

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Título do Projeto de Tese: **Fungos poroides (Ganodermataceae, Basidiomycota) em áreas de Mata Atlântica e Pampa: Contribuição ao conhecimento de sua diversidade e potencial farmacológico.**

Doutoranda: Viviane de Oliveira Garcia

Orientadora: Dra. Rosa Mara Borges da Silveira / Departamento de Botânica / UFRGS

Co-orientadora: Dra. Mirian Salvador / Universidade de Caxias do Sul (UCS)

1 INTRODUÇÃO

Fungos são consagrados pelo uso popular e utilizados há mais de 2000 anos pelos adeptos da Medicina Tradicional na China, Japão, Taiwan e outras regiões asiáticas (Shiao, 2003). Dentre eles o complexo *Ganoderma lucidum* (Ganodermataceae), da ordem Polyporales, tem chamado atenção da comunidade científica e mais de 270 patentes e artigos são registrados (Bojana, B., 2013). *G. lucidum* está consagrado por seu uso como imunomodulador e antitumoral (Mizuno *et al.*, 1995, Zhou e Gao, 2002, Liua *et al.*, , 2002, Lee *et al.*, 2003, Gao e Zhou, 2004, Yue-Qing *et al.*, 2005, Dudhgaonkar, Thyagarajan, Sliva, 2009, Ferreira *et al.*, 2010, Welti *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2012, Suarez-Arroyo *et al.*, 2013, Cör, *et al.*, 2014, Chien *et al.*, 2015, Cail *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2016, Kao *et al.*, 2016).

Puttaraju *et al.* (2006), avaliaram o conteúdo fenólico de cogumelos selvagens por HPLC e concluíram que diferentes tipos de ácidos fenólicos estão presentes. O teor de compostos fenólicos em extratos de fungos do gênero *Ganoderma* explicam sua atividade como antioxidante (Mau *et al.*, 2005a, 2005b, Bhardwaj *et al.*, 2016, Lee *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo causa dano em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA resultando em fator de risco para neoplasias (Liu, 2004). Os compostos fenólicos incluem diferentes subclasses (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas, taninos, polifenóis oxidados) sendo que, no Reino Fungi, os mais comuns são os ácidos fenólicos. Existem muitos artigos relatando a determinação de fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu. Estes compostos são hidroxilados aromáticos, possuindo um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila, alguns dos quais estão entre as mais potentes substâncias bioativas terapeuticamente úteis (Liu, 2004, Keles *et al.*, 2011). Além dos ácidos fenólicos, os terpenos, como triterpenos e meroterpenos,

são importantes constituintes relacionados à atividade antitumoral e antioxidante em espécies de Ganodermataceae (Yue *et al.*, 2010, Cheng *et al.*, 2010, Cheng e Silva, 2015, Ruan, Wei e Popovich, 2015, Peng *et al.*, 2016, Shao *et al.*, 2016).

Estudos avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de triterpenos extraídos de *G. lucidum* no Sul da Índia (Smina *et al.*, 2011a) e revelaram que são potentes antioxidantes, sendo eficazes na eliminação de radicais livres superóxido, peróxido, ensaio com DPPH e ABTS, além de apresentarem capacidade antioxidantes do superóxido dismutase, contribuindo para a prevenção da peroxidação lipídica, *in vitro*. Nos ensaios *in vivo* (30 dias, em ratos), demonstraram melhorar a capacidade antioxidante de enzimas endógenas (dismutase, catalase e glutathione peroxidase). Em estudos hematotoxicológicos para determinar os efeitos adversos no tecido hematopoiético, níveis de marcadores renal e hepáticos, foi comprovado que os triterpenos são desprovidos de toxicidade detectável (Smina *et al.*, 2011a). Em outro trabalho, os triterpenos totais atuaram na proteção do dano ao DNA por radiação, em linfócitos esplênicos e os ensaios utilizados foram o ensaio cometa, ensaio de DNA ladder e citometria de fluxo (Smina *et al.*, 2001b).

O ensaio cometa é um método muito sensível e altamente eficaz para a detecção de quebras no DNA em células de mamíferos, *in vitro* e *in vivo*. Através desta técnica é possível a avaliação de dano e de reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes, empregando-se amostras celulares extremamente pequenas. A proteção contra danos ao DNA induzidos pela radiação de esplenócitos foi avaliada por análise dos seguintes parâmetros: % cauda de DNA, o comprimento da cauda, momento da cauda e momento de cauda de Olive (produto da percentagem de DNA na cauda pelo comprimento da cauda) (Olive *et al.*, 1992). A irradiação causou um aumento destes parâmetros (indicando danos ao DNA), enquanto o extrato de triterpenos total de *G. lucidum* foi protetor. A atividade de enzimas antioxidantes endógenas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase) em linfócito esplênicos irradiados foi avaliada na presença e na ausência do extrato de triterpenos totais e mostrou atividade aumentada com tratamento de 100 g/ml deste extrato. Estresses ambientais, incluindo as radiações ionizantes e a consequente geração de espécies reativas, conduzem à ativação de muitas rotas apoptóticas. Esplenócitos irradiados, pré-tratados com triterpenos totais, não mostraram fragmentação de DNA, indicando a ausência de apoptose (Smina, *et al.* 2011b).

Apesar do comércio já institucionalizado nas últimas duas décadas com a espécie *G. lucidum*, evidências têm demonstrado, que mesmo as espécies cultivadas e comercializadas como “*G. lucidum*” apresentam problemas na identificação correta e

que há equívocos que geram confusões nos resultados das pesquisas farmacológicas e nos ensaios clínicos (Moncalvo *et al.*, 1995; Cao *et al.* 2012; Wang *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2015; Kwon, *et al.*, 2016). Os componentes bioativos pertencentes a estas espécies incluem polissacarídeos, triterpenos, proteínas de baixo peso molecular, esteróis, entre outros, com cerca de 400 biocompostos identificados (Zhou, 2007, Chen, *et al.*, 2012).

Cao *et al.* (2012) demonstraram através de análise filogenética de *G. lucidum*, que os espécimes asiáticos eram o *Ganoderma lingzhi*, espécie não coespecífica do europeu *G. lucidum*. Hennicke *et al.* (2016) confirmaram que o *G. lingzhi* diferencia-se do *G. lucidum* estrito senso por aspectos morfológicos e pela maior quantidade de triterpenos, o que lhe garante superioridade em termos de compostos bioativos. *Ganoderma lucidum* não é erroneamente reportado somente na Ásia, mas no mundo inteiro (Zhou *et al.*, 2015, Kwon *et al.*, 2016). No Brasil (representante da maior biodiversidade do planeta, Calixto, 2003), o Catálogo de Plantas e Fungos (2010) confirma a presença de 91 gêneros de Polyporales, dentre eles, 22 espécies são descritas como do gênero *Ganoderma*. Nos Estados brasileiros foram relatados espécies do complexo *G. lucidum* (Forzza, 2010) e segundo a Flora do Brasil, há registros de *G. lucidum* em todo o país.

Em vista disto, o presente trabalho pretende ampliar o conhecimento sobre a família Ganodermataceae no Brasil e avaliar seu potencial farmacológico contra o câncer através de experimentos laboratoriais e análise química dos extratos, bem como realizar a identificação correta das espécies coletadas no país.

1.2 Caracterização da família Ganodermataceae e do gênero Ganoderma P. Karst.

Pertencente ao Reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, a família Ganodermataceae foi introduzida por Donk (1948). Existem cinco gêneros aceitos atualmente: *Amauroderma* Murrill 1905 (com cerca de 30 espécies (Kirk *et al.*, 2008); *Haddowia* Steyaert 1972 (com 3 espécies); *Humphreya* Steyaert 1972 (gênero com 4 espécies); *Polyporopsis* Audet 2010 (representado por uma única espécie) e *Ganoderma* P. Karst. 1881. O gênero *Ganoderma* varia em número de espécies conforme a fonte: Ryvarden (1991), declarou que havia mais de 250 espécies; em 1997, Moncalvo e Ryvarden afirmaram se tratar de 217 espécies (Elfvingia e *Ganoderma* combinados), sendo que destes, 69 eram tratados como sinônimos); em 2003, Smith e Sivasithamparam, reportaram 214 espécies; em 2008, Kirk apresentou 80

espécies (Kirk, 2008), no Index Fungorum consta 428 nomes de espécies; a base de dados Mycobank menciona 420 espécies (Richter, 2015).

Donk (1948) segregou a família Ganodermataceae separadamente de políporos, baseando-se na coloração e morfologia dos esporos. Outros autores, por exemplo, Steyaert (1972) e Corner (1983), adicionaram gêneros, subgêneros e novas espécies. Estudos recentes empregaram métodos de filogenética molecular e lançaram nova luz no parentesco dos fungos. Mesmo assim, afinidades entre *Ganoderma* e outros gêneros de Polyporales precisam de melhores esclarecimentos (Hong e Jung 2004).

A família Ganodermataceae contém espécies de basidiomas perenes e sazonais, estipitados a pileados, de píleo velutino a glabro, amarelo, marrom, bege ou preto, opaco ou brilhante, geralmente sulcado com ou sem uma cutícula; o estipe, se presente, é arredondado ou achatado, opaco a brilhante e usualmente, com cutícula; a superfície dos poros é esbranquiçada quando em crescimento ativo, tornando-se ocráceo a escuro com o envelhecimento; os poros geralmente pequenos, raros os de tamanho médio; os tubos são estratificados; o contexto é marrom escuro a amadeirado, duplo ou com várias bandas ou zonas. O sistema hifal é di ou trimítico, hifas generativas com fíbulas, difíceis de serem encontradas; a cutícula, em muitas espécies se constitui de hifas generativas unicelulares curtas e coloridas de paredes espessas, onde dificilmente se observam fíbulas; hifas esqueléticas estão presentes em todas as espécies quer sejam ramificadas ou arboriformes com um longo segmento mais inferior não ramificado e uma parte superior ramificada; hifas ligadoras próprias aparentemente não estão presentes, mas hifas similares, finas e ramificadas preenchem poros velhos; cistídios são ausentes; basídios com 4 esterigmas e em forma de barril; basidiósporos tem parede dupla (há uma única exceção), no qual a parede interna é verrucosa a ornamentada, engrossada e colorida e a parede externa é fina e hialina. Ocorrem no chão ou na madeira morta com forte podridão branca. São cosmopolitas e apresentam pequeno número de gêneros. O gênero tipo é o *Ganoderma* P. Kartsten (1881) (Donk, 1948).

O gênero *Ganoderma* é um grupo de fungos degradadores de madeira com grandes basidiomas. A pesquisa por “*Ganoderma*” no Index Fungorum reporta a 428 espécies, incluindo sinônimos. Estudos taxonômicos reportam mais de 300 espécies do gênero, sendo que a maior parte delas está distribuída em regiões tropicais (Richter *et al.*, 2015; Seo e Kirk, 2000).

De acordo com Ryvarden (2004), o gênero *Ganoderma* tem as seguintes características: basidioma anual ou perene, estipitado a séssil, píleo com uma cutícula

espessa opaca ou brilhante e lacada com uma fina cutícula ou cutícula de células finais clavadas; contexto de cor creme ou marrom escuro avermelhado, macio a esponjoso ou firme e fibroso. Poros de cor creme, 4 a 7 por mm; camadas de tubos únicas ou estratificadas, claras a marrom avermelhadas; estipe central ou lateral (quando presente); sistema hifal dimítico, hifas generativas com fíbulas, hifas esqueléticas hialinas a marrons, não septadas, geralmente com longas ramificações; basídios elipsoides finos na base; cistídios ausentes; basidiósporos amplos a estreitamente elipsoides com um ápice truncado e um poro apical germinal, de parede dupla, o endósporo é castanho e separado do exósporo hialino por pilares inter-paredes, 7-30 µm de comprimento; reação de Melzer negativa.

Espécies brasileiras de *Ganoderma* formam um grupo monofilético e a distribuição geográfica é um valioso dado na delimitação de espécies do gênero (Lima Júnior, 2012). Atualmente, *Ganoderma* apresenta complexos de espécies de difícil separação, como o complexo *G. applanatum-australe* e o complexo *G. lucidum* (Kaliyaperumal e Kalaichelvan, 2008; Postnova e Skolotneva, 2010), que deram origem aos subgêneros *Elfvingia* (basidioma não lacados) e *Ganoderma* (basidioma lacado), respectivamente (Corner, 1983).

O gênero *Ganoderma* é bastante estudado devido aos seus atributos farmacológicos. Mais de 6500 publicações foram escritas recentemente em língua chinesa (Adams, 2010) somente para este gênero e *G. lucidum* é, sem dúvida, a espécie mais estudada. Sem levar em consideração problemas taxonômicos, foram relatados em diversos trabalhos com *G. lucidum* polissacarídeos, proteínas e mais de 150 triterpenos biologicamente ativos (Paterson, 2006; Qiao *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012) que são os constituintes majoritários em *G. lucidum* com importantes efeitos biológicos (Baby *et al.*, 2015).

Outras espécies bem investigadas são o *G. applanatum* e *G. tsugae* (Lindequist, 1998; Paterson, 2006; Jedinak, 2011, Trigos, 2011). *Ganoderma applanatum*, possui atividade antifúngica (Zjawiony, 2004, Karaman, 2012 e Florianowicz, 2014) e antitumoral devido aos compostos orgânicos voláteis e triterpênicos e apresenta também ação antimicrobiana, devido às saponinas (Karaman, 2009).

Metabólitos secundários de outras espécies foram estudados mais pobremente e algumas espécies como *G. weberianum*, *G. subamboinense* ou *G. sichuanense* carecem de dados (Richter, 2015).

No mundo, estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos, das quais cerca de 13.800 existiriam no Brasil, ou seja, aproximadamente 14% da diversidade mundial (Kirk *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade da ampliação do conhecimento da micobiota brasileira, especialmente para espécies de Ganodermataceae, a possibilidade de descobrimento de novos táxons com potencial para descoberta de novos arsenais contra neoplasias e motivado pelo (a):

- grande diversidade dos fungos poroides, em especial de Ganodermataceae, já evidenciada em estudos anteriores realizados na Região Sul;
- escassez de estudos taxonômicos na área, sendo que, em sua maior parte, os realizados tiveram enfoque apenas morfológico;
- a carência de informações sobre as espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, o que impossibilita conhecer melhor a filogenia do grupo;
- poucos trabalhos sobre o potencial farmacológico e aplicabilidade das espécies ocorrentes na região.

Propomos o estudo das espécies da família Ganodermataceae encontradas em áreas de Mata Atlântica e Pampa, através de uma abordagem morfológica e de ensaios farmacológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento sobre a diversidade e aplicabilidade de espécies de Ganodermataceae (Basidiomycota) em áreas de Mata Atlântica e Pampa, utilizando análises morfológicas e ensaios farmacológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Conhecer as espécies da família Ganodermataceae presentes em áreas de Mata Atlântica e Pampa;
- Utilizar caracteres morfológicos e, quando possível, moleculares para a identificação das espécies encontradas na área de estudo;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a atividade biológica de extratos etanólicos de espécies de Ganodermataceae.

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa compreende quatro diferentes linhas para investigação das espécies de macrofungos da família Ganodermataceae coletados: análise taxonômica, análise molecular (filogenética), análise do perfil químico e avaliação do potencial antitumoral.

4.1 Coleta, análise taxonômica e filogenética

Os espécimes pertencentes à família Ganodermataceae (Polyporales, Basidiomycota) serão coletados em diferentes localidades do Brasil, abrangendo áreas de Mata Atlântica e do Pampa, percorrendo áreas bem conservadas em Unidades de Conservação.

No momento da coleta, os basidiomas sadios (sem sinais de deterioração) serão fotografados e anotados dados referentes ao ambiente e substrato. Os espécimes serão removidos do substrato e logo em seguida acomodados em recipientes individuais.

O material coletado será submetido a uma análise macroscópica. O material será conservado sob refrigeração até a conclusão da análise complementar, no laboratório, com auxílio de microscópio estereoscópico, seguido de análise microscópica, segundo a metodologia descrita por Teixeira (1995). Serão feitas secções utilizando lâminas de aço, no píleo, contexto e himenóforo. Os cortes serão montados em lâminas com soluções alcalinas de KOH 3%, juntamente com o corante citoplasmático floxina 1% e, posteriormente, analisados sob microscópio óptico em aumento 1000X. Serão feitas 30 medidas de cada estrutura, incluindo basidiósporos, basídios e os diferentes tipos de hifas. Serão preparadas e analisadas seções das porções já citadas com reagente de Melzer, a fim de detectar reação amilóide ou dextrinóide nas estruturas. Observações sobre o sistema hifal, forma e coloração das diferentes estruturas e demais informações pertinentes serão realizadas e ilustradas em aumento com o auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio. Na identificação do material será utilizada bibliografia especializada.

Todo o material será acondicionado em envelopes de papel com etiquetas de identificação e incorporado ao acervo do Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) e, quando possível, duplicatas serão enviadas a outros herbários nacionais e internacionais indexados.

A análise molecular para confirmação das espécies será realizada após extração de DNA das amostras, segundo Doyle e Doyle, 1987. O DNA será amplificado por PCR nas regiões nuclear ribossomal ITS e sequência gênica de β -tubulina para caracterização taxonômica (Hennicke et al. 2016; Kwon, O. C., 2016). O sequenciamento será feito em empresa terceirizada. Os dados sequenciados serão submetidos a buscas de sequências similares através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Os fragmentos sequenciados serão analisados e alinhados utilizando-se o programa BioEdit (Halli, 1999). Para as análises filogenéticas, a inferência Bayesiana será realizada no programa Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Para escolha do modelo evolutivo, será utilizado o programa jModeltest v.0.1.1 (Posada, 2008; Darriba et al., 2012; Guindon & Gascuel, 2003). E para as análises de Máxima Verossimilhança, utilizaremos o programa RAxML v.8.1.11 (Stamatakis, 2014). Todas as análises serão implementadas na plataforma CIPRES (Miller et al. 2011). Após, as sequências obtidas serão inseridas no GenBank, sediado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Altschul et al., 1997).

4.2 Avaliação do perfil farmacológico

4.2.1 Perfil químico:

Após a identificação das espécies, os corpos de frutificação (200 g) serão separadamente secos em estufa de ar circulante a temperatura inferior a 30 °C, triturados e submetidos a extração com etanol 25% (1:10 proporção fungo:solvente) à temperatura ambiente, por 10 h com agitação periódica. Os extratos serão filtrados a vácuo, desalcolizados e liofilizados conforme Lee *et al.*, 2016, com modificações. Uma alíquota de cada amostra será enviada para a análise química dos ácidos triterpênicos, que será realizada por HPLC (Cromatografia Líquida de alta eficiência) acoplada a um espectrômetro de massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS). A razão das massas m/z será medida em analisador tipo quadrupolo-tempo de vôo (QToF) e as amostras serão comparadas entre si para evidenciar a similaridade ou não na constituição química e os dados de m/z serão comparados com os da literatura para a identificação do ácidos triterpênicos presentes.

Após a identificação das espécies, os corpos de frutificação (200 g) serão separadamente secos em estufa de ar circulante a temperatura inferior a 30 °C, triturados e submetidos a extração com etanol 25% (1:10 proporção planta:solvente) à temperatura ambiente, por 10 h com agitação periódica. Os extratos serão filtrados a

vácuo, desalcolizados e liofilizados conforme Lee et al., 2016, com modificações. Uma alíquota de cada amostra será enviada para a análise química dos ácidos triterpênicos, que será realizada por HPLC (Cromatografia Líquida de alta eficiência) acoplada a um espectrômetro de massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS). A razão das massas m/z será medida em analisador tipo quadrupolo-tempo de voo (QToF) e as amostras serão comparadas entre si para evidenciar a similaridade ou não na constituição química e os dados de m/z serão comparados com os da literatura para a identificação dos ácidos triterpênicos presentes.

4.2.2. Conteúdo de polifenóis totais

Será determinado o conteúdo de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu, no qual o extrato etanólico é misturado com carbonato de sódio (7.5%, w/v) e 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 30min, no escuro, a absorbância é medida em 765 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos será expresso em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g amostra.

4.2.3 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos será avaliada pela capacidade de doar elétrons ao radical (DPPH). O extrato será diluído em diferentes concentrações e adicionado ao tampão TRIS-HCl (100 mM, pH 7.0) e 250 µM de DPPH dissolvido em etanol. Os tubos serão mantidos no escuro (20 min) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 517 nm. Os resultados serão expressos como a IC_{50%} (quantidade de extrato necessária para neutralizar 50% do radical DPPH).

4.2.4 Atividade antitumoral

Para avaliação de atividade antitumoral serão utilizadas células padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) de câncer de mama (MCF-7), pâncreas (MIAPaCa-2), ovário (OVCAR-3), melanoma (MV-3), e hepatoma (HEPA 1c1c7 e HepG2), além de células normais (fibroblastos L929).

As células de linhagem tumoral serão mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 IU/ml penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina ou em meio Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 IU/ml penicilina e 100 µg /ml estreptomicina, a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. As células serão colocadas em placas em 96 poços com

11000-12000 células por poço e em 150 µL de meio de cultura seguido por incubação overnight a 37 ° C (5% de CO₂ e 95% de ar) para permitir a fixação das células nos poços. As células serão incubadas durante 24 h e/ou 48 h em presença ou na ausência de 50 µL de concentrações crescentes dos extratos fúngicos. Camptotecina e/ou etoposídeo serão utilizados como controle positivo. As células do controle do veículo serão tratadas com concentrações mais elevadas de DMSO (0,1%). Após, 100 µL do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) será adicionado a cada poço e a placa será incubada durante 2 h para permitir a reação do MTT com as desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazan formados serão dissolvidos por 200 µL de DMSO. Após 10 min, a absorbância do azul de formazan será lida em 595 nm, em leitor de microplaca, e será proporcional ao número de células viáveis. O ensaio com o MTT é projetado para quantificar espectrofotometricamente o crescimento celular, a viabilidade, e proliferação celular e calcular a dose que causa citotoxicidade em 50% das células cancerosas (IC_{50%}). O extrato que apresentar a melhor atividade antitumoral será avaliado em relação a danos oxidativos e função mitocondrial a fim de caracterizar seu mecanismo de ação.

4.2.5 Avaliação da atividade dos complexos mitocondriais I, II, III, IV da cadeia de transporte de elétrons

Para a detecção simultânea da atividade dos cinco complexos mitocondriais, será utilizado o sistema automatizado MILLIPLEX® *map Human OXPHOS Magnetic Bead Panel* (Merck, Millipore, Darmstadt, Alemanha). Para a realização destas análises, serão preparados previamente extratos celulares de acordo com protocolo de preparação padrão de amostra contendo 10 µg de lisado celular total. As amostras serão analisadas em triplicata e a medida de intensidade de fluorescência (MIF) será mensurada utilizando o sistema Luminex®. Os resultados das múltiplas análises dos cinco complexos serão expressos em percentual de controle (%).

4.2.6 Determinação do nível intracelular de ATP

Para verificar uma possível alteração na produção de ATP, após o tratamento, as células serão expostas ao reagente do kit Titer-Glo® (Promega, Madison, WI), que contém luciferina e luciferase. Na presença obrigatória de ATP, a luciferase produz luminescência utilizando a luciferina como substrato. A luminescência será lida em leitor de microplacas.

4.2.7 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

Será realizada a quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, os quais são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto de coloração rosa, que será lido espectrofotometricamente a 530 nm, segundo metodologia de Wills *et al.* (1966). Os resultados serão expressos em nmol de TBARS/mg de proteínas. Serão determinados, ainda, os níveis de danos às proteínas através da metodologia descrita por Levine *et al.* (1990), na qual são quantificados os grupos carbonil através da reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). A leitura será realizada espectrofotometricamente a 370 nm e os resultados serão expressos em nmol de DNPH/mg de proteína. Os níveis de NO serão determinados através da reação de Griess, de acordo com metodologia descrita por Green (1981). Os resultados serão expressos como nmol de nitritos por mg de proteína. O conteúdo de proteínas totais será quantificado através do método de Bradford (1976) e os resultados serão expressos em mg de proteína por mL.

4.2.8 Atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) será determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987), onde as células serão adicionadas ao tampão glicina 50 µM. Após, é adicionado à adrenalina e medida a inibição da taxa de formação de adenocromo a 480 nm, por um período de 3 min. Os resultados serão expressos como unidade de SOD (USOD/mg de proteína). Uma unidade de SOD é definida como a concentração de enzima presente na amostra capaz de inibir a formação de adenocromo em 50%. A atividade da enzima catalase será determinada através da medida da decomposição do peróxido de hidrogênio, segundo Aebi (1984). Para isto a amostra será adicionada ao tampão fosfato (pH 7,0). Após 2 min. será acrescentado o peróxido de hidrogênio e a leitura será realizada em 240 nm. Os valores serão expressos em mmol de H₂O₂/minuto/mg de proteína.

4.2.9 Avaliação dos marcadores apoptóticos

A expressão dos marcadores apoptóticos (caspases, AIF, Bax, Bad, entre outros) será realizada por análise de *immunoblotting* utilizando-se anticorpos específicos para cada proteína. Primeiramente será avaliada a concentração proteica das células pelo método de Lowry, ressuspendendo as mesmas em tampão de Laemmli (4% glicerol, 10% SDS, Tris-HCl 0,5M, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol e água milliQ). Após, será feita a fervura das células durante 2 minutos e as proteínas serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Em seguida, será realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio da membrana é efetuado com albumina 5% por no mínimo 60 minutos. As lavagens (três vezes de cinco minutos cada) da membrana serão feitas com PBS contendo 0,05% de TWEEN[®] 20. Após o bloqueio e lavagem, a membrana será incubada com os anticorpos primários (p53, PARP, AIF, caspases -3, -7 e -9 totais e clivadas), seguindo-se com lavagem da membrana, que será incubada novamente com os anticorpos secundários *anti-mouse* IGg e *anti-rabbit* IGg, ambos conjugados a peroxidase. A revelação das bandas será feita com o uso do kit ECL e registrada com hiperfilme (Amersham Biosciences). A intensidade das bandas será avaliada pelo programa Opticquant.

4.2.10 Análise estatística

Todos os resultados obtidos serão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística será realizada utilizando-se a análise de variância de uma e duas vias (ANOVA), seguida por comparação múltipla pos-hoc (teste de Tukey). As relações entre variáveis serão alcançadas com teste de correlação de Person. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. O programa estatístico utilizado será o SPSS (The Statistical Package for Social Sciences, version 19.0, Armonk, NY, USA, for Windows).

5 EQUIPE

Viviane de Oliveira Garcia – doutoranda da Pós Graduação em Botânica da UFRGS.

Rosa Mara Borges da Silveira – orientadora da Pós Graduação em Botânica da UFRGS.

Mirian Salvador – co-orientadora da Universidade de Caxias do Sul.

Simone Cristina Baggio Gnoatto – colaboradora Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS.

Márcio Fronza – colaborador da Universidade de Vila Velha.

5.1 EQUIPE DE COLETA

Viviane de Oliveira Garcia/RG 6054492787

Genivaldo Alves da Silva/RG RG: 9132279143

Maria Elenice de Oliveira Alves/ RG: 9095436813

6 CUSTOS DO PROJETO

Material de consumo	Quantidade	Valor Unitário	Total
Avaliação da atividade biológica: plásticos e reagentes	-	-	R\$ 8.000,00
Análises moleculares: serviço de sequenciamento de DNA	600	R\$ 10,00	R\$ 6.000,00
Excursões de coleta	15 diárias	R\$ 184,88*	R\$ 7.773,20
TOTAL		R\$ 21.773,20	

7 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Semestre	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Atividades								
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Obtenção dos créditos do PPG	X	X	X					
Proficiência em língua estrangeira		X						
Revisão de herbários			X	X	X	X		
Coleta de material: 3 dias em cada Unidade de Consevação		X	X	X	X	X	X	
Obtenção dos extratos			X	X	X	X		
Análise morfológica e molecular			X	X	X	X		
Ensaio biológicos <i>in vitro</i>			X	X	X	X		
Análise dos dados				X	X	X	X	

Discussão dos resultados					X	X	X	
Exame de qualificação							X	
Elaboração dos artigos						X	X	X
Defesa da tese								X

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. *et al.* Antiplasmodial lanostanes from the *Ganoderma lucidum* mushroom. **Journal of Natural Products**, v. 73, n.5, p. 897–900, 2010.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

ALTSCHUL, S., MADDEN, T., SCHÄFFERL, A., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BABY, S.; JOHNSON, A. J.; GOVINDAN, B. Secondary metabolites from Ganoderma. **Phytochemistry**, v.114: 66–101, . 2015.

BANNISTER, J.V., CALABRESE, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, 32: 279-312, 1987.

BHARDWAJ, A., SRIVASTAVA, M., PAL, M., SHARMA, Y. K., BHATTACHARYA, S., BHATTACHARYA, S., TULSAWANI, R., SUGADEV, R., MISRA, K. Screening of Indian Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A UPC2-SQD-MS Approach. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 2, p. 177–189, 2016.

BOJANA, B. Ganoderma lucidum: A Potential for Biotechnological Production of Anti-Cancer and Immunomodulatory Drugs. **Recent patents an anti-cancer drug discovery**, v. 8, n. 3, p. 255-287, 2013.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Analytical Biochemistry. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREITENBACH, J.; KRÄNZLIN, F. **Champignons de Suisse**. Tome 2. Champignons sans lames, Hétérobasidiomicètes, Aphylophorales, Gastéromycetes. Lucerne, Suisse: Verlag Mykologia, 1986.

CAIL, Z., WONG, C. K., DONG, J., JIAO, D., CHU, M., LEUNG, P. C., LAU, C. B. S., LAU, C. P., TAM, L. S., LAM, C. W. K. Antiinflammatory activities of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi) and *SanMiaoSan* supplements in MRL/lpr mice for the treatment of systemic lupus erythematosus. **Chinese Medicine**, v. 29, p. 11:23, 2016.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**, v. 55, n.3, p. 37-39, 2003.

CAO, Y., WU, S.H., DAI, Y.C. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 49–62, 2012.

CHEN, S., XU, J., LIU, C., ZHU, Y., NELSON, D.R., ZHOU, S., LI, C., WANG, L., GUO, X., SUN, Y., LUO, H., LI, Y., SONG, J., HENRISSAT, B., LEVASSEUR, A., QIAN, J., LI, J., LUO, X., SHI, L., HE, L., XIANG, L., XU, X., NIU, Y., LI, Q., HAN, M.V., YAN, H., ZHANG, J., CHEN, H., LV, A., WANG, Z., LIU, M., SCHWARTZ, D.C., SUN, C. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Nature Communication**, v. 3, n. 913, p. 1-9, 2012.

CHENG, C. R., YUE, Q. X., WU, Z. Y. Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1579–1585, 2010.

CHENG, S.; SLIVA, D. *Ganoderma lucidum* for Cancer Treatment: We Are Close but Still Not There. **Integrative Cancer Therapies**, v. 14, n. 3, p. 249–257, 2015.

CHIEN, R. C., TSAI, S. Y., LAI, E. Y., C., MAU, J. L. Antiproliferative Activities of Hot Water Extracts from Culinary-Medicinal Mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (Higher Basidiomycetes) on Cancer Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.17, n. 5, p. 453–462, p. 2015.

CÖR, D., CÖR, D., BOTIĆ, T., KNEZ, Z., BATISTA, U., GREGORIC, A., POHLEVEN, F., BONCINA, T. Two-stage extraction of antitumor, antioxidant and acetylcholinesterase compounds from *Ganoderma lucidum* fruiting body. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 91, p.53–60, 2014.

CORNER, E. J. H. **Ad Polyporaceas I: Amauroderma and Ganoderma**. Vaduz [Liechtenstein]: J. Cramer, 1983. P.1-182.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:8, 772.

DONK., Bulletin of the Botanical Gardens Buitenzorg sér. 3, v. 17, p. 474, 1948. Acesso em 25/08/2016. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=23658&Fields=All>>

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

FERREIRA, I. C. F. R., VAZ, J. A., VASCONCELOS, H., MARTINS, A. Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.10, n. 5, p. 424-436, 2010.

FLORA DO BRASIL 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=61AFF111CD9BC6A57A186F210838F2A4>> Acesso em 25/09/2016.

FLORIANOWICZ, T. Inhibition of growth and sporulation of *Penicillium expansum* by extracts of selected basidiomycetes. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 69, n. 4, p. 263–267, p. 2014.

FORZZA, R. C. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil, Vol. 1**. 2010. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 1-875. Disponível em:<<http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol1.pdf>>. Acesso em 22/10/2015.

GAO, Y., ZHOU, S. Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.)Lloyd (Aphyllophoromycetidae). Part II. Mechanism Considerations (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 6, n. 3, p. 219–230, 2004.

GILBERTSON, R. L., RYVARDEN, L. **North American Polypores**. Volume 1. Oslo: Fungiflora. 1986.

GILBERTSON, R.L.; RYVARDEN, L. **North American Polypores**. Volume 2. Oslo: Fungiflora, 1987. p. 1-445.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst Biol*, 52: 696–704.

GREEN, L.C., TANNENBAUM, S.R., GOLDMAN, P. (1981). Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

HALLI, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v.41, p.95-98, 1999.

HENNICKE, F., CHEIKH-ALI, Z., LIEBISCH, T., MACIÁ-VICENTE, J. G., BODE, H. B., PIEPENBRING, M. Distinguishing commercially grown *Ganoderma lucidum* from *Ganoderma lingzhi* from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles. **Phytochemistry**, v. 127, p. 29–37, 2016.

HONG, S.G.; JUNG, H.S. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences. **Mycologia**, v. 96, n. 04, p.742–755, 2004.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:<<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em 22/10/2015.

JEDINAK, A., THYAGARAJAN-SAHU, A., JIANG, J., SLIVA, D. Ganodermanontriol, a lanostanoid triterpene from *Ganoderma lucidum*, suppresses growth of colon cancer cells through β -catenin signaling. **International Journal of Oncology**, v. 38, N. 3, p. 761-767, 2011.

KALIYAPERUMAL, M., KALAICHELVAN, P.T. *Ganoderma australe* from southern India. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, 286-292, 2008.

KAO, C. H. J., BISHOP, K. S., XU, Y., HAN, D. Y., MURRAY, P. M., MARLOW, G. J., FERGUSON, L. R. Identification of potential anticancer activities of novel *Ganoderma lucidum* extracts using gene expression and pathway network analysis. **Genomics Insights**, v.9, p. 1-16, 2016.

KARAMAN, M., MIMICA-DUKIC N., METAVULY, M.N. Lignicolous fungi from Northern Serbia as natural sources of antioxidants. **Journal of Biology**, v.4, n. 03, p. 387–396, 2009.

KELES, A. , Koca, I., Gençcelep, H. Antioxidant Properties of Wild Edible Mushrooms. **Journal of Food and Processing and Technology**, v. 2, n.6, p. 2-6, 2011.

KARST. (Aphyllophoromycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p.121–138, 1999.

KIRK, P. M. *et al.* **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KWON, O. C., PARK, Y. J., KIM, H. I., KONG, W. S. CHO, J. H., LEE, C. S. Taxonomic Position and Species Identity of the Cultivated Yeongji 'Ganoderma lucidum' in Korea. **Mycobiology**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2016.

LEE, S. S., LEE, P. L., CHEN, C. F., WANG, S. Y., CHEN, K. Y. Antitumor Effects of Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllophoromycetideae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2003.

LEE, Y., KIM, J., SONG, C., JANG, K., KIM, C., KANG J., CHOI, Y., YOON, H. Ethanol extract of *Ganoderma lucidum* augments cellular anti-oxidant defense through activation of Nrf2/HO-1. **Journal of Pharmacopuncture**, v.19, n. 1, p. 059-069, 2016.

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G., AHN, B.W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.464-78, 1990.

LI, J. Q., ZHAN Z. H., CHEN, H. M., CHEN, X. D., LAN, J., LIU, C. Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **PLoS ONE**, v.8, n. 8, p. 1-12, 2013.

LI, L., GUO H. J., ZHU, L. Y., ZHENG, L., LUI, X. A supercritical-CO₂ extract of *Ganoderma lucidum* spores inhibits cholangiocarcinoma cell migration by reversing the epithelial–mesenchymal transition. **Phytomedicine**, v. 23, n. 4, p. 91–97, 2016.

LIMA JÚNIOR, N.C. **Relações filogenéticas em *Ganoderma* P. Karst. (Basidiomycota) baseadas em sequências do DNA ribossomal**. 2012. 67 p. Dissertação de mestrado. Universidade federal de Pernambuco. Recife, PE. 2012.

LINDEQUIST, U. 1998. **Ganoderma**. In: Blaschek, W. (Coord.), Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneider, G. (Eds.), Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Folgeband 5, pp. 750–761.

LIU, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. **International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. Journal of nutrition**, v. 134, n. 12 suppl., p 3479S-3485S, 2004.

LIU, X., YUAN, J. P., CHUNG, C. K., CHEN, X. J. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. **Cancer Letters**, v. 182, n. 2, p. 155–161, 2002.

LOGUERCIO-LEITE, C. 1990. 328 p. **Políporos (Basidiomycotina) xilófilos de la Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - FCEN, UBA, Buenos Aires, 1990.

LOGUERCIO-LEITE, C.; GROPOSO, C.; HALMENSCHLAGET, M.A. Species of *Ganoderma* Karsten in a subtropical area (Santa Catarina State, Southern Brazil). **IHERINGIA Série Botânica**, v.60, n. 02, p. 135-139, 2005.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 641-649, 2005a.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Sciences and Technology**, v. 38, n. 6, p. 589-597, 2005b.

MILLER, M. A., PFEIFFER, W. AND SCHWARTZ, T.(2011) “The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses”. In Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: Extreme Digital Discovery, (Salt Lake City, July 17, 2011). 41:1-8.

MIZUNO, T., WANG, G., ZHANG, J., KAWAGISHI, H., NISHITOBA, T., LI, J.. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. **Food Reviews International**, v. 11, n. 1, p. 151-166, 1995.

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

Ganoderma multipileum, the correct name for 'G. lucidum' in tropical Asia. **Botanical Studies**, v.50, p. 451– 458, 2009.

MYCOBANK. Família Ganodermataceae. Disponível em:<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=23658&Fields=All>. Acesso em 15/10/2015.

NÚÑEZ, M.; RYVARDEN, L. **East Asian polypores**. Oslo: Synopsis Fungorum, 2001. p. 1-552.

PATERSON, R. R. M. Ganoderma- A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1985-2001, 2006.

OLIVE, P. L., WLODEK, D., DURAND, R.E., BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Experimental cell research**, v. 198, n. 2, p. 259-267, 1992.

PATERSON, R. R. M. Ganoderma- A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1985-2001, 2006.

PEGLER, D.N. **Aphylophorales IV: Poroid Families** *In*: The Fungi, An Advanced Treatise. Vol. 4B. London: Academic Press, 1973.p. 1-420.

PENG, X., LI, L. ,WANG, X., ZHU, G., LI, Z., QIU, M. Antioxidant farnesylated hydroquinones from *Ganoderma capense*. **Fitoterapia**, v. 111, p. 18-23, 2016.

POSADA, D. ModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, p. 1253–1256, 2008.

POSTNOVA, E. L., SKOLOTNEVA, E. S. *Ganoderma lucidum* complex: Some Individual Groups of Strains. **Mikologiya i Fitopatologiya**, v. 43, n. 6, p.63-71, 2009.

PUTTARAJU, N. G., VENKATESHAIAH, S. U., DHARMESH, S. M., URS, S. M. N., SOMASUNDARAM R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal Agricultural and Food Chemmistry**, v. 54, n. 26, p. 9764-9772, 2006.

QIAO, Y.; ZHANG, X.M.; QIU, M.H. Two novel lanostane triterpenoids from *Ganoderma sinense*. **Molecules**, v. 12, p. 2038–2046, 2007.

RICHTER, C. *et al.* An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. **Fungal Divers**, v. 71, n. 01, p. 1–15, 2015.

RONQUIST, F. AND J. P. HUELSENBECK. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. **19**, p. 1572-1574, 2003.

RUAN, W., WEI, Y., POPOVICH, D. G. Distinct Responses of Cytotoxic *Ganoderma lucidum* Triterpenoids in Human Carcinoma Cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 11, p. 1744-1752, 2015..

RYVARDEN, L. **Genera of polypores: Nomenclature and taxonomy**. Oslo:Synopsis Fungorum, 1991. p. 363.

RYVARDEN, L. **Neotropical Polypores: Introduction, Ganodermataceae, & Hymenochaetaceae**. Part 1. Oslo:Synopsis Fungorum, 2004. p. 227.

RYVARDEN, L. Studies in neotropical polypores 8. Poroid fungi from Jamaica - a preliminary check list. **Mycotaxon**, v.76, p.349-360, 2000.

RYVARDEN, L.; ITURRIAGA, T. Studies in Neotropical Polypores 10. New polypores from Venezuela. **Mycologia**, v. 95, n. 06, p.1066-1077, 2003.

RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. **A preliminary polypore flora of East Africa**. Oslo: Synopsis Fungorum, 1980. p. 636.

SEO, G.S.; KIRK, P.M. **Ganodermataceae: nomenclature and classification**. In: Flood, J., Bridge, P.D., Holderness, P. (Eds.), *Ganoderma Disease of Perennial Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 3–22, 2000.

SHAO, Y., QIAO, L., WU, L., SUN, X., ZHU, D., YANG, G., ZHANG, X., MAO, X., CHEN, W., LIANG, W., ZHANG, Y., ZHANG, L. Structure identification and anti-cancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Molecules**, v. 21,, n.5 , p. E678, 2016.

SHIAO, M. S. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. **Chemical Record**, v. 3, n.3, p. 172-180, 2003.

SILVA, G.T.; GIBERTONI, T.B. Aphyllophorales (Basidiomycota) em áreas urbanas da Região Metropolitana do Recife, PE, Brasil. **Hoehnea**, v.33, n. 04, p. 533-543, 2006.

SILVEIRA, R.M.B. E GUERRERO, R.T. Aphyllophorales poliporóides (Basidiomycetes) do Parque Nacional de Aparados da Serra, RS. **Boletim do Instituto de Biociências**, v. 48, p.1-147, 1991.

SILVEIRA, R.M.B. *et al.* Polypores from a Brazilian pine forest in Southern Brazil: pileate species. **Hoehnea**, v. 35, n.04, p. 619-630, 2008.

SMINA, T. P., MATHEW, J., JANARDHANAN, K. K., DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in , South India. **Environment toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 438-446, 2011a.

SMINA, T. P., DE, S., DEVASAGAYAM, T. P. A., ADHIKAR, S., JANARDHANAN, K. K. Ganoderma lucidum total triterpenes prevent radiation-induced DNA damage and apoptosis in splenic lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 726, n. 2 , p. 188– 194, 2011b.

STAMATAKIS, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.

SUAREZ-ARROYO, I. J., ROSARIO-ACEVEDO, R., AGUILAR-PEREZ, A., CLEMENTE, P. L., CUBANO, L. A., SERRANO, J., SCHNEIDER, R. J., MARTINEZ-MONTEMAYOR, M. M. Anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in inflammatory breast cancer in in vivo and in vitro models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57431, 2013.

TEIXEIRA, A.R. **Métodos Para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos**. Manual nº 6. São Paulo. Instituto de Botânica,. 1995.

TRIGOS, A.; MEDELLIN, J. S. Biologically active metabolites of the genus *Ganoderma*: three decades of myco-chemistry research. **Rev. Mexicana de Micología**, v. 34, p. 63–83, 2011.

WANG, D.M., WU, S.H., SU, C.H., PENG, J.T., SHIH, Y.H., CHEN, L.C. *Ganoderma multipilium*, the correct name fro ‘G. lucidum’ in tropical Asia. **Botanical Studies**, v. 50, n. 4, p. 451-458, 2009.

WELTI, S., MOREAU, P. A., AZAROUAL, N., LEMOINE, A., DUHAL, N., KOUACH, M., MILLET, R., COURTECUISSÉ, R. Antiproliferative Activities of Methanolic Extracts from a Neotropical *Ganoderma* Species (Aphyllphoromycetidae): Identification and Characterization of a Novel Ganoderic Acid. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.12, n. 1, p.17–31, 2010.

WILLIAMS, E.D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. **Biochemical Journal**, 99(3): 667-76.

WRIGHT, J.E. E ALBERTÓ, E. **Guía de los Hongos de La Región Pampeana II**. Hongos sin Laminillas. Buenos Aires: L.O.L.A. 2006. p. 279.

WRIGHT, J.E. E DESCHAMPS, J.R. **Flora Criptogámica de Tierra del Fuego: Orden Aphyllphorales**. Tomo XI - Fascículo 3. Buenos Aires: Fundación para la Educación, Ciencia y Cultura, 1975. p. 62.

YAO, Y.J., WANG, X.C., WANG, B. Epitypification of *Ganoderma sichuanense* J.D. Zhao & X.Q. Zhang (Ganodermataceae). **Taxon**, v. 62, n. 5, p. 1025-1031, 2013.

YUE, Q. X., Song, X. Y., Ma, C., Feng, L. X., Guan, S. H., Wu, W. Y., Yang, M., Jiang, B. H., Liu, X., Cui, Y. J., Guo, D. A. Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of HeLa cells. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 606–613, 2010.

YUE-QING, Z., XIAO-TONG, Y., KE, M., HUI-QING, F., XU-QUAN, L., QING-YAO, Y. A Comparison Study of the Anticancerous Activity and Mechanism of Ethanolic Extracts from Different *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd Strains. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 3, p. 488-489, 2005.

ZHOU, L.W., CAO, Y., WU, S.H., VLASÁK, J., LI, D.W., LI, M.J., DAI, Y.C. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny. **Phytochemistry**, v. 114, p. 7–15, 2015.

ZHOU, S., GAO, Y. The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllphoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2002.

ZHOU, X. *et al.* Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 35, n. 04, p. 559-574, 2007.

ZHOU, X. W., SU, K. Q., ZHANG, W. M. Phylogenetic analysis of widely cultivated Ganoderma in China based on the mitochondrial V4-V6 region of SSU rDNA. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 886-897, 2015.

ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from Aphylophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 02, p. 300–310, 2004.