

Artigo

Composição Química e Potencial Biológico do Extrato do Micélio do Basidiomiceto *Tyromyces pulcherrimus* (Rodway) G. Cunn. Cultivado em Meio Líquido

Paganelli, C. J.* Mello, F. ; Costa, T. M.; Helm, C. V.; Siebert, D. A.; Vitali, L.; Micke, G. A.; Tavares, L. B. B.; Alberton, M. D.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (4), 00-00. Data de publicação na Web: 7 de Julho de 2020

<http://rvq.sjq.org.br>

Chemical Composition and Biological Potential of Mycelium Extract from Basidiomicete *Tyromyces pulcherrimus* (Rodway) G. Cunn. Cultivated in Liquid Medium

Abstract: The exploration of microorganisms as a source of biologically active substances have been performed since the discovery of the first fungal metabolite of great medical importance, the penicillin. Thus, the main objective of this study was to evaluate the chemical components in the extract of mycelium of *Tyromyces pulcherrimus*, and to evaluate the potential *in vitro* antibacterial, antioxidant and inhibitory activities of alpha-glucosidase and acetylcholinesterase enzymes. The classes of secondary metabolites detected by thin layer chromatography (TLC) were flavonoids, phenols and lipids. An analysis by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) comparing to the 47 standards of phenolic compounds, led to the identification of ellagic acid ($4.55 \pm 0.15 \mu\text{g g}^{-1}$). The extract showed weak antibacterial activity for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and showed no antibacterial activity against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). In anticholinesterase activity, $99 \pm 0.1\%$ of the enzyme was inhibited at a concentration of 1 mg mL^{-1} . At the same concentration, the sample showed weak antioxidant activity on the DPPH assay ($18.18 \pm 0.04\%$), and weak inhibitory activity of the enzyme alpha-glycosidase IC₅₀ of $15.19 \pm 5.52\%$. This study suggests that the anticholinesterase activity in this species is promising and may be involved with the compounds detected by TLC and mass spectrometry.

Keywords: Basidiomycota; antibacterial; antioxidant; acetylcholinesterase; *Tyromyces pulcherrimus*.

Resumo

A exploração dos microorganismos como fonte de substâncias biologicamente ativas tem sido realizada desde a descoberta do primeiro metabólito fúngico de importância na medicina, a penicilina. O objetivo principal deste estudo foi avaliar os componentes químicos presentes no extrato do micélio fúngico da espécie *Tyromyces pulcherrimus*, e avaliar as potenciais atividades antibacteriana, antioxidante e inibitória das enzimas alfa-glicosidase e acetilcolinesterase *in vitro* presentes na espécie. As classes de metabólitos secundários detectados por cromatografia em camada delgada (CCD) foram flavonoides, fenóis e lipídios. Uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS/MS), em comparação a 47 padrões de compostos fenólicos, permitiu a detecção do ácido elágico ($4.55 \pm 0.15 \mu\text{g g}^{-1}$). O extrato mostrou fraca atividade antibacteriana para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e não mostrou atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Na atividade anticolinesterásica, houve inibição de $99 \pm 0.1\%$ da enzima na concentração de 1 mg mL^{-1} . Nesta mesma concentração, a amostra apresentou fraca atividade antioxidante no ensaio com o radical livre DPPH ($18.18 \pm 0.04\%$) e fraca atividade inibitória da enzima alfa-glicosidase ($15.19 \pm 5.52\%$). Este estudo sugere que a atividade anticolinesterásica nesta espécie é promissora e pode estar envolvida com os compostos detectados por CCD e espectrometria de massas.

Palavras-chave: Basidiomycota; antibacteriano; antioxidante; acetilcolinesterase; *Tyromyces pulcherrimus*.

* Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CEP 89030-903 Blumenau-SC, Brazil.

 paganellcamila@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200082](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200082)

Composição Química e Potencial Biológico do Extrato do Micélio do Basidiomiceto *Tyromyces pulcherrimus* (Rodway) G. Cunn. Cultivado em Meio Líquido

Camila Jeriane Paganelli,^{a,*} Flávia de Mello,^a Tania Maria Costa,^b Cristiane Vieira Helm,^c Diogo Alexandre Siebert,^d Luciano Vitali,^d Gustavo Amadeu Micke,^d Lorena Benathar Ballod Tavares,^e Michele Debiasi Alberton^a

^a Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Farmácia, Blumenau-SC, Brasil.

^b Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis-SC, Brasil.

^c Embrapa Florestas, Colombo-PR, Brasil.

^d Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Florianópolis-SC, Brasil.

^e Universidade Regional de Blumenau, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Blumenau-SC, Brasil.

**paganellcamila@gmail.com*

Recebido em 25 de Março de 2020. Aceito para publicação em 20 de Junho de 2020.

1. Introdução

2. Procedimento Experimental

2.1. Obtenção do material fúngico

2.2. Cultivo do micélio e preparo do inóculo fúngico

2.3. Extração do micélio

2.4. Análise das classes de metabólitos secundários

2.5. Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

2.6. Avaliação da atividade antibacteriana

2.7. Avaliação da atividade anticolinesterásica

2.8. Determinação da atividade antioxidante através da captação do radical livre DPPH

2.9. Avaliação da atividade inibitória da enzima alfa-glicosidase

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da atividade biológica

4. Conclusões

1. Introdução

A humanidade vem utilizando fungos por milênios, primeiramente como alimento, devido ao seu valor nutricional complementar às dietas habituais.¹⁻² Posteriormente, os fungos passaram também a ser usados com propósitos medicinais. Suas ações farmacológicas e terapêuticas capazes

de beneficiar a saúde humana são estudadas há anos.³⁻⁴ O filo basidiomycota é constituído por fungos do tipo filamentosos, septados e geralmente sapróbrios. A maior parte dos fungos comestíveis e venenosos se encontra nesse filo.⁵

A espécie *Tyromyces pulcherrimus* pertencente à família Polyporaceae, utiliza como substratos troncos em decomposição e no Brasil, possui ocorrência nos estados do Paraná e Rio Grande do

Sul.⁶ Poucos estudos sobre a investigação química do gênero *Tyromyces* sp. foram encontrados na literatura até a presente data. Um estudo de 2004, realizado por Quang e colaboradores, reportou o isolamento e a elucidação estrutural de um triterpeno, o ácido tiromícico, da espécie *Tyromyces albidus*.⁷ Mais tarde, a tiromicina A, um anidrido metilmaleico, foi isolada de *Tyromyces lacteus*, e foi avaliada como inibidora de leucina e cisteína aminopeptidase.⁸

Há um vasto potencial presente nas regiões tropicais e poucos estudos objetivando a descoberta de novos compostos produzidos por basidiomicetos, especialmente no Brasil. A maior parte das investigações se concentra nas espécies mais comuns, como os cogumelos comestíveis, cujas espécies são facilmente reconhecidas.⁹ Segundo Ozturk (2012), o desenvolvimento e utilização de antioxidantes mais eficazes e compostos anticolinesterásicos e antidiabéticos de origem natural são de grande interesse.¹⁰

Os cogumelos são reconhecidos pela diversidade de compostos bioativos produzidos de interesse industrial e comercial, capazes de atuar como antioxidantes naturais.¹¹⁻¹² O estresse oxidativo e o processo respiratório que ocorrem no organismo humano, resultam na formação de radicais livres, que são espécies quimicamente constituídas de um átomo ou associação de átomos, possuindo um ou mais elétrons não emparelhados. Devido a essa configuração, os radicais livres tornam-se moléculas com alta instabilidade, meia-vida curta e quimicamente muito reativas.¹³ Acredita-se que estes radicais livres estejam envolvidos com o aparecimento de mais de 50 doenças,¹⁴ dentre elas, a doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson (DP), *diabetes mellitus* (DM) e doenças cardiovasculares.¹⁵

A acetilcolina é um neurotransmissor colinérgico central e periférico. A atividade neuronal colinérgica reduzida é uma das características da DA, doença neurodegenerativa, que se caracteriza pelo comprometimento cognitivo e distúrbios comportamentais.¹⁶ As causas desta patologia não são totalmente conhecidas, mas o déficit de acetilcolina, acúmulo de peptídeo β -amiloide ou formação de emaranhados neurofibrilares, provenientes do excesso de hiperfosforilação da proteína *Tau* e distúrbios metabólicos são características típicas da DA. A abordagem terapêutica que tem se mostrado mais eficaz, até então, foi a

inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a acetilcolina, buscando melhorar o comportamento do paciente em termos de apatia, iniciativa e capacidade funcional.¹⁷

O DM é uma doença metabólica crônica grave, que ocorre quando o pâncreas não produz em quantidade suficiente o hormônio da insulina, ou quando o corpo não pode efetivamente utilizá-lo, aumentando significativamente o nível de glicose no sangue, resultando em um quadro de hiperglicemia.¹⁸ Dentre os recursos terapêuticos conhecidos para o controle do diabetes incluem a administração diária de insulina, aliada a uma dieta específica, atividade física regular e uso de hipoglicemiantes orais, como sulfuniluréias, metformina, biguanidas e inibidores da enzima alfa-glicosidase.¹⁹

Na literatura há poucos estudos sobre a espécie *Tyromyces pulcherrimus*, sendo assim, este trabalho foi realizado com o intuito de investigar a composição química desta espécie e suas potenciais atividades antibacteriana, anticolinesterásica, inibitória da enzima alfa-glicosidase e antioxidante frente ao radical livre DPPH.

2. Procedimento Experimental

2.1. Obtenção do material fúngico

O fungo *Tyromyces pulcherrimus* foi obtido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Florestas) e armazenado no Laboratório de Engenharia de Biomassas (LEBIO) localizado no Campus II da Universidade Regional de Blumenau (FURB). A espécie foi conservada na forma de discos e armazenada conforme o método de Castellani, descrita no trabalho de Diogo e colaboradores²⁰.

2.2. Cultivo do micélio e preparo do inóculo fúngico

O fungo *T. pulcherrimus* foi repicado em placas de Petri contendo 39 g L⁻¹ de meio de cultivo batata- dextrose ágar (BDA - Kasvi®) constituído de 20 g L⁻¹ de dextrose, 4 g L⁻¹ de infusão a partir de batatas (200 g) e 15 g L⁻¹ de ágar bacteriológico. Sobre a placa contendo o meio BDA colocou-se um "disco" de 0,5 cm contendo o micélio fúngico.

A placa foi mantida em estufa a 26°C por 15-20 dias até recobrimento total da placa pelo micélio. Posteriormente, quatro discos deste micélio fúngico (0,5 cm) foram retirados das placas e inseridos em frascos de vidro cilíndricos de 500 mL (135 mm x 86,5 mm) contendo 80 mL de meio líquido, constituído de extrato de malte esterilizado (1%) Kasvi®, peptona bacteriológica (0,1%) Kasvi® e batata-dextrose ágar (BDA - 3,9%) Himedia®. Os frascos contendo o meio líquido foram vedados com tampa de metal perfurada com furo central e armazenados em estufa a 26 °C por 30 dias. No total foram cultivados 20 frascos nas condições e meio de cultivo acima descritos. Após a incubação, o micélio foi separado do caldo de cultivo por técnica de filtração a vácuo.²¹

2.3. Extração do micélio

Após filtração do meio de cultivo colonizado, o micélio foi separado, congelado e liofilizado. O micélio desidratado foi pesado para cálculo do rendimento, moído e após, foi macerado sob agitação por 24 horas em acetato de etila, na proporção de 1:50 (massa de amostra: solvente). O extrato fúngico foi filtrado e o solvente foi retirado sob pressão reduzida em rotaevaporador (50° C).

2.4. Análise das classes de metabólitos secundários

Com o propósito de identificar as classes de compostos presentes no extrato acetato de etila do micélio de *T. pulcherrimus*, foram realizados ensaios em placas de cromatografia em camada

delgada (CCD), de acordo com a metodologia descrita por Pompilho *et al.* (2014)²² e por Siqueira *et al* (2003)²³, conforme a tabela 1.

2.5. Quantificação dos compostos fenólicos por HPLC-ESI-MS/MS

Para a quantificação dos compostos fenólicos no extrato do fungo foi realizada a análise por HPLC-ESI-MS/MS no LABEC/INCT-Catálise na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Florianópolis, de acordo com a metodologia de Schulz *et al.* (2015).²⁴ A análise foi realizada em um cromatógrafo Agilent® 1200, com uma coluna C18 Phenomenex® (150 mm x 2 mm, 4 µm) e a temperatura da coluna ajustada em 30 °C. O eluente foi formado por uma mistura de solventes A (MeOH:H₂O na proporção de 95:5, v/v) e B (H₂O:ácido fórmico 0,1%) da seguinte forma: 1^ª fase – 10% de solvente A e 90% de B (modo isocrático) durante 5 minutos; 2^º estágio - gradiente linear de solventes A e B (de 10 a 90% de A) durante 2 minutos; 3^º estágio – 90% de solvente A e 10% de B (modo isocrático) durante 3 minutos; 4^º estágio - gradiente linear de solventes A e B (de 90 a 10% de A) por 7 minutos com taxa de fluxo de 250 µL min⁻¹ para a fase móvel. Em todas as análises o volume injetado foi de 5 µL.

O cromatógrafo líquido foi acoplado a um espectrômetro de massas Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, EUA) com fonte de ionização por electrospray usando o modo positivo de ionização com os seguintes parâmetros da fonte: interface íon-spray a 400 °C; voltagem íon-spray de 4.500 V; curtain gas, 10 psi; gás de nebulização, 45 psi; gás auxiliar, 45

Tabela 1. Análise das classes de compostos do extrato acetato de etila do fungo *T. pulcherrimus*

Classe de compostos	Fase móvel	Revelador
Alcaloides	Acetato de etila – metanol - água (100:14:10)	Reagente de Dragendorff
Antraquinonas	Acetato de etila – metanol - água (100:17:13)	Solução KOH 5% em etanol
Cardiotônicos	Acetato de etila – metanol – água (81:11:8)	Reagente de Kedde
Cumarinas	Ácido acético - tolueno – éter dietílico-água (50:25:25:5)	Solução KOH 5% em etanol
Flavonoides	Acetato de etila-ácido-fórmico - ácido acético - água (55:5:5:1)	Solução AlCl3 5% em etanol
Fenóis	Tolueno-butanol-ácido acético (80:40:16)	Reagente de Barton
Saponinas	Clorofórmio-ácido acético glacial- metanol-água (15:8:3:2)	Anisaldeído sulfúrico
Lipídios ¹	Hexano - acetato de etila*	Rodamina B

Fonte: Pompilho *et al.*, (2014), com exceção de ¹ Siqueira *et al.*, (2003); *dados do autor

psi; gás de colisão, médio. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para o registro e tratamento dos dados. Os pares de íons foram monitorados no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

Para a identificação dos compostos, 47 padrões de compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzoico, 4-metil-umbeliferona, ácido 4-hidroximetilbenzoico, ácido *p*-anísico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido síringico, ácido vanílico, apigenina, aromadendrina, carnosol, catequina, crisina, coniferaldeído, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina-galato, eriodictiol, escopoletina, fustina, galangina, hispidulina, isoquercetrina, canferol, miricetrina, naringenina, naringina, pinocembrina, ácido protocatecuico, quercetina, resveratrol, rutina, sinapaldeído, siringaldeído, taxifolina, umbeliferona e vanilina) dissolvidos em metanol (1 mg L⁻¹) foram analisados nas mesmas condições descritas acima. Para as análises quantitativas dos compostos identificados, a área de cada pico foi interpolada em uma curva de calibração realizada com os padrões identificados (0,02 a 6 mg L⁻¹, 19 pontos, R² > 0,98). As injeções foram realizadas em duplicata.

2.6. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), pelo método de microdiluição em caldo, com placas de 96 micropoços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).²⁵

O extrato do micélio fúngico foi diluído a 40 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO). Nos poços da fileira A da microplaca foram inseridos 190 µL de caldo Mueller-Hinton (MH) e mais 10 µL do extrato, em seguida transferidos 100 µL para os poços adjacentes, os quais já continham 100 µL do caldo (MH) com o objetivo de obter diluição seriada de ordem dois. O inóculo bacteriano foi adicionado (10 µL) em cada micropoço. Alguns poços da microplaca foram reservados para a

realização do controle negativo [caldo (MH) + DMSO + inóculo bacteriano], controle de crescimento [caldo (MH) + inóculo bacteriano] e para o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, em concentrações variando de 40 a 0,31 µg mL⁻¹.

2.7. Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi determinada *in vitro* através do método descrito por Mata *et al.* (2007).²⁶ A solução do micélio fúngico foi preparada em metanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Em cada tubo de ensaio foram adicionados 320 µL de Tampão Tris-HCl (pH 8), 100 µL de amostra e 20 µL de solução de enzima acetilcolinesterase (0,28 U mL⁻¹), incubados em temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 70 µL de solução de iodeto de acetiltiocolina (0,023 mg mL⁻¹) e 470 µL de Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditriobis (2-nitrobenzóico)). Depois de homogeneizados, os tubos de ensaio foram incubados ao abrigo de luz durante 30 minutos.

A atividade enzimática foi medida através da hidrólise da acetiltiocolina, monitorada pela formação de um produto de coloração amarela, medido através da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis a 405 nm. Foi preparada uma solução em branco, contendo somente o extrato diluído em metanol (1 mg mL⁻¹) para eliminação da interferência. O controle negativo foi preparado substituindo a amostra pelo solvente metanol. Como controle positivo, preparou-se uma solução de brometo de neostigmina, dissolvido em metanol (0,1 mg mL⁻¹).

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase foi calculada através da equação:

$$I\% = 100 - \frac{(Abs_{\text{Amostra}} - Abs_{\text{Branco}}) \times 100}{Abs_{\text{Controle negativo}}}$$

2.8. Determinação da atividade antioxidante através da captação do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenilpicril-hidrazil), foi baseada no método descrito por Cavin *et al.* (1998).²⁷ Uma solução de DPPH 0,004% foi

adicionada à solução do extrato fúngico dissolvido em metanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Após 30 minutos, as absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. O resultado foi expresso em % de inibição da descoloração do controle sem a presença da amostra. Foi preparada uma solução em branco, contendo somente a amostra em metanol (1 mg mL⁻¹) para eliminação da interferência. Como controle negativo foi utilizada a solução de DPPH 0,004% e o solvente metanol (1 mg mL⁻¹). O controle positivo foi utilizado o ácido gálico, diluído em metanol na mesma concentração da amostra (1 mg mL⁻¹).

2.9. Avaliação da atividade inibitória da enzima alfa-glicosidase

O ensaio de inibição da alfa-glicosidase foi realizado conforme descrito por Kim, Wang e Rhee (2004).²⁸ Uma alíquota de 50 µL de solução da enzima α-glicosidase (1 U mL⁻¹) foi pré misturada com a solução do extrato fúngico, dissolvido em metanol (1 mg mL⁻¹), seguido da adição de 570 µL de tampão fosfato de potássio pH 6,8 (0,1 mol L⁻¹). O controle negativo foi preparado da mesma forma descrita acima, no entanto a amostra foi substituída por metanol. Para a eliminação da interferência da amostra, foi preparado um tubo branco de cada amostra, contendo apenas a solução amostra juntamente com o tampão. A acarbose foi utilizada como controle positivo (0,4 mg mL⁻¹, em metanol). Depois da incubação por 37,5 °C por 20 minutos, 10 µL de *p*-nitrofenil-α-D - glicopiranosídeo (pNPG, 10 mmol L⁻¹) foi adicionado como substrato e a reação teve início. A mistura foi incubada durante 30 minutos em

banho-maria a 37,5 °C, seguida da adição de 650 µL de solução de Na₂CO₃ 1 mol L⁻¹ para o término da reação. A quantidade de *p*-nitro-fenol formada foi medida a 410 nm para a estimativa da atividade enzimática.

O cálculo da atividade inibitória foi realizado como segue:

$$I\% = 100 - \frac{(Abs_{Amostra} - Abs_{Branco}) \times 100}{Abs_{Controle\ negativo}}$$

3. Resultados e Discussão

O cultivo por submersão é considerado um método apropriado para crescimento de biomassa fúngica²⁹, decorrente da facilidade na separação do meio de cultivo. Análises da fisiologia e das propriedades bioquímicas do micélio fúngico também são favorecidas quando em cultivos submersos.

Após 30 dias de cultivo em sistema submerso, foram obtidos 2,9967 g de micélio liofilizado. O extrato fúngico obtido após a maceração com o solvente acetato de etila rendeu aproximadamente 80 mg, o equivalente a 2,66% em relação ao micélio liofilizado.

A análise das classes dos metabólitos do fungo *T. pulcherrimus* através de cromatografia em camada delgada detectou a presença de flavonóides, fenóis e lipídios, conforme tabela 2.

Em relação a análise das classes de metabólitos determinadas, este é o primeiro relato de estudo químico para esta espécie. Um estudo publicado por Mohanta (2020)³⁰, afirma que até outubro de 2015, havia 136 trabalhos relatando a presença de flavonoides e fenois em espécies de fungos. Compostos como rutina e catequina

Tabela 2. Classes de compostos detectados no extrato fúngico de *T. pulcherrimus*

Classe de compostos	Resultado
Alcaloides	ND
Antraquinonas	ND
Cardiotônicos	ND
Cumarinas	ND
Flavonoides	D
Fenóis	D
Saponinas	ND
Lipídios	D

D = detectado; ND = não detectado

foram identificados em *Tuber melanosporum* e *Pleurotus ostreatus*³¹ e hesperidina, naringenina, kaempferol e apigenina foram identificados em *Terfezia boudieri* Chatin, *Boletus edulis* e *Lactarius volemus*³², sendo que a espécie *B. edulis* mostrou alta capacidade antioxidante vinculada a presença destes compostos.

Outra classe de compostos bastante presente em corpos de frutificação de basidiomicetos são os lipídeos. Segundo Dulay³³, aproximadamente 5,7% do peso seco dos cogumelos correspondem às substâncias oleosas, dentre elas os óleos, terpenoides, esteroides e ácidos graxos, com grande potencial farmacológico.

Em relação à identificação e quantificação de compostos utilizando metodologia hifena HPLC-ESI-MS/MS, o cromatograma do extrato do micélio de *T. pulcherrimus* foi comparado frente à 47 padrões de compostos fenólicos disponíveis no laboratório. A espectrometria de massa sequencial tornou-se uma análise de identificação e confirmação, na qual o monitoramento de fragmentos garante grande discriminação comparada ao uso de um único estágio (MS).³⁴ Através desta análise, foi possível a identificação de apenas um composto em comparação aos padrões, o ácido elágico, na concentração de $4,55 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$. Apesar desta metodologia ser de alta sensibilidade, o número de padrões disponíveis não contempla toda a diversidade da composição química deste extrato. Sendo assim, o composto identificado não reflete totalmente a ausência de compostos fenólicos adicionais, e de outras classes presentes que não tenham sido detectados e quantificados pela ausência de padrões disponíveis. O ácido gálico já foi previamente identificado em outras espécies de

cogumelos, como nos corpos de frutificação de *Pleurotus eryngii* coletado na China.³⁵

3.1. Avaliação da atividade biológica

Os resultados de atividade biológica obtidos para *T. pulcherrimus* estão mostrados na tabela 3. Em relação à atividade antibacteriana, observa-se que contra *P. aeruginosa* o extrato demonstrou atividade fraca e frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* não houve atividade antibacteriana.

O potencial antibacteriano dos basidiomicetos foi investigado pela primeira vez por Anchel *et al* (1941), que examinou os extratos dos corpos de frutificação e do micélio de mais de 2 mil espécies.³⁶ Desde então, estudos vêm sendo publicados para outras classes de fungos. Apenas uma espécie do gênero *Tyromyces* já foi testada com vistas a verificar seu potencial antimicrobiano. O extrato acetato de etila da espécie *T. duracinus* mostrou importante atividade quando testado contra *Staphylococcus saprophyticus*³⁷.

Na atividade anticolinesterásica, o extrato apresentou $99,0 \pm 0,1\%$ de inibição, um resultado considerado promissor. Esta atividade pode ser atribuída, ao menos em parte, às classes de metabólitos secundários detectados através da cromatografia em camada delgada no extrato fúngico, como fenóis, flavonoides e lipídios, já que, existem estudos que atribuem a atividade anticolinesterásica algumas destas classes de compostos, como por exemplo os flavonoides.³⁸ Compostos como a rutina³⁹ e quercetina⁴⁰ já demonstraram efeito inibidores diferentes isoformas das enzimas colinesterase. Outras espécies fúngicas já apresentaram atividade

Tabela 3. Atividades biológicas do extrato fúngico de *T. pulcherrimus*

Atividade	Resultado	Controle positivo
Anticolinesterásica (Inibição%)	$99,00 \pm 0,1$	$99,9 \pm 0,3^a$
Inibitória da enzima alfa-glicosidase (Inibição%)	$15,19 \pm 0,52$	$50,1 \pm 0,8^b$
Antioxidante (DPPH) (Inibição%)	$18,18 \pm 0,04$	100% ^c
Antibacteriana (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
<i>S. aureus</i>	>1000	0,3125 ^d
<i>E. coli</i>	>1000	0,3125 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	1000	0,3125 ^d

^a Controle positivo: brometo de neostigmina ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$); ^b Controle positivo: acarbose ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$);

^c Controle positivo: ácido gálico (1 mg mL^{-1}); ^d Controle positivo: gentamicina.

de inibição da enzima acetilcolinesterase, como espécies da família Ganodermataceae, *Amauroderma amoiensis* e *Ganoderma tropicum*.⁴¹

A atividade inibitória da enzima alfa-glicosidase do extrato fúngico (tabela 3) foi considerada baixa para este ensaio. A atividade enzimática da alfa-glicosidase foi determinada através da estimativa do *p*-nitrofenol (*p*NP) formado a partir do *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NPG). Este ensaio é baseado na determinação da hidrólise contínua do *p*NPG em *p*NP, onde a formação do *p*NP produz uma coloração amarela dependente de Na_2CO_3 , que pode ser medida em espectrofômetro a 410 nm.²⁸ Outros extratos e metabólitos secundários de cogumelos, como *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus* e *Coriolus versicolor*, já mostraram efeito hipoglicemiante,⁴² como visto no estudo realizado por Artanti *et al.* (2011), onde foram testadas espécies de fungos endofíticos para avaliar seu potencial inibidor da alfa-glicosidase, com resultados promissores para oito espécies de micélio fúngico.⁴³ Um estudo feito com o basidiomiceto *Sarcodon leucopus* mostrou que alguns dos seus metabólitos, como o Sarcoviolina β , mostraram forte inibição desta enzima. O número de grupos hidroxílicos fenólicos nas estruturas contribuiu para a atividade inibitória da alfa-glicosidase.⁴⁴

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através da captação de radical livre (DPPH). A atividade descrita na tabela 3 apresentou resultado insatisfatório para o extrato testado, com inibição de $18,18 \pm 0,04\%$ na concentração de 1 mg mL^{-1} .

O ácido elágico (figura 1) demonstrou, em estudos anteriores, potenciais atividades

antibacteriana, antitumoral⁴⁵, antioxidante⁴⁶ e inibitória da alfa-glicosidase e acetilcolinesterase. Para a enzima alfa-glicosidase, o ácido elágico apresentou uma elevada inibição, com uma IC_{50} de $2,18 \text{ mg mL}^{-1}$.⁴⁷ Pode ainda atuar como potente inibidor da tirosinase e acetilcolinesterase, além de possuir efeito neuroprotetor e ter um importante papel na patogênese da doença de Alzheimer.⁴⁸

Tem se investigado a habilidade do ácido elágico em inibir o crescimento de patógenos em humanos, provavelmente por acoplar-se à proteína na parede das bactérias, como *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Salmonella*.⁴⁹

4. Conclusões

Este trabalho é o primeiro relato da composição química e atividade biológica do fungo *T. pulcherrimus*, que revelou a presença das classes de metabólitos como os fenóis, flavonoides e lipídios identificados através de CCD, que podem ter auxiliado na forte atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase. Em relação à identificação das substâncias, apenas um composto fenólico, o ácido elágico, pode ser identificado dentre os padrões utilizados. Sendo assim, acredita-se ser fundamental a realização futura de novos ensaios biológicos e a possível caracterização de outros compostos presentes e responsáveis pelas atividades do fungo *T. pulcherrimus*. Ainda, este trabalho contribuiu para a compreensão das propriedades químicas do gênero *Tyromyces* auxiliando na busca por novos compostos biologicamente ativos.

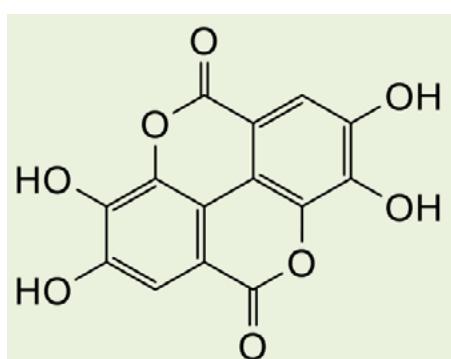


Figura 1. Estrutura molecular do ácido elágico

Referências Bibliográficas

- ¹ Valverde, M. E.; Hernández-Pérez, T; Paredes-López, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology* **2015**, ID 376387. [\[CrossRef\]](#)
- ² Jaworska, G.; Pogon, K.; Emilia Bernas, E.; Duda-Chodak, A. Nutraceuticals and antioxidant activity of prepared for consumption commercial mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Food Quality* **2015**, 38, 111. [\[CrossRef\]](#)
- ³ Lenzi, J.; Costa, T. M.; Alberton, A. D.; Goulart, J. A. G.; Tavares, L. B. B. Medicinal fungi: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2018**, 102, 5791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴ Costa, T. M.; Mayer, D. A.; Siebert, D. A.; Micke, G. A.; Alberton, M. D.; Tavares, L. B. B.; Oliveira, D. Kinetics analysis of the inhibitory effects of alpha-glucosidase and identification of compounds from *Ganoderma lipsiense* mycelium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2020**, 190, 996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁵ Coelho, M. A.; Bakkerenb, G.; Sunc, S.; Hoodd, M. E.; Giraude, T. Fungal Sex: The Basidiomycota. *Microbiology Spectrum* **2017**, 5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶ Westphalen, M.C.; *Tese de doutorado*, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016. [\[Link\]](#)
- ⁷ Quang, D. N.; Toshihiro, H.; Tanaka, M.; Shigeru, T.; Yoshinori, A. Tyromycic acids B-E, new lanostane triterpenoids from the mushroom *Tyromyces fissilis*. *Journal of Natural Products* **2004**, 67, 148. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Weber, W.; Semar, M.; Anke, T.; Bross, M.; Steglich, W. Tyromycin A: A novel inhibitor of leucine and cysteine aminopeptidases from *Tyromyces lacteus*. *Planta Medica* 1992, 58, 56. [\[CrossRef\]](#)
- ⁹ Lima, M. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, 2009. [\[Link\]](#)
- ¹⁰ Ozturk, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry* **2012**, 134, 48. [\[CrossRef\]](#)
- ¹¹ Huber, K.; Queiroz, J. H.; Moreira, A. V. B.; Ribeiro, S. M. R. Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga Ubá (*Mangifera indica* L.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* **2012**, 6, 640. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Oliveira, O. M. M. F.; Velloso, J. C. R.; Fernandes, A. S.; Buffa-Filho, W.; Hakime-Silva, R. A.; Furlan, M.; Brunetti, I. L. Antioxidant activity of *Agaricus blazei*. *Fitoterapia*, **2007**, 78, 263. [\[CrossRef\]](#)
- ¹³ Liochev, S. I. Free Radicals: How Do We Stand Them? Anaerobic and Aerobic Free Radical (Chain) Reactions Involved in the Use of Fluorogenic Probes and in Biological Systems. *Medical Principles and Practice* **2014**, 23, 195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁴ Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* **2007**, 30, 1323. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁵ Sikora, E.; Cieslik, E.; Leszczynska, T.; Filipiak-Florkiewicz, A.; Pisulewski, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry* **2008**, 107, 50. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁶ Fotiou, D.; Kaltsatou, A.; Tsitsios, D.; Nakou, M. Evaluation of the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease with neuropsychological methods. *Aging Clinical and Experimental Research* **2015**, 27, 727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁷ Falco, A.; Cukierman, D. S.; Hauser-Davis, R. A.; Rey, N. A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*, **2016**, 39, 63. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Dominguez, C.; Ruiz, E.; Gussinye, M.; Carrascosa, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* **1998**, 21, 1736. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁹ Araújo, L. M. B.; Britto, M. M. S.; Cruz, T. R. P. Tratamento do *Diabetes Mellitus* do Tipo 2: Novas Opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **2000**, 44, 509. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁰ Diogo, H. C.; Sarpieri, A.; Pires, M. C. Fungi preservation in distilled water. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **2005**, 80, 591. [\[CrossRef\]](#)
- ²¹ Costa, T. M.; Kaufmann, V.; Paganelli, C. J.; Siebert, D. A.; Micke, G. A.; Alberton, M. D.; Tavares, L. B. B.; Oliveira, D. Kinetic identification of phenolic compounds and potential production of caffeic acid by *Ganoderma lipsiense* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2019**, 42, 1325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²² Pompilho, W. M.; Marcondes, H. C.; Oliveira, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2014**, 16, 473. [\[CrossRef\]](#)

- ²³ Siqueira, A. J. S.; Siqueira; B. A. Introdução à cromatografia com ênfase em material biológico, EDIPUCRS: Porto Alegre, 2003.
- ²⁴ Schulz, M.; Campelo, G. S.; Gonzaga, L. V.; Seraglio, S. K. T.; Olivo, I. S.; Azevedo, M. S.; Nehring, P.; Gois, J. S.; Almeida, T. S.; Vitali, L.; Spudeit, D. A.; Micke, G. A.; Borges, D. I. G.; Fett, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International* **2015**, 77. 125. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁵ CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* **2012**, 32, 184. [\[Link\]](#)
- ²⁶ Mata, A. T.; Proença, C.; Ferreira, A. R.; Serralheiro, M. L. M.; Nogueira, J. M. F.; Araújo, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* **2007**, 103. 778. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁷ Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica* **1998**, 64. 393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁸ Kim, Y. M.; Wang, M. H.; Rhee, H. I. A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research* **2004**, 339. 715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ²⁹ Elisashvili, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **2012**, 14. 211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁰ Mohanta, T. P. Fungi contain genes associated with flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of Functional Foods* **2020**, 68. 103910. [\[CrossRef\]](#)
- ³¹ Vamanu, E.; Sultana, N. Biological activity of fluidized bed ethanol extracts from several edible mushrooms. *Food Science and Biotechnology* **2014**, 23, 1483. [\[CrossRef\]](#)
- ³² Özyürek, M.; Bener, M.; Güçlü K.; Apak, R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food Chemistry* **2014**, 157, 323. [\[CrossRef\]](#)
- ³³ Dulay, R. M. R; Ray, K.; Hou, C. T. Optimization of liquid culture conditions of Philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2015**, 4, 409. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁴ Oshita, D.; Jardim, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. *Química Nova* **2015**, 38, 1273. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁵ Hu, Q.; Yuan, B.; Xiao, H.; Zhao, L.; Wu, X.; Rakariyatham, K.; Zhong, L. Han, Y.; Kimatub, B.M.; Yang, M. Polyphenols-rich extract from *Pleurotus eryngii* with growth inhibitory of HCT116 colon cancer cells and anti-inflammatory function in RAW264.7 cells. *Food & Function* **2018**, 9, 1601. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁶ Sandven, P. Epidemiology of canidemias. *Revista Iberoamericana de Micología* **2000**, 17. 73. [\[Link\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁷ Rosa, L. H.; Machado, K. M. G.; Jacob, C. C.; Capelari, M.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2003**, 98. 967. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁸ Einbond, L. S.; Reynertson, K. A.; Luo, X. D.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **2004**, 84. 23. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁹ Anesti, M; Stavropoulou, N; Atsopardi, K; Lamari, FN; Panagopoulos, N. T.; Margarity, M. Effect of rutin on anxiety-like behavior and activity of acetylcholinesterase isoforms in specific brain regions of pentylenetetrazol-treated mice. *Epilepsy & Behavior* **2020**, 102, 106632. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁰ Ademosun, A. O.; Oboh, G.; Bello, F.; Ayeni, P. O. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **2016**, 21, NP11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴¹ Hu, L. L.; Ma, Q. Y.; Huang, S. Z.; Guo, Z. K.; Ma, H. X.; Guo, J. C.; Dai, H. F.; Zhao, Y. X. Three new lanostanoid triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2013**, 4. 357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴² Su, C. H.; Lu, T. M.; Lai, M. N.; Ng, L. T. Inhibitory potential of *Grifola frondosa* bioactive fractions on α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2013**, 60. 446. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴³ Artanti, N.; Tachibana, S., Kardono, L. B.; Sukiman, H. Screening of endophytic fungi having ability for antioxidative and α – glucosidase inhibitor activities isolated from *Taxus sumatrana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2011**, 14. 1019. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

- ⁴⁴ Ma, K.; Han, J.; Bao, L.; Wei, T.; Liu, H. Two Sarcoviolins with Antioxidative and α -Glucosidase Inhibitory Activity from the Edible Mushroom *Sarcodon leucopus* Collected in Tibet. *Journal of Natural Products* **2014**, 77, 942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁵ Gontijo, D. C.; Gontijo, P. C.; Brandão, G. C.; Diaz, M. A. N.; Oliveira, A. B.; Fietto, L. G.; Leite, J. P. V. Antioxidant study indicative of antibacterial and antimutagenic activities of an ellagitannin-rich aqueous extract from the leaves of *Miconia latecrenata*. *Journal of Ethnopharmacology* **2019**, 236, 114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁶ Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods* **2015**, 18, 820. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁷ You, Q.; Chen, F.; Wang, X.; Jiang, Y.; Lin, S. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *Food Science and Technology* **2012**, 46, 164. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁸ Neagu, E.; Paun, G.; Albu, C.; Radu, G. L.; Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgari* and *Filipendula ulmaria* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2015**, 52, 1. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁹ Sepúlveda, L.; Ascacio, A.; Herrera, R. R.; Carbó, A. A.; Aguilar, C. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology* **2011**, 10, 4518. [\[CrossRef\]](#)