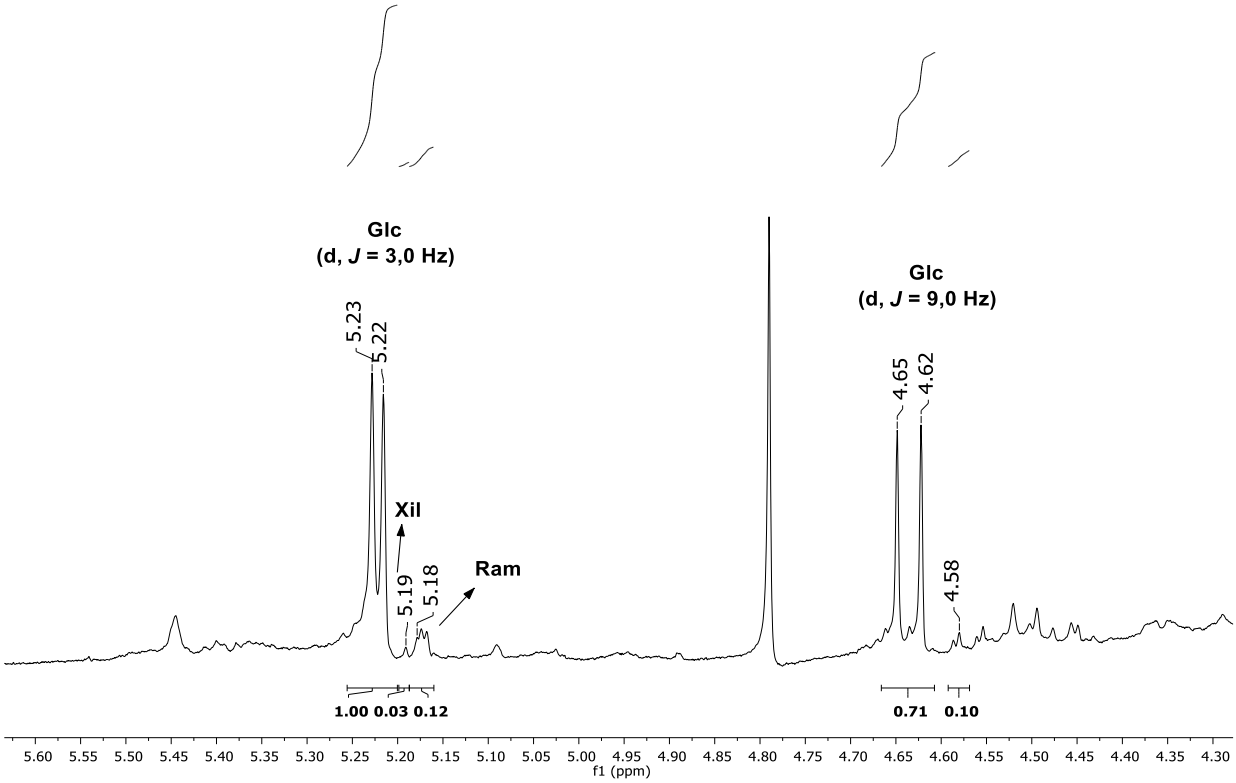


Figura 20. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica de FalcLC-PPGD após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica.

Essa quantidade de glicose é semelhante aos encontrados na literatura para outras espécies de cogumelos, 70,2% para *Macrocybe titans* (SILVA, 2017) e 83,2% para *Pholiota nameko* (SOVRANI, 2016) e 91,4% para *L. edodes* (Morales et al. 2020). A grande porcentagem de glicose na amostra, indica a presença de polissacarídeos do tipo glucanas. Segundo López-Legarda et al. (2020) que analisou os teores de carboidratos e glucanas presentes nas frações solúveis de polissacarídeos intra e extracelulares de *L. crinitus*, aproximadamente 10% dos polissacarídeos extraídos dessa espécie de cogumelo são glucanas, sendo quase 90% do tipo β-glucana.

As glucanas são polímeros com apenas monômeros de glicose (Glc) (ZHU et al., 2016), incluindo α-1,4-glucana, α-1,6-glucana, β-1,3-glucana, β-1,6-glucana. Tem funções estrutural, de reserva, e ações como proteção da hidratação das hifas e regulação a concentração de glicose

extracelular, contribuindo na manutenção do pH ótimo para as enzimas ligninolíticas (SILVA et al., 2006).

Os glucanos constituem a parede celular de fungos e são os principais polissacarídeos presentes nos cogumelos (CERLETTI; ESPOSITO; IACOVIELLO, 2021). De acordo com sua anomericidade, é possível encontrar α-D-glucanos e β-D-glucanos em corpos de frutificação de cogumelos, embora α/β-D-glucanos mistos também tenham sido descritos (SYNYTSYA; NOVAK, 2013). No entanto, as glucanas de fungos são em sua maioria β-glucanas, com ligações do tipo (1→3), e com ramificações em *O*-6. Alguns cogumelos também apresentam β-glucanas com ligações (1→4) ou glucanas em configuração α, mas em menor quantidade (SMIDERLE, 2012). Várias glucanas de cogumelos foram isoladas e caracterizadas, sendo relatados seus efeitos imunomodulador, profilático e antitumoral. No entanto, como já mencionado, os glucanos mais comumente isolados de fungos são os β-D-glucanos, e uma grande variedade de efeitos benéficos à saúde humana foi descrita para eles, como atividades imunomoduladoras, antitumorais, hipolipidêmicas ou antimicrobianas. (MAITY et al., 2017)

As moléculas mais descritas e que têm demonstrado atividade antitumoral são as que apresentam ligações β-(1→3) com ramificação (1→6) (REN et al., 2012; KAGIMURA et al., 2015). O lentinano, por exemplo, um polissacarídeo β-1,3-D-glucano de alto peso molecular com ramificações β-1,6-glicopiranosídeos isolado de *L. edodes*, mostrou uma notável atividade anticancerígena mediada pelo hospedeiro, dependendo da presença de sintomas típicos (ZHANG et al., 2011)

A estrutura macromolecular dos β-glucanos de cogumelos consiste em monômeros de D-glicose ligados por ligações glicosídicas do tipo β em duas posições diferentes, 1,3 e 1,6, responsáveis pela estrutura linear e pela ramificação principal, respectivamente; nos α-glucanos, proporcionalmente menos frequentes nos cogumelos, os polímeros contêm ligações do tipo α. Os β-glucanos de levedura possuem estruturas semelhantes às dos fungos, sendo as ligações 1,3 mais frequentes (cerca de 85%), em relação à 1,6. Embora todos os β-glucanos sejam semelhantes em termos de tipo de ligações glicosídicas que ligam as moléculas de glicose, os acúmulos estruturais dos β-glucanos variam em comprimentos de cadeia, posições de ligação glicosídicas, grau de ramificação e estruturas tridimensionais (CERLETTI; ESPOSITO; IACOVIELLO, 2021).

Ainda, Manzi e Pizzoferrato (2000), por meio de seu estudo com os gêneros *Pleurotus* e *Lentinula*, demonstrou que as β-glucanas presentes nos cogumelos apresentam diferentes graus de afinidade com a água, provavelmente devido a diferenças na estrutura e peso molecular e grau de polimerização.

A amostra obtida da fração alcalina após o processo de purificação por gelo e degelo (FalcLC-PPGD) apresentou sinais característicos de uma β-1,3-glucana com ramificações no C-6. Os deslocamentos químicos de H1 anomérico ficaram entre 4,53-4,42 ppm, a região de ressonância de C1, entre 102,6-103,8 ppm e o sinal de C-6 substituído, a 69,0 ppm. (CUI et al., 2000; XU et al., 2012; KONO et al., 2017; ZHANG et al., 2018; MAITY et al., 2019). As Figuras 21 e 22 e a Tabela 21 apresentam estes resultados.

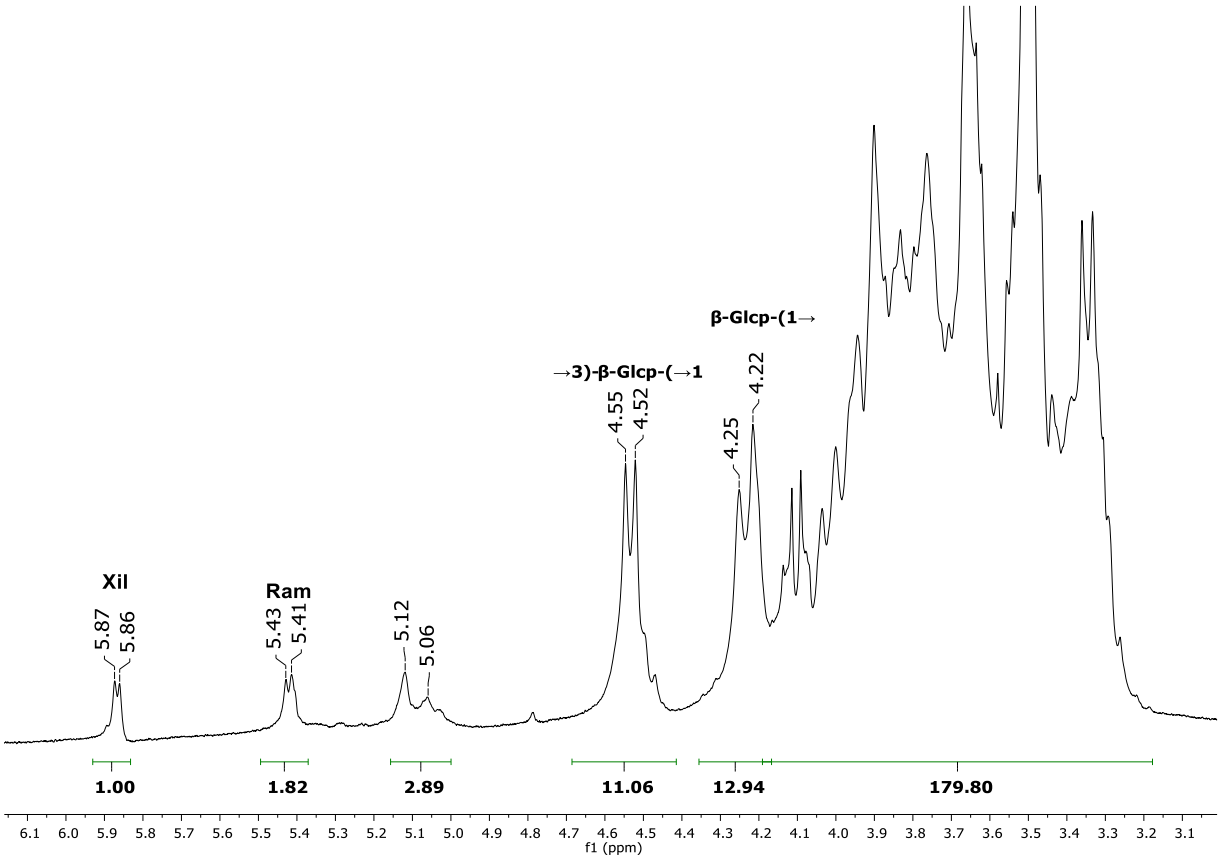


Figura 21. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica de FalcLC-PPGD.

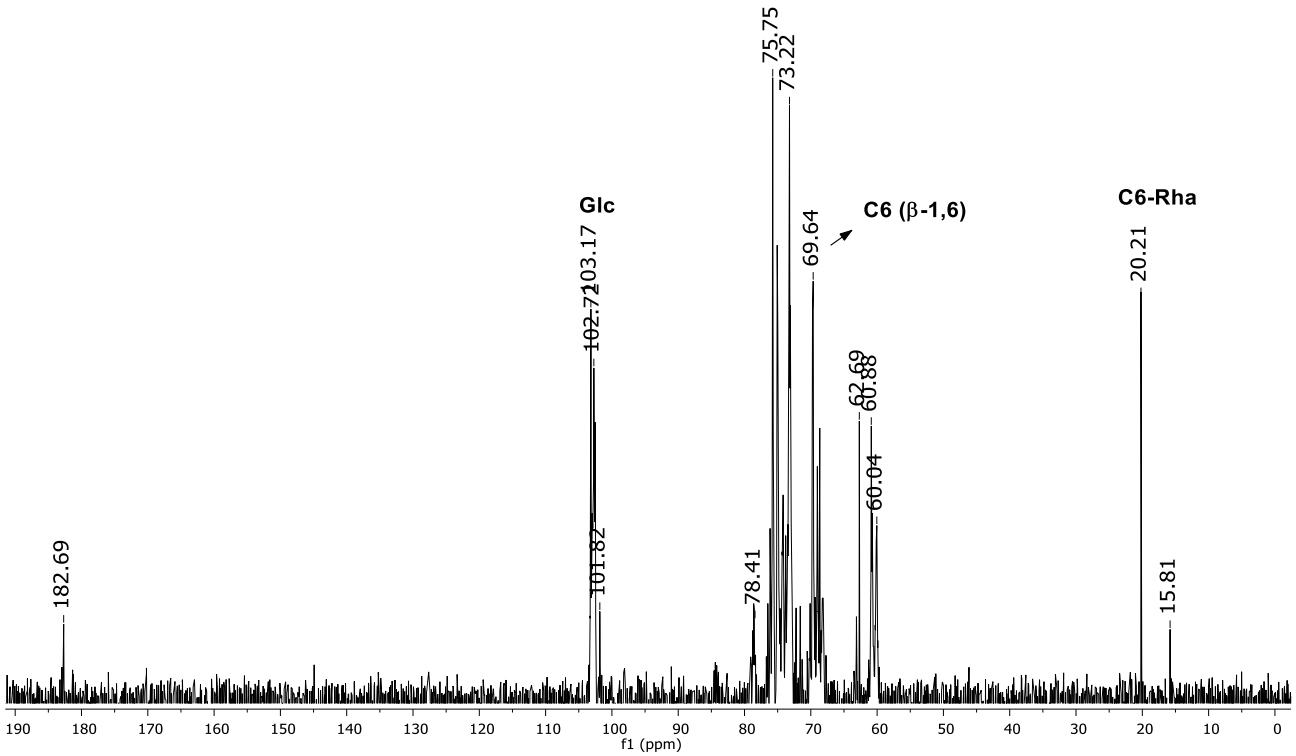


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de FalcLC-PPGD.

Morales et al., 2020 isolou três glucanos diferentes a partir do cogumelo *L. edodes*, sendo um ramificado (1→3), (1→6)-β-D-glucano, um linear (1→3),(1→6)-β-D-glucano 3)-α-D-glucano e uma fração mista composta principalmente por um (1→6)-β-D-glucano linear com baixos níveis de (1→3)-β-D-glucano. Neste trabalho, o espectro de uma das frações apresentou sinais intensos em δ 102,4/4,43; 102,6/4,27 e 102,8/4,17, confirmando a configuração β de D-Glcp e a 85,9/3,39 ppm em relação à substituição *O*-3 de unidades β-D-Glc *p*. Em outra fração, também foi observado os sinais em 102,1/4,41 e 102,7/4,17 de β-D-Glc*p*.

A Tabela 21 apresenta uma comparação com os deslocamentos químicos de RMN ^{1}H e ^{13}C da fração FalcLC-PPGD com os de uma β-glucana isolada de *Aureobasidium pullulans*, o que permite sugerir que existe uma boa correlação entre os deslocamentos químicos de FalcLC-PPGD e de uma amostra de β-glucana com estrutura já estabelecida.

Tabela 21. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da fração alcalina de *L. crinitus* após processo de gelo-degelo (FLC-PPGD) em comparação com β-glucana isolada de *A. pullulans.*

Origem	**Unidade de açúcar**	**($^{1}H/^{13}C$)**						**Referência**
		H1/C1	**H2/C2**	**H3/C3**	**H4/C4**	**H5/C5**	**H6 (H6')/C6**	
β-glucana *A. pullulans*	→3)-β-Glc*p*- (1→	4,54/102,7	3,34/72,5	3,51/86,3	3,29/68,4	3,32/76,1	3,73 (3,49)/60,7	KONO et al., 2017
	→3,6)- β-Glc*p*-(1→	4,55/102,6	3,37/72,3	3,51/85,8	3,34/68,2	3,54/74,6	4,08 (3,59)/68,3	
	β-Glc*p*-(1→	4,25/102,8	3,04/73,4	3,21/76,2	3,12/70,1	3,15/76,4	3,71 (3,53)/60,9	
L. crinitus	→3)-β-Glc*p*- (1→	4,53/102,7	/73,2	-	/68,7	-	/60,7	
	→3,6)- β-Glc*p*-(1→	4,53/102,5	/73,1	-	/68,1	/74,3	/69,0	
	β-Glc*p*-(1→	4.23/103,2	/73,3	/76,5	/69,8	-	/60,8	

Portanto, baseados nos dados anteriores, pode-se sugerir que a fração FalcLC-PPGD trata-se de uma β-glucana com uma cadeia principal com ligações β-1→3 ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6, comprovando a eficácia na extração e isolamento das glucanas de *L. crinitus.*

Foi possível avaliar quimicamente o material obtido a partir das extrações aquosas e alcalinas de *L. crinitus.* Os ensaios de espectofotometria de UV-Vis permitiram comprovar o processo de purificação para obtenção das glucanas e sugerir a presença deste polissacarídeo nas frações, que foi posteriormente evidenciada pelas análises de RMN. Esta análise indicou que a fração mais purificada do processo de extração se trata de uma β-glucana com uma cadeia principal com ligações β-1→3 e ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6.

Desta maneira, a possibilidade de extração e isolamento de glucanas a partir de *L. crinitus* implica no aumento do valor agregado deste cogumelo, que pode ser utilizado como fonte deste polissacarídeo para aplicações diversas, tanto em indústrias farmacêuticas quanto de nutracêuticos.

3.5 ANÁLISE DA FRAÇÃO SOBRENADANTE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*

A análise de RMN de ^{1}H foram realizadas para caracterizar o perfil dos compostos majoritários presentes na fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC-SP). A análise da fração sobrenante por Ressonância Magnética Nuclear mostrou sinais característicos de carboidratos entre 4,20 e 3,30 ppm. Foi observado no espectro a região anomérica (Figura 23, **B**), os sinais em δ 5,6 a 4,2, que correspondem os sinais das formas α e β de moléculas livres dos açucares presentes. Os sinais em δ 5,21 (d, J = 3,9 Hz) e 4,66 (d, J = 7,94 Hz) correspondem às formas α e β anoméricas do H1 da glicose, respectivamente. A intensidade do sinal δ 5,21 é um indicativo que os carboidratos são os componentes majoritários na amostra.

Os sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^{1}H (Figura 23, **A**), indicaram a provável presença de ácidos fenólicos e flavonoides, devido à abundância de sinais de hidrogênio da hidroxila fenólica (OH) (δ 9,0 e 4,0) e da região aromática (δ 8,5 e 6,0) (NERANTZAKI et al.,2011; PRESTES et al., 2012). Esse resultado é condizente com o doseamento de polifenóis, em que a fração FaqLC-SP apresentou a maior quantidade de composos fenólicos, com 50,37 $\mu EAG.mg^{-1}$. Os compostos fenólicos representam uma classe ampla, comumente constituída por substâncias que possuem em suas estruturas um anel aromático ligado a grupos hidroxilas. De acordo com Pavia et al. (2014), os hidrogênios ligados a anéis aromáticos são encontrados em uma região específica δ 8,0 a 6,5.

No entanto, a região de δ 8,5–6,0 (Figura 23, **A**) ppm também está relacionada com carbonos aromáticos de aminoácidos. Já a região entre δ 3,5–0,5 ppm está associada com carbonos alifáticos dos aminoácidos (Figura 23, **D**). Após análise da expansão do espectro (Figura 23, **C**) referente a região dos aminoácidos aromáticos, foi possível atribuir alguns dos sinais aos aminoácidos triptofano e tirosina, conforme também foi demonstrado no trabalho de Menecucci et al. (2015). Os mesmos autores, também demonstraram em seu trabalho sinais de carboidratos entre 4,20 e 3,30 ppm e um dupleto que foi atribuído ao hidrogênio H1 ligado ao carbono anomérico em 5,34 ppm, podendo estar associado à sacarose. No entanto, no presente trabalho, provalmente está relacionado a trealose, pois a sacarose é formada por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose, diferente da trealose, que é constituída por duas unidades de glicose. Bertélli et al. (2021a), demonstrou que a trealose representa mais do que 80% dos açúcares solúveis totais no basidiocarpo de *L. crinitus*, sendo observado em quantidades menores a presença da sacarose e do manitol. A trealose é o principal carboidrato dos fungos, principalmente porque a glicose por transporte ativo é convertida em trealose (CHANG; MILES, 2004).

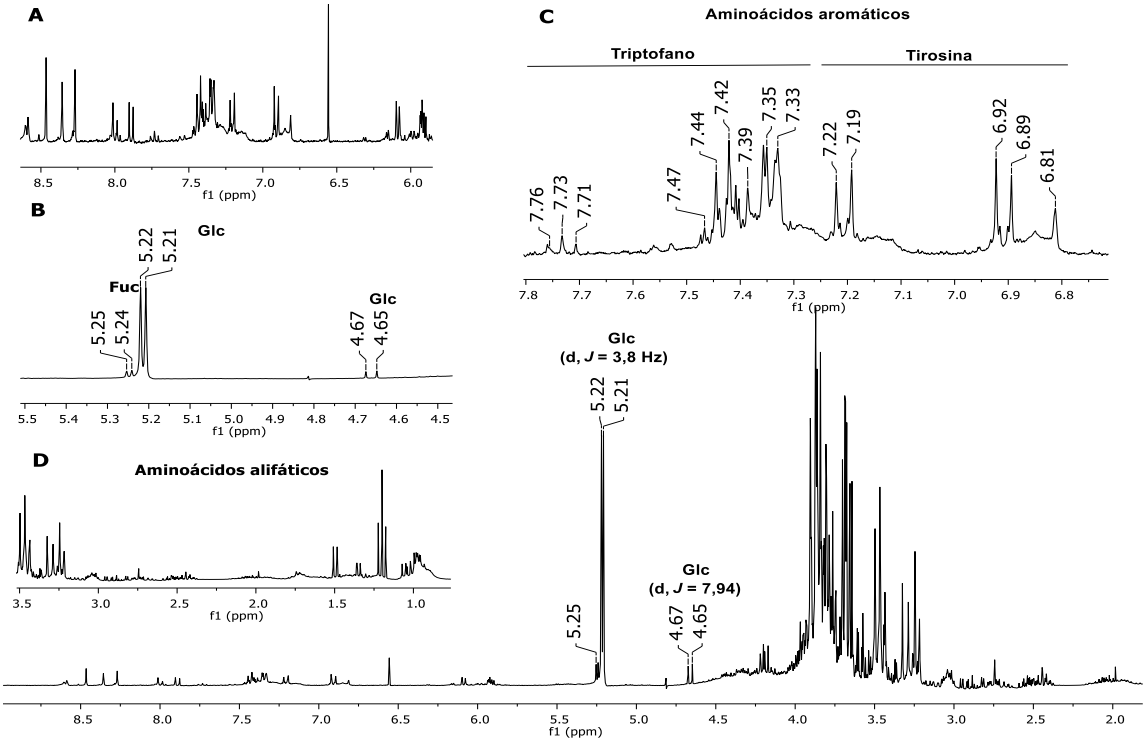


Figura 23.Espectro de RMN ^{1}H da fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP). Região aromática **(A)**; região anomérica **(B)**; região dos aminoácidos aromáticos **(C)**; região dos aminoácidos alifáticos **(D)**.

A partir da hidrólise da amostra, foi possível determinar a composição monossacarídica (Figura 24). A porcentagem de cada integral foi calculada para evidenciar a proporção de cada monossacarídeo presente na amostra. Os valores obtidos foram 1,00 (α-Glc), 0,22 (β-Glc) e 0,26 (α-Fuc). Estes valores foram somados a fim de obter o valor total de integração, correspondente a 100 %, sendo o valor de 1,48. A partir deste valor, a proporcionalidade entre as integrais pode ser definida. A análise da composição mostrou que o açúcar predominante é a glicose, correspondendo a 82,43 % (α e β), e em menores quantidades a fucose (17,57%). A composição de glicose acima de 80% é condizente com o trabalho de Bértelli et al. (2021), que como mencionado acima, demonstrou que a trealose (dissacarídeo de glicose) representa mais do que 80% dos açúcares solúveis totais no basidiocarpo de *L. crinitus*

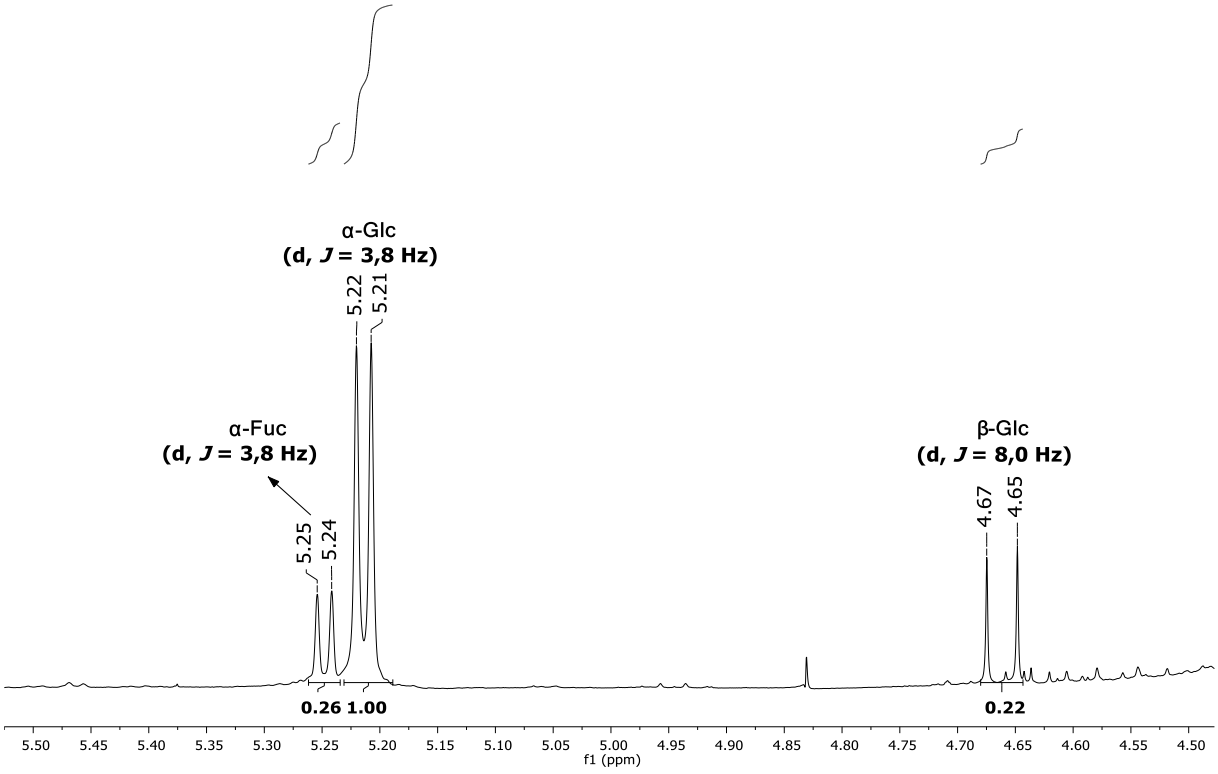


Figura 24. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP) após hidrólise para determinação da composição monossacarídica.

Em concordância com a analise de RMN, a análise cromatográfica também possibilitou verificar a presença de acúcares, aminoácidos e compostos fenólicos, permitindo realizar a identicação destes compostos (Tabela 22). Foram identidicados 29 compostos.

Tabela 22. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* na fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC – SP)

Compostos	**#**	**FM**	**MM (*m/z*)**	**Classe química**
Açúcares				
Glicose **(G)**	**59**	$C_6H_{12}O_6$	180,0628	Monossacarídeo
Ramnose	**60**	$C_6H_{12}O_5$	164,0679	Monossacarídeo
Manitol	**61**	$C_6H_{14}O_2$	182,0784	Poliól
Trealose (G-G)	**62**	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,1153	Dissacarídeo
G-G-G	**-**	$C_7H_6O_4$	154,0266	Trissacarídeo
G-G-G-G	**-**	$C_9H_8O_3$	164,0473	Tetrassacarídeo
Aminoácidos				
Alanina	**63**	$C_3H_7NO_2$	89,0471	Álifático
Serina	**64**	$C_3H_7NO_3$	105,0420	Álifático
Prolina	**65**	$C_5H_9NO_2$	115,0627	Álifático
Valina	**66**	$C_5H_{11}NO_2$	117,0784	Álifático
Cistéina	**67**	$C_3H_7NO_2S$	121,0192	Álifático
Leucina ou Isoleucina	**68**	$C_6H_{13}NO_2$	131,0940	Álifático
Asparagina	**69**	$C_4H_8N_2O_3$	132,0529	Álifático
Glutamina	**70**	$C_5H_{10}N_2O_3$	146,0685	Álifático
Ácido glutâmico	**71**	$C_5H_9NO_4$	147,0526	Álifático
Histidina	**72**	$C_5H_{11}NO_2S$	149,0505	Álifático
Fenilalanina	**73**	$C_9H_{11}NO_2$	165,0784	Aromático
Tirosina	**74**	$C_9H_{11}NO_3$	181,0733	Aromático
Triptofano	**75**	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,0893	Aromático
Metionina	**76**	$C_{12}H_{22}O_4$	230,1518	Álifático
Compostos fenólicos e ácidos orgânicos				
Fenol	**77**	C_6H_6O	94,0413	Composto fenólico
Ácido fumárico	**78**	$C_4H_4O_4$	116,0104	Ácido orgânico
Ácido benzoico	**79**	$C_7H_6O_2$	122,0362	Composto fenólico
Ácido málico	**80**	$C_4H_6O_5$	134,0209	Ácido orgânico
Ácido salicilico	**81**	$C_7H_6O_3$	138,0311	Composto fenólico
Ácido protocatecuíco	**82**	$C_7H_6O_4$	154,0260	Composto fenólico
Ácido *p*-cumárico	**83**	$C_9H_8O_3$	164,0467	Composto fenólico
Ácido vanílico	**84**	$C_8H_8O_4$	168,0417	Composto fenólico
Ácido gálico	**85**	$C_7H_6O_5$	170,0209	Composto fenólico
Ácido cítrico	**86**	$C_6H_8O_7$	192,0264	Ácido orgânico

FM: Formula molecular; MM: Massa molecular; G: Glicose

Dentre os açúcares, foi possível identificar os monossacarídeos glicose (**59**), ramnose (**60**) e o manitol (**61**), que é um polioól. Além de monossarídeos, foi identificada a presença da trealose (**62**), que consiste em um dissacarídeo de glicose. Foi observado o íon em *m/z* 341,1012 $[M-H]^-$, *m/z* 343,1216 $[M+H]^+$, *m/z* 365,1031 $[M+Na]^+$ e *m/z* 381,0773 $[M+K]^+$. Foi observada também a presença de um trissacarídeo (*m/z* 505,1739) e um tetrassacarídeo (*m/z* 667,2258), evidenciando a presença de oligossacarídeos na amostra. Considerando a composição monossarídica, em que a glicose corresponde a mais de 80%, provalmente o trissacarideo e o tetrassacarídeo são formados por unidades de glicose. Dentre as possibilidades de trissacarídeos

e tetrassacarídeos, tem-se a rafinose e a estaquiose, respectivamente. No entanto, a rafinose é um trissacarídeo formado por α-galactose, α-glicose e β-frutose, enquanto a estaquiose é um tetrassacarídeo formado por duas unidades de α-galactose, uma unidade de α-glicose e uma unidade de β-frutose. Como observado na análise da composição monossacarídica, os dois monossarídeos identificados foram a glicose e a fucose, logo é descartada a possibilidade de se tratar destes oligossarídeos, reforçando que são olissacarídeos de glicose.

Em relação aos aminoácidos, foi possível identificar 14 compostos, alifáticos e aromáticos. Dentre os alifaticos foram identificados: alanina (**63**), serina (**64**), prolina (**65)**, valina (**66**), cisteína (**67**), leucina ou isoleucina (**68**), asparagina (**69**), glutamina (**70**), ácido glutâmico, (**71**), histidina (**72**), metionina (**73**); dentre os aromáticos: fenilalanina (**74**), tirosina (**75**) e triptofano (**76**). Machado et al. (2015), também encontrou esses aminoácidos na biomassa do *L. crinitus*. Neste trabalho, os aminoácidos predominantes foram o ácido glutâmico (4,00-4,41 mg/100g de proteína), ácido aspártico (2,49-2,57 mg/100g de proteina), serina (1,52-1,83 mg/100g de proteína), glicina (1,24-2,28 mg/100g de proteína), arginina (1,47-2,28 mg/100 g de proteína), alanina (1,11-1,78 mg/100 g de proteína), valina (1,25-1,55 mg/100 g de proteína), leucina (0,93-2,07 mg/100 g de proteína) e lisina (1,33-1,85 mg/100 g de proteína)

Dentre os aminoácidos identificados, 6 são considerados essencias, ou seja, que os humanos não conseguem sintetizar, a saber: histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano e valina. Os cogumelos constituem uma fonte de nove aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) (YUWA-AMORNPITAK; BUTKHUP; YEUNYAW, 2020).

Como observado, o sobrenadante aquoso de *L. crinitus* apresentou a maior porcentagem de proteínas totais, com 22,38%. Segundo Singh et al. (2008), os cogumelos com alto teor de proteína também mostram altos níveis de aminoácidos essenciais. As proteínas que contêm todos os aminoácidos essenciais, nas quantidades necessárias para atender às necessidades, são conhecidas como proteínas completas, e aquelas que são deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais são chamadas de proteínas incompletas (GONZÁLEZ et al., 2020). Diante disto, os cogumelos comestíveis representam uma opção viável para a obtenção de proteínas de alta qualidade, uma vez que a maioria deles possui um perfil completo de aminoácidos essenciais (BACH et al., 2017).

Também foi possível identificar a presença de 7 compostos fenólicos (Fenol (**77**), ácido benzóico (**79**), ácido salicílico (**81**), ácido protocatecuíco (**82**), ácido *p*-cumárico (**83**), ácido vanílico (**84**) e ácido gálico (**85**)) e ácidos orgânicos (ácido fumárico (**78**), ácido málico (**80**) e ácido cítrico (**86**) (Figura 25).

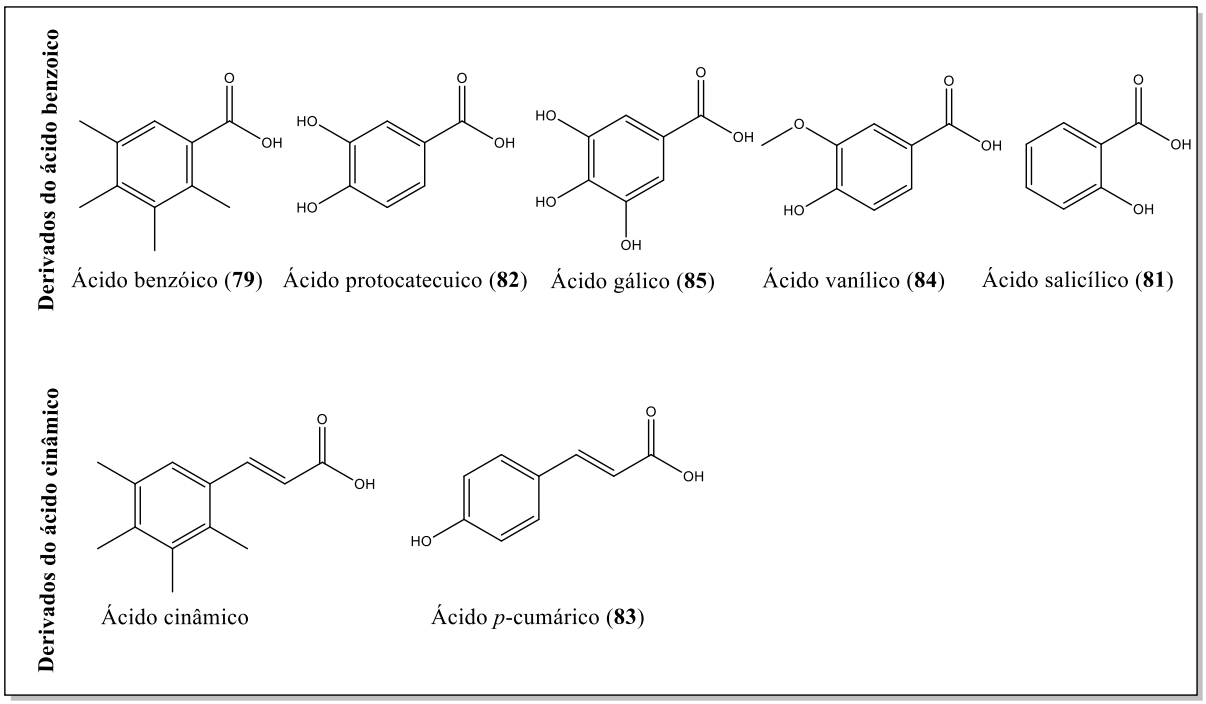


Figura 25. Compostos fenólicos presentes na fração sobrenadante aquosa de *L. crinitus* (FaqLC– SP)

Nos extratos de cogumelos, os componentes fenólicos mais importantes encontrados são: a catequina, o ácido caféico e o ácido gálico (**85**) (OKE; ASLIM, 2011), sendo este último um dos compostos com alta capacidade antioxidante dentre vários outros polifenóis (GALATO et al., 2001). Segundo Kalac (2013), os ácidos protocatecuico (**82**), *p*-cumárico (**83**), vanílico (**84**) e gálico (**85**), geralmente são detectados em cogumelos. Nam et al. (2021), também encontrou no extrato de *L. edodes*, os ácidos benzóico (**79)** e gálico (**85**)

A ocorrência de ácidos fenólicos, incluindo ácidos cafeico, *p*-cumárico, gálico, cinâmico, protocatecuico, ferúlico, clorogênico, sinápico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, salicílico e siríngico, bem como compostos flavonóides foram relatados a partir de extratos de espécies de cogumelos (YAHIA, GUTI ERREZ-OROZCO; MORENO PEREZ, 2017; BAHADORI et. al. 2019; MUTUKWA et al. 2019).

3.6 ATIVIDADE PREBIÓTICA

Quando as amostras foram testadas em *L. fermentum* o extrato que apresentou a melhor atividade foi FaqLC-PPGD com densidade óptica (DO = λ 600 nm) de 0,77 ± 0,12, se igualando ao controle inulina 0,72 ± 0,14, sem diferença estatística entre eles (p>0,05). Os extratos FaqLC-SP (0,21 ± 0,14) e FalcLC-PPGD (0,21 ± 0,04), apresentaram resultados semelhantes com o padrão FOS (0,40 ± 0,01).

Frente ao microrganismo *L. paracasei* o FaqLC-SP a melhor potencial nos testes, com 1,23 ± 0,08 de DO (p>0,05), apresentando resultados superiores a Inulina (1,09 ± 0,05) e FOS (1,01 ± 0,03). Seguidos por FaqLC-PPGD e FalcLC-PPGD (DO = 0,79 ± 0,06 e 0,26 ± 0,07, respectivamente; p>0,05), Figura 26.

Na fermentação com *L. acidophilus*, os três extratos não apresentaram diferenças estatísticas entre si (FalcLC-PPGD: 1,21 ± 0,10; FaqLC-PPGD: 1,18 ± 0,01; FaqLC-SP: 0,98 ± 0,11), porém não foram melhores que a Inulina 1,74 ± 0,01 e FOS 1,52 ± 0,01 (p>0,05). Quando as amostras foram cultivadas com a cepa de *L. brevis* as DO foram para FaqLC-PPGD de 0,99 ± 0,04, sendo estatisticamente iguais a FOS 0,92 ± 0,03 e Inulina 0,83 ± 0,04 (p>0,05), resultados seguidos por FalcLC-PPGD 0,45 ± 0,18 e FaqLC-SP 0,22 ± 0,07).

E por fim, quando os extratos foram analisados na fermentação de *B. coagulans* os resultados obtidos foram: Inulina com DO de 1,62 ± 0,14, FOS 1,55 ± 0,13, sendo mais ativos que os extratos, FalcLC-PPGD 1,33 ± 0,06, FaqLC-PPGD: 1,22 ± 0,17 e FaqLC-SP: 0,66 ± 0,11 (Figura 26).

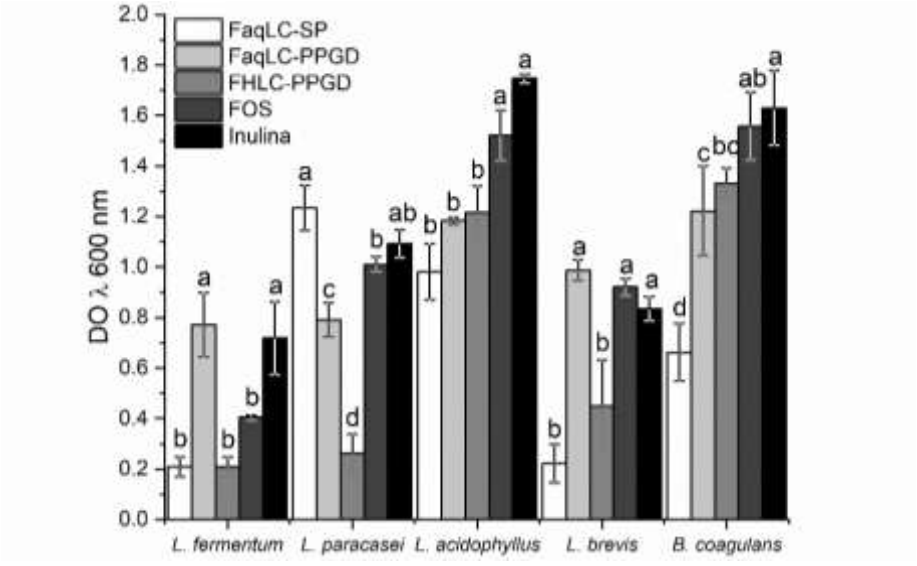


Figura 26. Fermentabilidade de extratos de *L. crinitus* por cepas de lactobacilos e *B. coagulans*

Com estes resultados, os extratos que apresentaram a melhor ação fermentativa para as cepas testadas, foram FalcLC-PPGD e FaqLC-PPGD. Estes resultados são justificados pelas maiores concentrações de açucares totais presentes nestes extratos (23,5 e 14,6%, respectivamente; Tabela 18).

As medidas de pH nos meios de cultura fermentados (Figura 27), os resultados mais expressivos foram obtidos com o extrato FaqLC-SP junto as cepas *L. fermentum, L. paracasei*

e *L. brevis* com pH de 6,06 ± 0,09, 5,11 ± 0,09, 6,06 ± 0,09, e 5,98 ± 0,01, respectivamente, em comparação a todas as amostras testadas e aos padrões (p>0,05). Frente as cepas *L. acidophyllus* e *B. coagulans* o extrato FaqLC-SP apresentou resultados similares aos controles Inulina e FOS, com pH de 5,09 ± 0,15, e 5,99 ± 0,02, respectivamente.

Essa redução no pH nos meios de cultura, evidencia uma maior produção de ácidos de cadeia curta, com a fermentação dos microrganismos, utilizando os extratos como fonte de carbono. Neste ensaio, a amostra que se demostrou com potencial prebiótico na redução do pH, e produção de ácidos, foi o extrato FaqLC-SP, convergindo em parte com os encontrados com os resultados de DO.

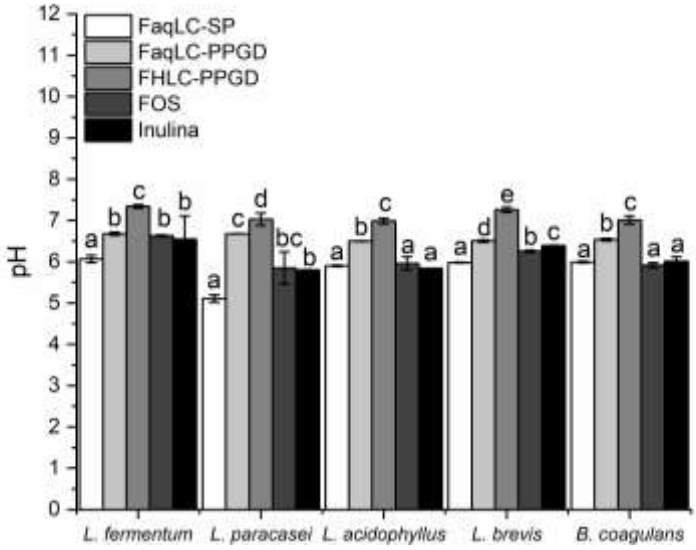


Figura 27. Mensuração do pH dos meios de culturas após o cultivo cepas de lactobacilos e *B. coagulans* com os extratos de *L. crinitus.*

Este é o primeiro relato das ações prebióticas com extratos polissacarídicos do cogumelo *L. crinitus*, apontando diversas aplicações para esta cultura *in vitro*, sendo uma fonte renovável e de produção em larga escala, no qual no futuro pode ser desenvolvido um produto alimentício com ações prebióticas.

O efeito prebiótico de cogumelos é um tema de crescente interesse no campo da nutrição e saúde humana e animal. Os prebióticos são substratos seletivamente utilizados por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde (GIBSON et al., 2017). Os prebióticos podem ser categorizados em vários grupos com base em seu desenvolvimento e status regulatório. Inulina, galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos e lactulose são amplamente reconhecidos como prebióticos bem estabelecidos. Xilooligossacarídeos, isomaltooligossacarídeos, quitooligossacarídeos e lactosucrose se enquadram na categoria de

"prebióticos emergentes", indicando seu crescente reconhecimento e potencial. Rafinose, neoagarooligossacarídeos e epilactose estão atualmente “em desenvolvimento”, sugerindo pesquisas em andamento e refinamento de seu status prebiótico. Além disso, outras substâncias como oligossacarídeos do leite humano, polifenóis, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, hidrolisados de proteínas e peptídeos são considerados “novos candidatos” (CARDOSO et al., 2021).

Os cogumelos (*Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) podem modificar significativamente a composição da flora intestinal, promovendo o metabolismo e a proliferação de microrganismos benéficos, como Lactobacilos e Bifidobactérias, bem como inibindo bactérias patogénicas, como *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Salmonella* (ZHOU et al., 2011). Os principais componentes que desempenham a função prebiótica nos cogumelos são os polissacarídeos não digeríveis, como glucano, quitina e heteropolissacarídeos. Os cogumelos também previnem infecções virais, aumentando o crescimento de bactérias probióticas no intestino grosso (VILLARES; MATEO-VIVARACHO; GUILLAMON, 2012)

Vários polissacarídeos de cogumelos como pleurano, lentinano, esquizofilano, β e αglucanos, mananos, xilanos, galactanos, quitina, inulina e hemiceluloses podem ser creditados como efeitos prebióticos promissores. Pleurana de cogumelos ostra (*Pleurotus ostreatus*) e lentinana de cogumelos Shiitake (*Lentinula edodes*) são atualmente os β-glucanos mais frequentemente utilizados como prebióticos (SINGDEVSACHAN et al., 2016).

Atualmente, a seleção de substâncias prebióticas confirmadas permanece limitada, com galactanos e frutanos (como a Inulina) dominando amplamente o mercado. No entanto, a busca para estimular um espectro mais amplo de organismos comensais tem impulsionado o desenvolvimento de novos candidatos a compostos prebióticos. Espera-se que esses compostos englobem substâncias à base de carboidratos derivadas de cogumelos, semelhantes aos prebióticos tradicionais, como a Inulina (CUNNINGHAM et al., 2021).

As espécies de cogumelos possuem a notável capacidade de produzir uma quantidade substancial de fibras, carboidratos fermentáveis, compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, glicosídeos e flavonóis, ácidos graxos, bem como outros compostos bioativos (AIDA et al., 2009; CHOU et al., 2013; MOHAN et al., 2022). Dada a sua rica abundância nos compostos mencionados, a fermentação surge como uma abordagem atraente para aproveitar seu potencial em diversos campos, inclusive oferecendo benefícios relacionados à saúde. Essas plantas abrigam uma variedade de carboidratos fermentáveis que podem ser facilmente metabolizados por microrganismos benéficos.

Nesse contexto, a fermentação tem sido apontada como uma estratégia promissora de valorização das espécies de fungos (AIDA et al., 2009; CHOU et al., 2013; MOHAN et al., 2022). No entanto, o escopo dos estudos realizados até agora foi restrito a um número limitado de espécies, destacando a necessidade de mais pesquisas para explorar o potencial da fermentação como uma estratégia abrangente de valorização

CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos, o *L. crinitus* é uma excelente fonte de ácidos graxos, demonstrando que o basidiocarpo de *L. crinitus* apresenta concentrações altas de ácidos graxos insaturados, sobretudo de poli-insaturados (AGPI), sendo o ácido linoleico poli-insaturado predominante em todas as amostras analisadas. Isto demonstra que embora os cogumelos apresentem baixas quantidades de lipídios, como foi demonstrado através da composição centesimal, a sua qualidade de lipídios é boa, constituída principalmente por AGPI. Além disso, o EBL e frações (LN, GL e FL) apresentaram atividade antileishmania contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e antiproliferativa contra as contra as linhagens celulares MCF-7 e HepG2/C3A, demonstrando seu potencial biológico.

Em relação aos polissacarídeos, a caracterização química da última fração obtida foi analisada por RMN e revelou a presença de uma β-glucana com cadeia principal com ligações β -1→3 e ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6, demonstrando atividade prebiótica. Esse resultado tem uma grande relevância, pois várias glucanas de cogumelos tem tem demonstrado efeitos imunomodulador, profilático e antitumoral, sendo que as moléculas mais descritas e que têm demonstrado atividade antitumoral são as que apresentam ligações β-(1→3) com ramificação (1→6), como a obtida neste trabalho.

Nas análises por *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS,* foram identificados compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos, cromononas e compostos sesquiterpênicos, sendo muitos compostos relatados pela primeira vez na espécie. Além disso, a análise de composição centesimal demonstrou que o cogumelo *L. crinitus* é rico em carboidratos e proteínas, demonstrando potencial nutricional, bem como a possibilidade de ser usado como um alimento funcional.

A análise da fração sobrenadante por RMN e *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS,* demonstrou que essa fração é rica em proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e aminoácidos. Dentre os cardoidratos, foi possível observar a presença de dissacarídeos e oligossacarídeos, destacando a presença da trealose que é um dissacarídeo predominante na espécie. Também foi

observado uma grande variedade de aminoácidos, sendo que dentre os aminoácidos identificados, 6 são considerados essencias (histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano e valina). Além do potencial químico, essa fração também demonstrou ser um bom prospecto em relação a atividade prebiótica.

Portanto, conclui-se que os extratos e frações de *L. crinitus* são fontes importantes para obtenção de compostos bioativos com potencial biológico e nutricional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, D.; ABRAHAM, W.-R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. **J. Antibiot. Res.**, 47, n. 11, p. 1348-1350, 1994.

ABRAHANR, W.-R.; ABATE, D. Chromanones from *Lentinus crinitus* (basidiomycetes). **Z. Naturforsch., C, J. Biosci.**, 50, n. 11-12, p. 748-750, 1995.

AGARWAL, S.; KUSHWAHA, A.; VERMA, V.; SINGH, M. P. **Nutritional attributes of Pleurotus mushroom**, 2019

AHMAD, N.; MAHMOOD, F.; KHALIL, S. A.; ZAMIR, R.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H. Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 9, p. 826-834, 2014.

AIDA, F. M. N. A. et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends in Food Science & Technology, v. 20, n. 11-12, p. 567-575, 2009.

ANSTEAD, G.; ZHANG, Q.; MELBY, P. Malnutrition promotes prostaglandin over leukotriene production and dysregulates eicosanoid-cytokine crosstalk in activated resident macrophages. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids**, 81, n. 1, p. 41-51, 2009.

ARAÚJO, N.V.P.; LIÃO, L.M.; ALCANTARA, G.B. Quantificação de sacarose em formulações farmacêuticas líquidas de uso oral pela técnica de RMN de 1H. Disponível em: < www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/natha000.pdf > Acesso em: 20 de Fev 2023.

BACH, F.; HELM, C. V.; BELLETTINI, M. B.; MACIEL, G. M.; HAMINIUK, C. W. I. Edible mushrooms: A potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 11, p. 2382-2392, 2017.

BAHADORI, M. B.; SARIKURKCU, C.; YALCIN, O. U.; CENGIZ, M.; GUNGOR, H. Metal concentration, phenolics profiling, and antioxidant activity of two wild edible Melanoleuca mushrooms (*M. cognata* and *M. stridula*). **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104172, 2019.

BERTÉLI, M. B. D.; BARROS, L.; REIS, F. S.; FERREIRA, I. C. *et al.* Antimicrobial activity, chemical composition and cytotoxicity of *Lentinus crinitus* basidiocarp. **Food Funct**, 12, n. 15, p. 6780-6792, 2021b.

BERTÉLI, M. B. D.; OLIVEIRA FILHO, O. B.; FREITAS, J. D.; BORTOLUCCI, W. C. *et al. Lentinus crinitus* basidiocarp stipe and pileus: chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activity. **Eur. Food Res. Technol.**, 247, n. 6, p. 1355-1366, 2021a.

BIAGIOTTI, M.; DOMINGUEZ, S.; YAMOUT, N.; ZUFFEREY, R. Lipidomics and anti-trypanosomatid chemotherapy. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, p. 1-11, 2017.

BITENCOURT, E. L. **Prospecção química de carboidratos isolados dos basidiomas das linhagens branca e cinza do cogumelo medicinal Grifola frondosa ("Maitake")**. Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química, Universidade Federal de Goiás. Catalão, 2015.

BOUABID, C.; YAMARYO-BOTTÉ, Y.; RABHI, S.; BICHIOU, H.; HKIMI, C.; BOUGLITA, W. RABHI, I. Fatty Acid Profiles of Leishmania major Derived from Human and Rodent Hosts in Endemic Cutaneous Leishmaniasis Areas of Tunisia and Algeria. **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 92, 2022.

BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, P.; UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res.**, 101, n. 3, p. 715-722, 2007.

CALDER, P. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutr. Res. Rev.**, 21, n. 1-2, p. 309-341, 2001.

CARDOSO, B. B.; AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R. Novel and emerging prebiotics: Advances and opportunities. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. Academic Press, 2021. p. 41-95.

CARRILLO PÉREZ, C.; CAVIA CAMARERO, M. d. M.; ALONSO DE LA TORRE, S. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. **Nutr. Hosp.**, n. 27, p. 1860-1865, 2012.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de química**, p. 421-437, 2013.

CHEN, Y.; CHEN, Y.; SHI, Y.; MA, C. *et al.* Antitumor activity of *Annona squamosa* seed oil. **J. Ethnopharmacol.**, 193, p. 362-367, 2016.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food chemistry**, 81(2), 249-255, 2003.

CHOU, WT; SHEIH, I. C.; FANG, T. J. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 7, p. M1041-M1048, 2013.

COLLA, I.; FILHO, O.; BERTÉLI, M.; DE FREITAS, J. *et al.* Carbon-to-nitrogen ratios on laccase and mushroom production of *Lentinus crinitus*. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, p. 1-12, 2022.

COLLA, I.; OLIVEIRA FILHO, O. B. Q. d.; FREITAS, J. D. S. d.; BERTÉLI, M. B. D. *et al.* Mycelial biomass cultivation of *Lentinus crinitus*. **Biosci. j.**, 36, n. 6, p. 2238-2246, 2020.

COLQUHOUN, A.; SCHUMACHER, R. γ-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and cell biology of lipids**, v. 1533, n. 3, p. 207-219, 2001.

COLZATO, M.; FORATO, L.A.; COLNAGO, L.A.; GARRIDO de ASSIS, O.B. Análise comparativa dos espectros de 1H RMN de óleos comestíveis oxidados. *Embrapa instrumentação agropecuária,* v. 92, p. 1-4, 2008.

CUI, S. W., WOOD, P. J., BLACKWELL, B., & NIKIFORUK, J. Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat β-D-glucan-comparison with other cereal β-D-glucans. **Carbohydrate Polymers**, 41(3), 249–258, 2000

CUNNINGHAM, M.; AZCARATE-PERIL, M. A.; BARNARD, A.; BENOIT, V.; GRIMALDI, R.; GUYONNET, D.; GIBSON, G. R. Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 0471496413.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and relates substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p; 350-356, 1956.

DENNY, P. W. Sphingolipid-free Leishmania are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 313-327, 2004.

DOMMELS, Y. E.; HARING, M. M.; KEESTRA, N. G.; ALINK, G. M.; VAN BLADEREN, P. J.; VAN OMMEN, B. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE 2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 385-392, 2003.

DYE, C.; WILLIAMS, B. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.**, 254, n. 1339, p. 33-39, 1993.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIČ, J. Proteins of higher fungi–from forest to application. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 259-273, 2012.

ERKEL, G.; ANKE, T.; STERNER, O. Inhibition of NF-κB activation by panepoxydone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 226, n. 1, p. 214-221, 1996.

FARIA, M. G. I.; AVELINO, K. V.; DO VALLE, J. S.; DA SILVA, G. J. *et al.* Lithium bioaccumulation in *Lentinus crinitus* mycelial biomass as a potential functional food. **Chemosphere**, 235, p. 538-542, 2019.

FARIA, M. G. I.; DO VALLE, J. S.; LOPES, A. D.; GONÇALVES JR, A. C. *et al.* Bioaccumulation of lithium (Li_2CO_3) in mycelia of the culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes). **Int. J. Med. Mushrooms**, 20, n. 9, 2018.

FERREIRA, I. C. F. R.; A VAZ, J.; VASCONCELOS, M. H.; MARTINS, A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 10, n. 5, p. 424-436, 2010.

FONSECA, A. M.; SOARES, N. B.; COLARES, R. P.; DE LIMA COELHO, E. *et al.* In Silico Study of The Potential of Naturally Caffeoylquinic Acids From *Lentinus Crinitus* Basidiocarp With Zika Virus Inhibition Targets. **Res. Sq.**, 2021.

FUJIWARA, F.; TODO, S.; IMASHUKU, S. Fatty acid modification of cultured neuroblastoma cells by gamma linolenic acid relevant to its antitumor effect. **Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine**, v. 30, n. 1, p. 37-49, 1987.

FREITAS, J. C., & BONAGAMBA, T. J. Os núcleos atômicos e a RMN. **Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear**, 1999.

GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C.; RIBEIRO-DO-VALLE; R. M.; SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. **Redox Report**, 6(4), 243-250, 2001.

GARCIA, M.C. *Transesterificação de oleos vegetais.* 2006. 136 f. Tese (Mestre em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

GARCIA, M. C. F.; SOARES, D. C.; SANTANA, R. C.; SARAIVA, E. M. *et al.* The in vitro antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against Leishmania amazonensis. **Parasitology**, 145, n. 9, p. 1219-1227, 2018.

GHANI, M. A.; BARRIL, C.; BEDGOOD JR, D. R.; PRENZLER, P. D. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chem.**, 230, p. 195-207, 2017.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GOMES-SILVA, A. C.; GIBERTONI, T. B.. Revisão do Herbário URM. Novas ocorrências de Aphyllophorales para a Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 587-596, 2009..

GREENBERG, M. E.; LI, X.-M.; GUGIU, B. G.; GU, X. *et al.* The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. **J. Biol. Chem**, 283, n. 4, p. 2385-2396, 2008.

GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C. Contribution to the lignocellulolytic fungi (Basidiomycetes) of the Atlantic Rain Forest in Southern Brazil. **Mycotaxon**, v. 92, p. 103-106, 2005.

GONZÁLEZ, A.; CRUZ, M.; LOSOYA, C.; NOBRE, C.; LOREDO, A.; RODRÍGUEZ, R.; BELMARES, R.Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. **Food & function**, v. 11, n. 9, p. 7400-7414, 2020.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M. J.; ORTEA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. α-Linolenic and γ-linolenic acids exercise differential antitumor effects on HT-29 human colorectal cancer cells. **Toxicol. Res.**, 9, n. 4, p. 474-483, 2020.

GÜNÇ ERGÖNÜL, P.; AKATA, I.; KALYONCU, F.; ERGÖNÜL, B. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. **Sci. World J.**, 2013, 2013.

HARRISON, L. H.; NAIDU, T. G.; DREW, J. S.; DE ALENCAR, J. E. *et al.* Reciprocal relationships between undernutrition and the parasitic disease visceral leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.**, 8, n. 3, p. 447-453, 1986.

HELENO, S. A.; FERREIRA, R. C.; ANTONIO, A. L.; QUEIROZ, M.-J. R. *et al.* Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food Biosci.**, 11, p. 48-55, 2015.

HOA, H. T; WANG, C. L; WANG, C. H. The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, v. 43, n. 4, p. 423-434, 2015.

HONG, J.-S.; KIM, Y.-H.; KIM, M.-K.; KIM, T.-Y. *et al.* Studies on the lipids composition of Korean edible mushrooms. **J. Korean Soc. Food Cult.**, 5, n. 4, p. 437-442, 1990.

HORROBIN, D. F.; ZIBOH, V. A. The importance of linoleic acid metabolites in cancer metastasis and in the synthesis and actions of 13-HODE. **Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research**, p. 291-294, 1997.

JACOMINI, D.; SINZKER, R. C.; MANGOLIN, C. A.; GRANDE, P. A. *et al.* Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. **Ind. Crops Prod.**, 69, p. 408-414, 2015.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; MALFATTI, C. R.; DEKKER, R. F.; BARBOSA, A. M.; SALOMÉ, K Carboxymethylation of (1→ 6)-β-glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390-399, 2015.

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

KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **J. Sci. Food Agric.**, 93, n. 2, p. 209-218, 2013.

KONO, H.; KONDO, N.; HIRABAYASHI, K.; OGATA, M.; TOTANI, K.; IKEMATSU, S.; OSADA, M. NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble β-(1→3,1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans***. Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 876–886, 2017.

KWON, Y.-J.; UHM, T.-B. A study on the lipid components in oyster mushroom. **J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.**, 13, n. 2, p. 175-180, 1984.

IGUCHI, K.; OKUMURA, N.; USUI, S.; SAJIKI, H. *et al.* Myristoleic acid, a cytotoxic component in the extract from Serenoa repens, induces apoptosis and necrosis in human prostatic LNCaP cells. **The Prostate**, 47, n. 1, p. 59-65, 2001.

LEAVER, H. A.; BELL, H. S.; RIZZO, M. T.; IRONSIDE, J. W.; GREGOR, A.; WHARTON, S. B.; WHITTLE, I. R.Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 66, n. 1, p. 19-29, 2002.

LEICHSENRING, M.; AHMED, H.; LARYEA, M.; WELCHERING, T. *et al.* Polynsaturated and essential fatty acids in malnourished children. **Nutr. Res.**, 12, n. 4-5, p. 595-603, 1992.

LEROUX, M.; LUQUAIN-COSTAZ, C.; LAWTON, P.; AZZOUZ-MAACHE, S.; DELTON, I. Fatty Acid Composition and Metabolism in Leishmania Parasite Species:

LIAU, M. C.; KIM, J.-H.; FRUEHAUF, J. P. Arachidonic acid and its metabolites as surveillance differentiation inducers to protect healthy people from becoming cancer patients. **Clin. Pharmacol. Toxicol. Res.**, 4, n. 1, p. 7-10, 2021.Potential Biomarkers or Drug Targets for Leishmaniasis?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4702, 2023

LÓPEZ-LEGARDA, X.; ARBOLEDA-ECHAVARRÍA, C.; PARRA-SALDÍVAR, R.; ROSTRO-ALANIS, M.; ALZATE, J. F., VILLA-PULGARÍN, J. A.; SEGURA-SÁNCHEZ, F. Biotechnological production, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from a native strain of *Lentinus crinitus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 164, 3133-3144, 2020.

LOPES, S. M.; KRAUSOVÁ, G.; RADA, V.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A.; DE OLIVEIRA, A. J. Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Carbohydrate research**, v. 411, p. 15-21, 2015.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE SOUZA KIRSCH, L.; CAMPELO, M. D. C. L.; DE AGUIAR OLIVEIRA, I. M. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621-627, 2016.

MACHADO, F.; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A.; GONÇALVES, R. *et al.* Alkaloid production and isozymes expression from cell suspension culture of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). **J. Plant Sci.**, 1, n. 4, p. 324-331, 2006.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A.; SANTOS-ROSA, M. *et al.* Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum, L. tropica* and *L. major*. **Exp. Parasitol.**, 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MAGA, J. A. Mushroom flavor. **J. Agric. Food Chem.**, 29, n. 1, p. 1-4, 1981.

MAJUMDER, S.; DEY, R.; BHATTACHARJEE, S.; RUB, A.; GUPTA, G.; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S.; MAJUMDAR, S Leishmania-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite. **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 10, p. 1607-1616, 2012.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food chemistry**, 68(3), 315-318, 2000.

MAITY, G. N., MAITY, P., DASGUPTA, A., ACHARYA, K., DALAI, S., & MONDAL, S. Structural and antioxidant studies of a new arabinoxylan from green stem Andrographis paniculata (Kalmegh). Carbohydrate Polymers, v. 212, p. 297-303, 2019.

MARIM, R.; AVELINO, K.; LINDE, G.; COLAUTO, N. *et al. Lentinus crinitus* strains respond differently to cultivation pH and temperature. **Genet. Mol. Res.**, 17, n. 1, 2018.
MARTINS DE LIMA, T.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M.T.; CURI, R. Toxicidade comparativa de ácidos graxos em uma linha celular de macrófagos (J774). **Ciência Clínica** , v. 111, n. 5, pág. 307-317, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 4 ed. Rio de Janeiro. : Guanabara Koogan, 2015.

MATTILA, P., KÖNKÖ, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L.; VELI, H. KURPULAINEM, J.; VALTONEN, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, 2001.

MENIQUETI, A. B.; RUIZ, S. P.; FARIA, M. G. I.; DO VALLE, J. S. *et al.* Iron Bioaccumulation in *Lentinus Crinitus* Mycelia Cultivated in Agroindustrial Byproducts. **Waste Biomass Valorization**, 12, n. 9, p. 4965-4974, 2021.

MESSAOUD, H.; GUICHARD, M.; LAWTON, P.; DELTON, I.; AZZOUZ-MAACHE, S. Alterações na composição lipídica e de ácidos graxos durante a transformação intramacrofágica de promastigotas do complexo Leishmania donovani em amastigotas. **Lipídios** , v. 52, pág. 433-441, 2017

MESHULAM, T.; LEVITZ, S. M.; CHRISTIN, L.; DIAMOND, R. D. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye,(2, 3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). **J. Infect. Dis.**, 172, n. 4, p. 1153-1156, 1995.

MEŠIĆ, A., ŠAMEC, D., JADAN, M., BAHUN, V., & TKALČEC, Z. Integrated morphological with molecular identification and bioactive compounds of 23 Croatian wild mushrooms samples. **Food Bioscience**, 37, 100720, 2020.

MICHEL, G.; FERRUA, B.; LANG, T.; MADDUGODA, M. P. *et al.* Luciferase-expressing *Leishmania infantum* allows the monitoring of amastigote population size, *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, 5, n. 9, p. e1323, 2011.

MILES, P. G.; CHANG, ST. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. CRC press, 2004.

MOHAN, Kannan et al. The potential role of medicinal mushrooms as prebiotics in aquaculture: A review. Reviews in Aquaculture, v. 14, n. 3, p. 1300-1332, 2022.

MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, A. G. d.; CARVALHO, F. A.; PEREGO, C. H. *et al.* Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 61, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, V.T. *Lipídeos e Membranas*. In: MOTTA, V.T. (Ed). Bioquímica básica. 2 ed. Editora Med Book, 2011. p. 212-239.

MURRAY, H. W.; XIANG, Z.; MA, X. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 74, n. 6, p. 1013-1015, 2006.

MUTUKWA, I. B.; HALL III, C. A., CIHACEK, L.; LEE, C. W. Evaluation of drying method and pretreatment effects on the nutritional and antioxidant properties of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 4, p. e13910, 2019.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. **Annu. Rev. Nutr.** , 24, p. 345-376, 2004.

NAM, M; CHOI, J. Y; KIM, MS. Perfis metabólicos, compostos bioativos e capacidade antioxidante em Lentinula edodes cultivada em substratos de tora versus serragem. **Biomoléculas** , v. 11, n. 11, pág. 1654, 2021.

NANO, J.L., NOBILI, C.; GIRARD-PIPAU, F.; RAMPAL, P. Effect is of fatty acids on the growth of Caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 69, p. 207-215, 2003.

NEDELKOSKA, D. N.; PANČEVSKA, N. A.; AMEDI, H.; VELESKA, D.; IVANOVA, E.; KARADELEV, M.; KUNGULOVSKI, D. Screening of antibacterial and antifungal activities of selected Macedonian wild mushrooms. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences**, n. 124, p. 333-340, 2013.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. A. *et al.* Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **J. Hazard. Mater.**, 180, n. 1-3, p. 316-322, 2010.

NYONDA, M. A.; KLOEHN, J.; SOSNOWSKI, P.; KRISHNAN, A.; LENTINI, G.; MACO, B.; SOLDATI-FAVRE, D. Ceramide biosynthesis is critical for establishment of the intracellular niche of Toxoplasma gondii. **Cell Reports**, v. 40, n. 7, 2022.

OKE, F.; ASLIM, B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. **Food chemistry**, 128(3), 613-619, 2011.

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 8-9, p. 889-893, 2000.

PACHECO, Y. M.; LÓPEZ, S.; BERMÚDEZ, B.; ABIA, R. *et al.* A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. **J. Nutr. Biochem.**, 19, n. 3, p. 200-205, 2008.

PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; DE SOUSA-GOMES, M. L.; FERREIRA DE LIMA JUNIOR, F. E. Treatment of visceral leishmaniasis and American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Epidemiol. Serv. Saude. 20**:** 107-110 p. 2011.

PESSOA, F. B. **Extração e caracterização química de Polissacarídeos de Basidiomicetos comestíveis de ocorrência na Amazônia**. Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, 2016.

PUIGGROS, C.; CHACON, P.; ARMADANS, L.; CLAPES, J. *et al.* Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. **Clin. Nutr.**, 21, n. 1, p. 79-87, 2002.

RAMADAN, M. F.; EL-SHAMY, H. Snapdragon (*Antirrhinum majus*) seed oil: Characterization of fatty acids, bioactive lipids and radical scavenging potential. **Ind. Crops Prod.**, 42, p. 373-379, 2013.

RATHEE, S.; RATHEE, D.; RATHEE, D.; KUMAR, V. *et al.* Mushrooms as therapeutic agents. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 22, n. 2, p. 459-474, 2012.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, 5, n. 2, p. 35-46, 2017.

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review, Food & Function, London, v. 3, n. 11, 1118-30, 2012.

ROBERTS, C. W. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 126, n. 2, p. 129-142, 2003.

ROCHA, M. N.; CORRÊA, C. M.; MELO, M. N.; BEVERLEY, S. M. *et al.* An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 75, n. 3, p. 282-291, 2013.

RUBEL, I. A.; PÉREZ, E. E.; GENOVESE, D. B.; MANRIQUE, G. D. In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tubers at different storage times by Lactobacillus paracasei. **Food Research International**, v. 62, p. 59-65, 2014.

SAINI, S.; KOTTARATH, S. K.; DINDA, A. K.; DUBE, A. *et al.* Preventive as well as therapeutic significances of linoleic acid in the containment of *Leishmania donovani* infection. **Biochimie**, 175, p. 13-22, 2020.

SAINI, S.; RAI, A. K. Linoleic acid inhibits the release of *Leishmania donovani* derived microvesicles and decreases its survival in macrophages. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 10, p. 406, 2020.

SAINI, S.; RAI, A. K. Linoleic Acid—A Feasible Preventive Approach for Visceral Leishmaniasis. **Front. nutr**, 8, p. 649025, 2021.

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

SILVA FIGUEIREDO, P.; CARLA INADA, A.; MARCELINO, G.; MAIARA LOPES CARDOZO, C. *et al.* Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. **Nutrients**, 9, n. 10, p. 1158, 2017.

SILVA, S. **Polissacarídeos do cogumelo *Macroocybe titans*: caracterização estrutural e atividade biológica**. Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

SILVA NETO, C. D. M.; PINTO, D. D. S.; SANTOS, L. A. C.; CALAÇA, F. J. S. Aspectos bromatológicos do cogumelo *Lentinus crinitus* (Basidiomycota: Polyporaceae) em sistemas agroflorestais no Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 40, p. 659-664, 2019.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2006. 490 p.

SINGDEVSACHAN, S. K.; AUROSHREE, P.; MISHRA, J.; BALIYARSINGH, B.; TAYUNG, K.; THATOI, H. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGH, M. P.; PANDEY, V. K.; PANDEY, A. K.; SRIVASTAVA, A. K.; VISHWAKARMA, N. K.; SINGH, V. K. Production of xylanase by white rot fungi on wheat straw. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 10, n. 4, p. 859-862, 2008.

SHARIF, S.; SHAHID, M.; MUSHTAQ, M.; AKRAM, S.; RASHID, A. Wild Mushrooms: A Potential Source of Nutritional and Antioxidant Attributes with Acceptable Toxicity. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 22, n. 2, p. 124, 2017.

SHIROTA, T.; HAJI, S.; YAMASAKI, M.; IWASAKI, T.; HIDAKA, T.; TAKEYAMA, Y.; SHIOZAKI, H.; OHYANAGI, H. Apoptosis in human pancreatic cancer cells induced by eicosapentaenoic acid. ***Nutrition***, v. 21, p. 1010-1017, 2005.

SMIDERLE, F. R. **Caracterização estrutural de alguns polissacarídeos presentes no basidioma de *Pleurotus pulmonarius* e aplicações.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, 15(1), 71-81, 2002.

SOVRANI, V. **Caracterização estrutural de polissacarídeos do cogumelo *Pholiota nameko***. Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

TANAKA, H. S.; BERTÉLI, M. B. D.; CORDEIRO, F. A.; LOPES, A. D. *et al.* Semisolid culture medium improves mycelial recovery of *Agaricus subrufescens* cryopreserved in cereal grains. **Braz. J. Microbiol.**, 50, n. 2, p. 527-532, 2019.

TANAKA, H. S.; MANTOVANI, T. R. D.; DOS SANTOS, M. P.; LINDE, G. A. *et al.* Cereal grains and glycerol in *Agaricus blazei* cryopreservation. **Biosci. J.**, 29, n. 3, p. 627-633, 2013.

TOMÁS, M.; SENTí, M.; ELOSUA, R.; VILA, J. *et al.* Interaction between the Gln–Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. **Eur. J. Pharmacol.**, 432, n. 2-3, p. 121-128, 2001.

UMEO, S.; SOUZA, G.; RAPACHI, P.; GARCIA, D. *et al.* Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. **Genet. Mol. Res**, 14, n. 3, p. 9907-9914, 2015.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K.; PY-DANIEL, V. Contribuições etnomicológicas dos povos indígenas da Amazônia. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 3, n.1, p-58-65, 2013.

VENTURELLA, G.; FERRARO, V.; CIRLINCIONE, F.; GARGANO, M. L. Medicinal mushrooms: bioactive compounds, use, and clinical trials. **Int. J. Mol. Sci.**, 22, n. 2, p. 634, 2021.

VILLARES, A.; MATEO-VIVARACHO, L.; GUILLAMÓN, E. Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. **Agriculture**, v. 2, n. 4, p. 452-471, 2012.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2010. 0470547847.

WANG, X.; CHEN, B.; YANG, Y.; ZHENG, Y. *et al.* The effects of conjugated linoleic acid on the ability of murine macrophage in killing tumor cells. **Zhonghua yu Fang yi xue za zhi**, 38, n. 2, p. 107-110, 2004.

WANG, R.; MA, L.; WENG, D.; YAO, J.; LIU, X.; JIN, F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. **Oncology reports**, v. 35, n. 5, p. 3075-3083, 2016.

WANI, B. A.; BODHA, R. H. E.; WANI, A. H. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. **Journal of Medicinal plants research**, v. 4, n. 24, p. 2598-2604, 2010

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. **International Journal of medicinal mushrooms**, v.1, n., 1, 1999.

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

XU, Y.; GU, Y.; QIAN, S. Y. An advanced electron spin resonance (ESR) spin-trapping and LC/(ESR)/MS technique for the study of lipid peroxidation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14648-14666, 2012.

YAHIA, E. M.; GUTIÉRREZ-OROZCO, F.; MORENO-PÉREZ, M. A. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 226, p. 14-22, 2017.

YAO, C.; WILSON, M. E. Dynamics of sterol synthesis during development of Leishmania spp. parasites to their virulent form. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2016.

YAO, H. Y. Y., WANG, J. Q., YIN, J. Y., NIE, S. P., & XIE, M. Y. A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. **Food Research International**, 2021.

YOUNG, S. H. & JACOBS, R. R. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. **Carbohydrate Research**, 310(1-2), p. 91-99, 1998

YUWA-AMORNPITAK, T.; BUTKHUP, L.; YEUNYAW, PN. Amino acids and antioxidant activities of extracts from wild edible mushrooms from a community forest in the Nasrinual District, Maha Sarakham, Thailand. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 712-720, 2020.

ZAGHI JUNIOR, L. L. Z.; BERTÉLI, M. B. D.; DE FREITAS, J. D. S.; DE OLIVEIRA FILHO, O. B. Q. *et al.* Five-year cryopreservation at− 80° C of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. **J. Microbiol. Methods**, 176, p. 106030, 2020a.

ZHANG, K. Leishmania salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1566-1578, 2005.

ZHANG, H.; ZHANG, N.; XIONG, Z.; WANG, G.; XIA, Y.; LAI, P.; AI, L. Structural characterization and rheological properties of β-D-glucan from hull-less barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hook. f.). **Phytochemistry**, v. 155, p. 155–163, 2018.

ZHOU, B. L.; LIANG, Q.; ZOU, Y.; MING, J.; ZHAO, G. H. Research progress in prebiotic properties of edible mushroom. **Food Sci**, v. 32, n. 15, p. 303-307, 2011.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275–288, 2016.

ZHU, S.; JIAO, W.; XU, Y.; HOU, L. *et al.* Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway. **Life Sci.**, 286, p. 120046, 2021.

ANEXOS CAP. 2

MATERIAL SUPLEMENTAR

A1. Parte deste capítulo foi publicado na revista "*Brazilian Journal of Pharmacognosy*", Qualis A3.

ORIGINAL ARTICLE

Lipid Profile and Antileishmanial Activity of *Lentinus crinitus* Basidiocarp

José Rivaldo dos Santos Filho[1] · Rodolfo Bento Balbinot[2] · Celso Vataru Nakamura[2] · Juliana Cristina Castro[2] · Everton da Silva Santos[1] · José Eduardo Gonçalves[3] · Giani Andrea Linde[4] · Nelson Barros Colauto[3] · Regina Aparecida Correia Gonçalves[1] · Arildo José Braz de Oliveira[1]

Received: 18 January 2023 / Accepted: 13 June 2023 / Published online: 5 July 2023
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2023

Abstract

Leishmaniasis is a disease that affects millions of people and is an important public health problem. The aim of this study was to characterize and evaluate the *in vitro* activity of lipid fractions from *Lentinus crinitus* (L.) Fr., Polyporales, basidiocarp against the promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. A lipid crude extract was obtained by maceration, which was then separated into neutral lipids, glycolipids, and phospholipids by column chromatography. The crude extract and fractions were analyzed and quantified by gas chromatography and then evaluated for *in vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity against J774A.1 macrophages. Linoleic, palmitic, and oleic acids were identified as the main components of the crude extract and fractions. The neutral lipids, glycolipids, and lipid crude extract were able to inhibit *L. amazonensis* growth, with IC_{50} values of 56.18 µg/ml with a selectivity index (SI) of 1.06, 96.57 µg/ml (SI, 1.64), and 146.49 µg/ml (SI, 0.82), respectively, for promastigotes, and 22.40 µg/ml (SI, 2.67), 38.63 µg/ml (SI, 1.54), and 77.67 µg/ml (SI, 4.10), respectively, for amastigotes. The data indicated that the *L. crinitus* basidiocarp is rich in polyunsaturated fatty acids, being an excellent source of linoleic acid (174.66–838.24 mg/100 g), palmitic acid (48.16–189.78 mg/100 g), and oleic acid (21.85–125.25 mg/100 g). Furthermore, the crude extract and fractions proved to be more active against amastigote forms and more selective towards the parasites than the host cells. These results are the first report of antileishmanial activity of lipid fractions from *L. crinitus* basidiocarp and provide a significant basis for further investigation into the action of these fractions in the treatment of leishmaniasis.

Keywords Basidiomycete · Gas chromatography · Linoleic acid · Polyunsaturated fatty acids · Mushrooms · Selectivity index

✉ Arildo José Braz de Oliveira
ajboliveira@uem.br

[1] Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

[2] Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

[3] Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas, Universidade Cesumar e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação, Maringá, Paraná, Brazil

[4] Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e

Introduction

Leishmaniasis is a group of diseases caused by more than 20 species of the protozoan parasite of the *Leishmania* genus. According to the World Health Organization, leishmaniasis is endemic in 98 countries and territories and is associated with a weak immune system, malnutrition, population displacement, precarious housing, and lack of resources, mainly affecting people in Africa, Asia, and Latin America. There are three main clinical forms of leishmaniasis: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL), and mucocutaneous leishmaniasis (ML) (WHO 2022).

Currently, treatment for leishmaniasis is mainly based on

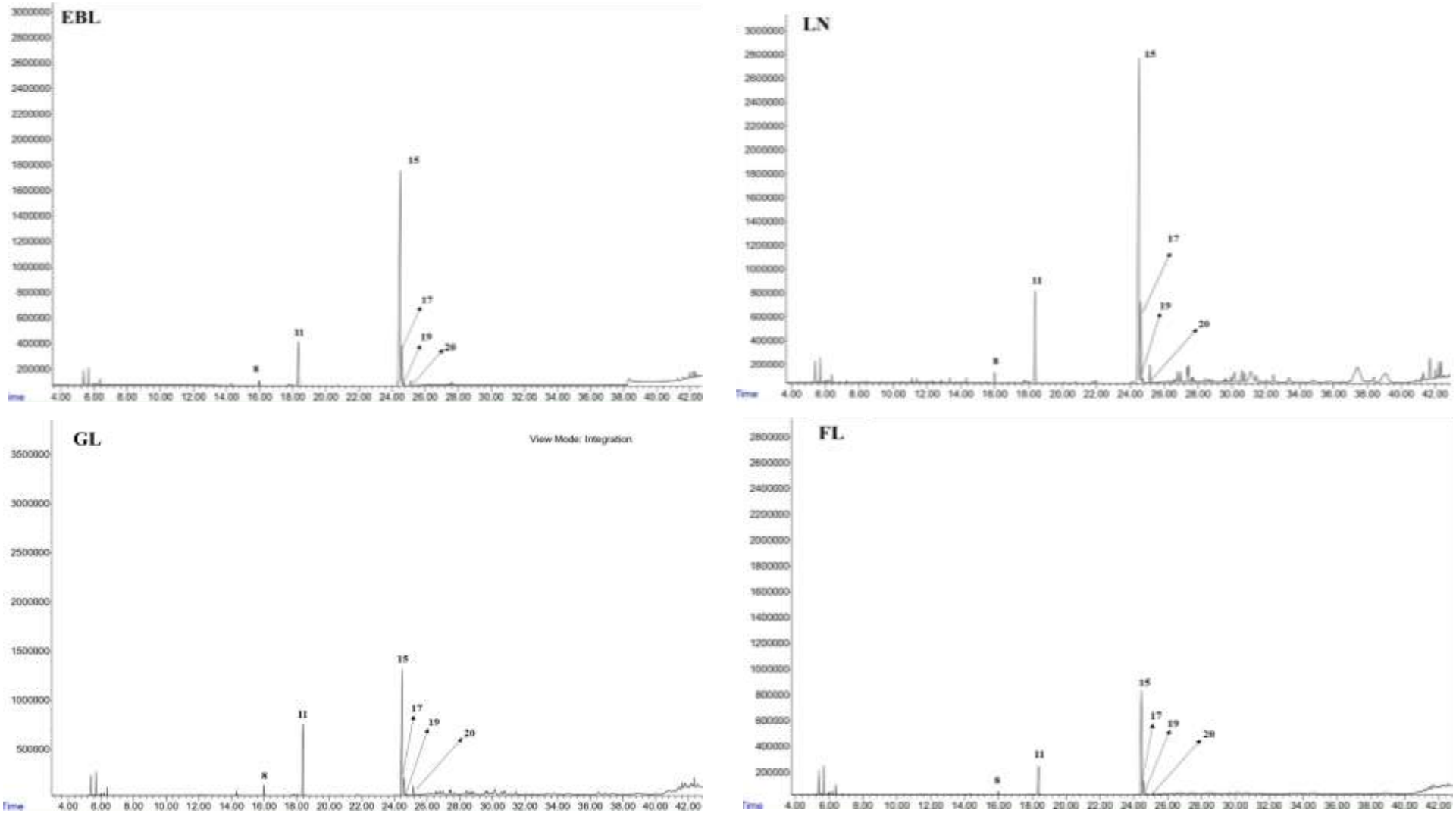


Figura S1. Cromatogramas obtidos pelo CG/DIC do Extrato Bruto Lipídico (EBL), e frações Lipídios Neutros (LN), Glicolipídios e Fosfolipídios (FL) de *L. crinitus*, demonstrando os ácidos graxos majoritários nas amostras. Ácido mirístico (**8**), ácido palmítico (**11**), ácido linoleico (**15**), ácido oleico (**17**), ácido elaídico (**19**) e ácido esteárico (**20)**

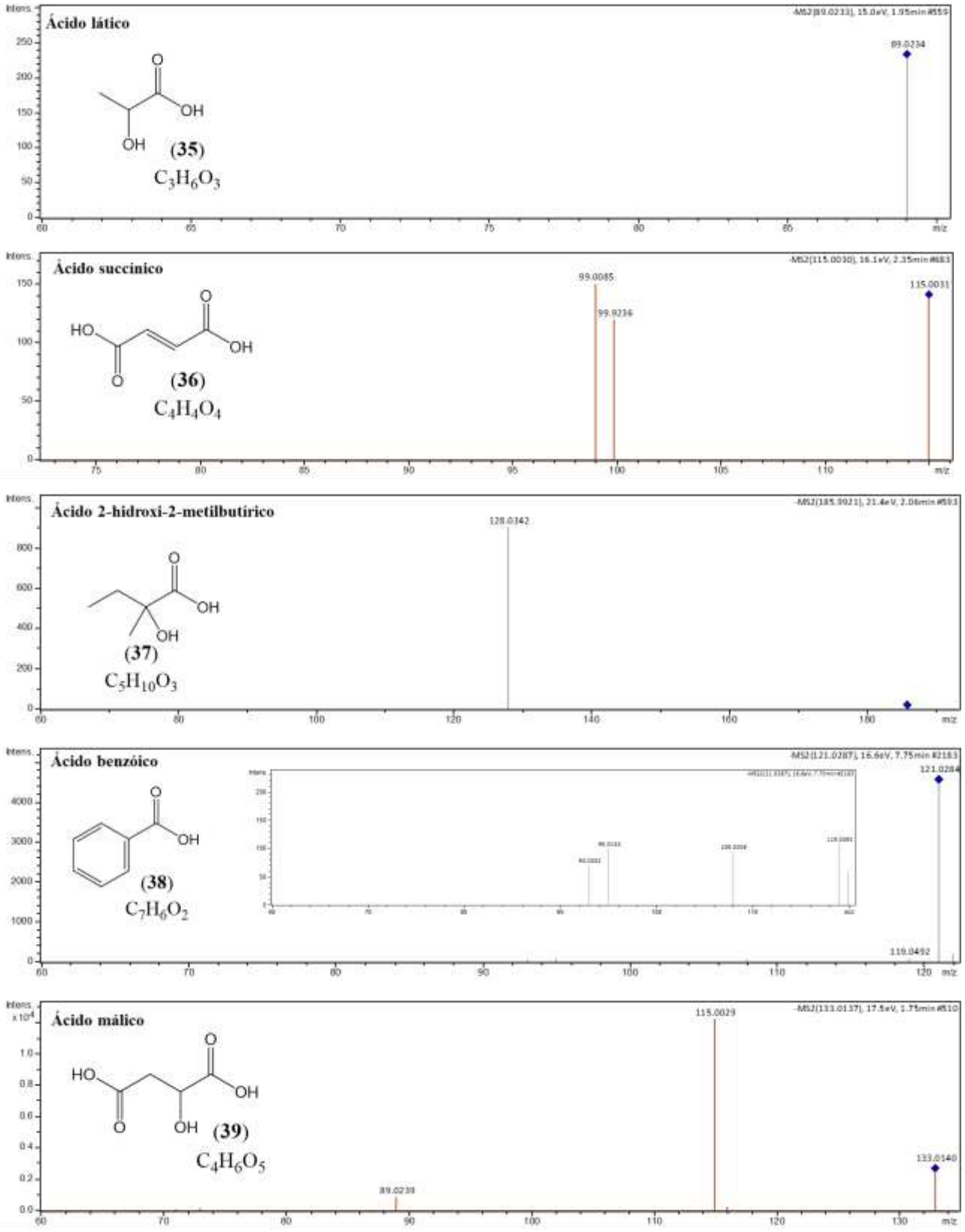
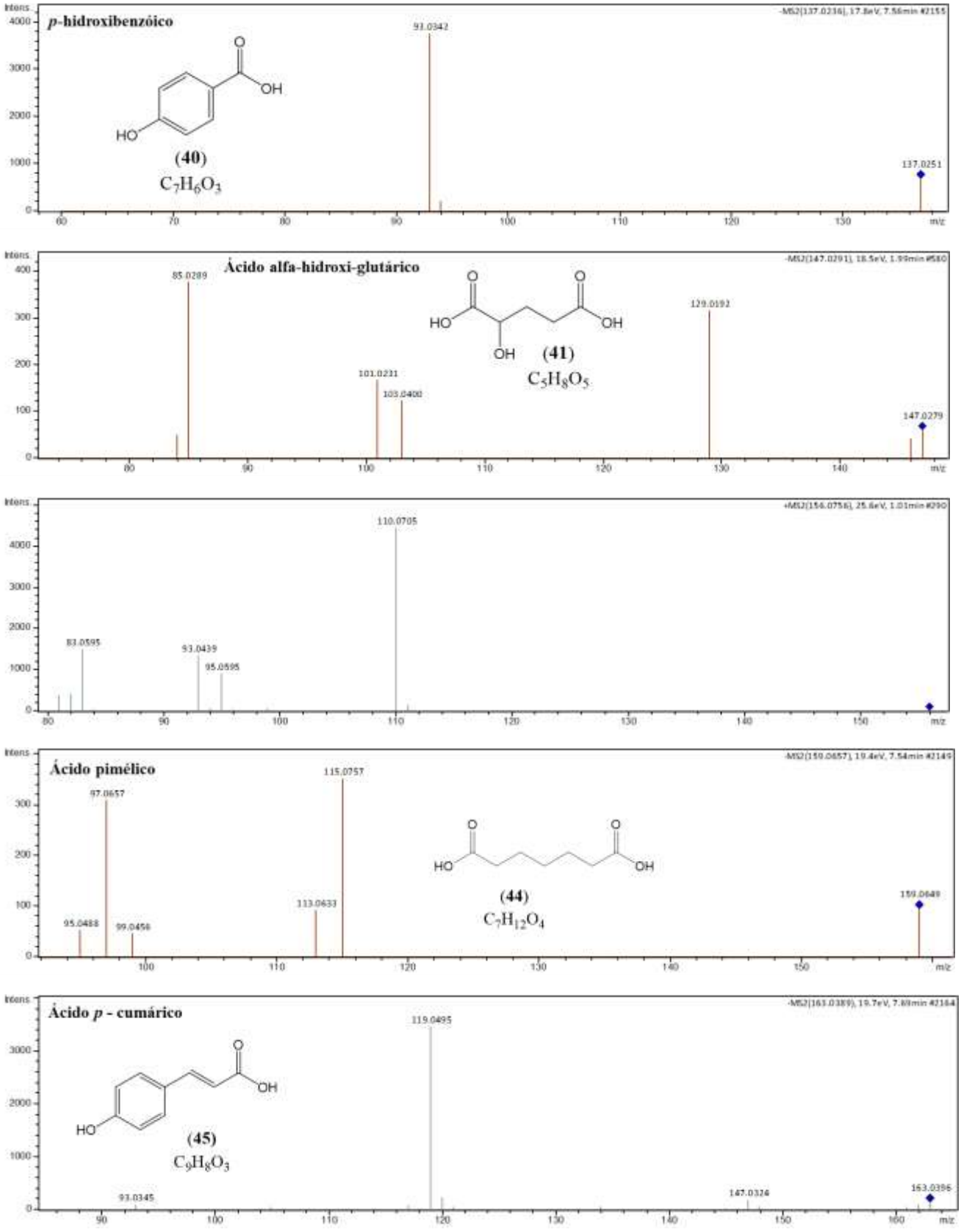
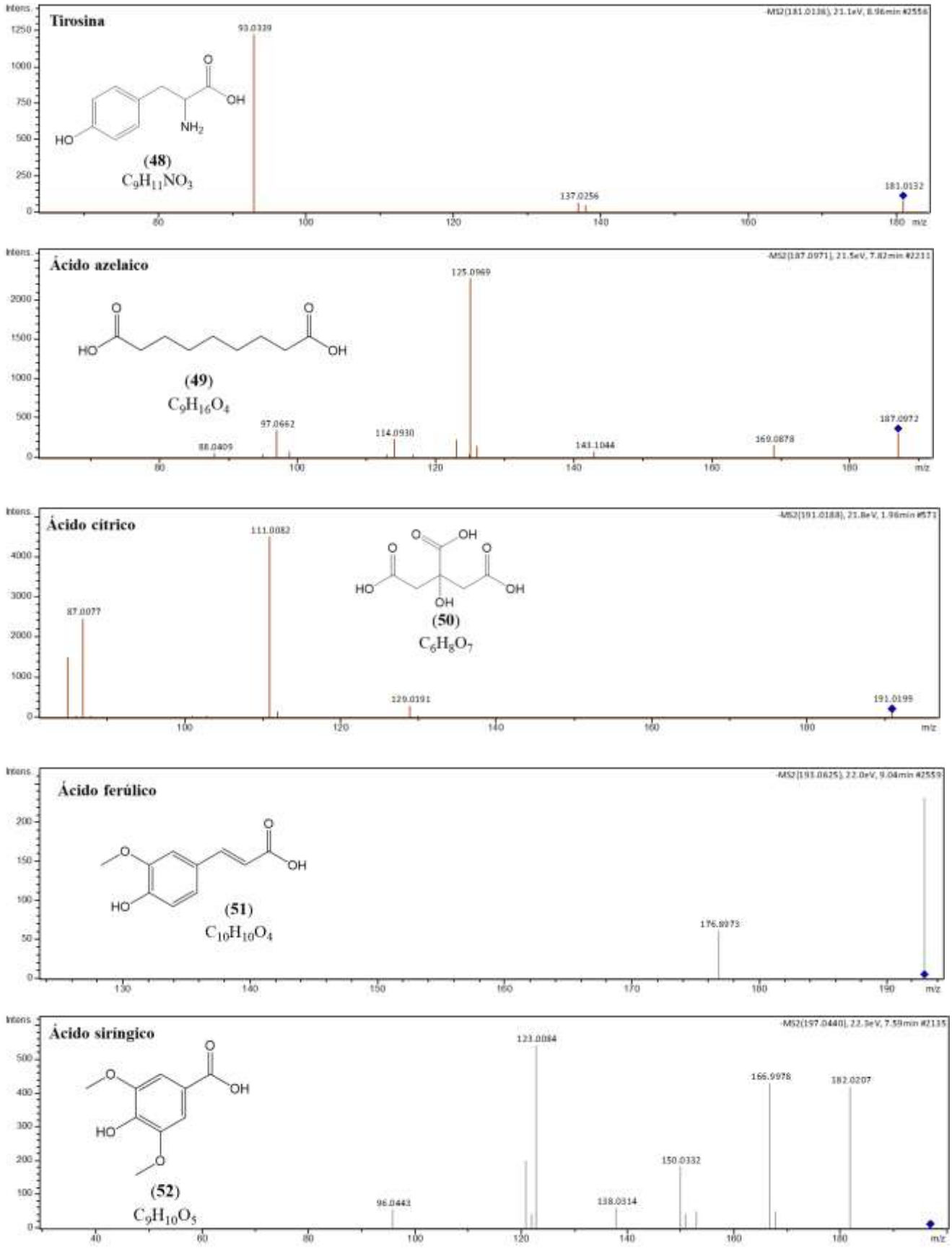


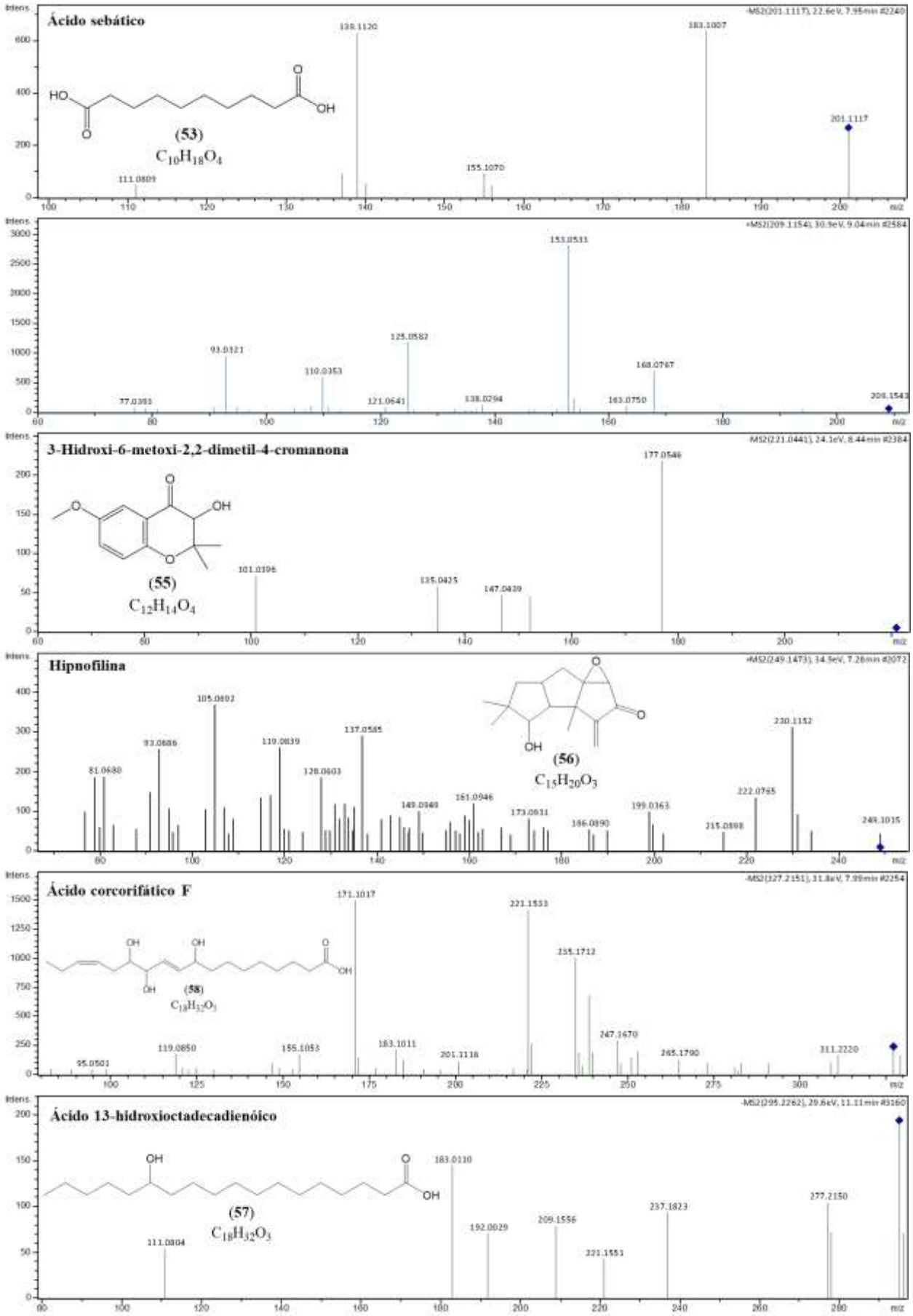
Figura S2. Espectros de fragmentação dos compostosobtidos pelo *UHPLC-HRMS/MS* do extrato e frações de *L. crinitus*



Continuação Figura S2



Continuação Figura S2



Continuação Figura S2

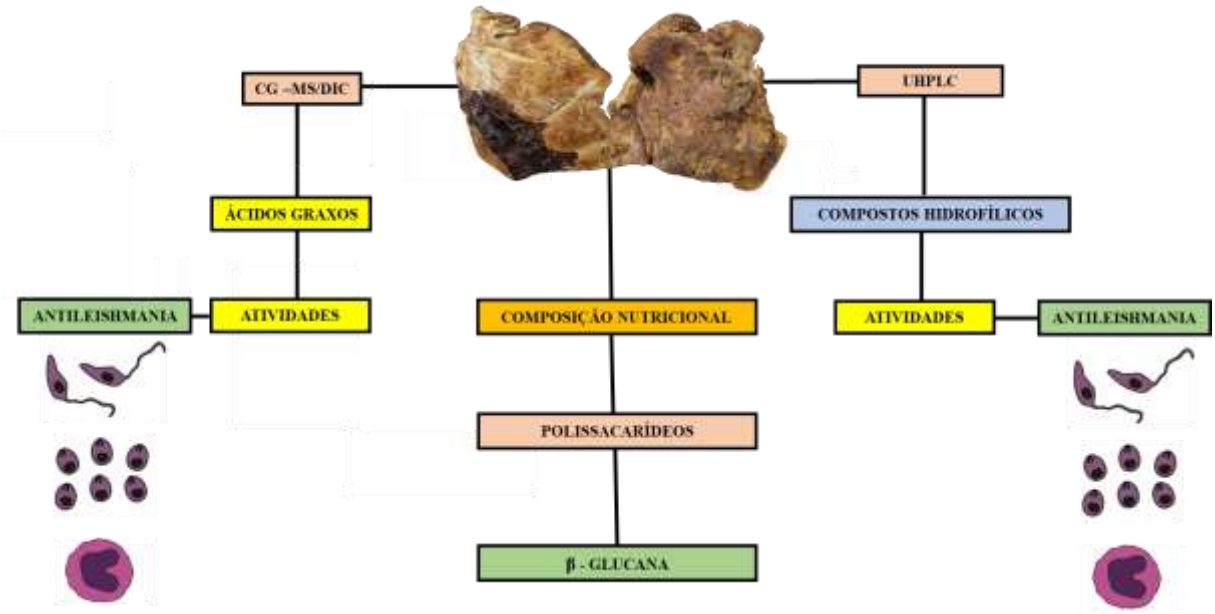
Tabela S1. Compostos identificados por *UPLC-HRMS* no extrato bruto metanólico e frações de *L. crinitus*.

Composto	#	FM	Massa exata *m/z*	Ion precursor *m/z*	Erro (ppm)	t_R (min)	Ions fragmentos	Amostras	Referências
Ácido lático	**35**	$C_3H_6O_3$	90,0311	89,0233 [M-H]-	0	1,95	89	FDCL	MSBNK-Metabolon-MT000003
Ácido Sucínico	**36**	$C_4H_4O_4$	116,0723	115, 0028 $[M-H]^-$ 115,0030 $[M-H]^-$	1,73 3,48	2,33	73; 99	EBML FHML	HMDB0000134
Ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico	**37**	$C_5H_{10}O_3$	118,0624	117,0550 $[M-H]^-$	3,42	7,34	99; 116	FDCL	HMDB0001987
Ácido benzoico	**38**	$C_7H_6O_2$	122,0368	121,0291 $[M-H]^-$ 121,0287 $[M-H]^-$	5,78 -2,48	4,16 7,75	93; 95; 108; 119; 120; 121	EBML FDCL	HMDB0001870
Ácido málico	**39**	$C_4H_6O_5$	134,0215	133,0134 $[M-H]^-$ 133,0134 $[M-H]^-$	-3,75 -3,75	1,75	71; 72; 89; 115	EBML FHML	HMDB0000744
p-hidroxibenzoico	**40**	$C_7H_6O_3$	138,1220	137,0236 $[M-H]^-$ 137,0231 $[M-H]^-$	-2,19 1,46	7,56 7,43	93; 94; 109; 137	EBML FDCL	HMDB0001895
Ácido alfa-hidroxi-glutárico	**41**	$C_5H_80_5$	148,1142	147,0292 $[M-H]^-$ 147,0291 [M-H]-	-2,72 -2,04	1,99	85; 87; 99; 101; 103; 129	EBML FHML	HMDB0059655
Histidina	**42**	$C_6H_9N_3O_2$	155,157	156,0756 $[M+H]^+$ 156,0760 $[M+H]^+$	7,04 4,48	1,01 0,99	83; 93; 95; 110;	EBML FHML	WANG et al. (2010)
Ácido pimélico	**43**	$C_7H_{12}O_4$	160,0730	159,0653 $[M-H]^-$	-1,04	7,36	85; 112; 115	FDCL	MSBNK-Keio_Univ-KO001652
Ácido *p*-cumárico	**44**	$C_9H_8O_3$	164,0468	163,0395 $[M-H]^-$ 163,0389 $[M-H]^-$ 163,0381 $[M-H]^-$	3,68 0 4,91	7,71 7,69 7,66	119; 120; 147	EBML FDCL FHML	HMDB0030677
Ácido fenil-láctico	**45**	$C_9H_{10}O_3$	166,0624	165,0542 [M-H]-	2,42	7,88	93; 103; 119; 134; 147; 163	FDCL	HMDB0000563
Ácido caféico	**46**	$C_9H_8O_4$	180,1590	161,0234 [M-H2O-H]-	1,69	15,54	117	EBML	HMDB0001964
Tirosina	**47**	$C_9H_{11}NO_3$	181, 0739	182, 0804 $[M+H]^+$	3,84	1,50	77; 91; 95; 107; 119; 123; 136; 147	EBML	HMDB0000158
Ácido azelaico	**48**	$C_9H_{16}O_4$	188,1043	187, 0971 $[M-H]^-$ 187, 0962 $[M-H]^-$ 187,0957 $[M-H]^-$	-3,74 1,07 -3,74	7,82 7,85 7,75	88; 97; 114; 123; 125; 126; 169	EBML FDCL FHML	HMDB0000784
Ácido cítrico	**49**	$C_6H_8O_7$	192,1237	191,0188 $[M-H]^-$	-1,04	1,96	85; 87; 111; 129	EBML	MSBNK-Keio_Univ-KO000382
Ácido ferúlico	**50**	$C_{10}H_{10}O_4$	194,1860	195,0636 $[M+H]^+$	6,15	7,03	79; 87; 96; 108; 124; 135; 139; 151; 179	FDCL	MoNA (PS103901)
Ácido siríngico	**51**	$C_9H_{10}O_5$	198,0522	197,0440 $[M-H]^-$	2,53	7,59	96; 123; 138; 150; 166; 182	FDCL	Bruker_HCD_library000672
Ácido sebático	**52**	$C_{10}H_{18}O_4$	202,1199	201,1117 $[M-H]^-$	1,99	7,95	111; 139; 155; 183; 201	FDCL	HMDB0000792
6-metoxi-2,2-dimetilcroman-4-ol	**53**	$C_{12}H_{16}O_3$	208,1094	209,1154 $[M+H]^+$	0,94	9,04	77; 93; 110; 125; 138; 153; 168	FDCL	ABRAHAM E ABATE (1995)
3-Hidroxi-6-metoxi-2,2-dimetil-4-cromanona	**54**	$C_{12}H_{14}O_4$	222,0887	221,0806 [M-H]-	0,90	8,80	108; 134; 135; 149; 177	FDCL	ABRAHAM E ABATE (1995)
Hipnofilina	**55**	$C_{15}H_{20}O_3$	248,1407	249,1473 $[M+H]^+$	4,82	7,28	81; 93; 105; 119; 128; 137; 143; 149; 161; 167; 173; 186; 199	FDCL	ABRAHAM E ABATE (1994); ABRAHAM E ABATE (1995)
O ácido 13-hidroxioctadecadienóico	**56**	$C_{18}H_{32}O_3$	296,2351	295,2262 [M-H]- 295,2255 [M-H]-	1,69 4,06	11,11 11,54	277; 278; 295	FDCL FHML	MoNA (PR309089)
Ácido corcorifático F	**57**	$C_{18}H_{32}O_5$	328,2244	327, 2152 [M-H]-	4,28	7,96	99; 139; 171; 211; 229	FDCL	HMDB0035919

FM: Fórmula molecular; Tr: Tempo de Retenção; EBML: Extrato bruto metanólico; FDCL: Fração diclorometano; FHML: Fração hidrometanólica.

CAPÍTULO 3

Caracterização química e atividade biológica de *Ganoderma stipitatum*



RESUMO

Ganoderma stipitatum é um cogumelo que pertence à família Ganodermataceae, com distribuição em países como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Índia. O objetivo do trabalho foi determinar o perfil químico e as diferentes classes de compostos bioativos e avaliar o potencial biológico e nutricional do cogumelo *Ganoderma stipitatum.* Os lipídios foram extraídos por meio da medologia Bligh e Dyer (extrato BD-C), Bligh e Dyer substituindo o clorofórmio pelo diclorometano (extrato BD-D) e por maceração com clorofórmio (M-C) e diclorometano (M-D). Os lipídios do M-C foram separados em lipídios neutros (NL), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (PL) por cromatografia em coluna. Os compostos hidrofílicos foram extraídos por maceração com metanol seguida de partição com diclorometano. As amostras foram analisadas quimicamente por *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*) e Cromatografia em fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (EM); e Ionização de Chama (DIC). Os polissacarídeos de *G. stipitattum* foram extraídos com água na autoclave (extração aquosa; 121 ºC, 1,5 atm, 20 min), e sequencialmente com hidróxido de potássio sob refluxo (extração alcalina). Em seguida, as amostras foram purificadas e analisadas quimicamento por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinação estutural e da composição monossacarídica. A atividade antileishmania foi avaliada contra formas promastigotas e amastigotas de *Leismania amazonensis*. Os extratos, frações lipídicas e hidrofílicas de *G. stipitatum* apresentaram atividade antileishmania em ambas as formas testadas, com maior potencial de atividade contra a forma amastigota. A análise da composição centesimal revelou predomínio de carboidratos (79,01%) e proteínas (17,90%), destacando-se a grande quantidade de fibras brutas neste cogumelo (42,77%). A caracterização dos ácidos graxos por CG/EM, demonstrou o predomínio de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em relação aos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e saturados (AGS) em todas as amostras. O ácido graxo identificado em maior quantidade em todas as amostras foi o ácido

linoleico (37,02 a 56,60%), seguido do ácido palmítico (10,80 a 17,71%), ácido oleico (8,05 a 9,56%), ácido elaídico (3,21 a 7,06%) e ácido esteárico (2,13 a 5,54%). Nas análises por *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*, foram identificados compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ácidos graxos e diversos compostos triterpênicos. A caracterização química por RMN revelou a presença de β-glucanas de cadeia principal com ligações β-1→3 e ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6, no extrato aquoso e alcalino. Os monossacarídeos glicose, ramnose e fucose foram identificados na fração aquosa, enquanto glicose e xilose foram identificadas na fração alcalina. Conclui-se que os extratos e frações de *G. stipitatum* são promissores em relação a atividade antileishmania, sendo o cogumelo, uma excelente fonte de compostos bioativos, como os ácidos graxos poli-insaturados, compostos fenólicos e glucanas.

Palavras-chave: *Ganoderma* spp., ácidos graxos, compostos fenólicos, atividade antileishmania, composição centesimal.

ABSTRACT

Ganoderma stipitatum is a mushroom that belongs to the Ganodermataceae family, distributed in countries such as Brazil, Peru, Bolivia, Venezuela and India. The objective of the work was to determine the chemical profile and different classes of bioactive compounds and evaluate the biological and nutritional potential of the *Ganoderma stipitatum* mushroom. Lipids were extracted using Bligh and Dyer extract (BD-C extract), Bligh and Dyer replacing chloroform with dichloromethane (BD-D extract) and by maceration with chloroform (M-C) and dichloromethane (M-D). M-C lipids were separated into neutral lipids (NL), glycolipids (GL) and phospholipids (PL) by column chromatography. The hydrophilic compounds were extracted by maceration with methanol followed by partitioning with dichloromethane. The samples were chemically analyzed by Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and Gas Chromatography (GC) coupled to Mass Spectrometry (MS); and Flame Ionization (FID). *G. stipitatum* polysaccharides were extracted with water in an autoclave (aqueous extraction; 121 ºC, 1.5 atm, 20 min), and sequentially with potassium hydroxide under reflux (alkaline extraction). Then, the samples were purified and chemically analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to determine structure and monosaccharide composition. The antileishmanial activity was evaluated against promastigotes and amastigotes of *Leismania amazonensis*. The extracts, lipid and hydrophilic fractions of *G. stipitatum* showed antileishmanial activity in both forms tested, with greater potential for activity against the amastigote form. Analysis of the proximate composition revealed a predominance of carbohydrates (79.01%) and proteins (17.90%), highlighting the large amount of crude fiber in this mushroom (42.77%). The characterization of fatty acids by GC/MS demonstrated the predominance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in relation to monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (SFA) in all samples. The fatty acid identified in greatest quantity in all samples was linoleic acid (37.02 to 56.60%), followed by palmitic acid (10.80 to 17.71%), oleic acid (8.05 to 9. 56%), elaidic acid (3.21 to 7.06%) and stearic acid (2.13 to 5.54%). In analyzes by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, phenolic compounds, organic acids, amino acids, fatty acids and several triterpene compounds were identified. Chemical characterization by NMR revealed the presence of main chain β-glucans with β-1→3 linkages and branched chain β-glucans with β-1→6 linkage in the aqueous and alkaline extract. The monosaccharides glucose, rhamnose and fucose were identified in the aqueous fraction, while glucose and xylose were identified in the alkaline fraction. It is concluded that extracts and fractions of *G. stipitatum* are promising in relation to antileishmanial activity, with the mushroom being an excellent source of bioactive compounds, such as polyunsaturated fatty acids, phenolic compounds and glucans.

Keywords: *Ganoderma* spp., fatty acids, phenolic compounds, antileishmanial activity, β-glucans.

1. INTRODUÇÃO

Ganodermataceae, família dos Polyporales, tem sido pesquisada há muitas décadas devido aos seus elevados valores medicinais e ecológicos (SUN et al., 2022). Esta por sua vez é uma família grande e complexa que tem sido estudada há muitas décadas, mas a diversidade de espécies, distribuição geográfica, classificação de espécies e taxonomia permanecem incertas (FRYSSOULI et al., 2020; SUN et al., 2022). *Ganoderma*, o principal gênero de Ganodermataceae, é caracterizado por sua natureza cosmopolita, sendo encontrado especialmente em regiões tropicais e subtropicais, incluindo África, América, Ásia (FRYSSOULI et al., 2020).

O gênero *Ganoderma* foi descrito pela primeira vez em 1881 pelo micologista finlandês Petter Adolf Karsten e inicialmente incluía apenas uma espécie, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (SUŁKOWSKA-ZIAJA et al., 2023). Atualmente, aproximadamente 300 espécies de *Ganoderma* foram identificadas em todo o mundo (WIŃSKA et al., 2019), incluindo *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. boniense*, *G. atrum* e *G. sinense*, que apresentam uma ampla gama de efeitos promotores da saúde (ZANG et al., 2023).

Ganoderma spp. são cogumelos populares, tanto para fins medicinais como alimentares há mais de 2.000 anos (ZENG et al., 2019), sendo usados há séculos como medicamento ou suplemento nutricional para prevenção, controle e tratamento de doenças crônicas (CAO et al., 2018), como doenças cardiovasculares, autoimunes, digestivas, diabetes, tumores malignos (ZANG et al., 2023). Essas atividades biológicas estão relacionadas a abundante variedade de componentes bioativos (mais de 600 compostos) identificados em *Ganoderma* spp., incluindo polissacarídeos, esteróides, triterpenos, glicoproteínas, esteróis, peptídeos (GONG et al., 2019).

De acordo com o Index Fungorum Database (2023) e o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SIBBR, 2023), a classificação para a espécie *Ganoderma stipitatum* (*G. stipitatum*) é: *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill (Polyporales, Ganodermataceae).

Quem primeiro descreveu a espécie foi Murrill (1908) e embora a nomenclatura atual seja *Ganoderma stipitatum*, pode também ser encontrado como *Fomes parvulus* (Murrill) Sacc. e D. Sacc., *Fomes stipitatus* Murrill, *Ganoderma bibadiostriatum* Steyaert e *Ganoderma parvulum* Murril (INDEX FUNGORUM DATABASE, 2023; SIBBR, 2023). Esta espécie é encontrada em países como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Índia (BHOSLE et al., 2010). No território brasileiro este fungo é encontrado nos estados do Pará (MARTINS JÚNIOR; BAPTISTA GIBERTONE; SOTÃO, 2011), Pernambuco, Rondônia (LIMA JUNIOR; BAPTISTA GIBERTONE; MALOSSO, 2014) e Bahia (FIGUEIRÊDO, 2008).

Como já demonstrado, o gênero *Ganoderma* possui uma grande variedade de compostos bioativos, no entanto, a literatura referente a composição química e a atividade biológica da espécie *G. stipitatum* é muito escassa. Diante disto, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização química de metabólitos presentes em diferentes extratos e frações do cogumelo *G. stipitatum* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), *ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry* (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS*) e Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e acoplada a um detector de ionização de chama (CG/DIC), avaliar a composição centesimal, e realizar a avaliação de suas atividade antileishmania.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL FÚNGICO

O corpo de frutificação de *Ganoderma stipitatum* (Murrill) Murrill (sinonímia *Ganoderma parvulum* Murrill) foi coletado em Umuarama-PR (-23.424517, -51.943312), no ano de 2015, em tronco de Sibipiruna (*Cenostigma pluviosum* (DC.) Gagnon & G. P. Lewis), estando registrado no Sisgen sob o número A04E776 (Figura 28).

Figura 28. Corpo de frutificação do *Ganoderma stipitatum*. Fonte: O autor, 2020

O cogumelo foi triturado com moedor de facas e armazenado em Ultrafreezer (Panasonic, MDF-U76VC) a -80ºC para análises posteriores.

2.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O valor nutricional do cogumelo *G. stipitatum* foi avaliado pela determinação de proteína bruta, lipídios, matéria seca, material mineral, fibra bruta e carboidratos, conforme metodologia da "*Association of Official Agricultural Chemists*" (AOAC, 1975). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA-UEM),

sob a coordenação do Prof. Dr. Leandro Dalcin Castilha, e supervisão do químico Dr. Osvaldo Pezoti Junior.

A determinação da proteína bruta foi realizada a partir do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. O teor de lipídios das amostras foi determinado pela extração das amostras com éter de petróleo via Goldfish. O teor de matéria seca foi obtido por secagem em estufa a 105 °C até a massa constante. Determinou-se fibra bruta pelo método de digestão ácida e básica.

O teor de minerais foi determinado pela combustão das amostras em forno mufla a 600 °C por 4 h. Os carboidratos foram determinados subtraindo-se os teores de proteína bruta, lipídios, matéria seca e material mineral da massa seca total (100 g). A energia total foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteína} + \text{g carboidratos}) + 9 \times (\text{g gordura}) \quad (1)$$

2.2 ÁCIDOS GRAXOS

2.2.2 Extração por Bligh e Dyer

Para a extração dos lipídios pelo método de Bligh e Dyer (1956), foram utilizados 5 g do corpo de frutificação de *G. stipitatum* seco. O método foi realizado utilizando metanol, clorofórmio e água na proporção de 2:2:1 (v/v/v), conforme descrito por Alves et al. (2017). Em um erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 50 mL de metanol, 25 mL de clorofórmio e 10 mL de água. O erlenmeyer foi tampado e colocado sob agitação por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 25 mL de clorofórmio e 25 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e agitou-se a mistura por mais 2 minutos. A solução com a amostra foi filtrada em papel filtro e transferida para um funil de separação, onde ocorreu a formação do sistema bifásico. A camada inferior, ou seja, a fase orgânica rica em clorofórmio e que contém os lipídios foi coletada em um erlenmeyer de 125 mL e rotaevaporada a 40-45 °C. O extrato resultante foi denominado BD-C. O mesmo procedimento foi realizado novamente com uma nova massa de *G. stipitatum*, mas substituindo o clorofórmio pelo diclorometano, sendo o extrato resultante denominado BD-D.

2.2.3 Extração total de lipídios por maceração

Uma amostra de 5 g do corpo de frutificação de *G. stipitatum* moído e seco foi submetido à maceração com 100 mL de isopropanol em agitador orbital a 115 rpm e 28°C por 24 h. Em seguida, a re-extração foi realizada com 100 mL de solução de clorofórmio-metanol

(2:1, v/v) por maceração por 24 h. Ambas as frações de cada extração foram reunidas e os solventes evaporados em rotaevaporador a 40 ºC (MACHADO et al., 2006), resultando na obtenção do extrato brutos lipídicos (EBL) denominado M-C. Seguindo os mesmos procedimentos, outra extração por maceração foi realizada, utilizando uma nova massa de *G. stipitatum* e substituindo o clorofórmio por diclorometano, sendo o extrato resultante denominado M-D.

2.2.4 Fracionamento das classes lipídicas por cromatografia em coluna

O extrato M-C foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) (JACOMINI et al., 2015; RAMADAN e EL-SHAMY, 2013) usando uma coluna de vidro (20 cm × 1,25 cm de diâmetro interno) que continha 20 g de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como adsorvente. As eluições foram realizadas com 200 mL de clorofórmio, acetona e metanol que resultaram nas três frações lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL), respectivamente. Após, os solventes de todas as frações foram evaporados em rotaevaporador a 40°C.

2.2.5 Preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos por derivatização

Os ácidos graxos dos extratos BD-C, BD-D, M-C, M-D e frações LN, GL e FL de *G. stipitatum* foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs) por transesterificação com 1 mL de hidróxido de sódio a 1% (NaOH) em metanol seguido de aquecimento a 55 °C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 5% em metanol e aquecidos a 55 °C durante 15 min e depois foi adicionado 1 mL de água ultrapura (água Milli-Q). Depois disso, os EMAGs foram extraídos com hexano (3 x 1 mL) e evaporados em evaporador rotativo a 40 ºC. As amostras foram armazenadas a -4 °C em *vials* para posterior análise por GC. Após, foram redissolvidos em 1 mL de hexano e análisados por CG.

2.2.6 Análise por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama (CG/DIC)

Os EMAGs dos extratos BD-C, BD-D, M-C, M-D e frações LN, GL e FL de *G. stipitatum* foram analisados por CG/DIC.

Os EMAGs foram analisados por CG utilizando o cromatógrafo a gás (Agilent 7890B), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Agilent HP5 com fase de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 μm d.i. x 0,25 μm de espessura do filme). Para a

análise foram injetados 2 μL da amostra foi injetado na coluna usando o modo de injeção Split na razão 1:71, nas seguintes condições do forno: temperatura inicial de 65 ºC mantida por 4 min, em seguida rampa de 16 °C min^{-1} até 185°C mantida por 12 min, aquecimento de 20 °C/min até 235 mantida por 14 min e rampa de 35 °C/min até 300 °C e mantida por 1 min. As demais condições do método de análise foram: fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,4 mL/min, temperatura do injetor de 235 °C e temperatura do detector de 350 ºC com fluxo de H_2 de 35 mL/min, fluxo de ar sintético de 300 mL/min e fluxo reposição de N_2 de 25 m/min.

EMAGs foram identificados por comparação com EMAGs padrão, previamente identificados por CG/EM. Através da integração dos picos e do cálculo com base na área correspondente no cromatograma para cada ácido graxo, foi possível realizar a quantificação absoluta dos EMAGs (QAEMAGs) do basidiocarpo de *G. stipitatum* utilizando o software MSD ChemStation (versão F 01.00. 1903, Agilent Technologies, Inc.). Inicialmente, a área do cromatograma dos ácidos graxos foi calculada nas corridas dos padrões FAME em diferentes concentrações (62,5; 125,0; 250,0; 500,0; 1.000,0 e 5.000,0 μg/mL) e curvas analíticas foram construídas para cada EMAG. Após as EMAGs as áreas de cada componente das amostras foram inseridas nas curvas analíticas (EMAGs das amostras; EMAGa).

Foi obtida a quantificação absoluta dos EMAGs dos extratos e frações. As injeções foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg/100 g (base seca).

Para os extratos BD-C, BD-D, M-C, M-D, os valores absolutos foram convertidos em porcentagem, para facilitar a comparação entre os extratos e com a literatura.

2.3 COMPOSTOS HIDROFÍLICOS

2.3.1 Extrações de compostos hidrofílicos

Uma amostra de *G. stipitatum* (5 g) foi extraída por maceração com metanol (MeOH) durante 8 dias à temperatura ambiente, na proporção de 1:20 (p/v), sendo o MeOH substituído a cada 2 dias (4 ciclos) obtendo-se o extrato bruto metanólico (EBM). Uma parte do EBM foi suspensa em MeOH:H_2O (1:1, v/v), e sucessivamente particionada com *n*-hexano e diclorometano (DCM) em funil de separação. Os solventes foram removidos sob pressão reduzida a uma temperatura de 35 °C, obtendo as frações hexânica, diclorometânica (DCM) e hidrometanólicas residuais (HM). As frações foram denominadas: extrato bruto metanólico (EBMGAN); fração diclorometano (FDCGAN) e fração hidrometanólica (FHMGAN). Em seguida, os extratos e frações foram liofilizados e armazenados a -80 ºC em ultra freezer.

2.3.2 *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization and quadrupole time-of-flight tandem mass* spectrometry (*UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS*)

As amostras (5 mg/mL) foram ressuspensos em 1,0 mL de metanol (grau HPLC) e 3,0 µL de cada extrato foram injetados e analisados por *UHPLC* acoplado a HRMS (*QTOF*) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. A tensão capilar foi operada no modo de ionização negativa e positiva, definida em 4500 V, e com um potencial de deslocamento da placa final de -500 V. Os parâmetros de gás seco foram definidos em 8 L/min a 200 °C com uma pressão de gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram coletados de *m/z* 50-1300 com uma taxa de aquisição de 5 espectros por segundo, e os íons de interesse foram selecionados por fragmentação de varredura de MS/MS automática. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna C18 (75×2,0 mm d.i.; 1,6 µm). O gradiente da mistura de solventes **A** (H_2O) e **B** (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; V/V) foi a seguinte: 5% **B** 0-1 min, 30% **B** 1-3 min, 95% **B** 3-12 min, mantida a 95% **B** 12-15 min, e 5% **B** 15-17 min, a 40 ° C. Os cromatogramas e os espectros de MS e MS/MS foram comparados com a literatura, identificados por meio de banco de dados de espectrometria de massas, MoNA (*MassBank of North America*), HMDB (*Human Metabolome Database*) e Mass Bank (*MassBank Europe Mass Spectral DataBase*) e a partir do cálculo do erro, utilizando a Equação **2**. O *software* Data Analysis 4.3 (Bruker) foi utilizado para tratamento dos dados.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{MET-MEE}}{\text{MET}} x1.000.000 \qquad \text{Equacão } \mathbf{(2)}$$

Onde: MET é a massa exata teórica, e MEE é a massa exata observada.

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A atividade antileishmania dos extratos BD-C, BD-D, M-C, M-D, EBMGAN e frações LN, GL e FL, FDCGAN, FHMGAN de G. *stipitatum* foram avaliadas.

2.4.1 Cultura de células

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw (IFLA/BR/1967/PH8 transfectadas com pIR1SAT-LUC(a)DsRed2(b) [cepa B5947] gerada como descrito em Rocha et al. (2013)) foram cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração, hemina e ácido fólico; pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado

(SFB) e incubado a 25 °C. Macrófagos J774A.1 foram mantidos em meio RPMI 1640 (pH 7,2), suplementado com L-glutamina e 10% de SFB, e incubados a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2.

2.4.2 Determinação da atividade antiproliferativa de extratos e frações em formas promastigotas de *Leishmania*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitas/mL) em fase de crescimento logarítmico (72 h de cultivo), foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços, na ausência ou presença de extratos diluídos (1,5625 - 200 μg/mL) em dimetil sulfóxido 1% (DMSO), e incubada por 72 h a 25 °C. Em seguida, o ensaio de viabilidade celular foi realizado através da redução de XTT (MESHULAM, 1995). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tetrazólio hidrossolúvel (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide) em uma substância alaranjada, derivada do formazan. Deste modo, após o período de tratamento, adicionou-se a solução de XTT (0,5 mg/mL) aos poços da placa que foi incubada por 4 h. A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro de placas (Power Wave XS – BioTek). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle e as concentrações inibitórias para 50% dos parasitos (CI_{50}) foi obtida por regressão não linear dos valores plotados. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.4.3 Avaliação da atividade de extratos e frações na viabilidade de formas amastigotas de *Leishmania*

Para avaliar a atividade antiproliferativa contra as formas amastigotas, 5×10^5 macrófagos/mL foram adicionados juntamente com 5×10^6/mL promastigotas (proporção 1:10) na fase estacionária de crescimento, em placas brancas de 96 poços. As placas foram incubadas a 34 °C com 5% de CO_2 por 24 h para internalização e diferenciação dos parasitas em formas amastigotas. As células foram então lavadas para remover parasitas não internalizados e tratadas com concentrações crescentes de extratos (1 – 100 μg/mL) e incubadas por mais 48 h. Miltefosina (0,3125 – 5 μg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após este período de incubação, o kit *Pierce Firefly Luc One-Step Glow Assay* foi adicionado de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi quantificada em um luminômetro SpectraMax L (Molecular Devices) com λ em = 570 nm e tempo de integração de 1 s. A porcentagem de

inibição foi calculada com base na luminescência do controle não tratado. Os valores foram plotados e as concentrações de IC_{50} foram calculadas por regressão não linear (MICHEL et al., 2011). Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos J774A.1, utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (MOSSMANN, 1983). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tretazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) hidrossolúvel em uma substância púrpura insolúvel, denominada formazan.

Para isso, células J774A.1 (5 x 10^5 células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, as amostras foram adicionadas em concentrações crescentes de 7,8125 – 1.000 μg/mL e a placa incubada durante 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (pH 7,2) e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL) por 4 h. O sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em espectrofotômetro de placas (Power Wave XS – BioTek). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. Os valores de CC_{50} (concentração citotóxica em 50%) foram determinados por análise de regressão não linear. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

2.5. OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

2.5.1. Extrações

Partindo de 5 g do basidioma seco foi realizada a extração de glucanas sob refluxo na proporção de 1:20 (m/v) com água destilada deionizada em autoclave vertical (Phoenix Luferco, modelo AVS, 75 L, Araraquara, Brasil), a 121 ºC e 1,5 atm (condições padrão de uso) por 20 minutos. Este processo foi repetido mais duas vezes, sendo que a cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente e concentrado em rotaevaporador até pequeno volume. Os materiais obtidos foram reunidos e precipitados com etanol (1:3, v/v). Após centrifugação (3.000 rpm/20 min), o precipitado foi separado, dialisado (MWCO=10 KDa) por 5 dias e liofilizado, resultando na obtenção da fração aquosa (FaqGA).

O resíduo da extração aquosa foi submetido à extração alcalina sob refluxo, com uma solução contendo 4M KOH (hidróxido de potássio) e 0,02M de $NaBH_4$ (Borohidreto de sódio) na proporção de 1:20 (m/v) a 50 °C por 2 horas, três vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso foi filtrado a quente. O material foi reunido, neutralizado com ácido acético glacial, concentrado em rotaevaporador até pequeno volume e precipitado com etanol (1:3, v/v). A amostra foi então centrifugada e o precipitado foi dialisado (MWCO= 10 KDa) por 5 dias e liofilizado, originando a fração alcalina (FalcGA).

2.5.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise por Ressonância Magnética Nuclear, 20 mg das amostras foram dissolvidas em 700 µL de água deuterada (D_2O) 99,9%, colocadas em estufa a 45 °C durante 24 horas para troca do hidrogênio (^1H por ^2D) e em seguida, liofilizadas. O resíduo foi novamente solubilizado em 700 µL de D_2O e encaminhado para análise. Para avaliar os monossacarídeos, 5 mg das frações foram hidrolisadas com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1,0 mol/L a 100 °C por 8 horas. Em seguida, esta mistura foi evaporada até remoção completa do TFA e o resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de D_2O, colocado em estufa a 45 °C durante 24 horas e liofilizada. O material foi novamente dissolvido em 700 µL de D_2O e encaminhado para análise.

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais de ^1H e ^{13}C foram obtidos a 298 K utilizando um espectrômetro Bruker Avance HD III operado a 300,0 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,5 MHz para o núcleo de carbono, utilizando as sequências de pulso padrões que estão disponíveis no software Bruker. Foi solicitado o Mapa de Correlação Heteronuclear do tipo HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). As análises foram realizadas a temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p<0,05$) que foi utilizado para comparar as médias, utilizando o software SISVAR versão 5.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Ganoderma stipitatum apresentou 17,90% de proteína, 0,88% de lipídios, 2,21% de cinzas, e 79,01% de carboidratos, sendo que 42,77% deste percentual corresponde a fibras, e teor enérgetico de 348,3kcal/100 g (Tabela 23). Os resultados apresentados no presente trabalho são os primeiros relatos referentes a composição nutricional para a espécie *G. stipitatum.*

Tabela 23. Composição centesimal de *G. stipitatum*

Referências	**Composição centesimal**					
	Matéria mineral (%)	Proteína Bruta (%)	Lipídio (%)	Fibra bruta (%)	Carboidratos totais (%)	Energia (kcal/100 g)
Experimental	2,21	17,90	0,88	42,77	79,01	348,3
STOJKOVIĆ et al. (2014)	2,80-8,19	9,93-11,34	3,72-4,43	ND	78,16-81,48	385,86 – 410,93
TAOFIQ et al. (2017)	2,4	6,82	2,50	ND	88,4	201

ND: não determinado

No trabalho de Stojković et al. (2014) com *G. lucidum*, os valores da composição centesimal variaram de 9,93-11,34% de proteína, 3,72-4,43% de gordura, 2,80-8,19% de cinzas, 78,16-81,48% de carboidratos, e teor energético de 385,86 a 410,93 kcal/100 g. Já no trabalho com *G. lucidum* de Taofiq et al. (2017), o teor foi de 6,82% de proteína, 2,50% de gordura, 2,4% de cinzas, 88,4% de carboidratos e valor energético de 201 kcal/100 g.

Em relação ao teor de proteínas, segundo Kalač et al. (2013), os cogumelos silvestres apresentam de 13,2 a 62,8 g/100 g. Portanto, o conteúdo de proteína obtido no presente trabalho está dentro da faixa relatada na literatura, além de que, foram superiores aos valores apresentados por Stojković et al. (2015) e Taofiq et al. (2017).

Segundo Chang e Miles (2004), os teores de gordura de cogumelos variam de 1,1 a 8,3 g/100 g. Em nosso estudo, o teor de gordura (0,88%), foi menor em comparação com a literatura, como demonstrado nos trabalhos de Stojković et al. (2015) e Taofiq et al. (2017) (Tabela 24).

Como foi observado no presente trabalho, o conteúdo de carboidratos corresponde a aproximadamente 80% da composição nutricional. Segundo Kalac (2013), os carboidratos constituem cerca de metade do peso seco dos cogumelos, compreendendo vários compostos: açúcares (monossacarídeos, seus derivados e oligossacarídeos) e polissacarídeos de reserva e de construção (glucanos). Paralelo a quantidade de carboidratos, o conteúdo de fibras no cogumelo *G. stipitatum* é alto, correspondendo a 42,77% do conteúdo total de carboidratos.

Os polissacarídeos constituem uma importante porcentagem da biomassa fúngica. A parede da hifa, por exemplo, apresenta mais de 75% desse tipo de molécula. Além de atuarem como elemento de suporte para hifas, alguns polissacarídeos constituem uma capa extracelular

ao redor do micélio (exopolissacarídeos), proporcionando suporte para adesão de enzimas secretadas e participando na degradação da lignina (SILVA et al., 2006). Entre os homopolissacarídeos, as glucanas são as mais comuns em basidiomicetos, podendo ser lineares ou ramificadas, e apresentar diferentes configurações e massas molares (YOUNG et al., 1998). As glucanas de fungos são em sua maioria β-glucanas, com ligações do tipo (1→3), e com ramificações em *O*-6. Alguns cogumelos também apresentam β-glucanas com ligações (1→4) ou glucanas em configuração α, mas em menor quantidade (SMIDERLE, 2012).

3.2 ÁCIDOS GRAXOS

3.2.1 Rendimento

A partir de 5 g do material seco de *G. stipitatum*, calculou-se os rendimentos dos extratos lipídicos. Os rendimentos dos extratos avaliados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Rendimento das extrações lipídicas de *G. stipitatum.*

Extratos	**Rendimento (%)**
BD-C	$3,72 \pm 0,08^{a}$
BD-D	$3,13 \pm 0,13^{b}$
M-C	$2,31 \pm 0,16^{c}$
M-D	$1,77 \pm 0,03^{d}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes, pelo teste Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); BD-C: Bligh e Dyer/clorofórmio; BD-D: Bligh e Dyer/diclorometano; M-C: Maceração/clorofórmio; M-D: Maceração/diclorometano.

O maior rendimento foi para o extrato BD-C, com 3,72%, seguido do BD-D (3,13%), M-C (2,31%) e por fim, M-D (1,77%). Por meio destes resultados, pode-se observar que a extração de lipídios pelo método de Bligh e Dyer foi mais eficiente que a extração por maceração, pois percebe-se um maior rendimento do primeiro em relação ao segundo, quando comparado ao uso de um mesmo solvente (3,72% em relação a 2,31%; e 3,13% em relação a 1,77%). Outra interpretação possível quanto aos resultados foi que, comparando o emprego dos solventes em um mesmo processo extrativo (Bligh e Dyer ou maceração), os rendimentos foram maiores quando utilizado o clorofórmio como solvente extrator.

Comparando todos os resultados, pode-se inferir que entre as duas variáveis analisadas (método extrativo e solvente extrator), o que influencia mais no resultado final é o método utilizado, uma vez que houve maior rendimento entre maceração e Bligh e Dyer se comparado a diferença de porcentagem entre a utilização de diclorometano e clorofórmio. Portanto, conclui-se que o rendimento da extração é maior quando utilizado o método de Bligh e Dyer e clorofórmio como solvente extrativo, sendo que o primeiro gera mais impacto no resultado final.

Os resultados obtidos neste estudo para M-D foram superiores ao encontrado por Ismail, Abdullah e Chong (2014) em sua pesquisa com *Ganoderma boninense*, que apresentou rendimento de 0,50%. De forma semelhante, o rendimento obtido para o extrato BD-C também foi maior em relação ao estudo de Lima (2019), que determinou rendimento de 3,24% para *Ganoderma chalceum.*

Outra pesquisa que empregou o método de extração por Soxhlet com diclorometano, demonstrou rendimento de 2,2% para *Ganoderma lucidum*, valor superior ao alcançado por maceração, mas inferior ao encontrado na metodologia de Bligh e Dyer, indicando boa eficiência do método (KAMRA; BHATT, 2012).

Diversos estudos mostraram que a escolha do método de extração influencia significativamente no resultado final (BRUM, ARRUDA, REGITANO-D´ ARCE, 2009). Os métodos utilizados neste estudo foram maceração e Bligh e Dyer modificado. A maceração é uma das técnicas extrativas mais utilizadas devido à simplicidade e custos reduzidos, sendo realizada em recipiente fechado e em temperatura ambiente. Suas principais desvantagens envolvem longos períodos de extração, necessidade de eliminação do solvente e baixa eficiência (MAZZUTI, 2012).

Já a metodologia de Bligh e Dyer (1959), que originalmente propõe o uso da mistura de solventes clorofórmio-metanol e água, apresenta como principal vantagem a formação de um sistema bifásico durante o processo de extração para remoção dos não-lipídios. No entanto, algumas de suas desvantagens seriam a possibilidade de ocorrer contaminação de não-lipídios na fase orgânica e a toxicidade dos solventes usados (BRUM, ARRUDA, REGITANO-D´ ARCE, 2009).

Outro fator que influencia na extração da fração lipídica é a escolha do solvente, considerando características como volatilidade, pureza, custo, poder de extração, tanto de componentes indesejáveis quanto de diferentes lipídios, e natureza tóxica (BRUM, 2004). Como os lipídios têm uma grande faixa de relativa hidrofobicidade, é praticamente inviável a utilização de um único solvente universal para a extração destes componentes (BRUM, ARRUDA; REGITANO-D´ ARCE, 2009).

3.2.2 Quantificação absoluta (CG/DIC)

3.2.2.1 Análise dos extratos BD-C, BD-D, M-C e M-D.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Ionização de Chama (CG/DIC). Por meio do cálculo de integração a

partir do cromatograma, foi possível determinar a concentração de ácidos graxos nos quatro extratos de *G. stipitatum* (Tabela 25). Os valores encontrados foram convertidos em porcentagem para a discussão e os espectros estão apresentados na Figura S1 (material suplementar).

Tabela 25. Quantificação (%) dos ésteres metílicos de ácidos graxos por CG/DIC dos extratos BD-C, BD-D, M-C e M-D de *G. stipitatum*.

Ácido Graxo	**#**	**BD-C (%)**	**BD-D (%)**	**M-C (%)**	**M-D (%)**
Ácido caprílico (C8:0)	**1**	0,98 ± 0.23^{a}	0,39 ± 0,04^{b}	0,45 ± 0,05^{b}	0,78 ± 0,01^{a}
Ácido láurico (C10:0)	**2**	0,64 ± 0.03^{b}	0,38 ± 0,05^{c}	0,37 ± 0,04^{c}	0,80 ± 0,02^{a}
Ácido tridecanoico (C13:0)	**3**	ND	0,33 ± 0,04^{b}	0,17 ± 0,02^{c}	0,77 ± 0,01^{a}
Ácido miristoleico (C14:1)	**4**	0,36 ± 0,02^{b}	0,34 ± 0,12^{b}	0,19 ± 0,02^{c}	0,84 ± 0,03^{a}
Ácido mirístico (C14:0)	**5**	0,51 ± 0,04^{b}	0,52 ± 0,22^{b}	0,27 ± 0,06^{c}	1,13 ± 0,13^{a}
Ácido pentadecanoico (C15:0)	**6**	4,44 ± 1,13^{a}	3,10 ± 1.15^{a}	4,59 ± 0,18^{a}	2,67 ± 0,63^{a}
Ácido palmitoleico (C16:1)	**7**	0,65 ± 0,10^{b}	0,67 ± 0,46^{b}	0,67 ± 0,04^{b}	1,38 ± 0,19^{a}
Ácido palmítico (C16:0)	**8**	17,71 ± 0,36^{a}	12,98 ± 0,07^{b}	12,23 ± 0,50^{b}	10,80 ± 0,14^{c}
Ácido *cis*-10-heptadecanoico (C17:1)	**9**	0,66 ± 0,10^{b}	0,66 ± 0,16^{b}	0,25 ± 0,17	1,16 ± 0,15^{a}
Ácido heptadecanoico (C17:0)	**10**	1,71 ± 0,36^{a}	1,43 ± 0,13^{a}	0,94 ± 0,53^{a}	2,04 ± 0,43^{a}
Ácido γ-linolênico (C18:3)	**11**	0,43 ± 0,04^{b}	0,36 ± 0,12^{b}	0,27 ± 0,03^{b}	0,88 ± 0,04^{a}
Ácido linoleico (C18:2n6c)	**12**	37,02 ± 1,98^{b}	54,37 ± 0,60^{a}	56,50 ± 1,50^{a}	37,56 ± 0,54^{b}
Ácido oleico (C18:1n9c)	**13**	6,46 ± 0,49^{c}	9,40 ± 0,09^{a}	9,15 ± 0,28^{a}	8,05 ± 0,09^{b}
Ácido elaídico (C18:1n9t)	**14**	7,06 ± 1,14^{a}	3,09 ± 0,03^{b}	6,83 ± 0,17^{a}	2,77 ± 0,01^{c}
Ácido esteárico (C18:0)	**15**	6,34 ± 0,14^{a}	2,13 ± 0,64^{b}	2,61 ± 0,06^{b}	2,86 ± 0,02^{b}
Ácido araquidônico (C20:4n6)	**16**	ND	0,34 ± 0,20^{b}	ND	0,91 ± 0,04^{a}
Ácido *cis*-11,14-eicosenoico (C20:2)	**17**	0,57 ± 0,08^{b}	0,50 ± 0,13^{bc}	0,29 ± 0,03^{c}	0,94 ± 0,06^{a}
Ácido *cis*-11-eicosanoico (C20:1n9)	**18**	0,47 ± 0,01^{c}	0,63 ± 0,02^{b}	0,28 ± 0,01^{d}	0,99 ± 0,04^{a}
Ácido araquídico (C20:0)	**19**	0,56 ± 0,02^{b}	0,53 ± 0,20^{b}	0,25 ± 0,13^{ab}	1,09 ± 0,28^{a}
Ácido heneicosanoico (C21:0)	**20**	0,24 ± 0,09^{c}	0,28 ± 0,18^{b}	0,11 ± 0,02^{d}	0,88 ± 0,05^{a}
Ácido beênico (C22:0)	**21**	1,47 ± 0,15^{b}	1,09 ± 1,09^{bc}	0,63 ± 0,10^{c}	2,47 ± 0,31^{a}
Ácido tricosanoico (C23:0)	**22**	3,76 ± 0,73^{b}	1,49 ± 0,72^{c}	1,50 ± 0,97^{c}	5,83 ± 0,89^{a}
Ácido lignocérico (C24:0)	**23**	5,44 ± 1,86^{b}	3,26 ± 1,81^{c}	1,25 ± 0,23^{d}	11,92 ± 3,13^{a}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes, pelo teste Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n=3); BD-C: Bligh e Dyer/clorofórmio; BD-D: Bligh e Dyer/diclorometano; M-C: Maceração/clorofórmio; M-D: Maceração/diclorometano

Foram encontrados 21 ácidos graxos para o extrato BD-C, 23 para o extrato BC-D, 22 para o M-C, e 23 para o M-D. Quanto a presença de cada ácido graxo nos extratos, houve algumas diferenças: o ácido tridecanoico somente não foi encontrado no extrato BD-C, o ácido araquidônico foi identificado apenas nos extratos BD-D e M-D.

O ácido graxo que foi identificado em maior quantidade em todas as amostras foi o ácido linoleico (37,02 a 56,60%), seguido do ácido palmítico (10,80 a 17,71%), ácido oleico (8,05 a 9,56%), ácido elaídico (3,21 a 7,06%) e ácido esteárico (2,13 a 5,54%). Com relação ao ácido linoleico, o extrato BD-D e M-C foram os que apresentaram os maiores valores, com 54,37% e 56,40%, respectivamente. Os extratos BD-D e M-C, também foram os que apresentaram os maiores valores do ácido oléico, 9,40% e 9,15%, respectivamente. O extrato BD-C foi o que apresentou as maiores porcentagens do ácido palmítico e esteárico, com 17,31% e 6,34%,

respectivamente. Já o extrato MD-D, foi o que apresentou as maiores porcentagens dos ácidos heneicosanoico (0,88%), beênico (2,47%), tricosanoico (5,83%), e lignocérico (11,92%).

De modo semelhante, utilizando a técnica de Bligh e Dyer como método extrativo de lipídios, o ácido linoleico apresentou-se predominante em várias outras espécies de cogumelos, como *Russula delica* (44,32%), *Lactarius deliciosus* (31,78%), *Lactarius sanguifluus* (34,57%) e *Lactarius semisanguifluus* (31,61%) (KALOGEROPOULOS et al., 2013). Além dessas espécies, Mazzutti (2012) também identificou o ácido linoleico e ácido palmítico como os predominantes no cogumelo *Agaricus brasilensis* (cogumelo-do-sol).

Outros estudos envolvendo o cogumelo *G. lucidum* revelaram maiores proporções de ácido oleico, seguido do ácido linoleico e ácido palmítico quando utilizado metodologia de Bligh e Dyer (AL-MAALI, BISKO, OSTAPCHUK, 2016), ou seguido do ácido palmítico e ácido esteárico quanto empregado maceração com n-hexano ou extração sob refluxo com clorofórmio (SALVATORE et al., 2020).

Stojković et al. (2015), também analisando duas cepas do cogumelo *G. ludidum* (Sérvia e China), demonstraram a predominância dos ácidos linoleico, oleico e palmítico. Na espécie da Sérvia, houve predomínio do ácido oleico (47,24%), seguindo do linoleico (33,94) e palmítico (12,1%). Já na espécie da China, predominou o ácido linoleico (39,80%), oleico (24,06%) e palmítico (18,54%). No trabalho de Obadai et al. (2017), analisando 12 espécies do gênero *Ganoderma*, o ácido linoleico (7,48 a 44,27%), oleico (21,78 a 48,76%) e palmítico (14,65 a 26,96%) também foram os predominantes.

A Tabela 26 resume a proporção de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) nas amostras analisadas.

Tabela 26. Porcentagem de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) dos extratos BD-C, BD-D, M-C e M-D por CG/DIC.

	BD-C	**BD-D**	**M-C**	**M-D**
Total AGS	43,03 ± 1,06 [a]	28,63 ± 2,00 [b]	25,37 ± 14,68 [b]	44,03 ± 1,63 [a]
Total AGI	56,99 ± 77,92 [b]	71,67 ± 1,73 [a]	74,44 ± 2,01 [a]	55,48 ± 1,04 [b]
Total AGMI	18,96 ± 3,03 [a]	16,09 ± 1,61 [a]	17,36 ± 17,17 [a]	15,18 ± 0,42 [a]
Total AGPI	38,02 ± 1,06 [b]	55,57 ± 0,16 [a]	57,06 ± 47,72 [a]	40,12 ± 0,66 [b]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes, pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Os dados são média ± desvio padrão de três medições paralelas (n=3); BD-C: Bligh e Dyer/clorofórmio; BD-D: Bligh e Dyer/diclorometano; M-C: Maceração/clorofórmio; M-D: Maceração/diclorometano

Em todos os extratos analisados, a quantidade de AGS (25,37% a 44,03%) foi menor que a quantidade de AGI. O predomínio de AGI é evidente, com valores variando de 55,48% a 74,44%, com destaque para os extratos BD-D e M-C, que apresentaram 71,67% e 74,44%,

respectivamente. Esses dois extratos também apresentaram os maiores valores de AGPI, com 55,57% (BD-D) e 57,06% (M-C).

Segundo Nappi et al. (1999), os ácidos graxos insaturados representam de 74,0 a 83,5% do total de ácidos graxos existentes em cogumelos, demonstrando que os valores encontrados estão de acordo com literatura. Segundo Kalač (2013), os ácidos linoleico, oleico e palmítico são os ácidos graxos mais predominantes encontrados no filo Basidiomycota, com o ácido linoleico e o ácido oleico representando dois terços ou mais da quantidade de ácidos graxos identificados, como foi observado no presente estudo.

Os ácidos graxos insaturados são considerados benéficos e desempenham ação fundamental na alimentação e funções fisiológicas, podendo ser comercializados para aplicações farmacêuticas ou terapêuticas (FAGHERAZZI, DIAS, BORTOLON, 2008; SANTOS et al., 2021).

O ácido linoleico (ômega 6) e ácido oleico (ômega 9) têm sido relacionados com a diminuição do risco de doença cardiovascular, reduzindo os níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e exercendo efeito hipolipidêmico (PAPPIANI, 2016). Além disso, o ácido linoleico é transformado pelo organismo humano no ácido araquidônico e em outros ácidos graxos poli-insaturados, que exercem diversas funções no organismo, como participar da estrutura de membranas celulares, influenciar na viscosidade sanguínea, permeabilidade dos vasos, pressão arterial, funções plaquetárias e reações inflamatórias (EGÍDIO, JUNIOR, MENEZES, 2016).

O ácido elaídico, um ácido graxo insaturado trans, é um isômero geométrico do ácido oleico, sendo este último a sua forma cis. Esse ácido graxo aumenta a atividade da proteína transferente de colesteriléster (CETP), elevando a quantidade de LDL e diminuindo a quantidade de HDL (lipoproteína de alta densidade), o que pode favorecer a ocorrência de problemas cardiovasculares como a aterosclerose (COSTA, 2018).

Já o ácido esteárico é o ácido graxo saturado encontrado em maior quantidade nas amostras. Apesar dos ácidos graxos saturados serem relacionados com o aumento de colesterol total, LDL e triglicerídeos, o ácido esteárico apresenta um comportamento único em relação aos outros da mesma classe, uma vez que possui efeito neutro ou até de redução dos níveis de colesterol. Algumas das teorias que explicam este comportamento é a absorção incompleta ou significantemente diferente de outros ácidos graxos saturados, e de que o ácido esteárico é metabolizado em ácido oléico no corpo humano (COSTA, 2018; FAGHERAZZI, DIAS, BORTOLON, 2008).

O ácido palmítico, um AGS, foi detectado em altas quantidades em todos os extratos. O ácido palmítico é o precursor de uma variedade de ácidos graxos de cadeia longa, como ácido esteárico, ácido palmitoleico (ω7) e ácido oleico (ω9) (MARZZOCO; TORRES, 2015).

3.2.2.2 Análise das classes lipídicas obtidas por cromatografia em coluna

A Tabela 27 resume a composição de ácidos graxos em mg/100 g do extrato bruto lipídico (M-C) e frações [lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL)] do basidiocarpo de *G. stitpatum*. Vinte e três ácidos graxos foram identificados, variando de C8-C24. Os espectros são apresentados na Figura S2 (material suplementar).

O principal ácido graxo no M-C e frações foi o ácido linoléico (C18:2n6c) variando de 246,75 a 331,37 mg/100 g. Os próximos quatro ácidos graxos principais foram o ácido palmítico (C16:0, 55,78-74,06 mg/100 g), ácido oleico (C18:1n9c, 28,14-65,40 mg/100 g), ácido pentadecanóico (C15:0, 19,37-27,30 mg/100 g) e ácido esteárico (C18:0, 6,76-18,63 mg /100 g). Ácido docosahexaenóico (C22:6n3) e ácido α-linolênico (C18:3n3) não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. O ácido γ-linolênico (C18:3n6) foi identificado em todas as amostras, mas também em pequenas quantidades (1,23-4,33 mg/100 g).

Também foi observada a presença de ácidos graxos de número ímpar de carbonos em todas as amostras, como ácido pentadecanóico (C15:0, 19,37-27,66 mg/100 g), ácido heptadecanóico (C17:0, 5,50-7,99 mg/100 g), ácido *cis*-10-heptadecanóico na fração LN (4,67 mg/100 g) e ácido heneicosanóico (C21:0, 0,42-1,42 mg/100 g). Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono ocorrem com menor frequência e sua biossíntese resulta da incorporação de uma unidade inicial diferente do acetato (DEWICK, 2009). Também foi identificada a presença de ácido elaídico (C18:1n9t, 29,79-39,49 mg/100 g). Na fração FL, a quantidade de ácido elaídico (39,49 mg/100 g) foi superior à do ácido oléico (28,14 mg/100 g), o que é um fato interessante, uma vez que a ocorrência de ácidos graxos trans em cogumelos não é comum (KALAČ, 2009).

Tabela 27. Quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos (QA_{EMAG}) do extrato bruto e frações de *G. stipitatum* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra

Ácido graxo	M-C	LN	GL	FL
Ácido caprílico (C8:0)	2,63 ± 0.09^{a}	2,96 ± 0,18^{a}	2,64 ± 0,02^{a}	2,79 ± 0,11^{a}
Ácido cáprico (C10:0)	ND	1,13 ± 0,02^{a}	1,19 ± 0,01^{a}	1,23 ± 0,07^{a}
Ácido láurico (C12:0)	2,19 ± 0,06 ^{bc}	2,41 ± 0,09^{b}	2,87 ± 0,15^{a}	1,99 ± 0,20^{c}
Ácido tridecanóico (C13:0)	0,99 ± 0,05^{a}	1.04 ± 0,03^{a}	1,05 ± 0,02^{a}	ND
Ácido mirístico (C14:0)	1,61 ± 0.14^{b}	2,12 ± 0,11^{a}	2,04 ± 0,14^{ab}	1,35 ± 0,02^{c}
Ácido miristoleico (C14:1)	1,23 ± 0,01^{b}	1,28 ± 0,04^{a}	1,42 ± 0,01^{a}	1,09 ± 0,03^{d}
Ácido pentadecanóico (C15:1-0)	27,30 ± 5,41^{ab}	19,37 ± 1,56^{c}	27,66 ± 2,03 ^{a}	22,68 ± 0,19^{bc}

Ácido palmítico (C16:0)	67,54 ± 5,28^{a}	51,69 ± 0,15^{b}	74,06 ± 5,40^{a}	55,78 ± 0,33^{b}
Ácido palmitoleico (C16:1)	3,97 ± 0,41^{ab}	4,01 ± 0,15^{ab}	4,60 ± 0,55^{a}	3,39 ± 0,09^{b}
Ácido heptadecanóico (C17:0)	6,61 ± 0,49^{b}	5,94 ± 0,38^{b}	7,99 ± 0,51^{a}	5,50 ± 0,02^{b}
Ácido *cis*-10-heptadenóico (C17:1)	ND	4,67 ± 3,38^{b}	ND	ND
Ácido esteárico (C18:0)	13,99 ± 2,78^{b}	18,63 ± 1,26^{a}	18,06 ± 1,14^{a}	6,76 ±0,26^{c}
Ácido oleico (C18:1n9c)	48,65 ± 2,58^{b}	65,40 ± 4,91^{a}	55,65 ± 3,77^{b}	28,14 ± 0,50^{c}
Ácido elaídico (C18:1n9t)	36,47 ± 1,73^{a}	29,79 ± 3,10^{b}	35,73 ± 2,11^{a}	39,49 ± 1,30^{a}
Ácido linoleico (C18:2n6c)	292,79 ± 8,54^{b}	331,37 ± 0,23^{a}	287,16 ± 2,29^{b}	246,75 ± 9,87^{c}
Ácido γ -linolênico (C18:3)	1,61 ± 0,10^{b}	4,33 ± 0,80^{a}	1,59 ± 0,11^{b}	1,25 ± 0,03^{c}
Ácido araquídico (C20:0)	1,44 ± 0.13^{b}	2,15 ± 0,05 ^{a}	ND	ND
Ácido eicosanóico (C20:1n9c)	1,64 ± 0,27^{bc}	2,14 ± 0,05^{a}	1,73 ± 0,26^{bc}	1,03 ± 0,23^{c}
Ácido eicosadienóico (C20:2)	1,73 ± 0,13^{b}	2,58 ± 0,19^{a}	1,44 ± 0,04^{b}	1,00 ± 0,23^{c}
Ácido heneicosanóico (C21:0)	0,63 ± 0.06^{b}	1,31 ± 0,12 ^{a}	1,42 ± 0,30^{a}	0,42 ± 0,09^{a}
Ácido beênico (C22:0)	3,68 ± 0.08^{a}	2,83 ± 0,16^{b}	3,79 ± 0,34^{a}	1,73 ± 0,02^{c}
Ácido tricosanóico (C23:0)	8,31 ± 4,56	14,87 ± 2,92	11,09 ± 7,56	1,32 ± 0,24
Ácido lignocérico (C24:0)	7,30 ± 1,08	3,10 ± 4,64	4,44 ± 3,50	1,50 ± 0,02

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05), pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados são média ± desvio (dp) (n = 3); ND: Não detectado. Extrato bruto lipídico (M-C), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL).

A Tabela 28 resume a proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados nas frações analisadas.

Tabela 28. Proporção de ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados do extrato bruto lipídico (M-C), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) do basidiocarpo de *G. stipitatum* por CG/DIC, resultados apresentados em mg/100 g de amostra.

	M-C	**LN**	**GL**	**FL**
Total AGS	142,29 ± 15,01^{ab}	128,76 ± 15,76^{b}	153,96 ± 14,10^{a}	103,09 ± 0,53^{c}
Total AGI	389,51 ± 14,86^{b}	445,73± 12,85^{a}	389,33 ± 9,14^{b}	322,17 ± 17,23^{c}
Total AGMI	93,37 ± 6,08^{b}	107,30 ± 11,62^{a}	99,12 ± 6,69^{ab}	73,16 ± 3,00^{c}
Total AGPI	296,12 ± 8,77^{b}	338,43 ± 1,22^{a}	290,21 ± 2,44^{b}	249,01 ± 14,23^{c}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05), pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados são média ± desvio padrão (dp) (n = 3); AG: ácidos graxos, AGS: ácidos graxos saturados, AGI: ácidos graxos insaturados, AGMI: ácidos graxos monoinsaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

Os AGI (322–445,73 mg/100 g) predominaram sobre AGS (103,09–153,96 mg/100 g). Dos AGI, foi possível observar que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (249,01–338,43 mg/100g) predominaram sobre os AGS e AGMI. A concentração de AGMI foi a mais baixa no M-C e em todas as frações (73,16–107,30 mg/100 g).

Os resultados obtidos concordam com as observações de utros autores de que os AGI predominam sobre os AGS nos cogumelos, especialmente o ácido linoléico (BERTÉLI et al., 2021; HELENO et al., 2015; KALAČ, 2013). A predominância de AGI, especialmente AGPI, é particularmente boa, uma vez que os AGS estão associados a distúrbios cardiovasculares, enquanto uma alta ingestão de AGPI e AGMI está relacionada ao tratamento e prevenção desses distúrbios, bem como aqueles relacionados ao metabolismo da glicose e lipídios (SILVA FIGUEIREDO et al., 2017).

3.2.2.3 Atividade antileishmania dos extratos lipídicos e frações.

As atividades antileishmania *in vitro* dos extratos Bligh e Dyer/clorofórmio (BD-C), Bligh e Dyer/diclorometano (BD-D), Maceração/clorofórmio (M-C), maceração/diclorometano (M-D), lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) estão resumidas na Tabela 29. Todos os extratos e frações, com exceção da fração FL, foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas. Foi possível observar que todas as amostras foram mais ativas contra amastigotas do que promastigotas. A fração LN foi a que apresentou a maior atividade contra *L. amazonensis* na forma promastigota (69,86 µg/mL), enquanto que na forma amastigota, a maior atividade foi observada pelo BD-D (21,48 µg/mL)

Considerando somente os extratos, o que apresentou menor valor para ambas as formas parasitárias, ou seja, que obteve maior atividade contra o protozoário *L. amazonensis*, foi o BD-C, com 82,10 µg/mL para promastigota e 21,48 µg/mL para amastigota.

A citotoxicidade das amostras foi avaliada contra macrófagos J774A.1 (Tabela 29).

Tabela 29. Atividade antiproliferativa dos extratos e frações lipídicas de *G. stipitatum* contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1.

Amostras	J774A.1	*L. amazonensis*			
		Promastigotas		Amastigotas	
	CC_{50} (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)	IS	IC_{50} (µg/mL)	IS
BD-C	76,71 ± 8,96	82,10 ± 8,02	0,93	21,48 ± 2,29	3,57
BD-D	71,14 ± 7,13	153,61 ± 9,18	0,46	39,71 ± 2,39	1,79
M-C	117,52±13,69	176,73 ± 3,16	0,66	40,81 ± 4,93	2,88
M-D	129,40±14,15	187,85 ± 7,64	0.69	49,78 ± 3,55	2,70
LN	57,60 ± 9,22	69,86 ± 2,51	0,82	40,45 ± 2,23	1,42
GL	56,43 ± 7,55	129,73 ± 2,73	0,43	31,27 ± 1,25	1,80
FL	410,51 ± 32,44	>200	ND	>100	ND
Miltefosina	26.06 ± 4.43	9.63 ± 0,22	2.71	0.78 ± 0,04	33,41

Cada valor representa a média ± desvio padrão para três experimentos realizados em duplicata. LN: lipídios neutros, GL: glicolipídios, FL: fosfolipídios, BD-C: Bligh e Dyer/clorofórmio; BD-D: Bligh e Dyer/diclorometano; M-C: Maceração/clorofórmio; M-D: Maceração/diclorometano; IC_{50}: concentração inibitória para 50% dos parasitas, CC_{50}: concentração citotóxica para 50% das células, IS: índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50}); ND: não determinado.

Em relação ao CC_{50} dos extratos e frações para os macrófagos da linhagem J774A.1, quanto maior seu valor, menos citotóxico o extrato será para a célula. Deste modo, a fração FL foi a apresentou melhor resultado, com 410,51 µg/mL. No entanto, está fração não apresentou atividade contra as formas de *L. amazonensis.* Cabe destacar que, todas as amostras foram menos citotóxicas que o antileishmania miltefosina.

Os resultados da IC_{50} para promastigotas aproximam-se do encontrado na literatura, de 160 µg/mL contra promastigotas de *Leishmania major* quando testado extrato obtido da maceração com metanol de *Pleurotus ostreatus* (RAMEZANI et al., 2017). Outro estudo obteve IC_{50} para esta mesma forma parasitária de 100 µg/mL de extratos polissacarídicos de

Termitomyces eurhizus, 86,9 μg/mL de *Russula laurocerasi* e 93,9 μg/mL do extrato etanólico de *Grifola frondosa* (KOKO et al., 2021).

A atividade antileishmania dos extratos pode estar associada à presença do ácido linoleico, presente em maior quantidade em todas as amostras, bem como a alta quantidade de AGPI (Tabela 30) Sabe-se que os AGPI são um dos principais constituintes da membrana glicolipídica das células e que a deficiência destas substâncias, afetam o funcionamento de células de defesa, prejudicando a interação célula-célula por modificar a adesão celular, induzir fraca sinapse e comprometer a apresentação de antígeno às células T (SAINI; RAI, 2020).

Além disso, em nosso corpo, o ácido linoleico é precursor de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e do ácido araquidônico, que por sua vez, dá origem a várias moléculas bioativas, como prostaglandinas e leucotrienos, importantes para a resposta imune contra o parasita (SAINI; RAI, 2020; SILVA, 2016). O estudo de Saini e Rai (2020) realizado com *Leishmania donovani* com o objetivo de determinar o efeito do ácido linoleico sobre o parasita demonstrou a capacidade preventiva e terapêutica deste ácido graxo frente a infecção. Sua atividade se dá por duas explicações: inibição da liberação de microvesículas derivadas de *L. dovani* (LdMv) da forma promastigota, que exercem efeito imunossupressor por meio da resposta Th-2; e estimulação da resposta pró-inflamatória dentro do macrófago pela via da 5-lipoxigenase, possibilitando a eliminação do parasita intracelular.

Uma forma de associar os valores de atividade antileishmania e citotóxica para macrófagos é utilizando o índice de seletividade (IS), que pode ser definido como a razão entre CC_{50} e IC_{50}, indicando quantas vezes uma substância é mais seletiva para o parasito do que para a célula humana (LIMA, 2020). Idealmente, o composto deve apresentar IS maior que 1, ou seja, baixo IC_{50} (alta eficácia contra o parasito) e alto CC_{50} (baixa toxicidade celular) (BRAZ, 2021).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 29, quando avaliado a atividade dos extratos contra a forma amastigota do parasito, os valores de IS são satisfatórios e promissores, de 1,79 e 3,576 para BD-D e BD-C, respectivamente. No entanto, para a forma promastigota do parasito, nenhum dos extratos analisados apresentou IS acima de 1, mostrando-se mais seletivo para as células humanas do que em relação ao parasito. Já em relação as frações, a que apresentou melhor índice de seletividade foi a fração GL contra a forma amastigota, com IS 1,80, e contra a forma promastigota, a fração LN.

Uma possibilidade para aumentar o IS, diminuindo a toxicidade do composto e o mantendo estável, é a proteção dos ácidos graxos poli-insaturados, que são suscetíveis à oxidação durante o armazenamento e processamento. Esta proteção pode ser feita modificando

sua apresentação para um lipossoma e consequentemente aumentando sua eficácia, pois acarreta na melhora da biodisponibilidade, propriedades farmacocinéticas e diminui a toxicidade e reações adversas (SOUZA, 2014; BRAZ, 2021).

3.3 Identificação dos compostos por *UPLC-ESI-QTOF-MS/MS*

A investigação química dos extratos de *G. stipitatum* resultou na identificação putativa de 25 compostos. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução e a identificação desses compostos foi proposta após uma revisão do gênero *Ganoderma* e da família Ganodermataceae (BISWAL et al., 2022; PAN et al., 2015; TEL-ÇAYAN et al., 2015; ZENGIN et al., 2015), além do valor do erro de massa (ppm). Os compostos identificados são apresentados na Tabela 30 e os dados das análises (erro, fragmentos e referências) dos compostos são apresentados na Tabela S1 (material suplementar).

A análise cromatográfica dos extratos possibilitou a caracterização de três ácidos graxos, quatro aminoácidos, oito compostos fenólicos e treze triterpenos (Tabela 31). Os compostos identificados foram: serina (**24**), ácido fumárico (**25**), ácido benzóico (**26**), ácido *p*-hidroxibenzóico (**27**), ácido 3,4-di-hidroxi-2-metoxibutanóico (**28**), ácido protocatecuico (**29**), ácido *p*-cumarico (**30**), galato de metila (**31**), ácido azelaico (**32**), ácido ganodérico DM (**33**), ácido 11α-hidroxi-3,7-dioxo-5α-lanosta-8,24(E)-dien-26-óico (**34**), ácido 3β,15α,22β-trihidroxilanosta-7,9(11),24-trien-26-óico (**35**), ácido ganolucídico D (**36**), ácido 3β,7β-diidroxi-11,15,23-trioxo-lanost-8,16-dien-26-óico (**37**), ácido ganodérico D (**38**), ácido ganodérico A (**39**), ácido ganoderênico C (**40**), ácido ganolucídico C (**41**), ácido ganodérico M (**42**), ácido ganodérico N (**43**), ácido ganodérico η (**44**), ácido ganodérico K (**45**), feniletilamina (**46**), ácido málico (**47**), tirosina (**48**), sebacato de dimetila (**49**) e ácido 13-hidroxioctadecadienóico (**50**).

O extrato que demonstrou a maior variedade de compostos foi a fração hidrometanólica (FHMGAN) com 25 compostos identificados, seguido do extrato bruto metanólico (EBGAN) e fração diclorometânica (FDCGAN) com 16 e 14 compostos, respectivamente. Destacando os compostos triterpenos identificados apenas no extrato HMGAN (compostos **34**, **38**, **39, 40, 41, 42, 43, 44** e **45**) e EBGAN (composto **35**).

Tabela 30. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* em extratos e frações de *G. stipitatum.*

Compostos	#	FM	MM (*m/z*)	Amostra			Classe
				FDCGAN	EBGAN	FHMGAN	
Modo negativo (-)							
Serina	**24**	$C_3H_7NO_3$	105,0425		✓	✓	Aminoácido
Ácido fumárico	**25**	$C_4H_40_4$	116,0109		✓	✓	Composto fenólico
Ácido benzóico	**26**	$C_7H_6O_2$	122,0367	✓	✓	✓	Composto fenólico
Ácido *p*-hidroxibenzóico	**27**	$C_7H_6O_3$	138,0316	✓	✓	✓	Composto fenólico
Ácido 3,4-di-hidroxi-2-metoxibutanóico	**28**	$C_5H_{10}O_5$	150,0528	✓	✓	✓	Ácido graxo
Ácido protocatecuico	**29**	$C_7H_6O_4$	154,0266	✓		✓	Composto fenólico
Ácido *p*-cumarico	**30**	$C_9H_8O_3$	164,0473	✓		✓	Composto fenólico
Galato de metila	**31**	$C_8H_8O_5$	184,0371	✓	✓	✓	Composto fenólico
Ácido azelaico	**32**	$C_9H_{16}O_4$	188,1048	✓	✓	✓	Composto fenólico
Ácido ganodérico DM	**33**	$C_{30}H_{44}O_4$	468,3234	✓	✓	✓	Triterpeno
Ácido 11α-hidroxi-3,7-dioxo-5α-lanosta-8,24(E)-dien-26-óico	**34**	$C_{30}H_{44}O_5$	484,3183			✓	Triterpeno
Ácido 3β,15α,22β-trihidroxilanosta-7,9(11),24-trien-26-óico	**35**	$C_{30}H_{46}O_5$	486,3339		✓		Triterpeno
Ácido ganolucídico D	**36**	$C_{30}H_{44}O_6$	500,3132	✓	✓		Triterpeno
Ácido 3β,7β-diidroxi-11,15,23-trioxo-lanost-8,16-dien-26-óico	**37**	$C_{30}H_{42}O_7$	514,2925		✓	✓	Triterpeno
Ácido ganodérico D	**38**	$C_{30}H_{42}O7$	514,2925			✓	Triterpeno
Ácido ganodérico A	**39**	$C_{30}H_{44}O_7$	516,3081			✓	Triterpeno
Ácido ganoderênico C	**40**	$C_{30}H_{44}O_7$	516,3081			✓	Triterpeno
Ácido ganolucídico C	**41**	$C_{30}H_{44}O_7$	518,3238			✓	Triterpeno
Ácido ganodérico M	**42**	$C_{30}H_{42}O_8$	530,2874			✓	Triterpeno
Ácido ganodérico N	**43**	$C_{30}H_{42}O_8$	530,2874			✓	Triterpeno
Ácido ganodérico η	**44**	$C_{30}H_{44}O_8$	532,3030			✓	Triterpeno
Ácido ganodérico K	**45**	$C_{30}H_{46}O_9$	574,3136			✓	Triterpeno
Modo positivo (+)							
Feniletilamina	**46**	$C_8H_{11}N$	121,0891	✓	✓	✓	Aminoácido
Ácido málico	**47**	$C_4H_6O_5$	134,0215	✓	✓	✓	Composto fenólico
Tirosina	**48**	$C_9H_{11}NO_3$	181,0738	✓	✓	✓	Aminoácido
Sebacato de dimetila	**49**	$C_{12}H_{22}O_4$	230,1518	✓	✓	✓	Ácidos graxo
Ácido 13-hidroxioctadecadienóico	**50**	$C_{18}H_{32}O_3$	296,2351	✓	✓	✓	Ácidos graxo
Número total de compostos				14	16	25/	

FM: Formula molecular; MM: Massa molecular; Extrato bruto metanólico (**EBMGAN**); Fração diclorometano (**FDCGAN**) e Fração hidrometanólica (**FHMGAN**).

O ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido benzóico também foram encontrados nas espécies *Ganoderma applanatum e Ganoderma resinaceum* (ZENGIN et al., 2015). Stojković et al. (2015), encontraram em *G. lucidum* os ácidos málico, fumárico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico. Já Obodai et al. (2017), analisaram 12 espécies do gênero *Ganoderma* e observaram a presença dos ácidos málico, fumárico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico, demonstrando que esses ácidos são característicos do gênero *Ganoderma.*

A presença de diversos compostos triterpênicos nas frações analisadas é muito relevante, pois esses compostos têm aplicações na medicina e na alimentação. Sułkowska-Ziaja et al. (2023), demonstraram que os compostos triterpênicos de *Ganoderma* spp., apresentam atividade anticâncer, neuroprotetiva, anti-inflamatória e imunomoduladora.

Segundo Sanodiya et al. (2009), o ácido ganodérico A (**39**) é capaz de suprimir a liberação de histamina e aumentar o funcionamento dos órgãos digestivos em humanos. Chen et al. (2017) demonstrou que esse triterpeno diminui a gordura no sangue, reduz a pressão arterial e regula as funções hepáticas. Já o ácido ganodérico D (**38**) apresenta efeitos antiproliferativos (LIANG et al., 2019) e citotóxicos contra linhagens de câncer de cólon (LIU et al., 2010).

3.3.1 Atividade antileishmania dos extratos hidrofílicos

As atividades antileishmania *in vitro* do extrato bruto metanólico (EBMGAN), fração diclorometano (FDCGAN) e fração hidrometanólica (FHMGAN), estão resumidas na Tabela 31. Somente a FDCGAN foi capaz de inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas, pois o EBMGAN inibiu o crescimento somente da forma amastigota. Foi possível observar que as amostras foram ativas contra amastigotas do que promastigotas. A fração FDCGAN foi a única que apresentou atividade contra *L. amazonensis* na forma promastigota (85,79 μg/mL), e também a mais ativa contra a forma amastigota (47,67 μg/mL).

Tabela 31. Atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico e frações de *G. stipitatum* contra o protozoário parasita *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1.

Amostras	**J774A.1**	***L. amazonensis***			
		Promastigotas		**Amastigotas**	
	CC_{50} (μg/mL)	**IC_{50} (μg/mL)**	**IS**	**IC_{50} (μg/mL)**	**IS**
EBMGAN	117,55 ± 16,28	>200	ND	88,20 ± 0,86	1,33
FDCGAN	132,03 ± 3,28	85,79 ± 8,63	1,54	47,67 ± 4,71	2,77
FHMGAN	751,45 ± 13,84	>200	ND	>100	ND
Miltefosina	26.06 ± 4.43	9.63 ± 0,22	2.71	0.78 ± 0,04	33,41

Cada valor representa a média ± desvio padrão para três experimentos realizados em duplicata. EBM: Extrato Bruto Metanólico *Ganoderma*; FDCGAN: Fração Diclorometano *Ganoderma*; FHM: Fração Hidrometanólica *Ganoderma;* IC_{50}: concentração inibitória para 50% dos parasitas, CC_{50}: concentração citotóxica para 50% das células; IS: índice de seletividade (CC_{50}/IC_{50}); ND: não determinado

Em relação ao CC_{50} para os macrófagos da linhagem J774A.1, a FHMGAN foi a apresentou menor citotoxicidade com CC_{50} = 751,45,51 μg/mL. No entanto, está fração não apresentou atividade contra as formas de *L. amazonensis.*

Uma forma de associar os valores de atividade antileishmania e citotóxica para macrófagos é utilizando o IS. Idealmente, o composto deve apresentar IS maior que 1, ou seja, baixo IC_{50} (alta eficácia contra o parasito) e alto CC_{50} (baixa toxicidade celular) (BRAZ, 2021).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 31, quando avaliado a atividade dos extratos contra a forma amastigota do parasito, os valores de IS foram 3,77 e 1,33 para a FDCGAN e o EBMGAN, respectivamente. Para a forma promastigota do parasito, somente a FDCGAN apresentou IS acima de 1, mostrando-se mais seletivo para o parasito em relação ao células humanas.

Antwi et al. (2018), demonstraram a atividade de compostos fenólicos contra *Leishmania donovani*. Dentre os compostos identificados, foi observado a presença dos ácidos protocatecuico e *p*-cumárico, que também foram encontrados no presente trabalho. Esses compostos apresentaram atividade contra a forma promastigota da *Leishmania donovani.* O ácido protocatecuico e o *p*-cumárico apresentaram IC_{50} de 72.54 e 76,09 μM, com IS de 7,04 e 4,24, respectivamente.

3.4 POLISSACARÍDEOS

3.4.1 Obtenção

A partir de 5g do material seco de *G. stipitatum*, calculou-se os rendimentos das frações oriundas da extração aquosa e alcalina. Os resultados estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Rendimento das frações aquosas e alcalinas de *Ganoderma stipitatum*

Fração	Rendimento		Figura
	Peso (mg)	Porcentagem (%, p/p)	
Sobrenanante aquoso (FaqGA – SP)	600,5	12,09	29**A**
Fração precipada aquosa após a diálise (FaqGA)	186,5	3,73	29**B**
Fração precipada alcalina após a diálise (FalcGA	781,3	15,73	29**C**

p/p: peso por peso.

O maior rendimento dentre todas as frações foi para o precipitado alcalino após diálise (FalcGA), com rendimento bruto de 781,3 mg (15,73%) (Figura 29**C**). Em seguida, destacam-

se o sobrenadante aquoso (FaqGA-SP) (Figura 29**A**), com rendimento de 12,09%, e a fração precipitada aquosa após a diálise, com 3,73% (Figura 29**B**).

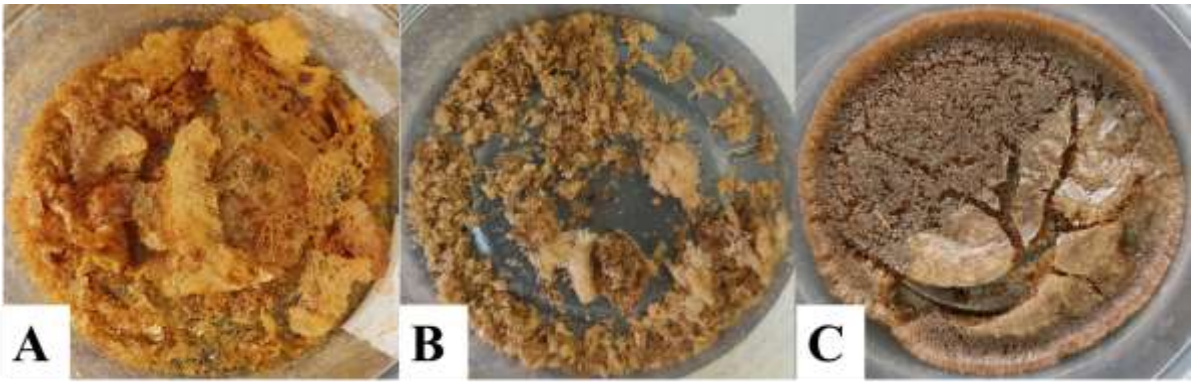


Figura 29. Frações aquosas obtidas a partir de *G. stipitatum*. Fração sobrenadante aquosa – FaqGA-SP **(A)**, fração precipitada aquosa após diálise – FaqGA **(B)**, fração precipitada alcalina após a diálise – FalcGA **(C)**. Fonte: O autor, 2020.

Os polissacarídeos são macromoléculas polares. A seleção do método de extração ideal depende da estrutura da parede celular. Os polissacarídeos extraídos podem ser purificados usando uma combinação de técnicas, como a precipitação com etanol. Devido às estruturas abrangentes e a uma variedade de atividades biológicas dos polissacarídeos, mais pesquisas são necessárias para explorar métodos comerciais eficazes de extração e purificação para obter amostras suficientes de polissacarídeos para pesquisa (GONG et al., 2020). O princípio básico é quebrar a parede celular da camada externa para a camada interna sob condições de extração suaves a fortes (pH e temperatura) (ZHANG et al., 2007).

A extração com água quente é a metodologia mais comum para extração de polissacarídeos de *Ganoderma*, onde a alta temperatura é necessária para acelerar a dissolução de polissacarídeos das paredes celulares (NIE et al., 2013; SHI et al., 2016). A extração aquosa juntamente com o método de precipitação com álcool é o método tradicional mais frequente e tem as vantagens de ser simples de operar e de baixos requisitos de equipamento. Este método não requer reagentes especiais e permite obter uma fração de polissacarídeo solúvel em água mais adequada para uso. No entanto, embora o método de extração tradicional seja fácil de realizar, requer um longo tempo de extração, grandes volumes de solventes e temperaturas elevadas (WU et al., 2019; GONG et al., 2020).

Como demonstrado, o processo de extração de polissacarídeos de cogumelos é tradicionalmente realizado utilizando água quente, e comumente é realizado por refluxo ou por soxhlet (RUTHES; SMIDERLE; IACOMINI, 2016). No entanto, possui um ciclo operacional longo, pois comumente a extração é realizada por 2-3h à 100 ºC, repetindo-se diversas vezes

para aumentar a eficência da extração (LIU et al., 2014). Estudos anteriores descrevem o uso de água quente (70–100 °C) em uma proporção amostra:líquido (1:10–1:40 g/L) por 1–4 h, e a extração é repetida até a exaustão (CAI et al., 2021; GAO et al., 2021; SONG et al., 2015; TIAN et al., 2022). Bheha et al. (2022), por exemplo, realizaram a extração por refluxo por 8 h à 100 ºC, logo, o ciclo exige uma extensa carga de trabalho. Uma alternativa possível é a extração hidrotérmica, levando a redução do tempo de extração para apenas 20 min (MARIANO et al., 2023).

Diferente dos métodos convencionais de extração aquosa a quente, que utilizam o refluxo, os polissacarídeos do basidiocarpo do cogumelo *G. stipitatum* foram obtidos a partir da extração aquosa a quente em autoclave, seguido da extração alcalina utilizando hidróxido de potássio. No entanto, a extração alcalina foi realizada pelo método tradicional sob refluxo.

No presente trabalho, os rendimentos da extração aquosa a quente em autoclave (3,73%) seguida da alcalina (15,73%) foram superiores aos relatados anteriormente para polissacarídeos de *G. resinaceum*, que após a extração aquosa a quente por refluxo, o rendimento foi de 2,33 % e, na alcalina, 10,57% (BLEHA et al., 2022). Também foi superior aos rendimentos relatados anteriormente para a extração aquosa de polissacarídeos de *G. lucidum* (1,45%) (WANG et al., 2011) e por extração alcalina (8,30%) (HUANG et al., 2010). Cabe destacar que, no trabalho de Bleha et al. (2022), a extração sob refluxo foi realizada por 8 h, e mesmo assim apresentou um rendimento menor comparado ao presente trabalho. Em contrapartida, a extração em autoclave foi realizada em apenas 20 min, reduzindo drasticamente o tempo de extração e demonstrando o potencial desta técnica para extração de polissacarídeos de cogumelos.

A extração hidrotérmica de polissacarídeos de materiais vegetais, como ocorre em autoclave, é uma metodologia promissora, não convencional e emergente, que pode constituir uma alternativa potencial aos métodos convencionais ou mesmo ser combinada com outros métodos para obter um efeito sinérgico, reduzindo assim o tempo de extração, gasto de energia, bem como consumo de solventes e evitar o uso de solventes tóxicos (CHEMAT; KHAN, 2011; ABREU et al., 2021).

Mariano et al. (2023), utilizaram a extração por autoclave para extração de inulina a partir das raízes de *Stevia rebaudiana*, comparando com o método convencional de extração que é realizado por refluxo à quente. No trabalho em questão, foi demonstrado que a extração em autoclave foi mais eficiente para a extração de inulina quando comparada ao processo convencional. Isto provavelmente ocorre porque este procedimento utiliza uma combinação de água pressurizada com alta temperatura (121 °C). O aquecimento até o ponto de ebulição geralmente permite a separação de heteropolissacarídeos e alguns glucanos das paredes

celulares dos fungos, muitas vezes misturados com proteínas e glicoproteínas (BAEVA et al., 2019). Essas condições foram alcançadas em autoclave de laboratório, o que efetivamente causa maior desintegração da parede celular vegetal e consequentemente um melhor desempenho de extração.

Além da água, soluções ácidas, salinas e alcalinas diluídas também são usadas para extrair os polissacarídeos com o intuito de quebrar as paredes celulares da camada externa para a interna em condições leves a fortes (NIE et al., 2013), e como já demonstrado, no presente trabalho os rendimentos da extração alcalina foi superior aos obtidos para outras espécies do mesmo gênero.

3.4.2 Análise dos polissacarídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Inicialmente as análises realizadas foram a determinação da composição monossacarídica das frações aquosa e da fração alcalina. A fração sobrenadante aquosa não foi analisada.

A partir da análise por RMN da região anomérica (6-4 ppm) após hidrólise da amostra, foi possível estimar as suas composições monossacarídicas. A análise e comparação dos deslocamentos químicos dos monossacarídeos foi realizada de acordo com Sassaki et al. (2014). A porcentagem a partir da integração relativa dos hidrogênios anoméricos foi calculada para determinar as proporções de cada monossacarídeo presente na amostra. Para a fração alcalina (Figura 30), os valores de integração obtidos foram 1,00 (α-Glc), 0,51 (β-Glc), 0,48 (α-Xil) e 0,80 (β-Xil), obtendo-se um valor total de integração de 2,79, correspondente a 100%. A partir deste valor, a proporcionalidade entre as integrais foi definida. A análise da composição mostrou que o açúcar predominante é a glicose, correspondendo a 54,11% (α e β), seguido da xilose (45,89%; α e β).

Em relação a composição monossacarídica da fração aquosa (Figura 31), baseado nos valores de integração, foi observado que o açúcar predominante é a glicose (79,39%; α e β), seguindo de ramnose (9,32%; α) e fucose (11,29%; α).

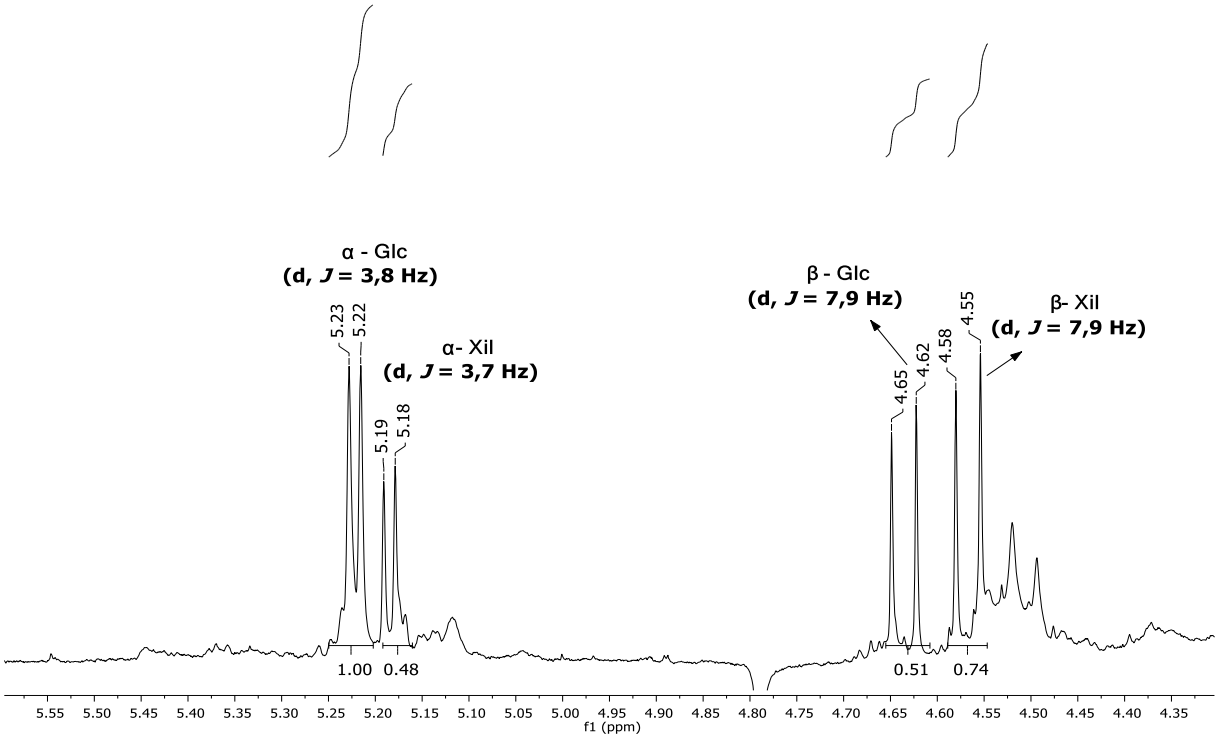


Figura 30. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica da fração alcalina após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica

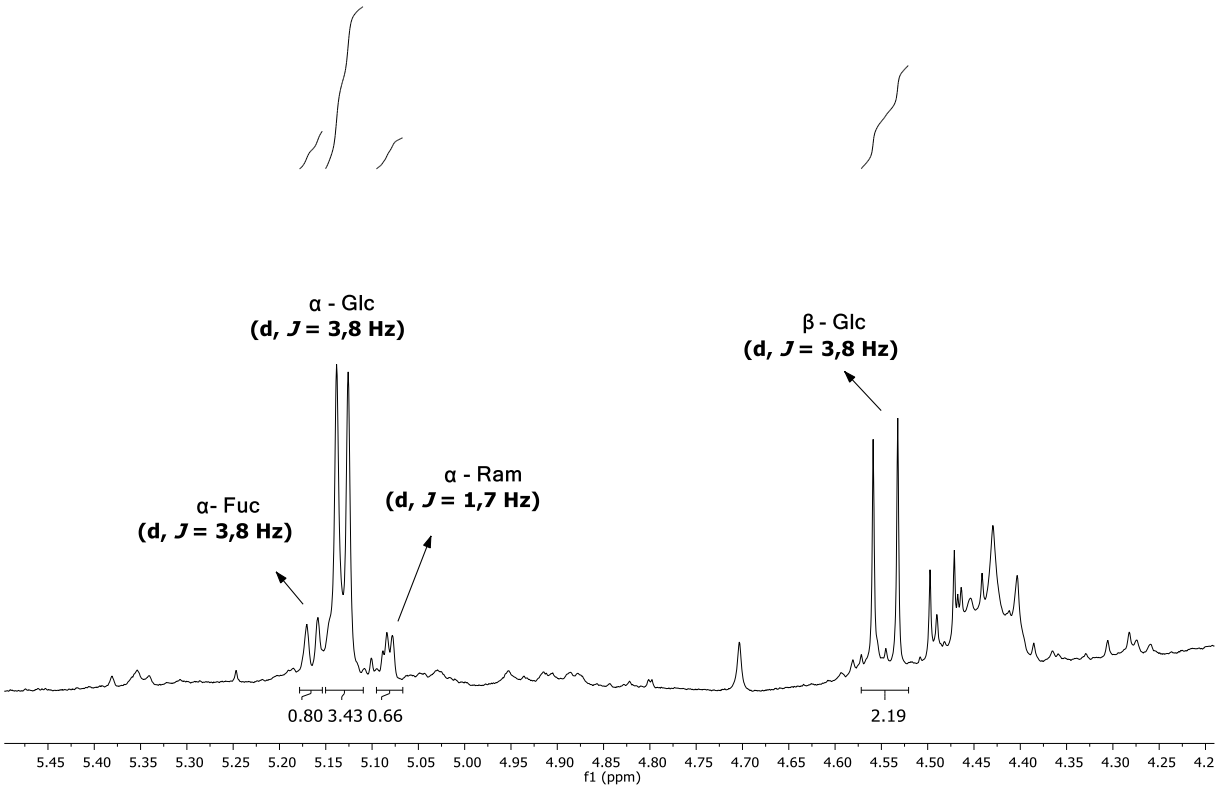


Figura 31. Espectro de RMN ^{1}H da região anomérica da fração aquosa após hidrólise utilizado na determinação da composição monossacarídica.

A presença de glicose como principal monossacarídeo presente nas frações analisadas, sugere que os polissacarídeos são glucanas, sobretudo na fração aquosa, em que a porcentagem de glicose é quase 80%. No entanto, o alto percentual de xilose na fração alcalina, pode ser um indicativo da presença de xilana, ou de unidades de xilose ligadas à cadeia principal.

Chen et al. (2014), estudaram a composição da parede celular do cogumelo *Pleurotus tuber-regium*, e demonstraram que a parede celular deste cogumelo é composta por uma fração solúvel em água, uma fração solúvel em solução alcalina e uma fração insolúvel em solução alcalina. A fração sóluvel alcalina é caracterizada como sendo β-glucanos na parede celular de leveduras e fungos filamentosos, que é composta principalmente por uma cadeia principal β-1,3 longa ou cadeias laterais curtas ligadas a β-1,6, exatamente como foi observado no presente trabalho e será apresentado posteriormente. No entanto, muito mais resíduos β-1,4 foram encontrados nas frações solúveis em solução alcalina da parede celular no corpo de frutificação do *P. tuber-regium.* Os monossacarídeos manose, galactose e xilose foram encontrados nos polissacarídeos da parede celular solúveis em solução alcalina no corpo de frutificação do cogumelo estudado. Todavia, como será demonstrando, os sinais analisados por RMN são característicos e indicativos da presença de β-glucanas do tipo 1,3.

Homoglucanas são biopolímeros lineares ou ramificados com uma estrutura composta por unidades de glicose ligadas α ou β (como (1-3), (1-6)-β-glucanos e (1-3)-α-glucanos) e podem conter cadeias laterais ligadas em diferentes posições. Entre os homoglucanos, os β glucanos (componentes primários das paredes celulares dos fungos superiores) são polímeros de glicose que podem existir como uma estrutura não ramificada (1-3)-β-ligada ou como estrututa linear β-1,3 com ramificação β-1,6 (MORADALI et al., 2007; FERREIRA et al., 2010). Em geral, D-glucanos lineares e ramificados de configurações α e β, e mistas α, β anoméricas são muito comuns em fungos, incluindo no gênero *Ganoderma* (GOW et al., 2017.

Os sinais espectro de RMN de ^{1}H da fração alcalina de *G. stipitatum* H1-H6 apareceram em 4,78-3,34 ppm (Figura 32) e seu espectro de ^{13}C (Figura 33) mostrou picos característicos de uma β-1,3-glucana a 103,4 (C-1), 73,9 (C-2), 84,9 (C-3), 69,5 (C-4), 76,4 (C-5) e 61,5 (C-6) ppms, respectivamente. Esses sinais estão em concordância com resultados descritos na literatura para β-glucanas de *G. lucidum* (KIM et al., 2000; MANDAL et al., 2010; KAO et al., 2012). No trabalho de Mandal et al. (2010), uma β-glucana também foi obtida a partir de um extrato alcalino.

Outras β-glucanas também foram obtidas a partir de extração alcalina do cogumelo *G. lucidum*. Wang et al. (2014), obtiveram uma β-glucana (1→3) com ramificações nos carbonos

C-6 e C-2. Wang e Zhang (2009) e Han et al. (2008), também encontraram uma β-1,3-glucana a partir da extração alcalina dos corpos de frutificação de *G. lucidum.*

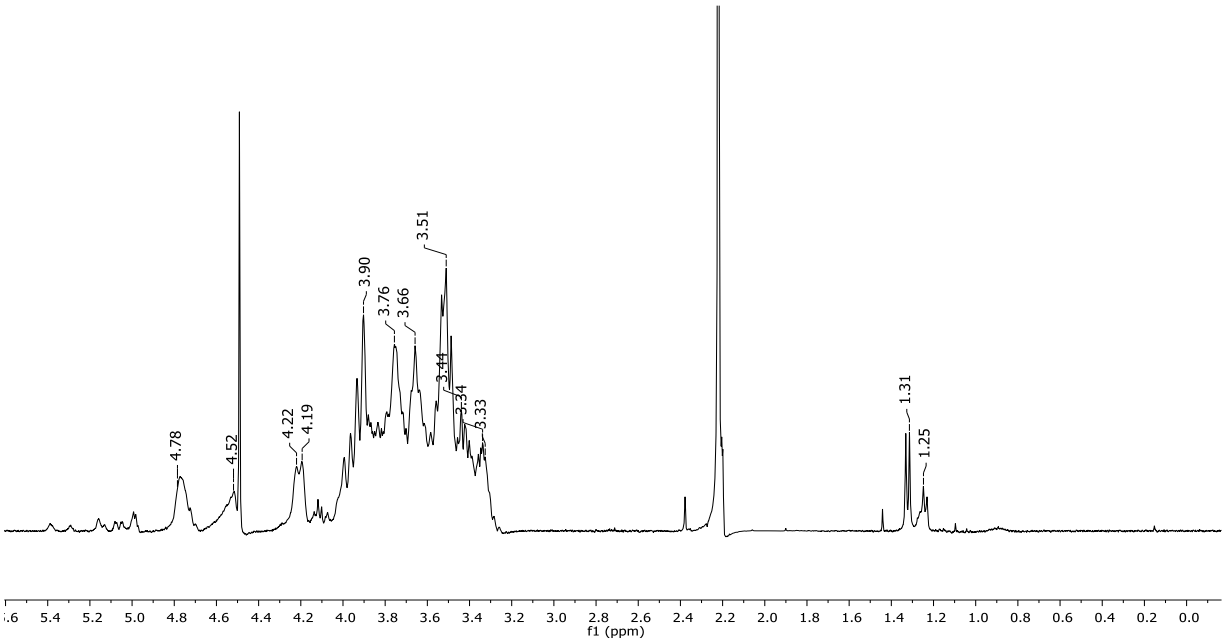


Figura 32. Espectro de RMN ^{1}H da fração alcalina de *G. stipitatum*

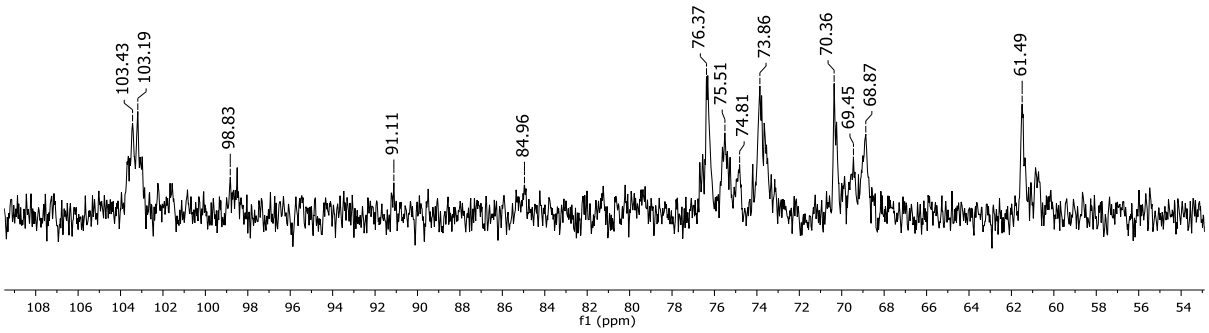


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C da fração alcalina de *G. stipitatum*

Como mostrado no espectro de RMN de ^{13}C, os sinais de uma β-1,6-glucana apareceram em 103,2 (C-1), 73,9 (C-2), 76,3 (C-3), 70,2 (C-4), 75,3 (C-5), e 69,5 (C-6) ppm e os prótons diagnósticos de H1 em 4,78 e H6 em 4,22a e 3,90b ppm (KAO et al., 2012). A cadeia da β-1,6-glucana pode estar ligada a cadeia principal de β-1,3-glucana. A β-1,3-glucana parcialmente isolada após a extração alcalina dos corpos de frutificação *G. stipitatum*, pode ser uma mistura com diferentes massas molares. O mesmo perfil apresentando para a fração alcalina também foi observado para a fração aquosa (Figura 34 e 35).

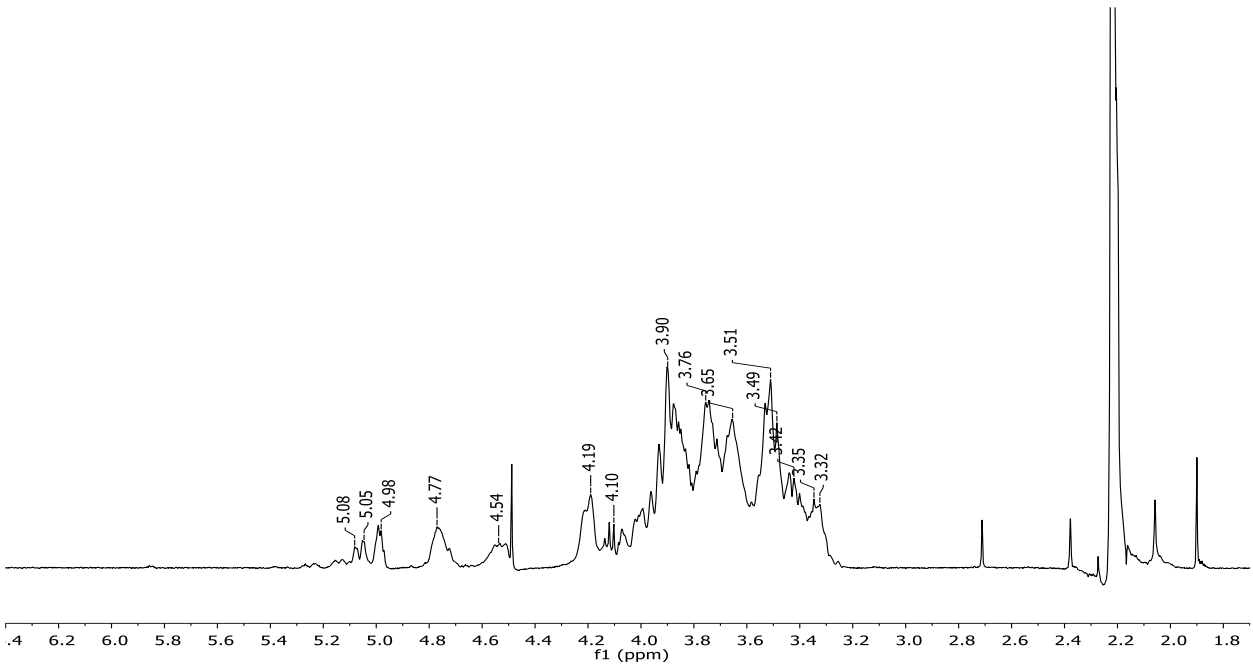


Figura 34. Espectro de RMN ^{1}H da fração aquosa de *G. stipitatum*

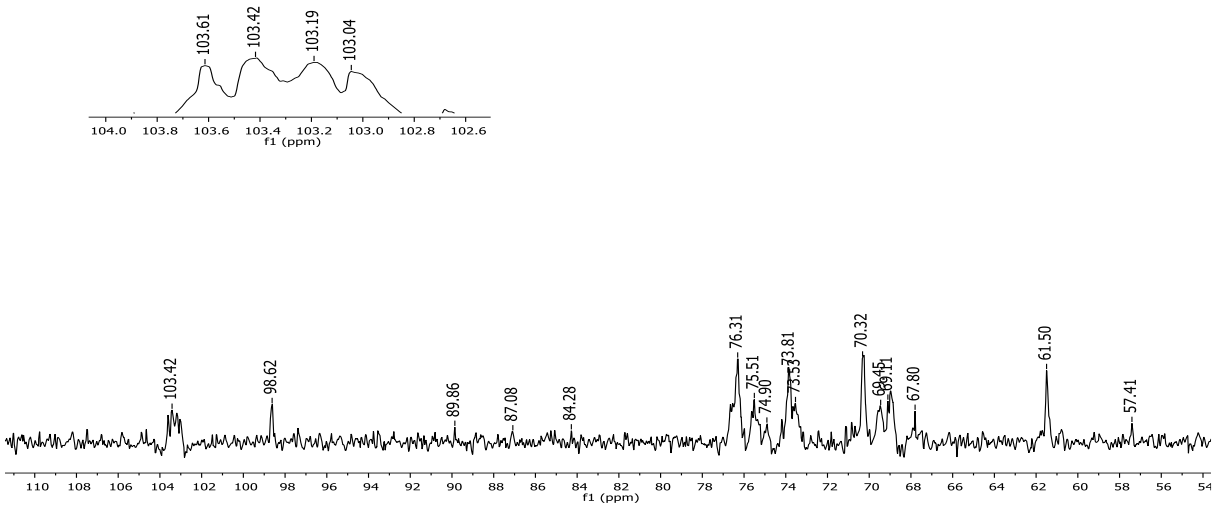


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C da fração aquosa de *G. stipitatum*

Os sinais do espectro de RMN de ^{1}H da fração aquosa de *G. stipitatum* H1-H6 apareceram em 4,77-3,35 ppm (Figura 34) e seu espectro de ^{13}C (Figura 35) mostrou picos característicos de uma β-1,3-glucana a 103,4 (C-1), 73,8 (C-2), 84,2 (C-3), 69,4 (C-4), 76,3 (C-5) e 61,5 (C-6) ppms, respectivamente. Esses sinais estão em concordância com resultados descritos na literatura para β-glucanas de *G. lucidum* (KIM et al., 2000; MANDAL et al., 2010; KAO et al., 2012).

Também foi possível observar os sinais de β-1,6-glucana no espectro de RMN de ^{13}C em 103,2 (C-1), 73,8 (C-2), 76,3 (C-3), 70,3 (C-4), 75,5 (C-5), e 69,5 (C-6) ppm e os prótons diagnósticos de H1 em 4,77 e H6 em 4,19a e 3,90b ppm (KAO et al., 2012). Assim como na fração alcalina, a cadeia da β-1,6-glucana pode estar ligada a cadeia principal constituída pela β-1,3-glucana. A atribuição dos sinais comparando com dados da literatura são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33. Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C da fração aquosa e alcalina de *G. stipitatum* em comparação com β-glucana isolada de *Pleutorus djamor* e *Ganoderma lucidum*

Origem	**Unidade de açúcar**	**($^{1}H/^{13}C$)**						**Referência**
		H1/C1	**H2/C2**	**H3/C3**	**H4/C4**	**H5/C5**	**H6 (H6')/C6**	
β-glucana *Pleotorus djamor*	→3)-β-Glc*p*- (1→	4,54/102,7	3,34/72,5	3,51/86,3	3,29/68,4	3,32/76,1	3,73 (3,49)/60,7	MAITY et al., 2019
β-glucana	→3)-β-Glc*p*- (1→	- /103,2	- /73,2	- /85,2	- /68,4	- /76,3	- /60,9	KAO et al., 2012
G. Lucidum	→6)- β-Glc*p*-(1→	- /102,2	- /73,9	- /76,5	- /70,4	- /76,8	- /69,7	
FaqGA	→3)-β-Glc*p*- (1→	4,54/103,4	3,35/73,8	3,51/84,2	3,42/69,4	3,32/76,3	3,76 (3,90)/ 61,5	
G. stipitatum	→6)- β-Glc*p*-(1→	4,77/103,2	3,35/73,8	3,51/76,3	3,49/70,3	3,65/75,5	4,19 (3,9)/ 69,5	
FalcGA	→3)-β-Glc*p*- (1→	4,53 / 103,4	3,34 / 73,9	3,51 / 84,9	3,44 / 69,5	3,33 / 76,4	3,74 (3,90) / 61,5	
G. stipitatum	→6)- β-Glc*p*-(1→	4,78 / 103,2	3,34 / 73,9	3,51 / 76,3	3,49 / 70,2	3,66 / 75,3	4,22 (3,90) / 69,5	

Fração sobrenadante aquosa – FaqGA-SP; Fração precipitada aquosa após diálise – FaqGA.

O pico de 4,63 ppm, observado no mapa de correlação HSQC, pode ser relacionada a unidade glicosil das cadeias laterais. Com base nessas observações e em seus resultados químicos turnos, o pico de 4,63 ppm foi atribuído para H-1 do único ramificado ou terminal da β-1,6-glucana e 4,53 ppm para H-1 de todas as de cadeia lateral da β-1,6-glucana, exceto o terminal na cadeia lateral (Figura 36).

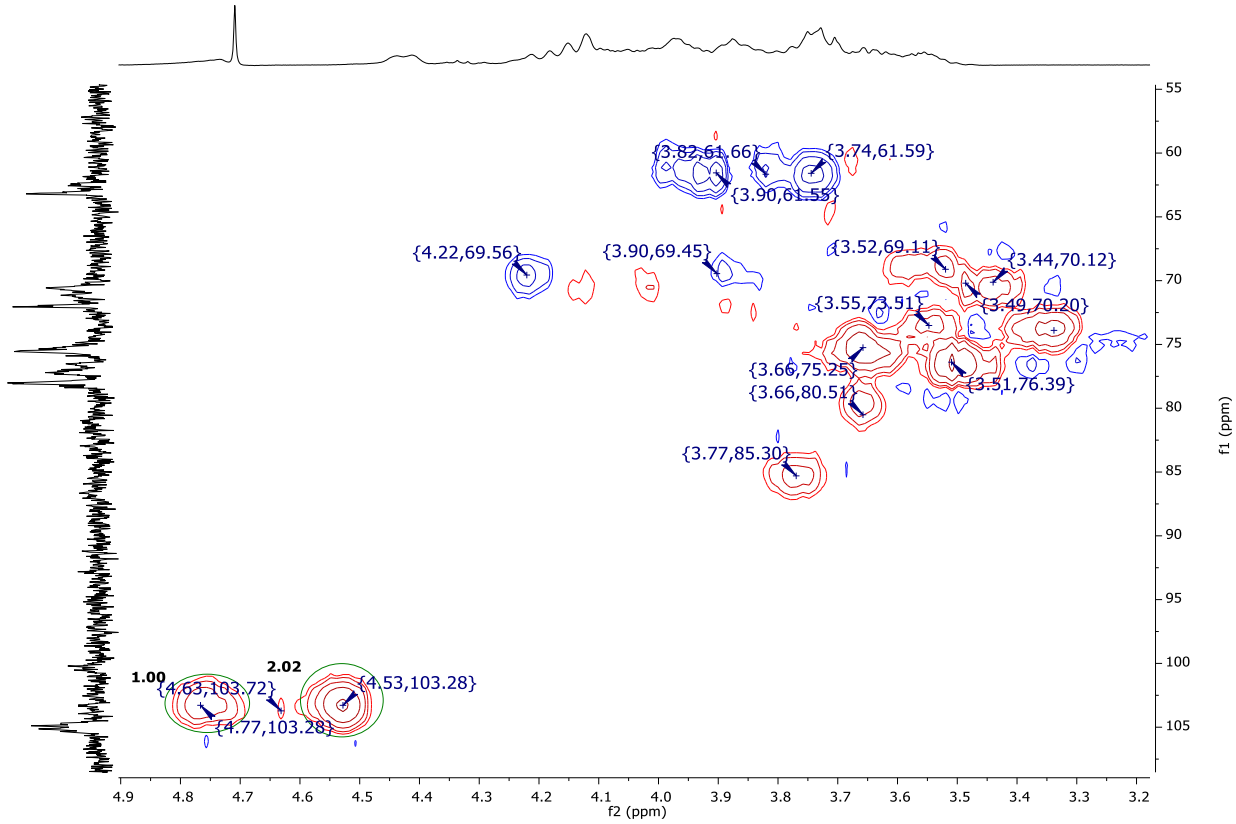


Figura 36. Mapa de correlação do tipo HSQC da fração alcalina de *G. stipitatum*

Em geral, os β-glucanos podem intensificar a fagocitose e ativar a expressão de uma série de citocinas, como o TNF-α e vários tipos de interleucinas. Foi relatado que polissacarídeos com características estruturais de ligação β-(1→3) na cadeia principal do glucano com pontos de ramificação β-(1→6) são eficientes na capacidade antitumoral (WASSER, 2002). Os polissacarídeos que possuem atividade imunomoduladora consistem em uma cadeia principal de β-glucano (1→3), ramificada com unidades de β-D-glucopiranosil ligadas (1→6), sendo capazes de produzir uma inibição completa do crescimento tumoral (SINGDEVSACHAN et al., 2016). Outra aplicação promissora dos glucanos é no câncer, como adjuvante da quimioterapia convencional. Os glucanos podem proteger o sistema cardiovascular, melhorando a glicose, o metabolismo lipídico e a pressão arterial (CERLETTI et al., 2021).

Devido à sua ampla gama de atividade biológica e à estrutura de resíduos de glicose ligados por ligações β-(1→3)-glicosídicas, muitas vezes com resíduos de glicose de cadeia lateral ligados por ligações β-(1→6), os polissacarídeos do cogumelo, particularmente os β-glucanos, são os metabólitos mais versáteis (GARCIA et al., 2022).

Algo que tem ganhado destaque em relação às glucanas é sua atuação como fibras solúveis. Estes polímeros podem agir como fibras dietéticas, protegendo a parede intestinal, servindo como probióticos e exercendo efeitos sobre a degradação de carboidratos disponíveis e, consequentemente, sobre o índice glicêmico dos alimentos ingeridos (MIRA, GRAF, CÂNDIDO, 2009). Além disso, devido a capacidade de β-glucanas em desenvolver alta viscosidade no trato gastrointestinal, podem retardar a absorção de glicose (DONG et al., 2011), interferir na digestão do amido (REGAND et al., 2011) e na absorção do colesterol (LAZARIDOU et al., 2014).

CONCLUSÃO

Os resultados para o presente trabalho se mostram promissores, pois a literatura é extremamente escassa em relação a composição e atividade biológica da espécie *G. stipitatum*, sendo este o primeiro relato do perfil lipídico (CG/DIC) e hidrofílico (*UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)* e atividade antileishmania.

O cogumelo demonstrou ser uma excelente fonte de ácidos graxos, com concentrações altas de ácidos graxos insaturados, sobretudo de poli-insaturados (AGPI), sendo o ácido linoleico poli-insaturado predominante em todas as amostras analisadas, seguido pelo ácido palmítico, ácido oleico, ácido elaídico, e esteárico. Nas análises por *UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS,* foram identificados compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos e diversos compostos triterpênicos. Os extratos e frações apresentaram atividade antileishmania contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e em relação a citotoxicidade para os macrófagos da linhagem J774A.1, todas as amostras apresentaram menor valores que o antileishmania miltefosina. A análise de composição nutricional também foi relatada pela primeira vez, apresentando 17,90% de proteína, 0,88% de lipídios, 2,21% de cinzas, e 79,01% de carboidratos, sendo que 42,77% deste percentual corresponde a fibras.

Em relação aos polissacarídeos, foi demonstrando que a extração utilizando a autoclave é um método alternativo eficaz para a obtenção destes compostos, reduzindo o tempo de extração e aumentando o rendimento quando comparado ao método convencional de extração. A caracterização química por RMN revelou a presença de β-glucanas com cadeia principal com

ligações β -1→3 e ramificada com unidades de glicose com ligação β-1→6, no extrato aquoso e alcalino. Considerando que glucanas de cogumelos apresentam várias atividades biológicas, como a atividade imunomoduladora e, que as glucanas mais descritas e que têm demonstrado atividade antitumoral são as que apresentam ligações β-(1→3) com ramificação (1→6), a presença destas moléculas nos extratos de *G. stipitatum* tem grande relevância.

Portanto, o presente trabalho contribui de forma significativa para a literatura científica do gênero *Ganoderma* e principalmente para a espécie *G. stipitatum*, demonstrando que o cogumelo é uma excelente fonte para obtenção de compostos bioativos com potencial biológico e nutricional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H.; ZAVADINACK, M.; SMIDERLE, F. R.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M.; IACOMINI, M. Polysaccharides from *Pleurotus eryngii*: Selective extraction methodologies and their modulatory effects on THP-1 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 117177, 2021.

ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: Wiley, 868 p, 1996.

AL-MAALI, G. A.; BISKO, N. A.; OSTAPCHUK, A. N. The effect of zinc citrate and zinc sulfate on the growth and biomass composition of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Mikologiya i fitopatoloqiya**, v. 50, n. 5, p. 313-317, 2016.

ALVES, G. G.; PEREIRA, I. B. T.; SANCHES, L. F.; MIKALOUSKI, F. B. D.; GOMES, M. C. S.; SIPOLI, C. C.; LINI, F.; SUZUKI, R. M. Extração de lipídios totais em amostra de semente de maracujá utilizando diclorometano. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 4, p. 408-413, 2017.

ANTWI, C. A.; AMISIGO, C. M.; ADJIMANI, J. P.; GWIRA, T. M. In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007206, 2019.

BAEVA, E.; BLEHA, R.; LAVROVA, E.; SUSHYTSKYI, L.; ČOPÍKOVÁ, J.; JABLONSKY, I.; SYNYTSYA, A. Polysaccharides from basidiocarps of cultivating mushroom *Pleurotus ostreatus*: isolation and structural characterization. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2740, 2019.

BERTÉLI, M. B. D.; OLIVEIRA FILHO, O. B.; FREITAS, J. D.; BORTOLUCCI, W. C.; SILVA, G. R.; GAZIM, Z. C.; LINDE, G. A. (2021a). *Lentinus crinitus* basidiocarp stipe and pileus: chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activity. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 1355-1366, 2021.

BHOSLE, S.; RANADIVE, K.; BAPAT, G.; GARAD, S.; DESHPANDE, G.; VAIDYA, J. Taxonomy and diversity of *Ganoderma* from the Western parts of Maharashtra (India). **Mycosphere**, v. 1, n.3, p. 249-262, 2010.

BISWAL, R. P.; DANDAMUDI, R. B.; PATNANA, D. P.; PANDEY, M.; VUTUKURI, V. R. K. Metabolic fingerprinting of *Ganoderma* spp. using UHPLC-ESI-QTOF-MS and its chemometric analysis. **Phytochemistry**, v. 199, p. 113169, 2022.

BLEHA, R.; TŘEŠNÁKOVÁ, L.; SUSHYTSKYI, L.; CAPEK, P.; ČOPÍKOVÁ, J.; KLOUČEK, P.; SYNYTSYA, A. Polysaccharides from basidiocarps of the polypore fungus *Ganoderma resinaceum:* Isolation and structure. **Polymers**, v. 14, n. 2, p. 255, 2022.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology,** v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRAZ, C. A. **Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a *Leishmania* spp.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2021.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D´ ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004.

CAI, M.; XING, H.; TIAN, B.; XU, J.; LI, Z.; ZHU, H.; SUN, P. Characteristics and antifatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118329, 2021.

CAO, Y., XU, X., LIU, S., HUANG, L., & GU, J. *Ganoderma*: A cancer immunotherapy review. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1217, 2018.

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

CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEN, L.; CHEUNG, P. C. K. Mushroom dietary fiber from the fruiting body of *Pleurotus tuber-regium*: fractionation and structural elucidation of nondigestible cell wall components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2891-2899, 2014.

CHEN, B.; TIAN, J.; ZHANG, J.; WANG, K.; LIU, L.; YANG, B.; LIU, H. Triterpenes and meroterpenes from *Ganoderma lucidum* with inhibitory activity against HMGs reductase, aldose reductase and α-glucosidase. **Fitoterapia**, v. 120, p. 6-16, 2017.

COSTA, W. S. **Perfil de ácidos graxos da semente de goiaba (*Psidium guajava* L.)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Licenciatura em Química, Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Piauí. Parnaíba, 2018.

DALETOS G.; EBRAHIM, W.; ANCHEEVA, E.; EL-NEKETI, M.; SONG, W.; LIN, W.; PROKSCH, P. Natural products from deep-sea-derived fungi a new source of novel bioactive compounds?. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 2, p. 186-207, 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 0471496413.

DONG, J.; CAI, F.; SHEN; R.; LIU, Y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptoxotocin-induces diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1066-1071, 2011.

EGÍDIO, E. S.; JUNIOR, J. R. S; MENEZES, M. E. S. Alimentos funcionais: uma revisão. **Educação, Ciência e Saúde**, v. 3, n. 1, p. 19, 2016.

FAGHERAZZI, S.; DIAS, R. L.; BORTOLON, F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, p. 381-386, 2008.

CFR FERREIRA, I.; A VAZ, J.; VASCONCELOS, M. H.; MARTINS, A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 10, n. 5, p. 424-436, 2010.

FIGUEIRÊDO, V. R. D. **Estudo de fungos Aphyllophorales no sul da Bahia.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade de Santa Cruz, Bahia. Santa Cruz, 2008.

FRYSSOULI, V.; ZERVAKIS, G. I.; POLEMIS, E.; TYPAS, M. A. A global meta-analysis of ITS rDNA sequences from material belonging to the genus *Ganoderma* (Basidiomycota, Polyporales) including new data from selected taxa. MycoKeys, v. 75, p. 71, 2020.

GAO, X.; QI, J.; HO, C. T.; LI, B.; XIE, Y.; CHEN, S.; WU, Q. Purification, physicochemical properties, and antioxidant activities of two low-molecular-weight polysaccharides from *Ganoderma leucocontextum* fruiting bodies. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1145, 2021.

GARCIA, J.; RODRIGUES, F.; SAAVEDRA, M. J.; NUNES, F. M.; MARQUES, G. Bioactive polysaccharides from medicinal mushrooms: A review on their isolation, structural characteristics and antitumor activity. **Food Bioscience**, p. 101955, 2022.

GONG, T., YAN, R., KANG, J., & CHEN, R. Chemical components of *Ganoderma*. **Ganoderma and Health: Biology, Chemistry and Industry**, p. 59-106, 2019.

GONG, P.; WANG, S.; LIU, M.; CHEN, F.; YANG, W.; CHANG, X.; CHEN, X. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini review. **Carbohydrate Research**, v. 494, p. 108037, 2020.

GOW, N. A.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. funk-0035-2016, 2017.

HAN, M. D.; HAN, J. S.; HYUN, S. H.; SHIN, H. W. Solubilization of water-insoluble beta-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of environmental biology**, v. 29, n. 2, p. 237, 2008.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A. *et al.* Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. **Food Chem.**, 119, n. 4, p. 1443-1450, 2010.

HUANG, S. Q.; LI, J. W.; WANG, Z.; PAN, H. X.; CHEN, J. X.; NING, Z. X. Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3694-3708, 2010.

INDEX FUNGORUM DATABASE, 2023. Disponível em: http://www.indexfungorum.org/names/names.asp. Acesso em: 10 jun. 2023.

ISMAIL, K.; ABDULLAH, S.; CHONG, K. Screening for potential antimicrobial compounds from *Ganoderma boninense* against selected food borne and skin disease pathogens. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 771-774, 2014.

JACOMINI, D. et al. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. **Industrial Crops and Products** 69: 408-414, 2015.
KALAČ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. **Food. Chem.**, 113, n. 1, p. 9-16, 2009.

KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **J. Sci. Food Agric.**, 93, n. 2, p. 209-218, 2013.

KALOGEROPOULOS, N.; YANNI, A. E.; KOUTROTSIOS, G.; ALOUPI, M. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 378-385, 2013.

KAMRA, A.; BHATT, A. B. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 4, n. 2, p. 359-362, 2012.

KAO, P. F.; WANG, S. H.; HUNG, W. T.; LIAO, Y. H.; LIN, C. M.; YANG, W. B. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1, 3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

KIM, Y. T.; KIM, E. H.; CHEONG, C.; WILLIAMS, D. L.; KIM, C. W.; LIM, S. T. Structural characterization of β-D-(1→ 3, 1→ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 328, n. 3, p. 331-341, 2000.

KOKO, W. S.; AL NASR, I. S.; KHAN, T. A.; SCHOBERT, R.; BIERSACK, B. An update on natural antileishmanial treatment options from plants, fungi and algae. **Chemistry & biodiversity**, e202100542, 2021.

KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; BHAVANATH, B. Comparative evaluation and selection of method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae**. Analytical Biochemistry,** 415: 134-144, 2011.

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

LAZARIDOU, A.; SERAFEIMIDOU, A.; BILIADERIS, C. G.; MOSCHAKIS, T.; TZANETAKIS, N. Structure development and acidification kinetics in fermented mil containingoat β-glucans, a yogurt culture and a probiotic strain. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 204-214, 2014.

LIANG, C.; TIAN, D.; LIU, Y.; LI, H.; ZHU, J.; LI, M.; XIA, J. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 174, p. 130-141, 2019.

LIMA, F. T **Cogumelos de ocorrência espontânea como produtos florestais em Bonito-PE**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2019.

LIMA JUNIOR, N. C.; BAPTISTA GIBERTONE, T.; MALOSSO, E. Delimitation of some neotropical laccate Ganoderma (Ganodermataceae): molecular phylogeny and morphology. **Revista de Biologia Tropical**, v. 62, n. 3, p. 1197-208, 2014.

LIMA, V. S. **Estudo in vitro da atividade anti-leishmania de compostos sintéticos derivados espiro-acridínicos sobre *Leishmania amazonensis***. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2020.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285-299, 2005.

LIU, Y.; LIU, Y.; QIU, F.; DI, X. Sensitive and selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* and its related species. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 4, p. 717-721, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, J.; TANG, Q.; YANG, Y.; GUO, Q.; WANG, Q.; CUI, S. W. Physicochemical characterization of a high molecular weight bioactive β-D-glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 968-974, 2014.

MACHADO, F.A.P.S.A; CAPELASSO, M.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R.A.C.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Fatty Acids Production from Plants and Callus Cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Journal of Plants Sciences**, v. 1, n.4, p. 368-373, 2006.

MAITY, G. N.; MAITY, P.; CHOUDHURI, I.; BHATTACHARYYA, N.; ACHARYA, K.; DALAI, S.; MONDAL, S. Structural studies of a water insoluble β-glucan from *Pleurotus djamor* and its cytotoxic effect against PA1, ovarian carcinoma cells. **Carbohydrate polymers**, v. 222, p. 114990, 2019.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food chemistry**, 68(3), 315-318, 2000.

MANDAL, S.; MAITY, K. K.; BHUNIA, S. K.; DEY, B.; PATRA, S.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. Chemical analysis of new water-soluble (1→ 6)-,(1→ 4)-α, β-glucan and water-insoluble (1→ 3)-,(1→ 4)-β-glucan (Calocyban) from alkaline extract of an edible mushroom, *Calocybe indica* (Dudh Chattu). **Carbohydrate research**, v. 345, n. 18, p. 2657-2663, 2010.

MARIANO, T. B.; DA SILVA LIMA, H. R.; RIBEIRO, S. T. C.; DO SANTOS FILHO, J. R.; SERRATO, R. V.; REIS, A. V.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Inulin extraction from *Stevia rebaudiana* roots in an autoclave. **Carbohydrate Research**, v. 530, p. 108850, 2023.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. D.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. D.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINS JÚNIOR, A. S.; BAPTISTA GIBERTONE, T.; SOTÃO, H. M. P. Espécies de *Ganoderma* P. Karst (Ganodermataceae) e Phellinus Quél. (Hymenochaetaceae) na Estação Científica Ferreira Penna, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasiliensis**, v. 25, n. 3, p. 531-533, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 4 ed. Rio de Janeiro. : Guanabara Koogan, 2015.

MAZZUTTI, S. **Obtenção de extrato de Cogumelo do Sol (*Agaricus brasiliensis*): atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

MESHULAM, T.; LEVITZ, S. M.; CHRISTIN, L.; DIAMOND, R. D. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). **Journal of Infectious Disease**. 172 (4), 1153–1156, 1995.

MILES, P. G.; CHANG, ST. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. CRC press, 2004.

MIRA, G. S.; GRAF, H.; CANDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta- glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 11-20, 2009.

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

MORADALI, M. F; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A.; UEDA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.var. pallescens (C. DC.) Yunck. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.

NAPPI, B. P.; ZILIOTTO, C. H.; RABELLO, G.; GONZAGA, L. V.; MORETTO, E.; CRUZ, R. Composição do lipídio presente na biomassa produzida pelos cogumelos comestíveis P*leurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-judae* em soro de leite. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, 93-99, 1999.

NIE, S.; ZHANG, H.; LI, W.; XIE, M. Current development of polysaccharides from Ganoderma: Isolation, structure and bioactivities. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 1, n. 1, p. 10-20, 2013.

PAN, D.; WANG, L.; CHEN, C.; HU, B.; ZHOU, P. Isolation and characterization of a hyperbranched proteoglycan from *Ganoderma lucidum* for anti-diabetes. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 106-114, 2015.

PAPPIANI, C. **Efeito dos ácidos graxos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 sobre o risco cardiovascular de indivíduos adultos: estudo clínico de prevenção primária.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

PESSOA, F. B. **Extração e caracterização química de Polissacarídeos de Basidiomicetos comestíveis de ocorrência na Amazônia**. Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, 2016.

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

RAMEZANI, P.; HEJAZI, S. H.; NARIMANI, M., & SOLEIMANIFARD, S. In vitro antileishmanial activity and apoptosis induction of *Pleurotus ostreatus* alcoholic extract on *Leishmania major*. **Research Journal of Pharmacognosy,** *4*(3), 51-58, 2017.

REGAND, A.; CHOWDHURY, Z.; TOSH, S. M.; WOLEVER, T. M. S.; WOOD, P. The molecular weight, solubility and viscosity of oat beta-glucan affect human glycemic response by modifying starch digestibility. **Food Chemistry**, v. 129, p. 297-304, 2011.

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

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

SAINI, S.; RAI, A. K. Linoleic acid inhibits the release of Leishmania donovani derived microvesicles and decreases its survival in macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 406, 2020.

SALVATORE, M. M., ELVETICO, A., GALLO, M., SALVATORE, F., DELLAGRECA, M., NAVIGLIO, D., & ANDOLFI, A. Fatty acids from *Ganoderma lucidum* spores: Extraction, identification and quantification. **Applied Sciences**, v. 10, n. 11, p. 3907, 2020.

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

SANTOS, B.; CORRÊA, D. O.; SELESU, N. F. H.; KAVA, V. M.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. Produção de biomassa microalgal em escala: desafios e oportunidades. In: **Microalgas: potenciais aplicações e desafios.** Canoas: Mérida Publishers, cap 1, p. 8-44, 2021.

SASSAKI, G. L.; GUERRINI, M.; SERRATO, R. V.; SANTANA FILHO, A. P.; CARLOTTO, J.; SIMAS-TOSIN, F.; GORIN, P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate polymers**, v. 104, p. 34-41, 2014.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 37-48, 2016.

SIBBR, 2023. **Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira.** Disponível em: https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/352107?lang=es_ES. Acesso em: 10 jun. 2023.

SILVA, C. A. T. D. O. **Uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2016.

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

SILVA FIGUEIREDO, P.; CARLA INADA, A.; MARCELINO, G.; MAIARA LOPES CARDOZO, C. *et al.* Fatty acids consumption: the role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. **Nutrients**, 9, n. 10, p. 1158, 2017.

SINGDEVSACHAN, S. K., AUROSHREE, P., MISHRA, J., BALIYARSINGH, B., TAYUNG, K., & THATOI, H. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes.* **Food Chemistry.** Barking. v. 108, n. 1. P. 329-333, 2008.

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

SOUZA, M. F. **Perfil de ácidos graxos do óleo de chia encapsulado em partículas de ácido esteárico**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

SONG, C. F.; WANG, S. G.; YANG, J.; CUI, Z. W.; GU, Y. H. Optimization of vacuum-microwave radiation pretreatment on extraction of *Ganoderma* polysaccharides. **Mathematical Problems in Engineering**, v. 2015, 2015.

STOJKOVIĆ, D. S.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; GLAMOČLIJA, J.; ĆIRIĆ, A.; VAN GRIENSVEN, L. J.; FERREIRA, I. C. A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 1, p. 42-47, 2014.

SUŁKOWSKA-ZIAJA, K.; BALIK, M.; SZCZEPKOWSKI, A.; TREPA, M.; ZENGIN, G.; KAŁA, K.; MUSZYŃSKA, B. A. Review of Chemical Composition and Bioactivity Studies of the Most Promising Species of *Ganoderma* spp. **Diversity**, v. 15, n. 8, p. 882, 2023.

SUN, Y. F.; XING, J. H.; HE, X. L.; WU, D. M.; SONG, C. G.; LIU, S.; CUI, B. K. Species diversity, systematic revision and molecular phylogeny of Ganodermataceae (Polyporales, Basidiomycota) with an emphasis on Chinese collections. Studies in Mycology, v. 101, n. 1, p. 287-415, 2022.

TAOFIQ, O.; HELENO, S. A.; CALHELHA, R. C.; ALVES, M. J.; BARROS, L.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; FERREIRA, I. C. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. **Food and chemical toxicology**, v. 108, p. 139-147, 2017.

TEL-ÇAYAN, G.; ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; REHMAN, M. U.; ADHIKARI, A.; TÜRKOĞLU, A.; CHOUDHARY, M. I. Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 749-754, 2015.

TIAN, B.; ZHAO, Q.; XING, H.; XU, J.; LI, Z.; ZHU, H.; CAI, M. Gastroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with different molecular weights on ethanol-induced acute gastric injury in rats. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1476, 2022.

TORRES-TORRES, M. G.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; DE MELLO GUGLIOTTA, A. Ganoderma in Brazil: known species and new records. **Mycotaxon**, v. 121, n. 1, p. 93-132, 2013.

WANG, J.; MA, Z..; ZHANG, L.; FANG, Y.; JIANG, F.; PHILLIPS, G. O. Structure and chain conformation of water-soluble heteropolysaccharides from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 844-851, 2011.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β-D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 105-112, 2009.

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

WANG, J.; YUAN, Y.; YUE, T. Immunostimulatory activities of β-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 47-54, 2014.

WASSER, S. J. A. M. B. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WIŃSKA, K.; ĄCZKA, W.; GABRYELSKA, K.; GRABARCZYK, M. Mushrooms of the genus *Ganoderma* used to treat diabetes and insulin resistance. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4075, 2019.

YOUNG, S. H. & JACOBS, R. R. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. **Carbohydrate Research**, 310(1-2), p. 91-99, 1998.

ZENG, P.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; XING, M. *Ganoderma lucidum* polysaccharide used for treating physical frailty in China. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, p. 179-219, 2019.

ZENGIN, G.; SARIKURKCU, C.; GUNES, E.; UYSAL, A.; CEYLAN, R.; UYSAL, S.; AKTUMSEK, A. Two *Ganoderma* species: profiling of phenolic compounds by HPLC–DAD, antioxidant, antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus, Alzheimer's disease and skin disorders. **Food & Function**, v. 6, n. 8, p. 2794-2802, 2015.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 4-19, 2007.

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

WU, Y. J.; WEI, Z. X.; ZHANG, F. M.; LINHARDT, R. J.; SUN, P. L.; ZHANG, A. Q. Structure, bioactivities and applications of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* mushroom: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1005-1010, 2019.

ANEXOS CAP. 3

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Compostos identificados por *UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS* em extratos de *Ganoderma stípitatum*

Compostos	#	FM	TM (*m/z*)	Ion precursor	Erro (ppm)	t_R (min)	Ions fragmentos	Extratos	Referência/Número na base de dados
Serina	**24**	$C_3H_7NO_3$	105,0425	104,0345 $[M-H]^-$ 104,0344 $[M-H]^-$	2,88 1,92	1,23 1,43	72; 74; 102	EBGAN HMGAN	PAN et al. (2015)
Ácido Fumárico	**25**	$C_4H_40_4$	116,0109	115,0032 $[M-H]^-$ 115,0032 $[M-H]^-$	5,21 5,21	2,30 1,43	73; 98; 99	EBGAN HMGAN	TEL-CAYAN et al. (2015)
Ácido benzóico	**26**	$C_7H_6O_2$	122,0367	121,0291 $[M-H]^-$ 121,0291 $[M-H]^-$ 121,0290 $[M-H]^-$	5,78 5,78 4,95	7,77 7,80 7,83	93; 95; 108; 119; 120	DCGAN EBGAN HMGAN	HMDB0001870 ZENGIN et al. (2015)
Ácido *p*-hidroxibenzóico	**27**	$C_7H_6O_3$	138,0316	137.0238 $[M-H]^-$ 137.0238 $[M-H]^-$	3,64 6,10	7,55 7,56	81; 93; 94; 108; 109; 119; 123; 135; 136	DCGAN HMGAN	ZENGIN et al. (2015)
Ácido 3,4-di-hidroxi-2-metoxibutanóico	**28**	$C_5H_{10}O_5$	150,0528	131,0345 $[M-H_2O-H]^-$ 131,0344 $[M-H_2O-H]^-$ 131,0346 $[M-H_2O-H]^-$	5,34 4,57 6,10	7,36 7,38 7,43	85; 87; 88; 113; 114; 131	DCGAN EBGAN HMGAN	-
Ácido protocatecuico	**29**	$C_7H_6O_4$	154,0266	153,0187 $[M-H]^-$ 153,0188 $[M-H]^-$	3,26 3,92	7,55 7,56	91; 95; 107; 108; 109; 110; 123; 124; 125; 151	DCGAN HMGAN	ZENGIN et al. (2015)
Ácido *p*-cumarico	**30**	$C_9H_8O_3$	164,0473	163,0394 $[M-H]^-$ 163,0395 $[M-H]^-$	3,06 3,92	7,69 7,56	93; 117; 119; 120; 121; 134; 135; 145	DCGAN HMGAN	HMDB0030677
Galato de metila	**31**	$C_8H_8O_5$	184,0371	165,0188 $[M-H_2O-H]^-$ 165,0184 $[M-H_2O-H]^-$ 165,0183 $[M-H_2O-H]^-$	3,63 1,21 0,60	7,53 8,42 8,41	77; 87; 93; 95; 121; 123; 137; 139; 165	DCGAN EBGAN HMGAN	HMDB0254590
Ácido azelaico	**32**	$C_9H_{16}O_4$	188,1048	169,0867 $[M-H_2O-H]^-$ 169,0861 $[M-H_2O-H]^-$	4,73 1,18	8,95 8,97	125; 127; 141; 142	DCGAN HMGAN	HMDB0000784
Ácido ganoderico DM	**33**	$C_{30}H_{44}O_4$	468,3234	467,3170 $[M-H]^-$ 467,3143 $[M-H]^-$ 467,3147 $[M-H]^-$	3,20 -2,72 -1,71	12,44 12,44 12,79	78; 94; 110; 112; 115; 152; 154; 171; 255; 293; 370; 423; 465	DCGAN EBGAN HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido 11α-hidroxi-3,7-dioxo-5α-lanosta-8,24 (E)-dien-26-óico	**34**	$C_{30}H_{44}O_5$	484,3183	483,3104 $[M-H]^-$	-0,15	9,71	85; 100; 116; 152; 163; 219; 255; 301; 345; 407; 425; 466; 469; 470	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido 3β,15α,22β-trihidroxilanosta-7,9 (11),24-trien-26-óico	**35**	$C_{30}H_{46}O_5$	486,3339	485,3245 $[M-H]^-$	-3,24	9,24	116; 128; 195; 197; 213; 214; 235; 255; 256; 287; 288; 289; 290; 301; 423; 439; 441; 443; 483	EBGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganolucídico D	**36**	$C_{30}H_{44}O_6$	500,3132	481,2940 $[M-H_2O-H]^-$ 481,2925 $[M-H_2O-H]^-$	-1,66 -4,77	11,53 11,57	78; 100; 152; 272; 299; 314; 341; 367; 382; 383; 407; 408; 409; 423; 437; 438; 451; 452	DCGAN EBGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido 3β,7β-diidroxi-11,15,23-trioxo-lanost-8,16-dien-26-óico	**37**	$C_{30}H_{42}O_7$	514,2925	495,2726 $[M-H_2O-H]^-$ 495,2731 $[M-H_2O-H]^-$	-3,02 -2,01	8,77 8,76	99; 122; 142; 149; 150; 193; 201; 214; 215; 217; 247; 283; 285; 287; 299; 301; 302; 131; 535; 417; 421; 433; 435; 436; 451	EBGAN HMGAN	BISWAL et al. (2022)

Ácido ganodérico D	**38**	$C_{30}H_{42}O_7$	514,2925	513,2835 $[M-H]^-$	-2,28	7,87	95; 99; 111; 149; 153; 177; 195; 211; 247; 265; 283; 285; 301; 303; 319; 436; 438; 451; 469	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganodérico A	**39**	$C_{30}H_{44}O_7$	516,3081	497,2896 $[M-H_2O-H]^-$	-0,20	8,31	124; 168; 195; 201; 249; 285; 287; 303; 304; 437; 452; 453; 454	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganoderênico C	**40**	$C_{30}H_{44}O_7$	516,3081	515,2989 $[M-H]^-$	-2,66	8,20	85; 115; 147; 149; 151; 163; 165; 187; 193; 195; 211; 249; 251; 269; 285; 287; 288; 299; 301; 302; 303; 304; 338; 345; 377; 451; 456; 497; 500	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganolucídico C	**41**	$C_{30}H_{44}O_7$	518,3238	517,3148 $[M-H]^-$	-2,27	7,90	85; 129; 137; 151; 153; 165; 195; 229; 249; 287; 301; 303; 411; 437; 455; 499; 515	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganodérico M	**42**	$C_{30}H_{42}O_8$	530,2874	511,2675 $[M-H_2O-H]^-$	-2,93	8,76	97; 111; 135; 149; 165; 189; 205; 247; 263; 272; 283; 299; 301; 332; 355; 405; 434; 449; 467; 495	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganodérico N	**43**	$C_{30}H_{42}O_8$	530,2874	529,2789 $[M-H]^-$	-1,27	8,10	73; 83; 85; 87; 95; 101; 108; 111; 115; 121; 122; 124; 129; 150; 167; 182; 195; 201; 208; 210; 263; 271; 285; 310; 340; 350; 411; 421; 449; 467; 469; 470; 501; 511; 513; 514	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganodérico η	**44**	$C_{30}H_{44}O_8$	532,3030	531,2938 $[M-H]^-$	-2,58	7,85	85; 109; 111; 115; 123; 129; 144; 151; 155; 189; 203; 211; 217; 253; 265; 301; 318; 319; 423; 425; 453; 454; 469; 471; 469; 470; 513; 515; 516	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Ácido ganodérico K	**45**	$C_{30}H_{46}O_9$	574,3136	531,2938 $[M-H]^-$	-3,44	8,15	116; 129; 149; 191; 217; 233; 249; 253; 265; 285; 301; 307; 315; 317; 343; 317; 359; 361; 419; 421; 434; 449; 450; 451; 452; 465; 480; 493; 501; 511; 527; 529; 531; 555	HMGAN	BISWAL et al. (2022)
Feniletilamina	**46**	$C_8H_{11}N$	121,0891	122,0956 $[M+H]^+$ 122,0956 $[M+H]^+$ 122,0956 $[M+H]^+$	-6,55 -8,19 -5,73	1,52 4,02 1,59	77; 78; 79; 80; 103; 104; 105; 106; 121; 122	DCGAN EBGAN HMGAN	HMDB0012275
Ácido málico	**47**	$C_4H_6O_5$	134,0215	157,0117 $[M+Na]^+$ 157,0102 $[M+Na]^+$	6,36 -3,18	4,55 1,75	81; 84; 95; 98; 102; 110; 112; 113; 128; 155; 157	EBGAN HMGAN	HMDB0000744
Tirosina	**48**	$C_9H_{11}NO_3$	181,0738	218,0224 $[M+K+2H]^+$ 182,0801 $[M+H]^+$ 218,0214 $[M+K+2H]^+$	4,58 -5,49 3,66	1,17 3,03 0,78	70; 77; 84; 98; 100; 106; 114; 118; 121; 123; 130; 135; 144; 147; 160;	DCGAN EBGAN HMGAN	HMDB0000158
Sebacato de dimetila	**49**	$C_{12}H_{22}O_4$	230,1518	231,1575 $[M+H]^+$ 231,1582 $[M+H]^+$	-6,48 -3,89	7,93 7,93	77; 79; 81; 83; 85; 91; 93; 95; 96; 97; 105; 109; 113; 123; 127; 151	DCGAN HMGAN	NIST1118501
Ácido 13-hidroxioctadecadienóico	**50**	$C_{18}H_{32}O_3$	296,2351	319,2231 $[M+Na]^+$ 319,2228 $[M+Na]^+$ 319,2230 $[M+Na]^+$	-3,75 -5,49 -4,07	10,68 10,68 10,78	79; 91; 95; 103; 105; 109; 119; 120; 123 127; 128; 135; 145; 155; 161; 179; 185	DCGAN EBGAN HMGAN	HMDB0253281

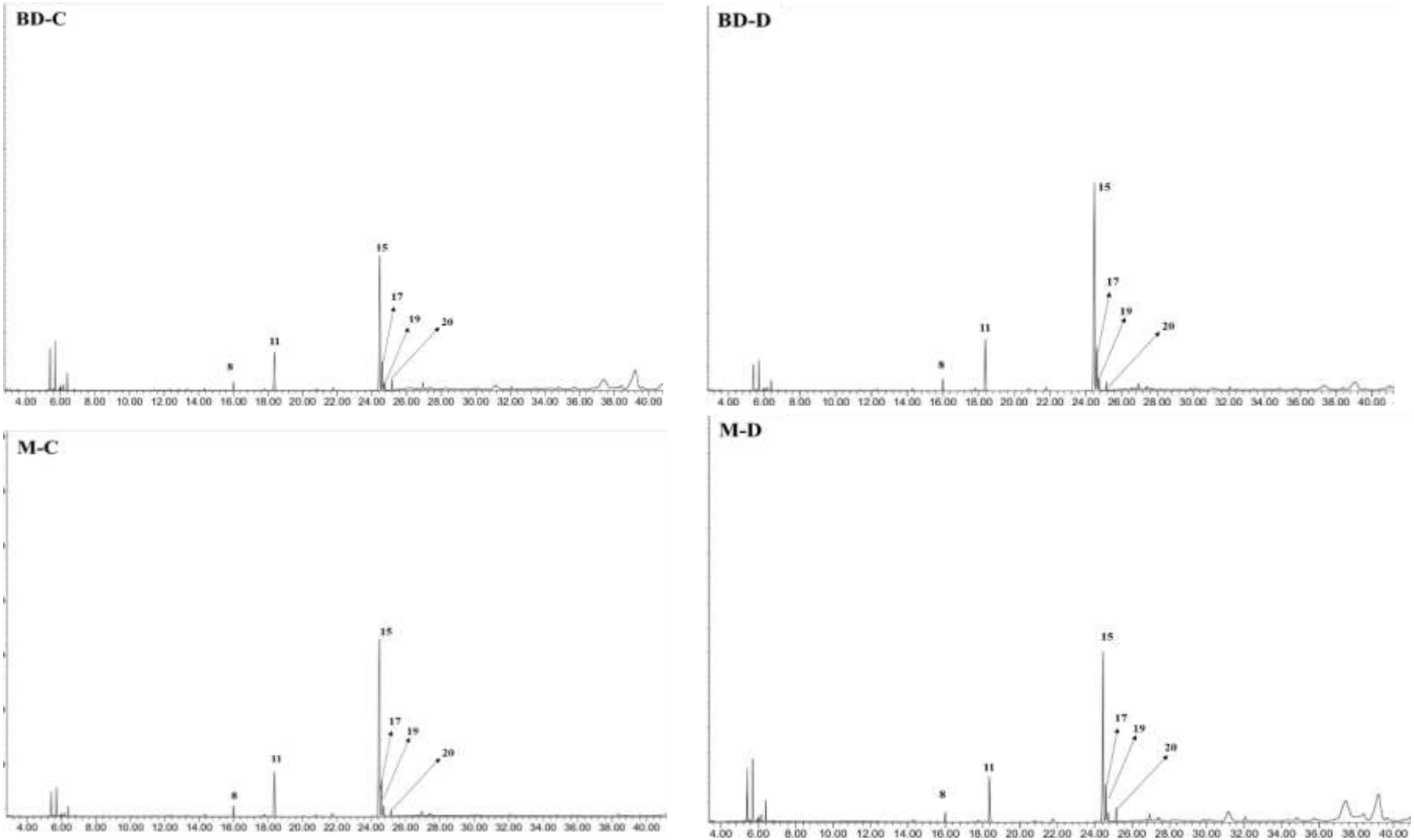


Figura S1. Cromatogramas obtidos por CG/DIC do **(BD-C)** Bligh e Dyer/clorofórmio; **(BD-D)**: Bligh e Dyer/diclorometano; (**M-C)**: Maceração/clorofórmio; **(M-D):** Maceração/diclorometano de *G. stipitatum* demonstrando os ácidos graxos majoritários nas amostras. Ácido mirístico (**8**), ácido palmítico (**11**), ácido linoleico (**15**), ácido oleico (**17**), ácido elaídico (**19**) e ácido esteárico (**20**).

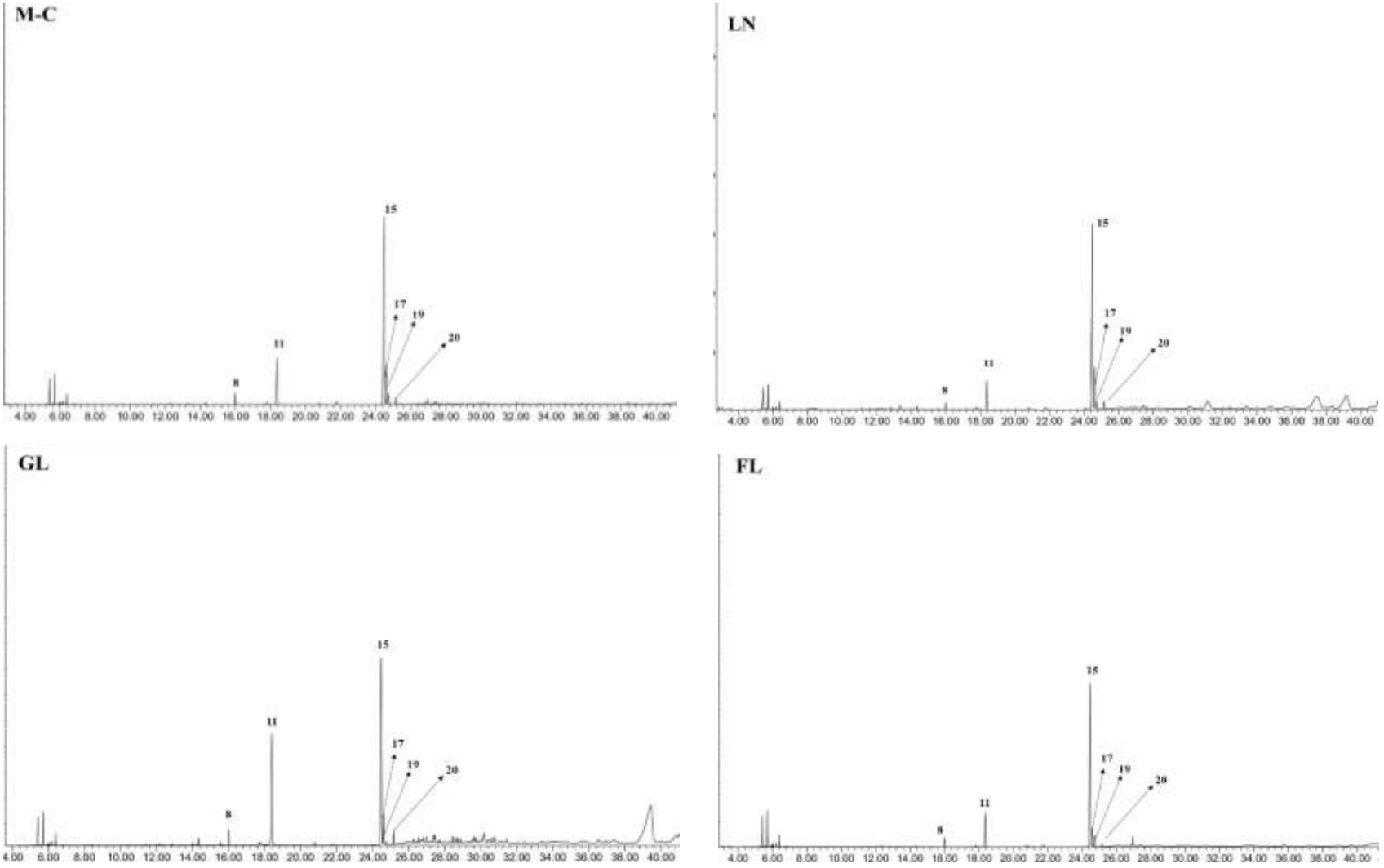


Figura S2. Cromatogramas obtidos por CG/DIC do extrato (**M-C)** Maceração/clorofórmio; **(LN)** Lipídios Neutros; (**GL**) Glicolipídios; (FL) Fosfolipídios de *G. stipitatum*, demonstrando os ácidos graxos majoritários nas amostras. Ácido mirístico (**8**), ácido palmítico (**11**), ácido linoleico (**15**), ácido oleico (**17**), ácido elaídico (**19**) e ácido esteárico (**20**).