



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Olavo Henrique Petrucci Della Torre

**Bioprospecção de macrofungos brasileiros cultivados e selvagens:**

Investigação in vitro das atividades antixanthomonas, antiglicante, fotoprotetora, antioxidante e antiviral.

São José do Rio Preto  
2022

Olavo Henrique Petrucci Della Torre

**Bioprospecção de macrofungos brasileiros cultivados e selvagens:**

Investigação in vitro das atividades antixanthomonas, antiglicante,  
fotoprotetora, antioxidante e antiviral.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini  
Coorientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

São José do Rio Preto  
2022

Della-Torre, Olavo Henrique Petrucci.

Bioprospecção de macrofungos brasileiros cultivados e selvagens: Investigação in vitro das atividades antixanthomonas, antiglicante, fotoprotetora, antioxidante e antiviral. / Olavo Henrique Petrucci Della Torre. -- São José do Rio Preto, 2022  
54 p.

D357b

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Luis Octávio Regasini  
Coorientador: Henrique Ferreira

1. Bioprospecção. 2. Cogumelos Medicinais. 3. Antiviral

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Olavo Henrique Petrucci Della Torre

**Bioprospecção de macrofungos brasileiros cultivados e selvagens:**

Investigação in vitro das atividades antixanthomonas, antiglicante,  
fotoprotetora, antioxidante e antiviral.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Aristóteles Goes Neto  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathalia Zini  
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, familiares e amigos pelo apoio e incentivo durante minha trajetória. Esta rede de apoio foi e é essencial para minhas conquistas.

Agradeço ao meu orientador Prof Dr. Luis Octávio Regasini pelo acolhimento para embarcar no mundo da química de macrofungos em seu laboratório, pelos diversos momentos de troca de saberes e pela sua amizade, foi um prazer trabalhar com você!

Agradeço aos produtores de cogumelos comestíveis Octaviano Murakami e Jorge Augusto Salvim de Oliveira pela doação das variedades de shimejis *Pleurotus* sp. e Rodolfo Bruniera Anchieta pela doação dos shitakes *Lentinula edodes*, obrigado por contribuírem com a pesquisa e por produzirem alimento de qualidade.

Agradeço ao amigo e produtor Johan Klaus Petry pela doação de diversas amostras de sua incrível produção e pelas coletas realizadas de cogumelos selvagens na Serra Gaúcha.

Agradeço ao amigo e professor Marcos José Correia por todas as conversas sempre muito ricas que colaboraram para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos professores e colaboradores Carolina Pacca, Henrique Ferreira e Maria Luiza Zeraik por todo ensinamento e pela realização da prospecção das atividades biológicas deste trabalho.

Agradeço aos professores que colaboraram nas bancas de qualificação e defesa, Aristóteles Goes Neto, Maria Luiza Zeraik e Nathalia Zini.

Agradeço ao Financiamento dado ao presente trabalho pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E por fim, também agradeço à população brasileira por possibilitar o desenvolvimento dos meus estudos por meio dos impostos pagos.

## RESUMO

Cogumelo é o nome popular pelo qual são conhecidas as estruturas reprodutivas macroscópicas dos fungos pertencentes aos grupos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Esses organismos têm sido devidamente estudados em busca de moléculas bioativas produzidas em seu metabolismo com diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antiviral, dentre outras. Neste trabalho foram utilizadas 19 amostras de cogumelos cultivados e selvagens como matéria prima que passou por extração química, sequencialmente por ordem crescente de polaridade, dos metabólitos produzidos pelo macrofungo para realização dos testes antixanthomonas, antiglicante, antioxidante, fotoproteção solar e atividades citotóxica e antiviral dos extratos brutos obtidos. Dentre as atividades testadas nos screenings com todos os extratos, a atividade biológica que se destacou com bons indicadores foi atividade antiviral contra Mayaro Vírus demonstrada pelos extratos 04 acetato com 65% de proteção e 70% de viabilidade a 250 ug/mL, 11 acetato com 24% de proteção e 79,8% de viabilidade a 7,8 ug/mL, 12 acetato com 63% de proteção e 85% de viabilidade na concentração de 125 ug/mL, 18 hexânico com proteção celular de 44% e zero toxicidade a 125 ug/mL, indicando o potencial para a extração e síntese de análogos para o desenvolvimento de fármacos antivirais a partir de macrofungos.

**Palavras-chave:** Antiviral. Cogumelo Medicinal. Bioprospecção. Macrofungos. Mayaro Vírus.

## ABSTRACT

Mushroom is the popular name by which the macroscopic reproductive structures of fungi that belongs to the *Ascomycota* and *Basidiomycota* taxons are known. These organisms have been studied in a long time to search for bioactive molecules produced in their metabolism with different biological activities such as anti-inflammatory, antitumor, antioxidant, antiviral, among others. In this work, 19 samples of cultivated and wild mushrooms were used as raw material for chemical extraction by maceration, sequentially in ascending order of polarity, of the metabolites produced by the macrofungus for further analyzes of antixanthomonas, antiglicant, antioxidant, solar photoprotection, cytotoxic and antiviral activities of the crude extracts obtained. Among the activities tested in the screenings with all the extracts, the biological activity that showed better results was the antiviral activity against Mayaro Virus demonstrated by the extracts 04 acetate with 65% protection and 70% viability at 250 ug/mL, 11 acetate with 24% protection and 79.8% viability at 7.8 ug/mL, 12 acetate with 63% protection and 85% viability at a concentration of 125 ug/mL, 18 hexane with 44% cell protection and zero toxicity at 125 ug/mL, indicating the potential for the extraction and synthesis of analogues for the development of antiviral drugs from macrofungi.

**Keywords:** Mushroom Extract. Natural Products. Antiviral. Macrofungi. Biological Activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Processo de extração sequencial para obtenção dos extratos fúngicos	28
<b>Figura 2.</b> Reação de neutralização de DPPH em DPPH-H.	29
<b>Figura 3.</b> Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração infusão contra o isolado 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	41
<b>Figura 4.</b> Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração acetato de etila contra o isolado 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	41
<b>Figura 5.</b> Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração etanólica contra o isolado 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	42
<b>Figura 6.</b> Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração infusão contra o isolado 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	43
<b>Figura 7.</b> Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração decocção contra o isolado 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	43
<b>Figura 8.</b> Graficos de % de inibição celular dos extratos hexânicos à esquerda e acéticos à direita.	44
<b>Figura 9.</b> Graficos de % de inibição celular dos extratos etanólicos à esquerda e infusos à direita.	44
<b>Figura 10.</b> Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 18 hexânico à esquerda e foto da placa à direita.	45
<b>Figura 11.</b> Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 4 e 12 acético.	46
<b>Figura 12.</b> Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 16 e 18 acético.	46
<b>Figura 13.</b> Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 3 etanólico.	46
<b>Figura 14.</b> Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 11 acetato	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estudos farmacológicos sobre propriedades medicinais de macrofungos	14
<b>Tabela 2.</b> Modo de ação de compostos antivirais encontrados em cogumelos	16
<b>Tabela 3.</b> Compostos dos cogumelos capazes de inibir a replicação viral na concentração inibitória de 50%.	17
<b>Tabela 4.</b> Identificação macroscópica prévia e a origem de cada amostra utilizada para extração.	26
<b>Tabela 5.</b> Rendimento em massa (g) e % dos extratos obtidos.	34
<b>Tabela 6.</b> Resultados das atividades antioxidantes de cada extrato em % de inibição do radical DPPH em DPPH-H	37
<b>Tabela 7.</b> Resultados em FPS dos extratos na concentração de 0,2 mg/mL.	49
<b>Tabela 8.</b> Resumo dos resultados de screening antiviral	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>PN</b>	Produto Natural
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentration
<b>IZD</b>	inhibitory zone diameter
<b>MBC</b>	Minimum Bactericidal Concentration
<b>IC50</b>	50% inhibition concentration
<b>CC50</b>	50% viability concentration
<b>IS</b>	selective index
<b>CMNT</b>	Concentração Máxima não tóxica
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b>	11
<b>1</b> Introdução e revisão	12
<b>1.1</b> Os fungos e o uso medicinal	12
<b>1.2</b> Macrofungos como fonte de compostos antivirais	16
<b>2</b> Objetivo geral	19
<b>2.1</b> Objetivos específicos	19
<b>3</b> Referências	20
<b>Capítulo 2</b>	25
<b>1</b> Material e métodos	26
<b>1.1</b> Obtenção dos cogumelos e Preparação dos extratos	26
<b>1.2</b> Atividade antioxidante por DPPH •	28
<b>1.3</b> Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria UV/visível	30
<b>1.4.</b> Atividade antiglicante	30
<b>1.5.</b> Atividade Antixanthomonas pelo método REMA	31
<b>1.6.</b> Atividade citotóxica e antiviral dos extratos	32
<b>2.</b> Resultados e discussão	34
<b>2.1.</b> Extração química dos cogumelos	34
<b>2.2.</b> <i>Atividade antioxidante por DPPH•, antiglicante e de fotoproteção solar</i>	37
<b>2.3.</b> Atividade Antixanthomonas	40
<b>2.4.</b> Atividade antiviral e citotóxica	45
<b>3.</b> Conclusão	49
Referências	51



# *Capítulo 1*

## 1 Introdução e revisão

### 1.1 Os fungos e o uso medicinal

O grupo dos fungos é caracterizado pela presença de células eucariontes com parede celular composta por quitina, podendo ser uni ou pluricelulares e realizam digestão extracelular, enquanto o termo popular cogumelo se refere especificamente às estruturas reprodutivas macroscópicas visíveis ao olho nu que alguns desses organismos apresentam, e que, taxonomicamente são compostos na maioria por táxons do filo *Basidiomycota* e alguns do filo *Ascomycota*.

Sobre a diversidade dos fungos, algumas estimativas um pouco conservadoras apontam que ultrapassam 1 milhão e meio de espécies e os macrofungos colaboram com cerca de 50 - 110 mil dessas espécies distribuídas ao redor do mundo (HAWKSWORTH, 2001; MUELLER, SCHMIT, 2007).

Segundo dados disponíveis no Flora do Brasil, banco de dados administrado pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a biodiversidade total de fungos descritas para o Brasil é de 6320 espécies, sendo 2966 espécies de *Basidiomycota* e 2153 espécies de *Ascomycota*. Ainda se o número de macrofungos for superestimado e considerarmos hipoteticamente que todos os fungos do filo *Ascomycota* são formadores de cogumelos assim como os *Basidiomycota*, seria um total de 5 mil espécies descritas, representando menos do que 10% da biodiversidade mínima mundial estimada para o grupo dos macrofungos, ou seja, existe uma lacuna de informação acerca da biodiversidade dos cogumelos no Brasil. Essa falta de dados micológicos ocorre de forma intensificada no Brasil, mas é uma realidade no mundo todo. Se tivermos uma taxa constante de 1000 novas espécies de fungos descritas por ano, precisaríamos de mil anos para descrever todas as espécies estimadas (HAWKSWORTH, 2001; MUELLER, SCHMIT, 2007).

Quanto aos registros históricos do uso de macrofungos, temos diversos povos ancestrais que tinham os cogumelos incorporados em suas culturas e faziam o uso tanto na forma de alimento como também para obter moléculas com atividades biológicas específicas, demonstrado por um dos registros rupestres mais antigo sobre uso de cogumelos, datado de cerca de 6000 anos atrás (GARTZ, 1996; SAMORINI,

2019; WINKELMAN, 2019) que analisa duas gravuras, sendo a primeira com destaque para o uso de cogumelos psicoativos e uma segunda representando uma figura antropomorfizada com dezenas de cogumelos crescendo ao redor, evidenciando a íntima relação entre povos antigos do norte da África e os cogumelos (SAMORINI, 1992).

Ainda um outro registro do uso milenar dos cogumelos foi encontrado com o “Homem do Gelo” que viveu a 5000 anos atrás e seu corpo mumificado foi encontrado com diversos artefatos preservados, entre eles haviam três referentes aos macrofungos: dois diferentes basidiomas da espécie *Fomitopsis betulina* embrulhados separados em material de couro, e um outro material inflamável composto por grande quantia de *Fomes fomentarius* (PEINTNER, PÖDER, PÜMPEL, 1998), evidenciando um uso com objetivos específicos para esses cogumelos. Em outros estudos mais recentes de saberes de povos tradicionais micofílicos, como é o caso dos indígenas Yanomami, que vivem entre a Amazônia brasileira e venezuelana, também foi acessado as diversas práticas que envolve os cogumelos e são realizados por essa etnia, que por anos vem se alimentando de fungos da floresta, incorporando rizomas de espécies de *Marasmius* sp. em seus artesanatos e realizam até os dias atuais um sistema de cultivo natural em roças de mandioca para induzir maior produção de cogumelos comestíveis nesses locais, dominando saberes que vão da alimentação ao manejo para fungicultura (ZENT, ZENT, ITURRIAGA, 2004; CARLOS, WELCH, 2018).

Atualmente, existe a diferenciação entre civilizações que coletam e se beneficiam em oposição às que evitam os macrofungos, sendo fator para caracterizá-las em sociedades micofílicas ou micofóbicas, respectivamente (FERICGLA, 1994; MAPES et al., 2002).

Os indivíduos que consomem cogumelos, se beneficiam de uma abundância de moléculas bioativas que podem ser encontradas tanto no micélio, estrutura vegetativa, como também nos corpos de frutificação dos macrofungos e as atividades biológicas são bastante diversas como antibiótica, antiviral, antifúngica, antitumoral, antioxidante, propriedades adaptógenas do sistema imune, atividade neuroprotetora, anti convulsiva, anti diabética, dentre outras que podem ser observadas na tabela 1

(LEE et al., 2002; ALVES et al., 2012; AGUIRRE-MORENO et al., 2013; THAKUR, SINGH, 2013; FRIEDMAN, 2016; NEWMAN, CRAGG, 2016; SEO, CHOI, 2021).

**Tabela 1.** Estudos farmacológicos sobre propriedades medicinais de macrofungos

BIOATIVIDADE	COMPOSTO FÚNGICO	ALVO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
ANTIBACTERIANA (GRAM -)	Proteína ( <i>Clitocybe cinopica</i> )	<i>Xanthomonas malvacearum</i> e <i>Xanthomonas oryzae</i>	MIC = 0.46 µm	ZHENG et al., 2010
ANTIBACTERIANA (GRAM -)	Extrato bruto <i>Lentinus edodes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	IZD = 9 mm	HEARST et al., 2009
ANTIBACTERIANA (GRAM -)	Extrato bruto <i>Lentinus edodes</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	IZD = 11 - 13 mm	ISHIKAWA, KASUYA, VANETTI, 2001; HEARST et al., 2009; KALYONCU et al., 2010;
ANTIBACTERIANA (GRAM +)	Extrato bruto <i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC e MBC 8 mg/mL	KEYPOUR et al., 2008
ANTIBACTERIANA (GRAM +)	Extrato bruto <i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	MIC 8 mg/mL e MBC 16 mg/mL	KEYPOUR et al., 2008
ANTIBACTERIANA (GRAM +)	Extrato bruto <i>Amanita muscaria</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	MIC 0.625 µg/ml e MBC 2.5 µg/ml	NOWACKA et al., 2015
ANTIOXIDANTE	Extrato bruto <i>Lentinula edodes</i>	DPPH	55.4% - 6mg/ml	CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003
ANTIOXIDANTE	Extrato bruto <i>Lepista nuda</i>	DPPH	97.4% - 180 µg/ml	ELMASTAS et al., 2007
ANTIOXIDANTE	Extrato bruto <i>Pleurotus ostreatus</i>	DPPH	81.3% - 180 µg/ml	ELMASTAS et al., 2007
ANTIVIRAL E CITOTÓXICO	Extrato bruto <i>Agaricus brasiliensis</i>	Poliovírus tipo 1	IC50 - 187.6 µg/ml; CC50 - 2302 µg/ml IS - 12.3	FACCIN et al., 2007
ANTIVIRAL E CITOTÓXICO	Extrato bruto <i>Pleurotus columbinus</i>	Adenovírus tipo 7	IC50 - 185.5 µg/ml CC50 - 40.29 µg/ml IS - 4.60	ELHUSSEINY et al., 2021
ANTIVIRAL E CITOTÓXICO	Extrato bruto <i>Pleurotus ostreatus</i>	Adenovírus	IC50 - 13.80 µg/ml CC50 - 63.45 µg/ml IS - 4.5	ELHUSSEINY et al., 2021
ANTIVIRAL E CITOTÓXICO	Extrato bruto <i>Hypoxylon fuscum</i>	Echovírus 7	IC50 - 0.3811 µg/ml CMNT - 10 µg/ml IS - 22.57	OGBOLE et al., 2018

O motivo da existência moléculas com diversas atividades biológicas presente nos fungos é objeto de estudo de diversos trabalhos e alguns resultados sugerem que esses compostos atuam como moléculas sinalizadoras no habitat e também servem como mecanismo de defesa contra predadores e parasitas (YIM, WANG, DAVIES, 2007), como observado por NÜTZMANN e colaboradores em 2011 que o fungo *Aspergillus nidulans* ao entrar em contato com a bactéria de solo *Streptomyces rapamycinicus* passa por uma indução genética à ativação de genes silenciados que resultam na expressão de arquétipos de ácido orselínico e análogos que são conhecidos por sua atividade antibacteriana (GOMES et al., 2003), sugerindo ser um dos modos de defesa do fungo contra bactérias.

Portanto, se assumirmos que parte dos compostos bioativos estão relacionados a respostas ecológicas as interações com outros organismos e que também estimativas datam que os Ascomycota e Basidiomycota, clados em que se encontram os macrofungos, divergiram a pelo menos 1.2 bilhões de anos (HECKMAN et al., 2001), esses organismos possuem uma longa história evolutiva com diversificações nos mais variados habitats e interações ecológicas, sofrendo constantes pressões seletivas que conservaram moléculas bioativas que garantiram um fitness adaptativo ao clado ao longo do tempo evolutivo e influenciaram na biodiversidade e na quimiodiversidade que encontramos hoje nos fungos.

## 1.2 Macrofungos como fonte de compostos antivirais

Para acessar os metabólitos presentes nos macrofungos, é necessário que o material passe pelo processo de extração química dos PNs, que pode ser resumido em 4 etapas: (1) os solventes penetram o material biológico até alcançarem o interior das células, então (2) os solutos são dissolvidos pelo solvente que logo (3) saem do interior celular para o meio externo por difusão e, por fim, (4) os extratos podem ser coletados (ZHANG, LIN, YE, 2018). Ao longo do tempo, as técnicas utilizadas na extração foram cada vez mais aprimoradas e hoje as extrações podem ser feitas por maceração, prensagem, destilação, infusão, decocção, soxhlet, extração com auxílio de ultrassônico, microondas, dentre outras. (ESCLAPEZ et al., 2011; CHEMAT, VIAN, CRAVOTTO, 2012; ZHANG, LIN, YE, 2018).

As moléculas com propriedades antivirais estão presentes em grande diversidade nos macrofungos e distribuídas nos mais diversos táxons. Essas moléculas podem apresentar bioatividade diretamente relacionada ao vírus, como também atuar como imunomodulatórias gerando uma melhoria na resposta imune contra infecções por meio da ativação de macrófagos, neutrófilos, células NK e linfócitos, como é o caso de polissacarídeos encontrado no cogumelo *Ganoderma lucidum* (AHMAD et al., 2021).

Além da ação imunomodulatória, as macromoléculas presentes nos cogumelos podem prevenir ou interromper uma infecção viral interagindo tanto com as partículas virais quanto com a célula hospedeira e assim, interferir nas etapas de adsorção, replicação ou montagem que ocorrem nos ciclos virais (CARTER, SAUNDERS, SAUNDERS, 2007). Na tabela 2 abaixo, estão sintetizados alguns trabalhos que estudaram o modo de ação dos compostos com atividade antiviral nos macrofungos.

**Tabela 2.** Modo de ação de compostos antivirais encontrados em cogumelos

Vírus	Cogumelo	Composto	Efeito	Referência
HSV-1 e HSV-2	<i>Ganoderma lucidum</i>	Proteoglicano APBP	Bloqueio na adsorção e replicação viral.	EO et al., 2000
Enterovirus 71	<i>Ganoderma lucidum</i>	Triterpenóides GLTA	Bloqueio na etapa de	ZHANG et al., 2014

				adsorção, desmontagem do vírus, replicação do RNA viral.		
HIV-1 e CoVs	<i>Auricularia polytricha</i>	Extrato hexânica	fração	Atua como inibidor de protease		SILLAPACHAIYAPORN et al., 2019
HIV – 1	<i>Ganoderma lucidum</i>	Lacase		Atua na transcriptase reversa		WANG, 2006
HIV – 1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ubiquitina		Atua como inibidor de protease		WANG, NG, 2000

Uma outra característica dos compostos antivirais além de seu efeito no ciclo viral pode ser quantificado através de ensaios de plaqueamento para citotoxicidade em que utiliza-se uma célula modelo e o extrato e um segundo ensaio utilizando a linhagem celular, o vírus e os extratos, no qual obtêm-se dados sobre os efeitos da proteção celular pelos extratos contra a infecção viral, gerando dados de concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% da reprodução viral, como pode ser observado nos trabalhos resumidos na tabela 3 abaixo.

**Tabela 3.** Compostos dos cogumelos capazes de inibir a replicação viral na concentração inibitória de 50%.

Vírus	Cogumelo	Composto	Resultado	Referência
H1N1	<i>Flammulina velutipes</i>	Extrato	EC 50: 1,25 (mg/mL)	KRUPODOROVA, RYBALKO, BARSHTEYN, 2014)
H1N1	<i>Ganoderma lucidum</i>	Extrato	EC 50: 0,077 (mg/mL)	KRUPODOROVA, RYBALKO, BARSHTEYN, 2014

HIV	<i>Ganoderma lucidum</i>	Triterpenos lucidumol B e ganoderic acid beta	IC 50: 50 $\mu$ M e 20 $\mu$ M	MIN et al., 1998
HSV-1 F strain	<i>Ganoderma lucidum</i>	Extrato aquoso	EC 50: 1510 mg/ml	EO et al., 1999
HIV-1	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderic acid B	EC 50: 140 $\mu$ M	MIN et al., 1998
Hepatite C	<i>Agaricus bisporus</i>	Tirosinase	EC 50: 2,5 $\mu$ g/mL	LOPEZ-TEJEDOR et al., 2021

Diversos avanços científicos e tecnológicos foram impulsionados pelos produtos naturais que iniciaram no século XIX e continuam até os dias atuais colaborando para o acúmulo de conhecimento em áreas como a de extração química, síntese orgânica, caracterizações físico-química, farmacologia, dentre outras, e também gerou um aprofundamento nos estudos relativos à relação entre estrutura química e atividade biológica, mecanismo de ação de drogas em patógenos e humanos, tendo papel essencial em descobertas de fármacos nos últimos anos (WOODWARD, 1968; SEEBACH, 1990; YEH, LIM, 2007; HARVEY, 2008).

Portanto, a bioprospecção de macrofungos se mostra um campo promissor para a descoberta de novos compostos com atividade antiviral e o desenvolvimento de novos fármacos.

## **2. Objetivo geral**

Bioprospecção em extratos de macrofungos cultivados e selvagens encontrados no Brasil para investigar a presença de moléculas com atividades biológicas variadas como antioxidante, antiglicante, fotoprotetora, antiviral e antixanthomonas.

### **2.1 Objetivos específicos**

- A - Extração química dos macrofungos cultivados e selvagens;
- B - Avaliação da atividade antixanthomonas dos extratos;
- C - Avaliação da atividade antiviral contra Mayaro virus dos extratos;
- D - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos;
- E - Avaliação da atividade antioxidante DPPH dos extratos;
- F - Avaliação da atividade antiglicante dos extratos;
- G - Avaliação da atividade fotoprotetora dos extratos.

### 3. Referências

AGUIRRE-MORENO, Alma et al. Anticonvulsant and neuroprotective effects of oligosaccharides from Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 15, n. 6, 2013.

AHMAD, Md Faruque et al. *Ganoderma lucidum*: A potential source to surmount viral infections through  $\beta$ -glucans immunomodulatory and triterpenoids antiviral properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 769-779, 2021.

ALVES, Maria José et al. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Planta medica**, v. 78, n. 16, p. 1707-1718, 2012.

ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BILLS, Gerald F.; GLOER, James B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 6, p. 4.6. 01, 2016.

BOLZANI, Vanderlan da Silva et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

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

CARTER, John; SAUNDERS, Venetia; SAUNDERS, Venetia A. **Virology: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2007.

CHEMAT, Farid; VIAN, Maryline Abert; CRAVOTTO, Giancarlo. Green extraction of natural products: concept and principles. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.

CROTEAU, Rodney et al. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

EO, Seong-Kug et al. Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 129-136, 1999.

EO, Seong-Kug et al. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. **Journal of ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 475-481, 2000.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2011.

FERICGLA J. M. 1994. El hongo y la génesis de las culturas. Duendes y gnomos: Ambitos culturales forjados por el consumo de la seta enteógena *Amanita muscaria*. **Los Libros de la Liebre de Marzo**. Barcelona, España.

FRIEDMAN, Mendel. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 80, 2016.

GARTZ, Jochen. Magic mushrooms around the world. **A scientific journey across cultures and time. LIS publs. Los Angeles**, 1996.

GOMES, Alcir Teixeira et al. Antibacterial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 194-196, 2003.

HARVEY, Alan L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HAWKSWORTH, David L. The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. **Mycological research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HECKMAN, Daniel S. et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **science**, v. 293, n. 5532, p. 1129-1133, 2001.

KRUPODOROVA, Tetiana; RYBALKO, Svetlana; BARSHTEYN, Victor. Antiviral activity of Basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture. **Virologica sinica**, v. 29, n. 5, p. 284-290, 2014.

LEE, In-Kyoung et al. Dictyoquinazols A, B, and C, new neuroprotective compounds from the mushroom *Dictyophora indusiata*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1769-1772, 2002.

LOPEZ-TEJEDOR, David et al. In Vitro Antiviral Activity of Tyrosinase from Mushroom *Agaricus bisporus* against Hepatitis C Virus. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, p. 759, 2021.

MAPES, C. et al. Mycophobic or mycophilic. **A Comparative Ethnomycological Study between Amazonia and Mesoamerica; The International Society of Ethnobiology: Athens, Greece**, 2002.

MIN, Byung-Sun et al. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1607-1612, 1998.

MUELLER, Gregory M.; SCHMIT, John Paul. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. **Biodiversity and conservation**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2007.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NÜTZMANN, Hans-Wilhelm et al. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 34, p. 14282-14287, 2011.

PEINTNER, Ursula; PÖDER, Reinhold; PÜMPEL, Thomas. The iceman's fungi. **Mycological research**, v. 102, n. 10, p. 1153-1162, 1998.

SAMORINI, Giorgio. The oldest archeological data evidencing the relationship of *Homo sapiens* with psychoactive plants: A worldwide overview. **Journal of Psychedelic Studies**, v. 3, n. 2, p. 63-80, 2019.

SAMORINI, Giorgio. The oldest representations of hallucinogenic mushrooms in the world (Sahara Desert, 9000-7000 BP). **Integration**, v. 2, n. 3, p. 69-78, 1992.

SEEBACH, Dieter. Organic synthesis—where now?. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 29, n. 11, p. 1320-1367, 1990.

SEO, Dong Joo; CHOI, Changsun. Antiviral bioactive compounds of mushrooms and their antiviral mechanisms: a review. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 350, 2021.

SILLAPACHAIYAPORN, Chanin et al. Anti-HIV-1 protease activity of the crude extracts and isolated compounds from *Auricularia polytricha*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.

THAKUR, M. P.; SINGH, Harvinder K. Mushrooms, their bioactive compounds and medicinal uses: A review. **Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2013.

WANG, H. X.; NG, T. B. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 508-513, 2006.

WANG, H. X.; NG, T. B. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 587-593, 2000.

WINKELMAN, Michael. Introduction: Evidence for entheogen use in prehistory and world religions. **Journal of Psychedelic Studies**, v. 3, n. 2, p. 43-62, 2019.

WOODWARD, R. B. Recent advances in the chemistry of natural products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 17, n. 3-4, p. 519-547, 1968.

YEH, Brian J.; LIM, Wendell A. Synthetic biology: lessons from the history of synthetic organic chemistry. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 9, p. 521-525, 2007.

YIM, G.; WANG, H. H.; DAVIES, J. Antibiotics as signalling molecules. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**, v. 362, n. 1483, p. 1195-1200, 2007.

ZENT, Egleé L.; ZENT, Stanford; ITURRIAGA, Teresa. Knowledge and use of fungi by a mycophilic society of the Venezuelan Amazon. **Economic botany**, v. 58, n. 2, p. 214-226, 2004.

ZHANG, Qing-Wen; LIN, Li-Gen; YE, Wen-Cai. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-26, 2018.

ZHANG, Wenjing et al. Antiviral effects of two Ganoderma lucidum triterpenoids against enterovirus 71 infection. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 449, n. 3, p. 307-312, 2014.

# *Capítulo 2*

## 1. Material e métodos

### 1.1 Obtenção dos cogumelos e preparação dos extratos

Os macrofungos utilizados como matéria prima para obtenção dos extratos testados foram gentilmente doadas por produtores de cogumelos comestíveis e medicinais, como também coletados em diferentes regiões, como pode ser observado pela tabela 4 abaixo mostrando a origem de cada amostra.

**Tabela 4.** Identificação macroscópica prévia e a origem de cada amostra utilizada para extração.

Nº	Identificação	Origem
1	<i>Pleurotus</i> sp.	Cultivado pelo produtor de cogumelos Octaviano Murakami, CNPJ: 09.210.310/0001-05, produzido no Sítio 13 de Janeiro, localizado em Sebastianópolis do Sul - São Paulo.
2	<i>Pleurotus</i> sp.	Cultivado por Jorge Augusto Salvim de Oliveira, CNPJ 36.140.484/0001-00, produzido na Estância Santa Edwirges, localizado em Icém - São Paulo.
3	<i>Pleurotus</i> sp.	Cultivado pelo produtor de cogumelos Octaviano Murakami, CNPJ: 09.210.310/0001-05, produzido no Sítio 13 de Janeiro, localizado em Sebastianópolis do Sul - São Paulo.
4	<i>Pleurotus</i> sp.	Cultivado pelo produtor de cogumelos Octaviano Murakami, CNPJ: 09.210.310/0001-05, produzido no Sítio 13 de Janeiro, localizado em Sebastianópolis do Sul - São Paulo.
5	<i>Lentinula edodes</i>	Cultivado pelo produtor de cogumelos Rodolfo Bruniera Anchieta, CNPJ: 33.416.050/0001-03, produzidos no Sítio Três Irmãos, localizado em Nova Granada - São Paulo.
6	<i>Suillus granulatus</i>	Coletado por Johan Petry em S29 21.858, W51 02.834
7	<i>Amanita muscaria</i>	Coletado por Johan Petry em plantação de <i>Pinus</i> sp. S29 24.404, W50 38.161
8	<i>Grifola frondosa</i>	Cultivado pelo produtor de cogumelos Johan Klaus Petry, CNPJ: 27.242.308/0001-08, no endereço Rua: Antônio Schoeler, 2553, Linha imperial, Nova Petrópolis-RS.
9	<i>Lactarius deliciosus</i>	Coletado por Johan Petry em plantação de <i>Pinus</i> sp. S29 24.404, W50 38.161

10	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Cultivado pelo produtor de cogumelos Johan Klaus Petry, CNPJ: 27.242.308/0001-08, no endereço Rua: Antônio Schoeler, 2553, Linha imperial, Nova Petrópolis-RS.
11	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	Cultivado pelo produtor de cogumelos Johan Klaus Petry, CNPJ: 27.242.308/0001-08, no endereço Rua: Antônio Schoeler, 2553, Linha imperial, Nova Petrópolis-RS.
12	<i>Ganoderma lucidum</i>	Cultivado pelo produtor de cogumelos Johan Klaus Petry, CNPJ: 27.242.308/0001-08, no endereço Rua: Antônio Schoeler, 2553, Linha imperial, Nova Petrópolis-RS.
13	<i>Morchella</i> sp.	Coletado por Johan Petry em mata nativa, S29 18.288, W50 59.930
14	<i>Lepista sordida</i>	Coletado por Johan Petry em S29 21.858, W51 02.834
15	<i>Clitocybula azurea</i>	Coletado por Johan Petry em galho de araucaria, S29 24.404, W50 38.161
16	<i>Boletus edulis</i>	Coletado por Johan Petry em plantação de <i>Pinus</i> sp. S29 24.404, W50 38.161
17	<i>Calvatia gigantea</i>	Coletado por Johan Petry em S29 21.858, W51 02.834
18	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Coletado por Johan Petry em S29 21.858, W51 02.834
19	<i>Auricularia</i> sp.	Coletado por Johan Petry em S29 21.858, W51 02.834

**Fonte:** do autor.

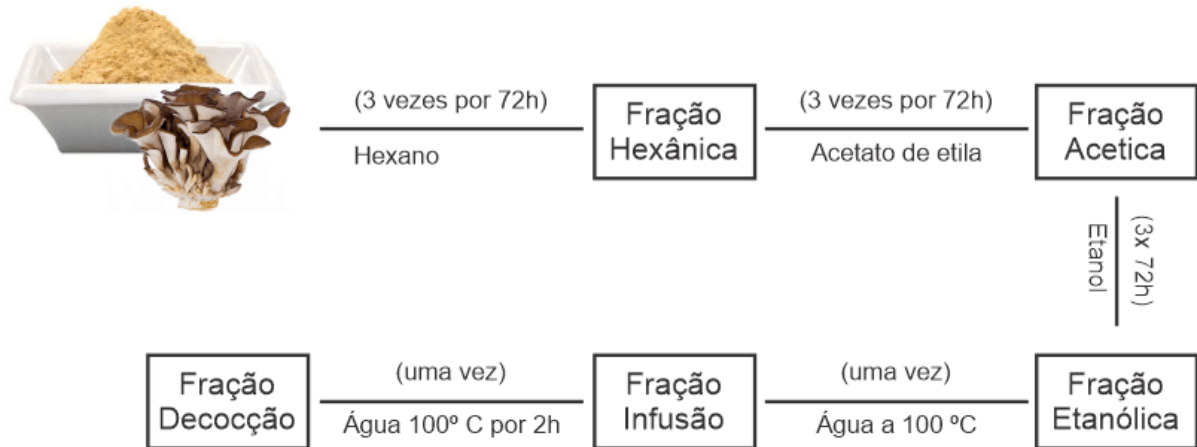
Os cogumelos foram previamente identificados pelos coletores ou produtores e uma alíquota do material desidratado e pulverizado foi guardado e preservado no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) para autenticação das amostras que será realizada por Barcoding.

Os cogumelos desidratados e pulverizados foram pesados e extraídos em temperatura ambiente por maceração sequencialmente com hexano, acetato de etila e etanol por 72h com três repetições para cada solvente, em seguida passaram por uma infusão aquosa e decocção por duas horas, como mostra a figura 1.

A proporção de solvente para grama de extrato foi de 10:1 ml/g e a escolha dos solventes foi feita com base na polaridade relativa de cada um, realizada em ordem crescente de polaridade, sendo eles hexano, acetato de etila, etanol e água com

polaridades relativas de 0.009, 0.228, 0.654 e 1, respectivamente (REICHARDT, WELTON, 2010).

**Figura 1.** Processo de extração sequencial para obtenção dos extratos fúngicos



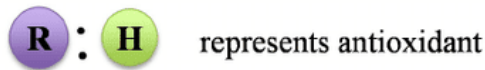
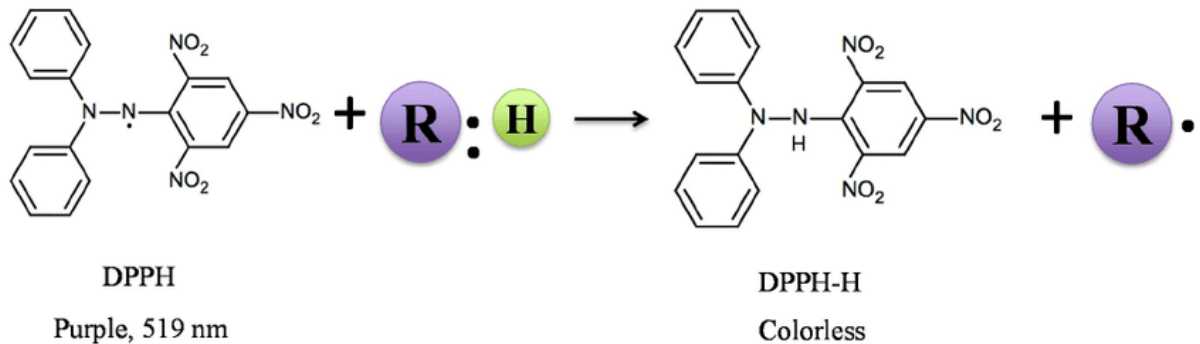
**Fonte:** do autor.

O conteúdo obtido após às 72 h com os solventes ou pelas extrações aquosas passaram pelo processo de filtragem e concentração dos extratos em rotaevaporador para obtenção dos extratos brutos secos que foram armazenados em  $-20^{\circ}$  C até o momento dos ensaios.

## 1.2 Atividade antioxidante por DPPH •

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos eles foram comparados com o padrão ácido gálico na capacidade de reduzir o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) em DPPH-H por meio de doação de um hidrogênio ou transferência de elétron pelas moléculas presentes nos extratos fúngicos, demonstrado pela figura 2. A atividade antioxidante pode ser acompanhada pela mudança da coloração inicial violeta, momento em que o DPPH• apresenta um elétron em ressonância na estrutura, para amarelo ou roxo claro quando encontrado na forma reduzida de DPPH-H, provocando diferenças na absorbância que pode ser medida através de espectrofotômetro de UV.

**Figura 2.** Reação de neutralização de DPPH em DPPH-H.



**Fonte:** Retirado de LIANG, KITTS, 2014.

O ensaio foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Foram pesados 2,0 mg de cada extrato em um eppendorf, em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 80% e o mesmo foi levado a incubadora a 60 °C e 500 rpm por 3 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi separado do precipitado. Foram retirados 333,3 µL do sobrenadante e adicionados 654,2 µL de etanol 80%, 12,5 µL de DPPH 8,0 mmol L<sup>-1</sup>. A reação ocorreu na ausência da luz por 1 h. A absorbância foi medida em cubeta de quartzo com capacidade de 1 mL em λ = 517 nm. A porcentagem de DPPH-h reduzido foi calculada utilizando a equação 1 e os resultados foram expressos % de DPPH. Todos os testes foram realizados em duplicata.

**Equação 1.** Cálculo de porcentagem de DPPH-H reduzido

$$\% \text{ DPPH-H reduzido} = \frac{\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}}$$

### 1.3 Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria UV/visível

A atividade fotoprotetora está relacionada com a dose mínima necessária para deixar uma pele vermelha, ou seja, com um eritema. Para determinar, foi utilizada metodologia desenvolvida por MANSUR e colaboradores (1986) para avaliar o fator de proteção solar (FPS) in vitro, na qual alíquotas dos extratos foram dissolvidas em álcool etílico na concentração de 0,2  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Realizaram-se leituras em duplicata na faixa de 290 a 320 nm (a cada 5 nm) em espectrofotômetro UV-visível. Foram obtidos os valores de absorvância dos extratos nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm. O cálculo de FPS pode ser observado na equação 2, no qual a absorvância foi multiplicada pelo efeito eritemogênico da radiação (EE) em cada comprimento de onda e a somatória dos valores multiplicada por um fator de correção determinado de acordo com dois protetores solares de FPS conhecidos, conforme WAGEMAKER e colaboradores (2013).

#### Equação 2. Cálculo de FPS in vitro

$$\text{FPS Espectrofotométrico} = \text{FC} \times \sum \text{ee}(\lambda) \times I(\lambda) \times \text{abs}(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (=10);

EE = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda  $\lambda$ ;

$I(\lambda)$  = intensidade do sol no comprimento de onda  $\lambda$ ;

$\text{Abs}(\lambda)$  = absorvância da solução no comprimento de onda  $\lambda$ .

### 1.4. Atividade antiglicante

A metodologia do ensaio antiglicante foi definida de acordo com Fraige e colaboradores (2018) e Lunceford e Gugliucci (2005), com algumas modificações. O teste se baseia na capacidade de inibição que uma amostra possui na reação de glicação da proteína albumina (BSA) com o metilglioxal (MGO), uma espécie reativa de carbonila com potente ação de glicação. Esta inibição é medida por fluorescência

(FRAIGE et al., 2018; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005). A proteína BSA foi solubilizada em uma solução de tampão fosfato (pH 7,4) em concentração final de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Foram feitas soluções finais para análise de 3 mL. Para isso, à 500 µL da solução de proteína BSA foram adicionados 450 µL das amostras a serem testadas como agente inibidor (150 ppm) e 2,3 µL do reagente metilgloxal (MGO, 5 mmol L<sup>-1</sup>), agente glicante. Para o grupo controle do ensaio, foi preparado um branco contendo apenas tampão e BSA, um controle positivo contendo tampão, BSA, aminoguanidina (AG, 10 mmol L<sup>-1</sup>, 1500 µL) e MGO (onde AG foi utilizada como inibidor da glicação) e um controle negativo contendo tampão, BSA e MGO, com ausência do inibidor AG. O volume de tampão fosfato foi adaptado para cada solução preparada no teste, branco, controle negativo, controle positivo e amostras, para se atingir o volume final de 3 mL desejados. A solução resultante foi incubada a 37 °C durante três dias e agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a leitura foi realizada em duplicata, nas quais as medidas de fluorescência foram realizadas a 370 nm (λexcitação) e a 440 nm (λemissão) para AGEs totais. A porcentagem de inibição da glicação foi calculada por meio da equação 3, onde FLCn e FLbcn são as intensidades de fluorescência dos controles negativos e seu branco e FLex e FLbex são as intensidades de fluorescência do extrato e seu branco, respectivamente.

### **Equação 3.** Cálculo de formação de AGES

$$\% \text{ Inibição formação de AGES} = \frac{(FL_{cn} - FL_{bcn}) - (FL_{ex} - FL_{bex})}{(FL_{cn} - FL_{bcn})} \times 100$$

### **1.5. Atividade Antixanthomonas pelo método REMA**

O processo de avaliação de atividade antixanthomonas por REMA foi realizado conforme o procedimento descrito por PALOMINO et al., 2002 e MARTIN et al., 2003, SILVA et al., 2013, com modificações. Uma solução estoque de 2 mg/mL foi preparada dissolvendo os extratos em 10% em Dimetilsulfóxido (DMSO). Após o preparo, as amostras foram diluídas e testadas nas concentrações fixas de 2000 ug/mL, 1000 ug/mL, 100 ug/mL e 50 ug/mL em microplacas de 96 poços inoculadas com 105 UFC/poço do isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. O controle negativo foi

apenas meio líquido com bactérias, enquanto o controle positivo teve a adição de canamicina a 15.6g/mL.

As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e então a viabilidade celular foi medida adicionando 15 uL de uma solução a 0.01% de resazurina em cada poço, seguido de incubação durante 2 h a 30°C.

Os organismos viáveis reduzem a coloração azul inicial para roxo, o que foi detectado por espectrofotometria utilizando SPECTRAfluor Plus (Tecan) com um perfil de excitação/emissão de 530 nm / 590 nm e os testes foram realizados em duplicatas.

### 1.6. Atividade citotóxica e antiviral dos extratos

A atividade antiviral e citotóxica dos extratos foi realizada em um teste simultâneo e independente em microplacas de 96 poços com células VERO E6 (1,8x10<sup>5</sup> células/mL) por cavidade e incubada por 24 horas até confluência.

Para a atividade antiviral, diluições seriadas das amostras foram preparadas em meio L-15 + 1 % de ATB. Para o teste, utilizou-se o MOI 0,5. O meio foi removido da placa com auxílio de bomba à vácuo e cada poço recebeu 100 µL do L-15 + amostra e 100 µL da suspensão viral MOI 0,5 do Mayaro vírus. A placa foi incubada e monitorada por 3 dias. Transcorrido este tempo o meio foi aspirado cuidadosamente e, cada cavidade, foi tratada com 50 µL de MTT (1 mg/mL). Após a adição do MTT a placa foi encubada por 4 horas a 37°C. Após este tempo, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada cavidade e a placa foi agitada por 10 min em agitador automático e submetida a avaliação espectrofotométrica a 495nm. Os valores de inibição foram expressos com base na equação 4:

**Equação 4.** Fórmula para calcular a porcentagem de inibição viral

$$\left( \frac{ABS \text{ Extrato} - ABS \text{ CV}}{ABS \text{ CC} - ABS \text{ CV}} \right) \times 100$$

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de L-15 + 1% de ATB contendo diferentes concentrações do extrato. A placa foi incubada por 3 dias a 37°C. Transcorrido o tempo, o meio foi aspirado cuidadosamente e, a cada cavidade, adicionou-se 50 µL de MTT (1 mg/mL). Após a adição do MTT a placa foi encubada por 4 horas a 37°C. Transcorrido este tempo, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada cavidade e a placa, agitada por 10 min em agitador automático. A avaliação foi feita utilizando espectrofotometria no comprimento de onda de 495 nm. A absorbância é diretamente proporcional a viabilidade celular, sendo esta expressa com base em comparações com o controle celular utilizando a equação 5 abaixo:

**Equação 5.** Fórmula para calcular a viabilidade celular

$$V(\%) = \left( \frac{dO_{ex}}{dO_{cc}} \right) \times 100$$

Onde V(%) = viabilidade celular em percentagem, dO<sub>ex</sub>= densidade optica do extrato testado e dO<sub>cc</sub> = densidade óptica do controle celular. Os valores de CC50 serão obtidos por análise de regressão linear dos percentuais referentes às diferentes concentrações avaliadas.

## 2. Resultados e discussão

### 2.1. Extração química dos cogumelos

As 19 amostras de cogumelos foram extraídas sequencialmente com hexano, acetato de etila, etanol e água, ao todo foram obtidos 88 extratos e 7 foram perdidos ao longo do processo. Os rendimentos podem ser observados detalhadamente na tabela 5.

**Tabela 5.** Rendimento em massa (g) e % dos extratos obtidos.

<b>Amostra / Massa inicial (g)</b>	<b>Fração Hexânica</b>	<b>Fração Acética</b>	<b>Fração Etanólica</b>	<b>Fração Infusão</b>	<b>Fração decocção</b>	<b>Rendimento total por amostra</b>
<b>1 – 63,2</b>	0,3942 g – 0,6%	0,1494 g - 0,2%	-	-	-	0,86 %
<b>2 – 45,3</b>	0,5212 g – 1,1%	0,4122 g - 0,9%	0,9732 g – 2,1%	6,4249 g - 14%	-	18,4%
<b>3 – 60,96</b>	0,3681 g – 0,6%	0,7057 g - 1,6%	1,8173 g – 3%	3,4006 g - 5,6%	5,058 g – 8,3%	18,6%
<b>4 – 48,44</b>	0,5538 g – 1,1%	0,3629 g - 0,8%	1,5352 g – 3,2%	9,3731 g - 19,4%	3,4424 g – 7,1%	31,5%
<b>5 – 100</b>	1,0598 g - 1%	1,4890 g - 1,5%	7,2141 g – 7,2%	23,5727 g - 23,5%	5,188 g – 5,1%	38,5%
<b>6 – 18,4</b>	0,7014 g – 3,8%	0,5226 g - 2,8%	1,733 g - 9,4%	6,9657 g - 37,8%	-	53,9%
<b>7 – 30,35</b>	1,4845 g – 4,9%	1,8357 g - 6%	2,4479 g - 8%	4,1448 g - 13,6%	1,2623 g – 4,2%	36,8%

<b>8 - 19,66</b>	0,278 g – 1,4%	0,2922 g - 1,5%	0,6707 g - 3,4%	4,2123 g - 21,4%	1,0834 g – 5,5%	33,2%
------------------	-------------------	--------------------	--------------------	---------------------	--------------------	-------

<b>9 - 22,9</b>	0,4396 g – 1,9%	0,9568 g - 4,2%	1,7029 g - 7,4%	3,8392 g - 16,8%	1,271 g – 5,5%	35,8%
-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	-------------------	-------

<b>10 - 24,35</b>	0,1882 g – 0,8%	0,4355 g - 1,8%	1,2423 g - 5,1%	2,4998 g - 10,3%	2,1704 g – 8,9%	26,8%
-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	--------------------	-------

<b>11 - 6,98</b>	0,0858 g – 1,2%	0,1467 g - 2,1%	0,4127 g - 5,9%	1,0514 g - 15%	0,3802 g – 5,4%	29,7%
------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------	--------------------	-------

<b>12 - 24,68</b>	0,0912 g – 0,37%	0,5315 g - 2,1%	1,1203 g - 4,5%	20,9606 g - 84,9%	0,7445 g – 3%	95%
-------------------	---------------------	--------------------	--------------------	----------------------	------------------	-----

<b>13 - 4,62</b>	0,0859 g – 1,8%	0,1181 g - 2,6%	0,1848 g - 4%	1,0719 g - 23,2%	0,0935 g – 2%	33,6%
------------------	--------------------	--------------------	------------------	---------------------	------------------	-------

<b>14 - 8,6</b>	0,1054 g – 1,2%	0,3555 g - 4,1%	0,8346 g - 9,7%	2,5155 g - 29,2%	0,5196 g – 6%	50,3%
-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	------------------	-------

<b>15 - 0,4</b>	0,0611 g – 15,2%	0,0981 g – 24,5%	0,0592 g – 14,8%	0,0801 g – 20%	0,0136 g – 3,4%	78%
-----------------	---------------------	---------------------	---------------------	-------------------	--------------------	-----

<b>16 - 23,46</b>	0,1491 g – 0,6%	0,1648 g – 0,7%	1,837 g – 7,8%	5,654 g – 24,1%	1,7309 g – 7,4%	40,6%
-------------------	--------------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	-------

<b>17 - 20,4</b>	0,303 g – 1,5%	0,4842 g – – 2,4%	2,396 g – 11,74%	-	0,3337 g – 1,6%	17,2%
<b>18 - 10,6</b>	0,0466 g – 0,4%	0,174 g – 1,6%	0,2455 g – 2,3%	0,812 g – 7,7%	0,6633 g – 6,2%	18,3%
<b>19 - 16,4</b>	0,2384 g – 1,4%	0,2082 g – – 1,3%	0,0989 g – 0,6%	-	0,1381 g – 0,8%	4,2%
<b>Média de rendimento</b>	2,2%	3,3%	6,1%	22,9%	5%	-

**Fonte:** do autor.

Durante a extração com os diversos solventes, obteve-se 88 extratos com diferentes propriedades físico-químicas provenientes do pool de moléculas extraídas dos cogumelos.

O processo de extração se mostrou suficiente e extraiu em média 34% da massa inicial dos cogumelos. Observando pelas classes de solventes utilizadas, a fração hexânica teve rendimento médio de 2,2%, enquanto a fração acética de 3,3%, 6,1% para fração etanólica, e o maior rendimento foi de 29,5% proveniente das frações aquosas da infusão e decocção com 22,9% e 5%, respectivamente, indicando que a maior parte das moléculas presentes nos cogumelos são extraídas por solventes de maior polaridade, o que corrobora com rendimentos obtidos em outros trabalhos (ELBATRAWY et al., 2015; MOREL et al., 2018; DIALLO et al., 2020).

Duas amostras tiveram valores de rendimento muito diferentes da média, sendo a amostra 15 variando com rendimentos acima e a amostra 19 com rendimentos inferiores à média. A possível explicação para a variação do rendimento da amostra 15 é a baixa massa inicial de apenas 0,4 g, enquanto a amostra 19, representante do gênero *Auricularia*, teve uma maior resistência no momento da trituração, o que pode ter dificultado a perfusão do solvente pelo tecido fúngico e influenciado negativamente no processo de extração dessas amostras.

Portanto, para futuros trabalhos de extração recomenda-se o mínimo de 10 g iniciais de cogumelos que devem ser triturados e peneirados a fim de sanar os empecilhos supracitados.

## 2.2. Atividade antioxidante por DPPH•, antiglicante e de fotoproteção solar

No ensaio com DPPH• para atividade antioxidante, dentre os extratos testados, os que obtiveram maiores porcentagens de inibição de DPPH• em DPPH-H foram as amostras 10 hexânica, 1 e 19 etanólica, 6 da infusão e 4 da decocção com valores acima de 50% de inibição em concentração de 1g/mL, podendo ser observado na tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados das atividades antioxidantes de cada extrato em % de inibição do radical DPPH em DPPH-H

Amostra	Hexano	Acetato de etila	Álcool	Infusão aquosa	Decocção 2h
1	45,53 ± 0,88	35,87 ± 3,17	-	-	-
2	7,56 ± 0,38	3,17 ± 0,01	0,04 ± 0,01	39,16 ± 5,09	-
3	27,56 ± 0,12	10,93 ± 0,38	40,06 ± 4,96	54,20 ± 2,03	47,78 ± 0,13
4	43,41 ± 4,57	12,72 ± 0,12	36,55 ± 1,91	39,05 ± 1,65	52,62 ± 2,03
5	36,43 ± 0,03	0,81 ± 1,39	34,18 ± 0,51	44,65 ± 2,67	39,81 ± 1,78
6	27,67 ± 0,15	0,00	8,92 ± 3,45	50,48 ± 4,20	-
7	1,37 ± 0,01	29,25 ± 1,01	10,48 ± 0,13	39,99 ± 0,25	22,95 ± 1,02
8	47,45 ± 3,81	21,27 ± 5,46	7,9 ± 3,05	46,21 ± 3,94	0
9	0	3,4 ± 0,05	16,9 ± 1,54	32,51 ± 0,13	39,58 ± 7,31
10	54,53 ± 2,41	0	6,55 ± 0,01	34,08 ± 1,59	0
11	0	39,6 ± 1,39	28,91 ± 1,91	23,17 ± 0,76	45,54 ± 0,88
12	0	39,81 ± 1,77	25,76 ± 3,43	24,07 ± 10,17	7,56 ± 0,38

<b>13</b>	39,58 ± 7,37	5,87 ± 1,52	3,17 ± 1,53	46,43 ± 1,91	27,56 ± 0,12
<b>14</b>	0,00	22,62 ± 3,94	4,07 ± 0,01	12,05 ± 1,65	43,41 ± 4,57
<b>15</b>	0,00	37,78 ± 2,03	1,6 ± 1,27	13,28 ± 1,27	-
<b>16</b>	6,66 ± 0,12	29,13 ± 3,43	50,03 ± 0,38	39,36 ± 1,53	27,67 ± 0,15
<b>17</b>	46,21 ± 5,21	3,73 ± 1,91	41,72 ± 1,65	-	1,37 ± 0,01
<b>18</b>	-	33,75 ± 0,01	26,88 ± 2,6	47,9 ± 0,05	47,45 ± 3,81
<b>19</b>	9,7 ± 0,01	2,27 ± 0,25	50,48 ± 2,92	-	0

**Fonte:** Do autor.

Nenhum dos extratos apresentou valores de inibição acima de 60%, e também, quando comparado com outros trabalhos na literatura JAYAKUMAR e colaboradores (2009) tiveram 56.2% de inibição do DPPH com extratos de *Pleurotus ostreatus* na concentração de 10 mg/mL e um outro exemplo é TEL e colaboradores (2014) que encontraram 68.8% de inibição de DPPH a 50 µg de amostras extraídas de *Suillus granulatus* com acetato de etila. Apesar de utilizar representantes dos mesmos gêneros de cogumelos, o presente trabalho não identificou forte atividade antioxidante entre os extratos testados, o que foi uma regra para as amostras independente da fração solúvel, não corroborando com os dados positivos presentes na literatura. Entretanto, BAKIR, KARADENIZ, UNAL, (2018) investigaram as variações entre as atividades antioxidantes presentes em um mesmo extrato de cogumelo *Pleurotus ostreatus* armazenado em diferentes temperaturas e encontrou uma correlação entre atividade e temperatura, sendo possível que a variação térmica durante o transporte possa ter afetado nos resultados antioxidantes e também o longo período de secagem dos extratos com alto fluxo de oxigênio pode ter contribuído para a oxidação de potenciais moléculas com atividade antioxidante.

Para análise de atividade de fotoproteção solar os extratos foram comparados com o padrão Benzofenona que tem valor de FPS 6,37 e os resultados da análise in vitro de fotoproteção solar expressos em FPS na concentração de 0,2 mg/mL podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7. Resultados em FPS dos extratos na concentração de 0,2 mg/mL.

Amostra - gênero	Hexano	Acetato de etila	Álcool	Infusão aquosa	Decocção 2h
1 - <i>Pleurotus</i>	0,112	-0,028	-	-	-
2 - <i>Pleurotus</i>	5,433	-0,139	4,612	0,751	-
3 - <i>Pleurotus</i>	0,667	0,011	1,380	1,478	2,664
4 - <i>Pleurotus</i>	1,749	0,153	0,270	0,394	1,624
5 - <i>Lentinula</i>	2,305	-0,060	4,610	2,736	1,070
6 - <i>Suillus</i>	2,116	-0,007	0,261	0,111	-
7 - <i>Amanita</i>	8,883	0,032	2,080	0,388	1,313
8 - <i>Grifola</i>	2,619	0,010	0,188	0,123	0,407
9 - <i>Lactarius</i>	1,516	-0,004	4,487	2,493	1,399
10 - <i>Pleurotus</i>	3,233	0,014	1,942	1,772	0,554
11 - <i>Hypsizyugus</i>	7,076	-0,004	2,024	0,362	0,112
12 - <i>Ganoderma</i>	2,634	-0,010	0,433	0,203	5,433
13 - <i>Morchella</i>	2,376	2,196	1,931	0,777	0,667
14 - <i>Lepista</i>	3,664	2,070	1,687	0,272	1,749
15 - <i>Clitocybula</i>	3,951	1,579	1,028	0,422	-
16 - <i>Boletus</i>	3,418	1,887	1,559	3,150	2,116
17 - <i>Calvatia</i>	1,804	1,229	1,293	-	8,883
18 - <i>Pycnoporus</i>	-	5,731	6,823	0,544	2,619
19 - <i>Auricularia</i>	-0,036	0,380	0,219	-	1,516

Fonte: do autor.

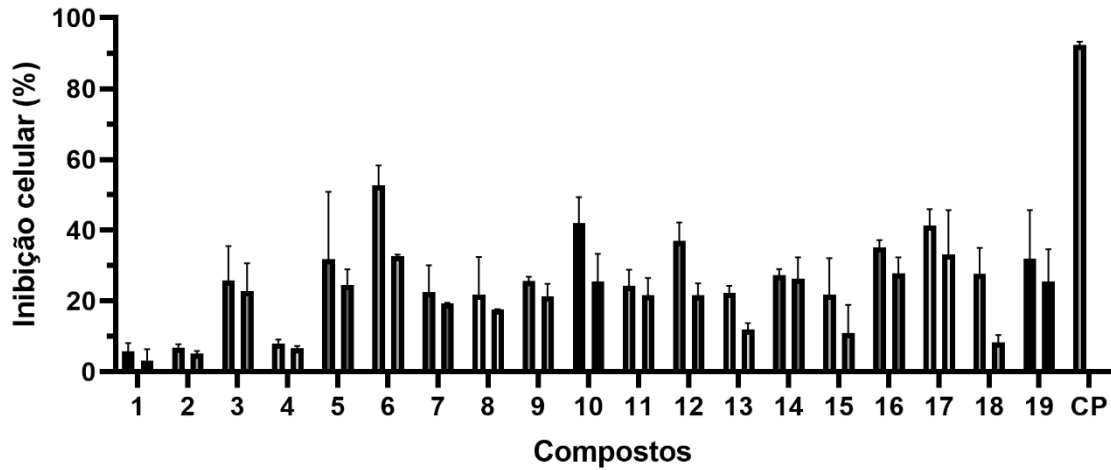
Os extratos com FPS maior que seis foram os extratos 7 e 11 da fração hexânica com valores de 8,88 e 7,07 FPS na concentração de 0,2 mg/mL, então, a concentração desses extratos foram reduzidas para 0,15 mg/mL e o ensaio foi repetido exclusivamente com essas amostras 7 e 11 hexânicas, gerando os valores de 6,68 e 5,14, respectivamente, demonstrando uma grande variação no FPS com uma pequena variação de concentração, que apesar de ser inédita para os cogumelos do gênero *Amanita* e *Hypsizygos*, indica uma fraca atividade fotoprotetora presente nos extratos.

Quanto ao ensaio antiglicante, o extrato que apresentou maior valor de inibição da formação de AGE na concentração de 0,5 mg/mL foi o extrato 16 etanólico com porcentagem de 13,5, seguido dos extratos 18 da decocção e 8 hexânico ambos com 11,4% de inibição. Os outros extratos que foram testados apresentaram valores menores do que 10% de inibição da formação das AGEs, não sendo bons valores para continuar prospectando moléculas com potencial antiglicante dos extratos.

### **2.3. Atividade Antixanthomonas**

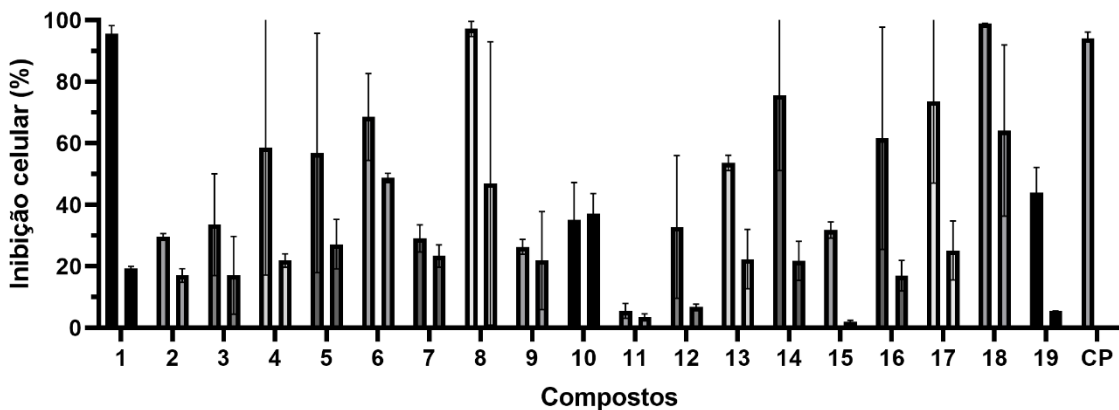
Os extratos inicialmente foram testados em concentração de 2000 ug/mL e 1000 ug/mL e os gráficos com as porcentagens de inibição celular de cada composto das frações hexânica, acética e alcoólica nessas concentrações pode ser observada nas figuras 3, 4 e 5 abaixo:

**Figura 3.** Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração hexânica contra o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



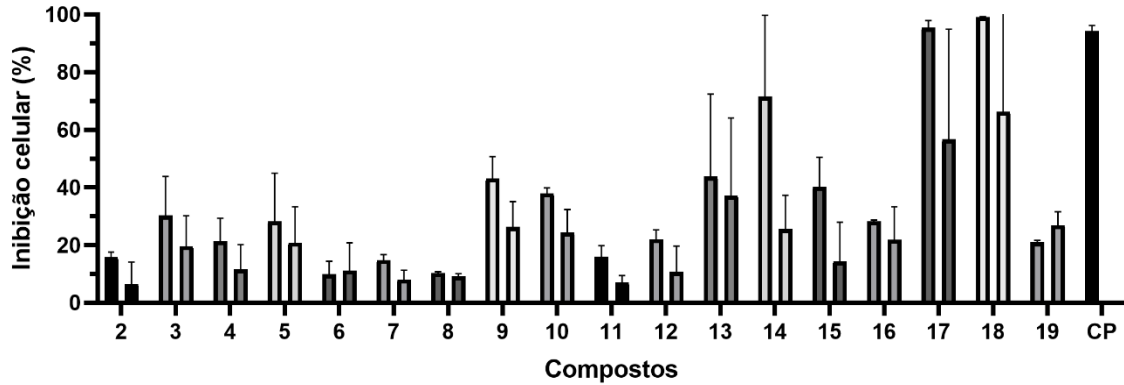
**Fonte:** do autor.

**Figura 4.** Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração acetato de etila contra o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



**Fonte:** do autor.

**Figura 5.** Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração etanólica contra o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

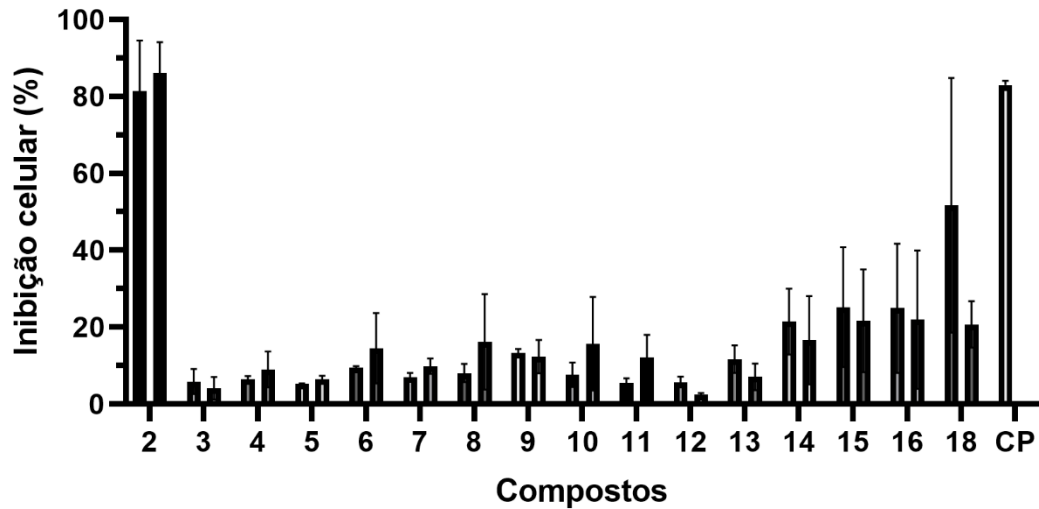


**Fonte:** do autor.

Os extratos que apresentaram uma melhor atividade antixanthomonas foram os números 8 e 18 da fração acética e também o 17 e 18 da fração alcoólica com porcentagens de inibição acima de 80% na concentração de 2000 ug/mL, entretanto essa porcentagem de inibição cai para menos de 60% na concentração de 1000 ug/mL.

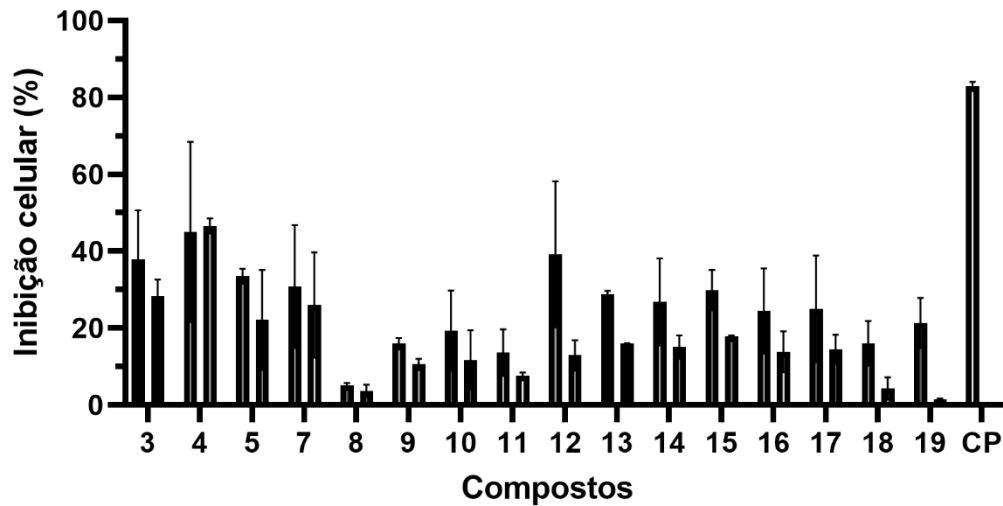
Nos extratos aquosos o destaque foi para a amostra 2 da infusão com porcentagens de inibição celular acima de 80% para ambas as concentrações de 2000 ug/mL e 1000 ug/mL, entretanto, todas as outras amostras de extratos aquosos tanto da infusão quanto da decocção apresentaram porcentagens de inibição celular abaixo de 50% nas concentrações testadas, como pode ser observado pelas figuras 6 e 7.

**Figura 6.** Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração infusão contra o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



**Fonte:** do autor.

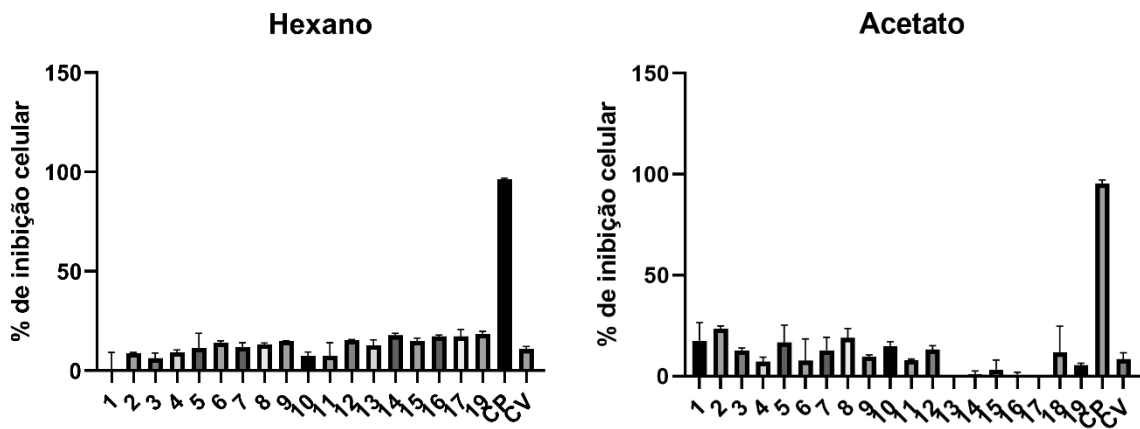
**Figura 7.** Grafico de porcentagem de inibição celular dos extratos da fração decocção contra o isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



**Fonte:** do autor.

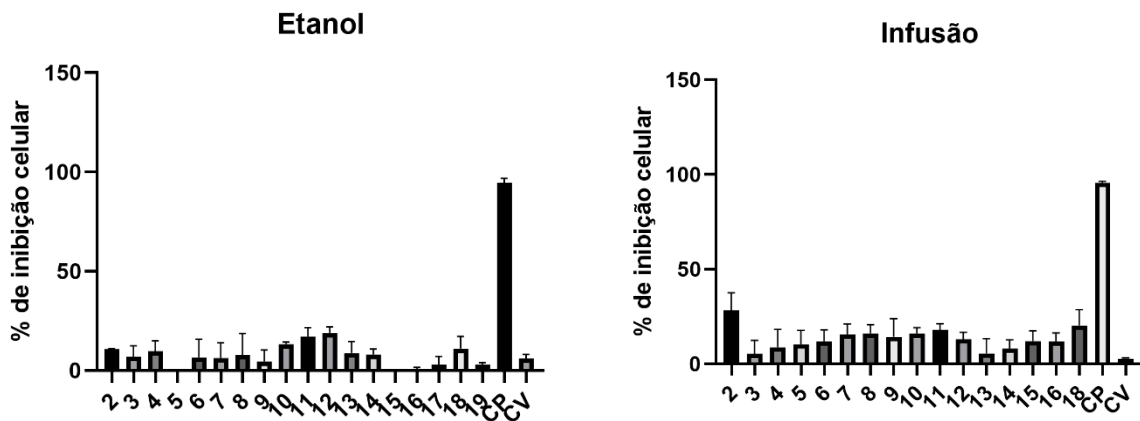
Todos os extratos também foram testados nas concentrações de 100 ug/mL e 50 ug/mL e foram plotados gráficos de inibição celular dos compostos na concentração de 100 ug/mL que podem ser observados abaixo nas figuras 8 e 9.

**Figura 8.** Graficos de % de inibição celular dos extratos hexânicos à esquerda e acéticos à direita.



Fonte: do autor.

**Figura 9.** Graficos de % de inibição celular dos extratos etanólicos à esquerda e infusos à direita.



Fonte: do autor.

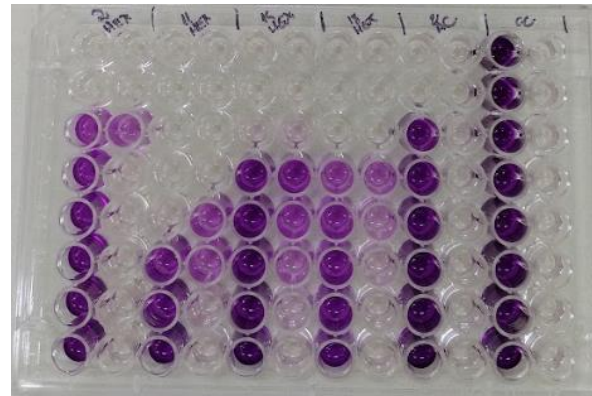
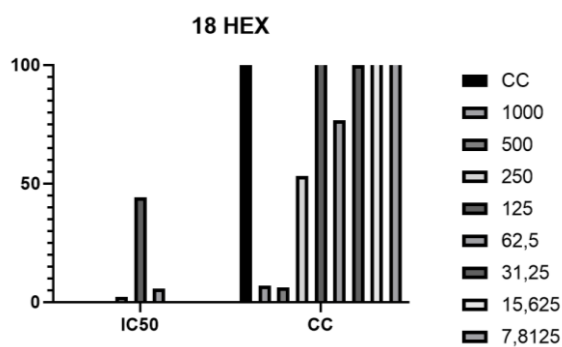
Na concentração de 100 ug/mL, que pode ser observada nos gráficos acima, nenhum dos extratos testados apresentou porcentagens de inibição celular acima de 40% e os extratos não possuíram capacidade de inibir o crescimento da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, não sendo boas fontes de compostos com bioatividade contra este patógeno.

## 2.4. Atividade antiviral e citotóxica

A atividade antiviral e citotóxica e antiviral foram medidas em uma mesma placa, na qual na coluna da esquerda continha apenas as células Vero e os extratos e na coluna adjacente à direita possuía também a presença do Mayaro vírus.

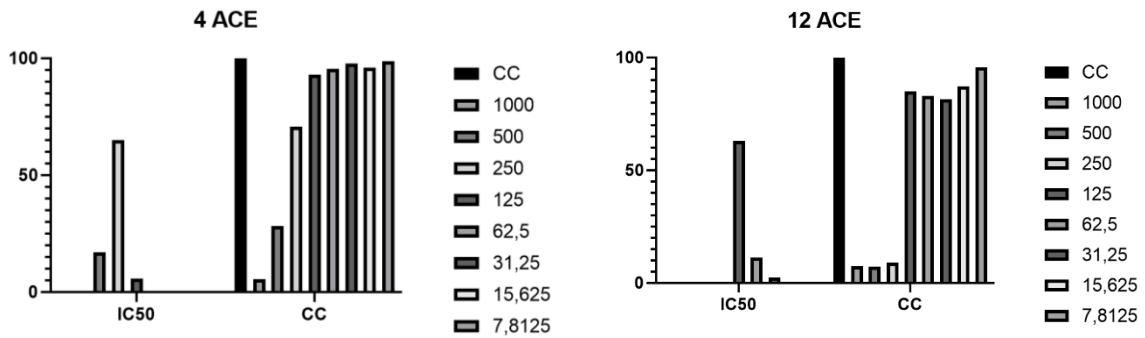
A leitura das placas permitiu os cálculos da porcentagem de viabilidade celular das células presentes nos extratos e também a porcentagem de proteção celular que os extratos forneceram às células contra o Mayaro vírus, e os extratos que apresentaram uma porcentagem de proteção celular acima de 40% tiveram um gráfico plotado na forma de barras, na qual à esquerda têm-se a porcentagem de proteção viral pelos extratos e mais à direita têm-se a porcentagem de viabilidade celular das células em presença dos extratos, relacionando à citotoxicidade das amostras, como observado nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14.

**Figura 10.** Gráfico de proteção viral e citotoxicidade do composto 18 hexânico à esquerda e foto da placa à direita.



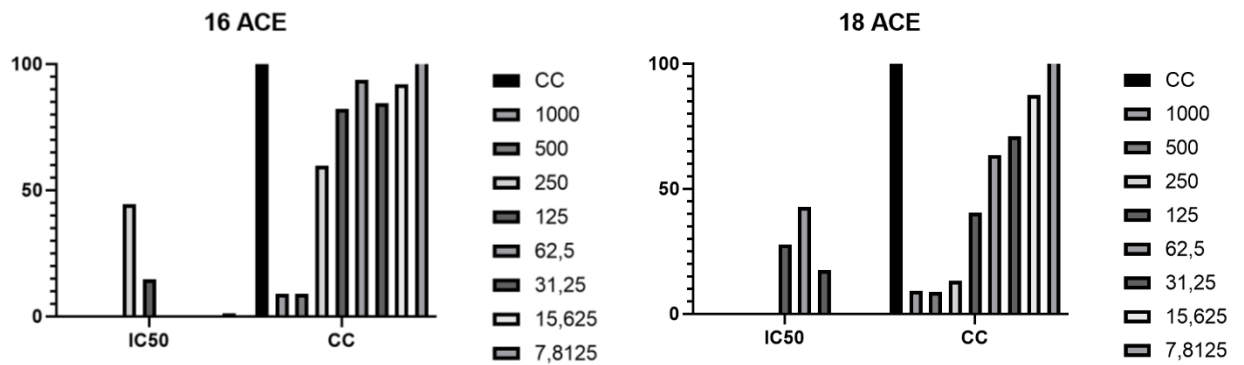
**Fonte:** do autor.

**Figura 11.** Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 4 e 12 acético.



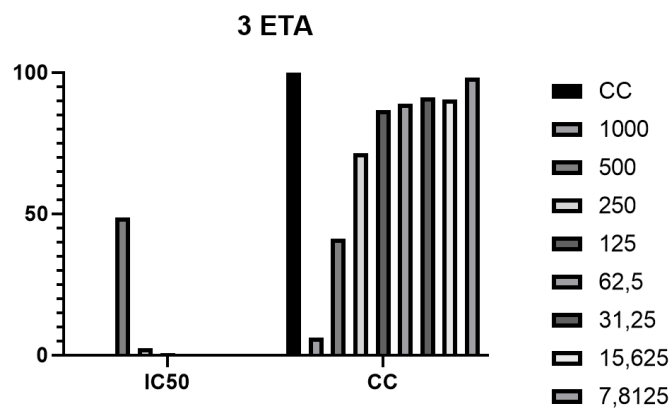
Fonte: do autor.

**Figura 12.** Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 16 e 18 acético.



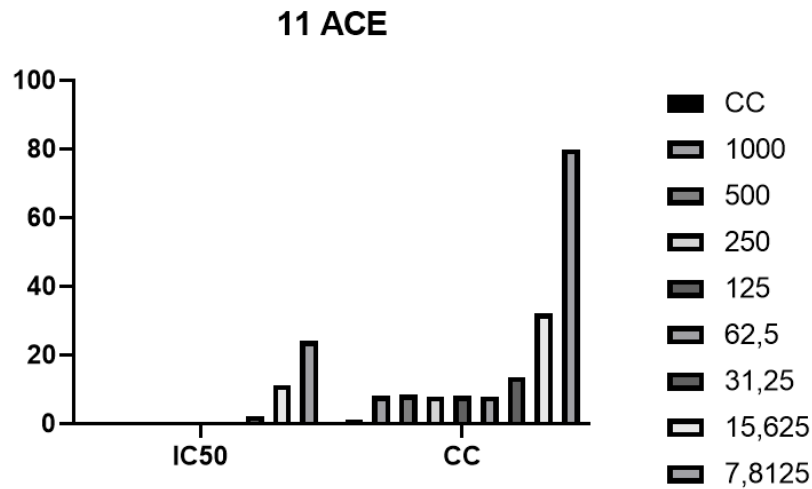
Fonte: do autor.

**Figura 13.** Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 3 etanólico.



Fonte: do autor.

**Figura 14.** Grafico de proteção viral e citotoxicidade do composto 11 acetato



**Fonte:** do autor.

De todos os extratos analisados, as frações que obtiveram maiores percentuais de proteção celular ao Mayaro vírus foi a fração acetato e também tiveram 2 compostos com porcentagens de proteção superiores à 40%, um dos extratos hexânicos e outra dos extratos etanólicos.

O único extrato hexânico com atividade protetora foi o extrato número 18 que apresentou taxa de proteção celular de 44% a 125 ug/mL e zero toxicidade celular na mesma concentração.

Quanto aos extratos acéticos, o extrato 04 apresentou proteção celular de 65%, e viabilidade celular de 70% na concentração de 250 ug/mL. O extrato 12 apresentou uma taxa de proteção celular de 63% e 85% de viabilidade celular em 125 ug/mL. Já o extrato 16 teve valores de 44.5% para proteção viral e 60% de viabilidade em 250 ug/mL e o extrato 18 obteve percentuais de 42.6% e 63.5% para proteção viral e viabilidade celular, respectivamente.

Por fim, o único extrato etanólico que apresentou valores superior à 40% foi o extrato 3 etanólico com valores de proteção viral de 48.6% e viabilidade celular de 41% na concentração de 500 ug/mL.

Todos os extratos analisados que apresentaram atividade biológica antiviral estão resumidos na tabela 8 abaixo:

**Tabela 8.** Resumo dos resultados de screening antiviral

Cogumelo – nº de amostra	Extrato	Resultados
<i>Hypsizygus tessulatus</i> – 11	Acetato	Proteção celular 24% e 79% de viabilidade a 7,8 ug/mL
<i>Ganoderma lucidum</i> – 12	Acetato	Proteção celular 63% e 85% de viabilidade a 125 ug/mL
<i>Pleurotus sp.</i> – 04	Acetato	Proteção celular 65% e 70% de viabilidade a 250 ug/mL
<i>Pycnoporus sanguineus</i> – 18	Hexânico	Proteção celular 44% e zero toxicidade a 125 ug/mL

**Fonte:** do autor

### 3. Conclusão

O processo de extração sequencialmente se demonstrou eficiente na extração dos compostos químicos presentes nos cogumelos, com diferentes rendimentos para cada fração e valores superiores em extratos que foram utilizados solventes mais polares, demonstrando um caráter mais polar da maior parte das moléculas presentes nos cogumelos.

Os extratos não demonstraram boas atividades antioxidantes, ao contrário de trabalhos anteriores disponíveis na literatura, sendo assim, suspeita-se que o tempo de secagem dos extratos sob constante fluxo de oxigênio possa ter degradado moléculas com atividade antioxidante presente nas amostras.

As atividades antiglicantes também não foram satisfatórias, obtendo percentuais de inibição da formação de AGEs inferiores à 15%.

Quanto à atividade fotoprotetora o destaque foi para extrato do cogumelo *Amanita muscaria* que apresentou FPS superior à 6 em 0,15 mg/mL.

A atividade antixanthomonas também apresentou valores de inibição superiores a 80% em concentrações acima de 1000 ug/mL, entretanto, na concentração de 100 ug/mL os valores de inibição foram abaixo de 40%, demonstrando que a atividade bactericida está apenas presente em concentrações muito elevadas, sendo uma fraca atividade biológica.

Os testes antivirais e citotóxicos demonstraram que moléculas com potencial atividade antiviral estão presentes majoritariamente na fração de acetato de etila, com os extratos 04 acetato com taxas de 65% de proteção 70% de viabilidade celular a 250 ug/mL, extrato 11 acetato com 24% de proteção e 79,8% de viabilidade celular a 7,8 ug/mL e o extrato 12 acetato com 63% e 85% de proteção e citotoxicidade, respectivamente, na concentração de 125 ug/mL.

O único extrato da fração hexânica que apresentou atividade antiviral foi o extrato 18 com proteção celular de 44% e viabilidade celular de 100% na concentração de 125 ug/mL.

Outros experimentos estão sendo realizados para o melhor entendimento das amostras 11 acetato e 12 acetato em relação à atividade antiviral, como a autenticação das amostras utilizando técnicas de extração de DNA, PCR e Barcoding para identificação molecular dos macrofungos que foram utilizados como fonte dos produtos naturais, aprofundamento nos ensaios biológicos antivirais contra Mayaro Vírus para compreender em qual fase da infecção viral os extratos apresentam proteção celular, como também análises químicas utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas LCMS/MS para descrever os constituintes químicos e identificar os compostos bioativos por meio de análises de rede de moléculas.

## Referências

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

FRAIGE, Karina et al. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and screening for biological activities of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 196-204, 2018.

LIANG, Ningjian; KITTS, David D. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 19180-19208, 2014.

LUNCEFORD, Nicole; GUGLIUCCI, Alejandro. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

MANSUR, João de Souza et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol**, p. 121-4, 1986.

MARTIN, Anandi et al. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3616-3619, 2003.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

REICHARDT, Christian; WELTON, Thomas. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. John Wiley & Sons, 2010.

SILVA, I. C. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.

WAGEMAKER, Tais Aleriana Lucon. **Aplicação do óleo de café em formulações cosméticas: avaliação da estabilidade e da eficácia fotoprotetora.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.