



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA**
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO (PROGRAD)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA – ICEN
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA – LPQ

NEIDELÊNIO BALTAZAR SOARES

**ESTUDO *IN SILICO*, AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ECOTOXICIDADE,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DO FUNGO
*Lentinus crinitus***

REDENÇÃO
2021

NEIDELÊNIO BALTAZAR SOARES

**ESTUDO *IN SILICO*, AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ECOTOXICIDADE,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DO FUNGO
*Lentinus crinitus***

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura plena em Química do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura plena em Química.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

REDENÇÃO

2021

Soares, Neidelenio Baltazar.

S652e

Estudo in silico, avaliação fitoquímica, ecotoxicidade, antioxidante e antibacteriana do extrato metanólico do fungo *lentinus crinitus* / Neidelenio Baltazar Soares. - Redenção, 2021. 83f: il.

Monografia - Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Antioxidantes. 2. Docking Molecular. 3. *Lentinus crinitus* (Fungo) - Avaliação fitoquímica. 4. Simulação (Computadores). I. Título

CE/UF/BSP

CDD 547

2021

UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA

NEIDELÊNIO BALTAZAR SOARES

**ESTUDO *IN SILICO*, AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ECOTOXICIDADE,
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DO FUNGO
*Lentinus crinitus***

Monografia julgada e aprovada para obtenção do título de Graduado em Licenciatura plena em Química pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

Data: 26/03/2021

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira



Prof. Dr. João Sammy Nery de Souza (avaliador)

Universidade Federal do Piauí



Dra. Ethaniêlda de Lima Coelho (Avaliadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

REDENÇÃO

2021

DEDICO

À DEUS, que excede todo o entendimento e conhecimento. À toda minha família. E em especial ao meu avô Domingos Baltazar que Deus o tenha em sua graça. (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar sempre, garantindo saúde e forças para persistir sempre e não desistir, apesar dos obstáculos encontrados. Aos meus amados pais Miguel Soares e Virginia Baltazar a quem sou e estarei eternamente grato, por garantirem que faltasse muitas coisas em casa, mas nunca a educação e necessário, muito obrigado por apoiarem esse sonho que parecia tão impossível.

Aos meus queridos irmãos Marcia Soares, Denilson Soares, Jurema Soares, Ariel Soares, Geneclenia Soares e Heliana Santana por sempre acreditarem em mim e nunca esquecerem de ligar e incentivar nessa caminhada, obrigado pelo apoio.

Ao meu querido avô Senhor Domingos Baltazar, que hoje não poderá ver o fruto dos seus ensinamentos, que a sua alma descanse em paz, obrigado por tudo que fez por mim enquanto em vida, as tuas ligações serviram para fortificar esse homem que sou hoje.

Aos meus familiares próximos e distantes, aos que nunca esqueceram de mandar uma e outra mensagem, de dar o seu apoio, eu agradeço por tudo.

Aos meus queridos amigos e irmãos em todos os momentos como: Jones Calongo, Emanuel Cipriano Neto Martins, Paula Lino, Bartolomeu Agostinho, Vicente Miúdo Kimbamba, Kialunda Sozinho, Fernandes Junior, Flávia Medar, Mila Sousa, Meury Coluna, Isaldina Capingana, Margarida Bendo, Claudia Cesar, Vanuza Malungo, Hermelindo Chico, Moniz Baptista, Augusto Panzo Cambunda, Lourenço Lopes, Benvindo Lukoki, Claudio Machado, Paz Paulo. Obrigado por abraçarem conhecer essa pessoa que sou hoje, obrigado por não desistirem quando surgiu alguma frustração, vocês fazem parte dessa caminhada.

À minha namorada e futura noiva Carla de Pina, pelo apoio incondicional e por compreender sempre nos momentos difíceis.

Aos companheiros do Laboratório, obrigado pelos sorrisos e ensinamentos. Em especial a Brunna, o Rubson, o Luthe e o Lutuima.

Aos companheiros da “Parada Química”, obrigado pelos sorrisos e ensinamentos. Levarei vocês para onde eu for.

Aos companheiros da “Placa”, pelos sorrisos e momentos incríveis que passamos, pelas conversas e trocas de ideias, vocês sem sombra de dúvidas acrescentaram no homem que sou hoje.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa Interdisciplinar em Química (GIQ), obrigado pelo apoio e prestatividade, e sobretudo, pelos momentos de sorrisos.

Ao meu professor e orientador Dr. Alúcio Marques Fonseca pela oportunidade cedida de ser membro do grupo GIQ e pelo apoio prestado em todos os momentos da graduação, obrigado por aceitar ser meu mestre.

À EMBRAPA, na pessoa de Paulo Riceli, por ajudar na injeção do extrato utilizado para a identificação dos compostos que constaram nesse manuscrito.

Agradeço aos programas: PIBID, PULSAR, PIBIC por onde eu atuei como bolsista durante o período que estive na Universidade.

À METALVI, por onde eu passei como estagiário de Auxiliar de laboratório, obrigado pela oportunidade concedida de conciliar os meus aprendizados de Química com a prática no vosso laboratório realizando diversas análises.

Aos professores do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza (ICEN), que contribuíram ricamente na minha formação e que sempre aconselharam e mostraram o caminho certo a seguir, obrigado.

Aos professores membros da banca que aceitaram participar da avaliação desse trabalho eu agradeço do fundo do coração.

A todos que Direta ou Indiretamente contribuíram para este trabalho. O meu muito obrigado.

“Não é um destino que se cumpra, mas uma escolha que se desdobra. Não acho justo creditar os resultados da vida a movimentos ocultos, forças que não aceitam nossa intervenção.

A mim soa, mais sensato compreender a vida como um exercício de semeadura. O plantio de hoje já nos indica a colheita de amanhã.

E se não florescer, se não for como esperávamos, seguimos plantando tudo de novo. Cercados de mistério, mas guiados pela sensatez”.

Pe. Fábio de Melo.

RESUMO

O Reino fungi possui uma grande importância para completar os ciclos biológicos na qual o ser humano faz parte, podendo muitas vezes ser maléfico ou benéfico em função da relação com outros organismos. O fungo *Lentinus crinitus* é um cogumelo consumido por algumas tribos indígenas, por essa questão é fundamental que se estude e se aprofunde para o conhecer. O objetivo do presente trabalho é avaliar as propriedades fitoquímicas do fungo *Lentinus crinitus* através de ensaios antioxidante, toxicidade frente à *Artemia salina* e antibacteriano usando as bactérias *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa aureus* e *Escherichia coli*, além de identificação da composição química do extrato mediante a métodos espectroscópicos como Cromatografia Líquida acoplada ao Espectro de Massas (LC-MS), bem como o estudo de *Docking* molecular com todos os compostos identificados frente à Transferase do Zika vírus (5M5B). Foram identificados nesse estudo 16 compostos demonstrando que o fungo *Lentinus crinitus* é uma fonte considerável de metabolitos secundários. Quanto ao teste de toxicidade frente à *Artemia salina* no tempo de 24 horas obteve-se $CL_{50} = 2747,2 \mu\text{g/mL}$ e em 48 horas mortalidade total. Para o teste antioxidante obteve-se 62,4% de inibição. Para a atividade antibacteriana do extrato, observou-se que não houve a inibição nas concentrações testadas. Em relação ao estudo fitoquímico, a composição química foi identificada, por meio do LC/MS, e o composto 1,13,4-di-O-Caffeoylquinic acid (composto 1), apresentou valores aproximados com o ligante nativo SAM da Transferase do Zika vírus, com energia de afinidade igual a -8,8 Kcal/mol e o seu desvio padrão médio (RMSD) de 1,872 Å. Deste modo foi possível calcular sua constante de afinidade $K_i (\mu\text{M}) = 0,689$. Portanto, pode-se concluir que o extrato do fungo *Lentinus crinitus* não possuiu atividade antibacteriana frente às bactérias *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa aureus* e *Escherichia coli*, e que o extrato não apresentou toxicidade nas concentrações testadas. A atividade antioxidante demonstrou que seu extrato pode ser considerado como potencial fontes de antioxidantes naturais. O ensaio antibacteriano sugere um material de baixa toxicidade com concentração abaixo de 500ppm. O resultado da simulação por meio de *docking* molecular dos fitoquímicos identificados apresentou como sendo o composto 1 um candidato promissor como inibidor do Zika vírus, tendo possibilidade de ser explorado pela indústria farmacêutica, caso outros testes sejam realizados.

Palavras Chaves: Fungos. *Lentinus crinitus*. Antioxidante. Toxicidade. CL-EM/EM. Docking Molecular.

ABSTRACT

The Fungi Kingdom has tremendous importance in completing the biological cycles in which the human being is part. It can often be harmful or beneficial depending on the relationship with other organisms. The fungus *Lentinus crinitus* is a mushroom consumed by some indigenous tribes, so it is essential to study and deepen to know it. The objective of this work is to evaluate the phytochemical properties of the fungus *Lentinus crinitus* through antioxidant assays, toxicity to *Artemia salina* and antibacterial using *staphylococcus* bacteria, *Pseudomonas aeruginosa aureus*, and *Escherichia coli*, as well as identification of the chemical composition of the extract through spectroscopic methods such as Liquid Chromatography coupled to the Mass Spectrum (LC-MS), as well as the molecular Docking study with all compounds identified against Zika Virus Transferase (5M5B). In this study, 16 compounds were identified, demonstrating that the fungus *Lentinus crinitus* is a significant secondary metabolite source. The test against *Artemia saline* in the 24-hour time, $CL_{50} = 2,747.2 \mu\text{g/mL}$, and total mortality was obtained 48 hours. For the antioxidant test, 62.4% inhibition was obtained. For the extract's antibacterial activity, it was observed that there was no inhibition in the tested concentrations. Regarding the phytochemical study, the chemical composition was identified using LC/MS, and the compound 1,13,4-di-O-Caffeoylquinic acid (compound 1) presented approximate values with the native SAM binding of Zika Transferase virus, with affinity energy equal to -8.8 Kcal/mol and its mean, standard deviation (RMSD) of 1.872 \AA . Thus, it was possible to calculate its affinity constant $K_i = 0.689 \mu\text{M}$. Therefore, it can be concluded that the extract of the fungus *Lentinus crinitus* did not have antibacterial activity against the bacteria *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa aureus*, and *Escherichia coli* and that the extract did not present toxicity in the tested concentrations. Antioxidant activity has shown that its extract can be considered as potential sources of natural antioxidants. The antibacterial assay suggests a low toxicity material with a concentration below 500ppm. The simulation results by molecular docking of the identified phytochemicals presented as compound 1, a promising candidate as a Zika virus inhibitor, being exploited by the pharmaceutical industry if other tests are performed.

Key Words: Fungi. *Lentinus crinitus*. Antioxidant. Toxicity. LC-MS/MS. Molecular Docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Basidiocarpo da espécie <i>Lentinus crinitus</i>	23
Figura 2: Principais malefícios causados pelos fungos	24
Figura 3: Principais Benefícios dos Fungos	24
Figura 4: Representação da molécula de DPPH	28
Figura 5: Representação Esquemática de um Espectrofotômetro de Massas	30
Figura 6: Imersão do fungo no solvente durante 1 dia	37
Figura 7: Representação da extração do Fungo	38
Figura 8: Sistema desenvolvido para eclosão dos cistos da <i>Artemia salina</i>	39
Figura 9: Captura do DPPH por antioxidante	41
Figura 10: Captura do DPPH por antioxidante	41
Figura 11: Espectro LC-MS/MS do Extrato metanólico do fungo <i>Lentinus crinitus</i> no modo íon positivo $[M+H]^+$	53
Figura 12: Espectro LC-MS/MS do Extrato metanólico do fungo <i>Lentinus crinitus</i> no modo íon negativo $[M-H]^-$	54
Figura 13: Padrão de halo para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia</i> utilizando discos Cloranfenicol	61
Figura 14: Atividade antibacteriana do extrato metanólico do fungo <i>Lentinus Crinitus</i> frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 15: Grid do ligante nativo SAM (S-Adenosilmetionin) utilizado para o Docking	65
Figura 16: Dados obtidos do docking com as estruturas dos compostos identificados e o ligante nativo	66
Figura 17: (a) Redocking: laranja a SAM na forma co-cristalizada e em azul a SAM obtida pelo redocking. (b) Docking do composto 1 (vermelho) com a proteína ancorando na mesma região da SAM (laranja)	68
Figura 18: (a) em vermelho o composto 1 interagindo em 3D com os principais resíduos de aminoácido. (b) em laranja o ligante co-cristalizado SAM interagindo em 3D com os principais resíduos de aminoácidos	69
Figura 19: Interações receptor-ligante com os resíduos de aminoácidos e suas distâncias	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação da porcentagem inibitória do DPPH e da concentração do extrato metanólico do fungo	46
Gráfico 2: Porcentagem das Artemias Salina mortas em diferentes concentrações, com extrato metanólico, com o tempo de 24 horas	64
Gráfico 3: Gráfico da relação entre RMSD (Desvio Quadrado Médio) e KI (Constante de Inibição)	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemas Comparativos da Classificação dos Fungos	21
Tabela 2: Posição Taxonômica do Basidiomiceto <i>Lentinus crinitus</i>	22
Tabela 3: Metabólitos secundários isolados do <i>Lentinus crinitus</i> descrito na Literatura	26
Tabela 4: Reagente, fórmula química e sua marca Erro! Indicador não definido.	
Tabela 5: Equipamentos utilizados e suas marcas	34
Tabela 6: Representação das concentrações da <i>Artemia salina</i>	40
Tabela 7: Representação das concentrações das soluções do extrato metanólico utilizado no DPPH	41
Tabela 8: Representação da concentração em mg/mL e µg/mL, da porcentagem imitativa e a absorvâncias do extrato metanólico do fungo	45
Tabela 9: Dados dos parâmetros obtidos da reta nos gráficos de determinação do valor de IC ₅₀ , do extrato metanólico	47
Tabela 10: Dados do espectro de LC-MS e tempo de retenção (tR) dos compostos detectados no extrato metanólico do fungo <i>Lentinus crinitus</i> , em modo de íon positivo [M-H] ⁺	50
Tabela 11: Dados do espectro de LC-MS e tempo de retenção (tR) dos compostos detectados no extrato metanólico do fungo <i>Lentinus crinitus</i> , em modo de íon negativo [M-H] ⁻	51
Tabela 12: Proposta das estruturas dos compostos identificados no extrato no íon positivo	59
Tabela 13: Proposta das estruturas dos compostos identificados no extrato no íon positivo	60

Tabela 14: Resultado da Concentração Mínima Inibitória do extrato metanólico do fungo ($\mu\text{L/mL}$).....	62
Tabela 15: Mortalidade das Artemia salina com extrato metanólico, com o tempo de 24 horas a 48 horas	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angstrom
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CL ₅₀	Concentração letal necessário para matar 50% das <i>Artemia salina</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CG-MS	Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massas
[]	Concentração Molar
LC-MS	Cromatografia Líquida - Espectrofotometria de Massas
G	Grama
°C	Graus Célsius
%	Porcentagem
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
Ki	Constante de Inibição
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
m	Massa do soluto, em gramas
MM	Massa Molar (g/mol)
µg/ML	Microgramas por mililitro
µL/ML	Microlitro por Litro
mg/L	Miligrama por Litro
mg/mL	Miligrama por Mililitro
mL	Mililitro
m/z	Razão Massa Carga
M	Molaridade
pH	Potencial de Hidrogênio
PDB	Protein Data Bank
RMSD	Desvio Quadrado Médio
tR	Tempo de Retenção dos Compostos
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNILAB	Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 objetivos específicos	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Química de produtos naturais	18
2.2 Aspectos gerais sobre os fungos	19
2.3 Classe basidiomicetos de fungos	21
2.4 Características do <i>Lentinus crinitus</i>	22
2.5 Importância ecológica dos fungos	23
2.6 Metabólitos secundários do gênero <i>Lentinus</i> descrito na literatura.....	25
2.7 Atividades antioxidantes pelo método espectrométrico de descoloração do radical DPPH.....	27
2.8 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (CL/EM)	28
2.9 Espectrometria de massas	29
2.10 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
2.11 Atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão	31
2.12 Considerações sobre as bactérias	32
2.13. Fundamentação sobre Docking Molecular	33
3 METODOLOGIA.....	34
3.1 Parte experimental	34
3.1.1 Especificações dos equipamentos utilizados	34
3.1.2 Coleta e lavagem do fungo.....	36
3.1.3 Extração do fungo	37
3.1.4 Teste de ecotoxicidade.....	38
3.1.5 Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	39
3.1.6 Teste antioxidante	40
3.1.7 Testes da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco	42
3.1.8 Análise cromatográfica	43
3.1.9 Simulação Computacional.....	44

3.2.9.2. Otimização das Estruturas	44
3.9.2.3 Docking Molecular	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1 Atividade antioxidante	45
4.2 Identificação cromatográfica dos constituintes químicos no extrato	48
4.2.1 Descrição dos Picos apresentado no Cromatograma em modo positivo	54
4.2.2- Fragmentos apresentados nos picos dos cromatogramas em modo negativo.	56
4.3 Teste da atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco	61
4.4 Teste de ecotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	62
4.5. Docking Molecular com os Compostos identificados Frente à Transferase do Zika Vírus.....	65
4.5.1 Visualização das Interações do Complexo Receptor-Ligante	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
Encaminhamentos.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A convenção da diversidade biológica foi o primeiro instrumento legal para assegurar a conservação e o uso sustentável dos recursos naturais no planeta (FRANCO, 2013). O fórum aconteceu quando o interesse pelo conhecimento da diversidade da vida e as preocupações com a sua conservação, tanto entre pesquisadores como entre uma parcela considerável da sociedade, tomavam impulso. A Sociedade para a Biologia da Conservação (SCB) foi fundada em 1985, e em 1987 foi publicado o primeiro número da revista *Conservation Biology*, que logo se tornou o principal veículo de divulgação científica e debate sobre as questões relacionadas com a biodiversidade (SARKAR, 2002).

O termo biodiversidade, ou diversidade biológica, descreve a riqueza e a variedade do mundo natural, as plantas, os animais e os microrganismos que fornecem alimentos, remédio e boa parte da matéria prima consumida pelo homem durante décadas (DIAS, 1995).

Dentre os mais diversos microrganismos encontrados nos reinos Monera, Protista e Fungi, as bactérias e os fungos são os mais estudados. Os fungos são seres de natureza complexa que desde a antiguidade têm algumas de suas espécies utilizadas como alimentos, devido ao sabor agradável e a suas propriedades nutricionais e medicinais, sendo também importantes agentes em diversos processos industriais como na obtenção de enzimas, vitaminas, síntese de antibióticos, extração de polissacarídeos, de pigmentos, lipídeos e glicolipídios (CHANG; BUSWELL, 1996). Estudos anteriores demonstraram que esses organismos produzem um elevado número de metabólitos secundários com atividades antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, antitrombótica, citostática, hipoglicemia e antimicrobiana (RAMOS et al., 2010).

Em função de seu potencial industrial, os fungos que anteriormente eram vistos apenas como tóxicos, são também hoje utilizados como decompositores dessas substâncias. Várias pesquisas têm surgido, em função do avanço tecnológico, demonstrando assim o interesse dos pesquisadores voltados para a área de micologia, que é, portanto, a área da Biologia destinada ao estudo dos fungos.

Os fungos vêm sendo explorados na medicina e em outros processos biotecnológicos envolvidos na produção de enzimas, e tem apresentado uma grande importância no setor agrícola e ecológico, atuando como decompositor de restos vegetais, e sobretudo degradando substâncias tóxicas e na simbiose com as plantas. (NEPOMUCENA, 2010).

Em relação a sua natureza, os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios microaerófilos, uni ou pluricelulares, com parede celular composta geralmente de quitina e/ou celulose, além de outros carboidratos complexos, com glicogênio como substância de reserva, nutrição por absorção, podendo viver como sapróbios, parasitas ou simbiontes com outros organismos (PUTZKE; PUTZKE, 2004). Possuem o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, e o seu conjunto recebe o nome de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede e localização do pigmento. Constituem um grupo muito grande e heterogêneo encontrado em qualquer nicho ecológico. O número de espécies fúngicas espalhadas pelo mundo está estimada em cerca de 1 milhão e 500 mil, sendo que destas, apenas foram descritas cerca de 74 mil espécies. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (AZEVEDO, 2004).

Esta pesquisa surgiu da necessidade de realizar estudo na área de produtos naturais para fazer uma análise fitoquímica da espécie de fungo que nascem nas árvores do maciço de Baturité (mangueiras e a árvore nim indiano), que são conhecidos como orelha de pau, além de fornecer algumas informações sobre a presença de metabolitos secundários.

A distribuição dos fungos tange aproximadamente todas as regiões do planeta, porém, sua maior incidência está em ambientes de clima tropical, quente e úmido, o que o caracteriza como um ser cosmopolita. Podem ser encontrados no solo, águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (BONONI et al., 1999).

O fungo *Lentinus crinitus* é uma espécie bastante comum em todo o Brasil e são frequentemente associadas a troncos em decomposição. Apresentam basidoma centralmente estipitado, infundibuliforme e superfície abhiminal verrugosa à estrigosa (BALLAMINUT, 2007).

Os procedimentos laboratoriais deste trabalho dividiram-se em 5 etapas que foram preestabelecidas no desenvolvimento central do projeto de pesquisa seção primeira, são apresentados a Introdução de forma geral e os objetivos gerais e específicos do trabalho. Na seção segunda apresenta-se o referencial teórico utilizado para construção bibliográfica do trabalho, na 3ª seção apresentamos a metodologia utilizada para responder os objetivos gerais e na quarta seção traz-se uma discussão em torno dos resultados obtidos em comparação com a literatura. E na quinta e última seção apresenta-se as considerações finais do trabalho.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo montar ensaios para a avaliação da capacidade funcional do fungo *L. crinitus* quanto ao potencial antioxidante, ecotoxicológico e antimicrobiano e fazer a avaliação fitoquímica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a ecotoxicidade do extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* frente a *Artemia salina*;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus*;
- Determinar a capacidade antibacteriana frente às bactérias *E.coli* e *S. aureus*, *P. aeruginosa*;
- Identificar a composição química do extrato mediante métodos espectroscópicos como Cromatografia Líquida acoplada ao espectro de massa (LC-MS/MS).
- Estudo de Docking Molecular com as estruturas identificadas frente a Proteína 5M5B (transferase do vírus da Zika).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Química de produtos naturais

Desde os tempos remotos, o ser humano tem utilizado os produtos naturais para diversas finalidades, uma delas foi para o tratamento de doenças, para isso, os antigos utilizaram ervas e folhas para este fim (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). É crescente a utilização e a demanda de produtos naturais em todo o mundo, especialmente devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente também (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).

A Química Orgânica Sintética está passando por profundas transformações. A busca por novas metodologias, praticidade, eficiência é hoje centro e foco das pesquisas na área. Isso está obrigando a Química Orgânica, como todas as outras áreas, a se adaptar e buscar alternativas mais eficientes, mais limpas e mais elegantes para alcançar as sínteses totais de produtos naturais (VICTOR, 2017).

A Química dos Produtos Naturais é uma subárea da Química Orgânica que foi estabelecida desde os tempos da Alquimia e que experimentou apenas o seu apogeu com o surgimento das técnicas de análise espectroscópica (BERLINK et al., 2017).

O maior desenvolvimento e emprego das técnicas de ionização se deu no início dos anos 90 e isso possibilitou a análise de moléculas termolábeis, complexos organometálicos e moléculas de elevada massa molecular incluindo polímeros e proteínas. Estes feitos ajudaram a popularizar a técnica nas mais diferentes áreas das ciências biológicas, pela Química de Produtos Naturais. Houve uma alteração gradual com a inserção dos métodos cromatográficos para determinação de produtos naturais que acelerou num intervalo de tempo considerável. conforme concordam A introdução dos métodos espectroscópicos e das diferentes modalidades de cromatografia na fitoquímica alterou gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e de determinação estrutural de Produtos Naturais (PINTO et al., 2002).

Assim, a estudo fitoquímico é importante principalmente quando ainda não são dispostos todos os estudos químicos com espécies de interesse popular, tendo como

objetivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e avaliar a sua presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES et al., 2004).

Para Berlink et al. (2017), é indiscutível a importância da Química dos Produtos Naturais. Pois, sabe-se que a maioria dos medicamentos que são sintetizados advém de produtos naturais ou seus derivados. Concordando com Oliveira et al. (2013), que nos mostra o grau de relevância da química dos produtos naturais por ser útil para o homem com aplicação como fármacos, agroquímicos, corantes, fragrâncias e aromatizantes.

Atualmente, podemos afirmar que a química de produtos naturais vive seu segundo apogeu, de maneira tão extensa e intensa que esta ciência praticamente teve que ser “desmembrada” em tópicos como química biológica, biologia química e química bio-orgânica, para além de suas especialidades mais reconhecidas, a fitoquímica e a farmacognosia (BERLINK et al., 2017).

Como mostram novamente Viegas, Bolzani e Barreiro (2006), o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais deve-se pela convivência mantida com os diferentes grupos étnicos que permitiu o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas. [...] E nas últimas décadas os microrganismos têm recebido uma especial atenção por parte das indústrias e pesquisadores que têm revelado enorme potencial nas bactérias, fungos e leveduras (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007). As plantas e microrganismos cultiváveis são as principais fontes de moléculas biologicamente ativas e terapeuticamente úteis, embora as triagens contínuas destas fontes frequentemente levem a altos índices de reisolamento de substâncias já caracterizadas. Fontes de biodiversidade menos exploradas ou inexploradas estão frequentemente associadas à nova diversidade química. “Entre estas fontes podem ser citadas os microrganismos extremofílicos, que vivem em condições ambientais de temperaturas anormalmente altas ou baixas, de escassez de umidade ou luminosidade, além dos microrganismos endofíticos” como é o caso dos fungos que se pretende estudar nesse trabalho.

2.2 Aspectos gerais sobre os fungos

De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, que obtêm sua alimentação a partir de matéria orgânica

inanimada ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Concordando com Putzke e Putzke (2004), que complementaram que os fungos podem ser aeróbios, aclorofilados, microaerófilos, uni ou pluricelulares com parede celular composta geralmente de quitina ou celulose além de outros carboidratos complexos, com glicogênio como substância de reserva, nutrição por absorção, podendo viver como aeróbios, parasitas ou simbioses com outros organismos.

Para Sidrim e Rocha (2004), os fungos apresentam uma membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. Por não possuírem pigmentos fotossintéticos, capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos, classificam-se como seres heterotróficos, pois aproveitam a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes, contendo na arquitetura da célula fúngica estruturas como parede celular, citoplasma, mitocôndrias e núcleo. Segundo Silva e Malta (2016), atualmente, estima-se que o reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente em todos os ecossistemas existentes no planeta. Aproximadamente 70.000 foram descritas até hoje, estando dentre elas as causadoras de micoses em humanos, de doenças em plantas cultivadas e as de importância biotecnológica.

A classificação moderna dos fungos reconhece quatro filos principais dos fungos: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota. O único desses filos do Reino Fungi que possui células móveis é o Chytridiomycota, indicando a dependência de água para se reproduzir. Os demais não possuem, essa ausência de células móveis nos restantes filos reflete uma alteração no curso evolutivo dos fungos, mostrando que a maioria é geralmente terrestre (SILVA; COELHO, 2006).

Os fungos são organismos muito diferentes, se comparados a animais e vegetais. A variação morfológica é muito grande, existindo espécies macro e microscópicas, o que contribui para a existência de muitos sistemas de classificação que ainda hoje sofrem adições e alterações (PUTZKE; PUTZKE, 2004). Na tabela abaixo é apresentada a classificação dos fungos de acordo com diversos autores e modificado por Putzke (2004).

Tabela 1: Sistemas Comparativos da Classificação dos Fungos

Hawkworth et al. (1983)	Hawkworth et al. (1995)	Alexopoulos et al. (1996)
Reino Fungi Divisão Myxomycota Divisão Eumycota	Reino Chromista Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota Filo Oomycota	Reino Stramenopila Filo Hyphochytridiomycota Filo Labyrinthulomycota Filo Oomycota
Subdivisões: ▪ Mastigomycotina ▪ Zygomycotina ▪ Ascomycotina ▪ Deuteromycotina	Reino protozoa Filo Acrasiomycota Filo Dictyosteliomycota Filo Myxomycota Filo Plasmodiophoromycota	Reino Protista Filo Acrasiomycota Filo Dictyosteliomycota Filo Myxomycota Filo lasmodiophoromycota
	Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota	Reino Fungi Filo Chytridiomycota Filo Zygomycota Filo Ascomycota Filo Basidiomycota

Fonte: Modificado de (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

Quanto ao seu habitat, os fungos apresentam-se como cosmopolitas, ou seja, encontram-se distribuídos em todas as regiões do planeta, porém, de maior incidência em ambientes de clima tropical, quente e úmido. Podem ser encontrados no solo, águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (TEIXEIRA et al., 2007).

2.3 Classe basidiomicetos de fungos

De acordo com Alexopoulos, Mims e Blackweel (1996), os basidiomicetos são incluídos taxonomicamente no Filo Basidiomycota do Reino Fungi. Morfológicamente são caracterizados como fungos que produzem esporos de origem sexuada em estruturas especializadas chamadas basídios, onde ocorre a cariogamia e a meiose. Para Nepomucena (2010. p.35) entende-se que os “[...] fungos do grupo dos basidiomicetos pertencem ao que há de mais evoluído entre os seus representantes; incluem-se nele os cogumelos, fungos gelatinosos, ferrugens, orelha-de-pau e alguns leveduriformes”.

O número de espécies de basidiomicetos está estimado em 140.000, no entanto, menos de 10% é conhecido (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005). Esta

classe compreende 22.300 espécies distribuídas em 3 classes, 41 ordens e 165 famílias.

Em ambientes terrestres, os basidiomicetos atuam principalmente como decompositores de madeira, sendo que alguns podem decompor esterco e folhas, são conhecidos alguns parasitas de espécies agrícolas importantes ou de árvores. Podem ainda formar associações micorrízicas com vegetais ou algas, formando líquens. Algumas espécies são cultivadas comercialmente e outras são coletadas em áreas naturais e utilizadas como alimentos (NEPOMUCENA, 2010).

2.4 Características do *Lentinus crinitus*

Lentinus crinitus é um fungo pertencente à classe dos basidiomicetos que apresenta a seguinte classificação taxonômica de acordo com a tabela abaixo (NEPOMUCENA, 2010):

Tabela 2: Posição Taxonômica do Basidiomiceto *Lentinus crinitus*

Basidiomiceto <i>Lentinus crinitus</i>	
Reino	Fungi
Divisão	Basidiomycetes
Classe	Basidiomycetes
Subclasse	Holobasidiomycetidaea
Ordem	Agaricales
Família	Trichomataceae
Gênero	<i>Lentinus</i>
Especie	<i>Crinitus</i>

Fonte: Nepomucena (2010).

Segundo Nepomucena (2010), a espécie *Lentinus crinitus* apresenta Píleo ou chapéu com 2-5 cm de diâmetro, frutificações castanhas, deprimidos no centro. Apresentam superfície com feixes de pelos de 1 mm de comprimento conforme a figura (1).

Figura 1: Basidiocarpo da espécie *Lentinus crinitus*



Fonte: Autores (2020).

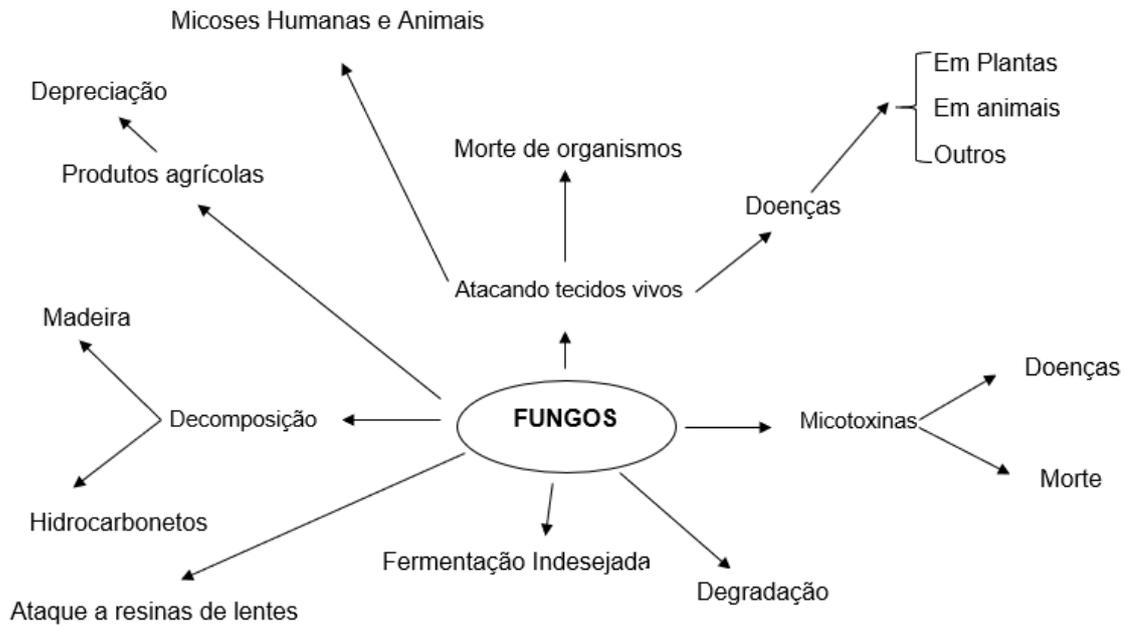
“Estudos de etnomicologia apontam este cogumelo como comestível por algumas tribos indígenas, somente após cozimento na brasa, pois, segundo relatos indígenas ele provoca vômitos se ingerido cru” (NEPOMUCENA, 2010, p. 36).

2.5 Importância ecológica dos fungos

Para Silva e Malta (2016, p. 51) caso o reino fungi seja “[...] extinto, ocasionaria também o desaparecimento da maioria das espécies atualmente existentes, inclusive a humana, uma vez que sem os fungos os ciclos biológicos não seriam completados”.

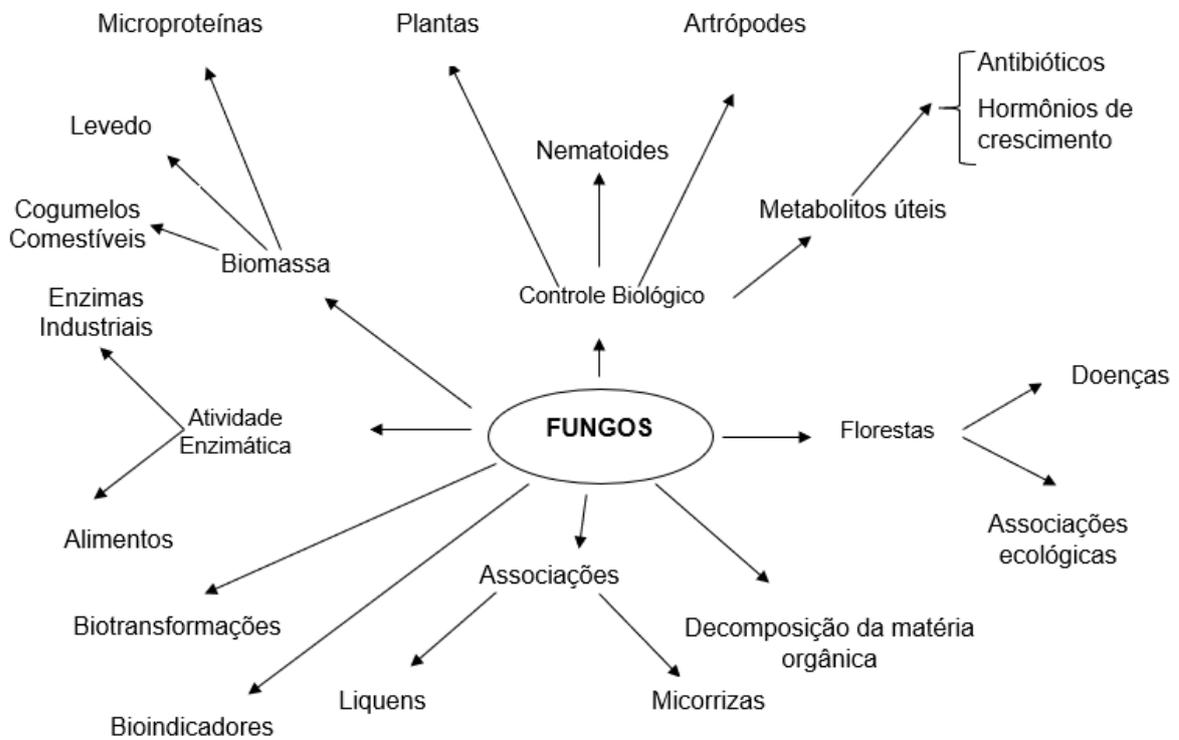
Sabe-se que apesar da utilização dos fungos desde os tempos mais antigos nos diversos ramos, ainda é comum esses micro-organismos serem associados à malecidade e a efeitos prejudiciais para o homem. A diversidade fúngica é bastante complexa sendo que existem algumas espécies que podem fazer mal aos animais, e outros podem causar doenças ao homem e aos vegetais. Porém, o mesmo pode também ter grande benefício para diversas áreas oferecendo uma variedade de utilização. Na figura 2 descreve-se os malefícios que o fungo pode trazer e na figura 3 os benefícios.

Figura 2: Principais malefícios causados pelos fungos



Fonte: Putzke e Putzke (2004).

Figura 3: Principais Benefícios dos Fungos



Fonte: Putzke e Putzke (2004).

Na natureza os fungos e as bactérias heterotróficas são os principais decompositores da matéria orgânica. Vários fungos estão associados à degradação

de dejetos e detritos de esgotos até um grau em que possa ser considerado adubo ou substância equivalente. Por essa questão, ecologicamente eles são considerados os lixeiros do mundo. Segundo Grandi (2007), os fungos são tão necessários à continuidade da vida quanto os produtores, pois devolve ao solo tudo o que dele foi retirado um dia. Por meio da decomposição a matéria orgânica é quebrada e incorporada nos organismos. Assim, os fungos desempenham importantíssimo papel na reciclagem dos elementos químicos que constituem a matéria orgânica do planeta.

2.6 Metabólitos secundários do gênero *Lentinus* descrito na literatura

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Nos organismos vivos, os compostos são divididos em dois grandes grupos principais: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários são encontrados principalmente em plantas, fungos, e outros microrganismos, mas também estão presentes em animais (ANULIKA et al., 2016).

De acordo com Fumagali et al. (2008), o papel do metabolismo primário é centrado nas funções básicas vitais, como por exemplo, na divisão, crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução. Por outro lado, o conceito de metabolismo secundário em Biologia descrito por Kossel (1891) é definido como oposto ao metabólito primário. O metabólito secundário, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008).

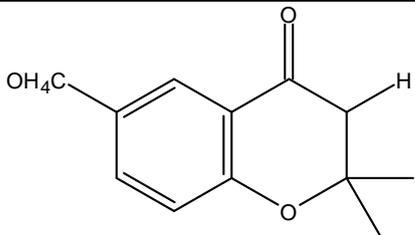
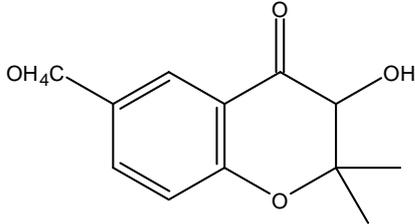
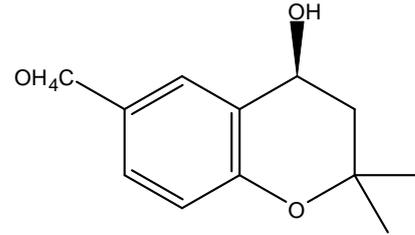
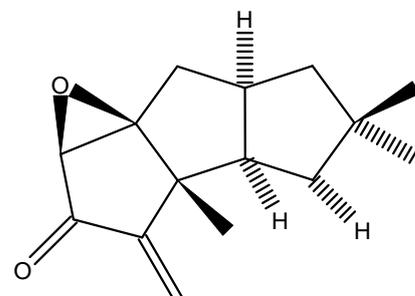
Na literatura, são descritas várias espécies de cogumelos que têm sido avaliados por seu valor nutricional e pelas suas propriedades farmacológicas, uma vez que são alimentos fisiologicamente benéficos, e muitas possuem efeitos terapêuticos frente a vários tipos de doenças (WASSER; WEIS, 1999).

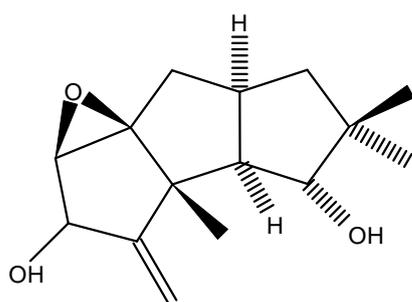
Mais de 40 espécies do gênero *Lentinus* são conhecidas nos países tropicais, onde também são consumidas e comercializadas (FORTES; NOVAES, 2006). As espécies *Lentinus crinitus* (L.) Fr., e outras espécies do gênero como: *L. velutinus* Fr., *L. glabratus* Mont., *L. cubensis* Berk. e *L. strigosus* (Schwein.) Fr. são consumidas

pelo grupo indígena Yanomami, na Amazônia brasileira (VARGAS-ISLA; ISHIKAWA, 2008), e existem relatos descritos que a espécie *L. strigellus* é considerada medicinal pelos estudos que apresentou (LIN et al., 2004).

Até o momento, na literatura são descritos poucos constituintes voláteis de *Lentinus*, o que torna a literatura bastante restrita (FILHO; OLIVEIRA, 2009). Hoje, são descritos e identificados no estudo do corpo de frutificação de *L. lepideus*, e 43 compostos, dos quais 19 eram sesquiterpenos. E desses compostos, apenas 6 foram identificados na espécie *Lentinus crinitus*, que serão descritos na tabela (3) abaixo.

Tabela 3: Metabólitos secundários isolados do *Lentinus crinitus* descrito na Literatura

Estrutura	Fórmula Molecular/ Nome	Referência
	C₁₂H₁₅O₃ 2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona Ou 2,2-dimethyl-4-oxo-6-(oxo-l7-methyl)chroman	(ABATE; ABRAHAM, 1994; K RUKACHAISIRIKUL et al., 2005)
	C₁₂H₁₅O₄ 3-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicroman-4-ona Ou 3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxo-6-(oxo-l7-methyl)chromane	(ABRAHANR; ABATE, 1995; RUKACHAISIRIKUL et al., 2005)
	C₁₂H₁₇O₄ 4-hidroxi-2,2-dimetil-6-metoxicromano Ou (S)-4-hydroxy-2,2-dimethyl-6-(oxo-l7-methyl)chromane	(ABATE; ABRAHAM, 1994; RUKACHAISIRIKUL et al., 2005)
	C₁₅H₂₀O₂ Hipnofilina Ou (1aS,3aR,3bR,6aR,7aS)-3a,5,5-trimethyl-3-methyleneoctahydrocyclopenta[4,5]pentaleno[1,6a-b]oxiren-2(1aH)-one	(ABATE; ABRAHAM, 1994; ABRAHANR; ABATE, 1995; COTA et al., 2008)

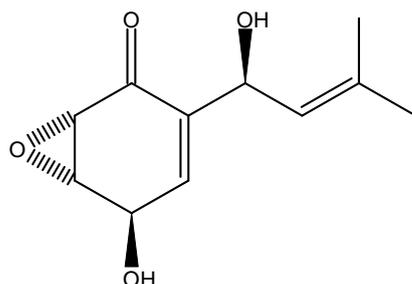


C₁₅H₂₂O₃
Dihidrohipnofilina

Ou

(1aR,3aR,3bR,4R,6aR,7aS)-
3a,5,5-trimethyl-3-
methylenedecahydrocyclope
nta[4,5]pentaleno[1,6a-
b]oxirene-2,4-diol

(ABATE; ABRAHAM, 1994;
ABRAHANR; ABATE, 1995;
COTA et al., 2008;
RUKACHAISIRIKUL et al.,
2005)



C₁₁H₁₄O₄
Panepoxidona
Ou

(1S,5R,6S)-5-hydroxy-3-((S)-
1-hydroxy-3-methylbut-2-en-
1-yl)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-
3-en-2-one

(ABRAHANR; ABATE, 1995;
ERKEL; ANKE; STERNER,
1996; KIS et al., 1970;
PETROVA et al., 2005;
RUKACHAISIRIKUL et al.,
2005)

Fonte: Autor (2021).

Na literatura, diversos compostos com princípio ativo foram relatados de outras espécies do gênero *Lentinus*, como por exemplo: Esteroides (GAN et al., 2007), benzoquinona, ciclohexanonas α β -epoxidadas (RUKACHAISIRIKUL et al., 2005), benzopiranos (ABRAHANR; ABATE, 1995), dentre outros bastante importantes para estudos de projetos de drogas e medicamentos.

2.7 Atividades antioxidantes pelo método espectrométrico de descoloração do radical DPPH

Segundo Krinsky (1994), antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Enquanto Sousa et al. (2007), definem antioxidantes como as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato.

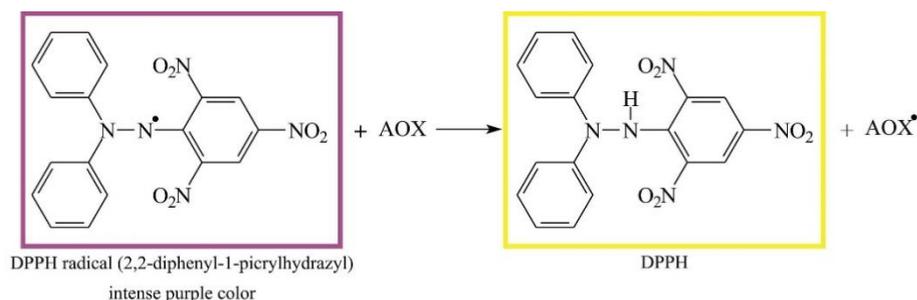
Os radicais livres e outros oxidantes, vêm sendo considerados, nos últimos anos, como grandes causadores de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes (SOUSA et al., 2007).

Para Alves et al., (2010), existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos e complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Estes testes

têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas, auxiliando os pesquisadores na avaliação das plantas isoladas de produtos naturais. Segundo Pires et al. (2017), é na captura do radical DPPH (2,2- difenil-1 picril-hidrazil), produzindo um decréscimo da absorbância a 520 nm. Em que se baseia um dos ensaios antioxidantes mais comuns. Nesse processo, ocorre uma reação de oxirredução, onde o radical DPPH, que apresenta coloração violeta é reduzido para DPPH-H (DPPH reduzido e estável), alterando a coloração da mistura de roxo para amarelo.

Este ensaio se baseia no mecanismo de SET (do inglês, *Single Electron Transfer*) ou de transferência de um elétron, processo que permite detectar a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron e reduzir qualquer substância, incluindo metais, carbonilas e radicais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 4: Representação da molécula de DPPH



Fonte: Becker et al. (2019).

Entre os diversos métodos relatados para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, o método de sequestro do radical DPPH é o mais fácil, simples e menos dispendioso, e o que tem sido usado principalmente para a avaliação da atividade antioxidante de amostras orgânicas (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

2.8 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (CL/EM)

Para Silverstein, Webster e Kiemle (2006), o acoplamento de um espectrômetro de massas a algum tipo de instrumento cromatógrafo, como um cromatógrafo a gás (CG-EM) ou um cromatógrafo a líquido (CL-EM), é bastante comum. Os espectrômetros de massa são muito úteis na análise de compostos cujo espectro é conhecido e na análise de espectros completamente desconhecidos.

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CL/EM) é uma técnica de caracterização que foi utilizada nesta pesquisa, para

caracterizar e identificar o extrato do fungo *Lentinus crinitus*. A combinação dos equipamentos (cromatografia líquida acoplada ao espectroscópio de massa) tem se mostrado bastante eficiente na realização de diversas pesquisas na área de fitoquímica, por essa razão ela é utilizada na presente pesquisa.

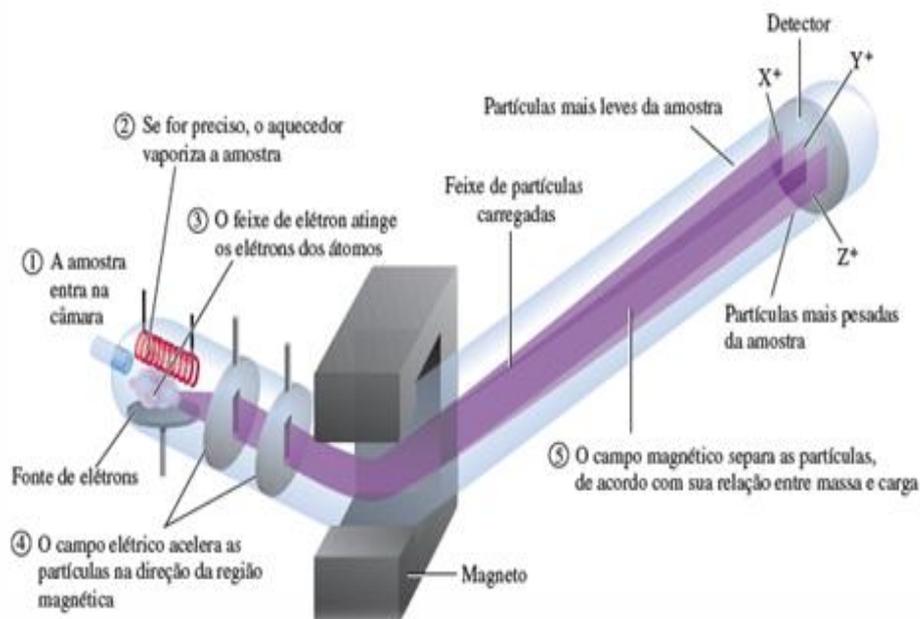
2.9 Espectrometria de massas

Segundo Skoog et al. (2014), a espectrometria de massa é uma ferramenta poderosa, versátil para obter informação sobre um composto desconhecido, sua massa molecular, sua composição elementar e em muitos casos sua estrutura química.

Para Silverstein, Webster e Kiemle (2006), o conceito de espectrometria é relativamente simples. Um composto é ionizado (método de ionização), os íons são separados na base da razão massa/carga (método de separação dos íons) e o número de íons que correspondem a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro.

De acordo com Hoffmann e Stroobant (2007), o primeiro passo na análise espectrométrica de massa de compostos orgânicos é a produção de íons gasosos do composto por ionização de elétrons, concordando com Carey (2011), que afirma que a ionização e a fragmentação produzem uma mistura de partículas, algumas neutras e outras com carga positiva. [...] A amostra é bombardeada com elétrons de 70 eV, e os íons com carga positiva resultantes (o íon molecular e os íons de fragmentos) são direcionados para um tubo analisador cercado por um magneto. Esse magneto deflete os íons de sua trajetória original, fazendo com que eles adotem um caminho circular, e o raio desse caminho depende de sua relação entre massa e carga (m/z). Os íons de m/z pequeno são mais defletidos que aqueles com m/z maior. Variando a intensidade do campo magnético ou o quanto os íons são acelerados ao entrar no analisador, os íons de determinado m/z podem ser seletivamente focalizados através de uma pequena fenda para um detector onde eles são contados. Fazer a varredura de todos os valores m/z resulta na distribuição de íons positivos, chamada de espectro de massas, característico de determinado composto conforme mostra a figura abaixo.

Figura 5: Representação Esquemática de um Espectrofotômetro de Massas



Fonte: Carey (2011).

2.10 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para Tonhi et al. (2002), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência como o da medicina.

Segundo Hoffmann e Stroobant (2007), para analisar uma mistura complexa, por exemplo, produtos naturais, uma separação técnica, cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL)- é acoplado ao espectrômetro de massa. Os produtos separados devem ser introduzidos um após o outro no espectrômetro, no estado gasoso para CG/EM ou em solução para CL/EM. Isso pode ocorrer de duas maneiras: o composto eluente é coletado e analisado *off-line*; ou o cromatógrafo é conectado diretamente à massa (do) espectrômetro e (o) espectro de massa são adquiridos enquanto os compostos da mistura são eluídos.

A cromatografia com detecção espectrométrica de massa fornece análises altamente seletivas e sensíveis que permitem obter informações estruturais sobre os analitos e sobre suas massas molares a partir das fragmentações registradas nos espectros (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.11 Atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão

Para Ostrosky et al. (2008), a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). A preocupação na determinação da CMI desses extratos deve-se aos aspectos toxicológicos e microbiológicos que muitos apresentam (PINTO et al., 2002).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Para determinar a CIM ou a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição.

No presente trabalho utilizaremos o método de difusão em ágar, ou difusão de disco. Este método é amplamente utilizado para o ensaio de suscetibilidade bacteriana, devido à simplicidade da realização e interpretação dos resultados, além de ser um método reconhecido e recomendado pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais). (CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE., 2008).

Nesse teste, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados com o extrato do fungo a ser testado são dispostos numa placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton solidificado, e sobre o qual encontram-se inoculadas as bactérias a serem testadas, sendo em seguida incubadas por 48 horas em estufa bacteriológica (a 35 °C). Durante esse período, o agente antimicrobiano irá difundir pelo meio e atuará negativamente (ou não) sobre o crescimento do micro-organismo, o qual será visualmente identificado pelo aparecimento de uma área em volta do disco contendo o extrato, onde as cepas não se desenvolverão, denominado halo de inibição. Quanto maior for o seu diâmetro, mais susceptível (resistente) é o

microrganismo enquanto a pequena ou nenhuma zona de inibição indica resistência por parte da bactéria.

2.12 Considerações sobre as bactérias

A *Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é uma espécie com enorme importância clínica. Pode ser encontrada no meio ambiente e na microbiota do Homem e dos animais de sangue quente. As bactérias desta família são caracterizadas como bastonete negativas, imóveis ou móveis, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e sem exigências nutricionais, crescendo bem em meios de cultura não seletivos. A separação dos gêneros desta família é feita com base na capacidade de fermentação da lactose. As bactérias fermentadoras, como é o caso de *E. coli*, são denominadas de coliformes termotolerantes (DUARTE, 2014; MAINIL, 2013).

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria de Gram-positivo que faz parte da microbiota do Homem, habitando, sobretudo, a narina e o períneo. O seu nome deriva dos termos gregos *Staphylé* (cachos de uvas) e *Kokkos* (grânulo), devido às suas características morfológicas. São imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa, crescem a temperaturas entre os 18° e 40 °C e apresentam tolerabilidade a elevadas concentrações de sal. Outra característica que os distingue dos restantes *Staphylococcus* é a sua capacidade de coagular o plasma, devido a presença de uma proteína de ligação ao fibrinogénio (coagulase). *S. aureus* é um patógeno muito perigoso por apresentar resistência aos antibióticos e seus fatores de virulência (OTTO, 2010).

De acordo com Blanc et al. (1998), a *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por 10 a 15% das infecções hospitalares em todo o mundo. Frequentemente, essas infecções são difíceis de tratar devido à resistência natural das espécies, bem como à sua notável capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência a múltiplos grupos de agentes antimicrobianos. A *P. aeruginosa* representa um fenómeno de resistência a antibióticos e demonstram praticamente todos os mecanismos enzimáticos e mutacionais conhecidos de resistência bacteriana.

2.13. Fundamentação sobre *Docking* Molecular

A realização de triagem virtual para busca de fármacos é de extrema importância para o processo de desenvolvimento de um medicamento, porém, esse processo é bastante complexo, e para chegar até uma molécula farmacologicamente aceitável é preciso estudar diversas propriedades e realizar diversos teste como farmacocinéticas, farmacodinâmicas e ainda desenvolver um padrão de qualidade (RODRIGUES et al., 2012).

Com o objetivo de reduzir o tempo necessário para obtenção de um fármaco, a Química Combinatória (QC), é uma das mais promissoras ferramentas para a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas com potencialidades terapêuticas (AMARAL et al., 2003). Associado a este método experimental foi desenvolvido uma técnica computacional que faz uma varredura virtual a busca de substâncias promissoras denominada (*Virtual Screening*). Uma técnica computacional que usa programas de computador para pesquisar resultados potenciais de bibliotecas de fragmentos virtuais, nesse método existem duas abordagens amplamente utilizadas: métodos baseados em estrutura (*docking*) e métodos baseados em ligante (KONTOYIANNI, 2017).

O *docking* molecular pode ser compreendido como uma técnica computacional criada para efetuar cálculos entre duas moléculas num espaço tridimensional. Surgiu com objetivo de identificar a melhor forma com que um ligante pequeno se acopla no sítio ativo de uma macromolécula biológica, e identificar a sua afinidade de ligação (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; PINZI; RASTELLI, 2019). O acoplamento molecular é capaz de prever a melhor orientação de uma molécula com relação a um ligante para a formação de um complexo estável, baseada em diversos parâmetros, entre eles sua energia de afinidade e o desvio quadrado médio entre o complexo formado (LENGAUER; RAREY, 1996).

3 METODOLOGIA

Os procedimentos metodológicos adotados durante a pesquisa em questão são a pesquisa bibliográfica e experimental. Na pesquisa experimental a manipulação foi feita em locais controlados. De acordo com Costa e Costa (2014), a pesquisa experimental é aquela em que o pesquisador manipula as variáveis com o objetivo de observar os fenômenos. E geralmente são trabalhos em laboratórios e são realizados em ambientes controlados.

Desta forma, a presente pesquisa se configura também como pesquisa bibliográfica, porque ela recorre a artigos, teses e dissertações para compor o embasamento teórico como afirma Gil (2002), que a pesquisa bibliográfica é desenvolvida com base em material já elaborado, constituído principalmente de livros e artigos científicos.

3.1 Parte experimental

Quanto à parte experimental, a pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Química Orgânica da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), localizado no campus das Auroras em Redenção-CE.

Foi usado como solvente Metanol PA, e os equipamentos utilizados nesta pesquisa estão relacionados nas tabelas 4.

Tabela 4: Equipamentos utilizados e suas marcas

EQUIPAMENTOS	MARCA
Balança analítica	Eduotec
Agitador magnético	Tecnal
Estufa	Solab
Capela	Cienlab
Rotoevaporador	Fisatom
Bomba de vácuo	NT 613
Espectrofotometro	PG Instruments Ltd

Fonte: Autor (2021).

3.1.1 Especificações dos equipamentos utilizados

3.1.1.1 Balança analítica

Possui calibração interna, externa e tara automática: Especialmente desenvolvida para a realização de pesagens rápidas e precisas. Sensor tipo célula

eletromagnética. Capacidade: 0 ~ 220 g. Precisão de leitura: 0,1 mg (0,0001 g). Faixa de tara: 0 ~220 g. Para mais informações entre em contato ou baixe nossos catálogos.

3.1.1.2 Agitador magnético

Temperatura na placa: 50 °C a 350 °C, rotação: 100 a 2000 RPM, controle de rotação e temperatura: Digital micro processado PWM com regulagem de 1 a 99 % no display, capacidade de agitação: até 20 litros de solução chapa aquecedora: Em alumínio 6351- diâmetro de 200mm Gabinete: Em aço carbono com tratamento anticorrosivo e pintura lisa, Dimensões: L = 210 x P = 250 x A = 130 mm Peso: 6 kg Potência: 400 Watts Tensão: 220 Volts; Cabo de energia conforme NBR 14136 com adaptador tripolar padrão

3.1.1.3 Estufa

Circulação de ar por convecção natural, controlador de temperatura micro processado digital, com sistema PID, sensor de temperatura PT 100, com leitura digital do set point e do processo, Relé estado sólido, temperatura: 5 °C acima do ambiente a 200 °C, resolução: 0,1 °C, variação: ± 1 °C.

3.1.1.4 Capela

Formato aerodinâmico para melhor exaustão, dispensa instalação especial de alvenaria, porta em vidro, de fácil visualização do interior, resistente a solventes com deslocamento vertical tipo guilhotina e sistema de peso e contrapeso para ajuste em qualquer posição, abertura máxima de até 57 cm, iluminação interna, isolada IP44, painel com interruptores para exaustão e iluminação com lâmpada piloto, exaustor laminado em fibra de vidro com turbina em material resistente, motor de 1/2 HP, exaustor podendo ser instalado fora do laboratório, alimentação: 110/220 (bivolt), exaustão: 15 m³/Min, dim. Internas (AxLxP): 110 x 110 x 60 cm, dim. externas (AxLxP) (c/motor): 146 x 101 x 62 cm.

3.1.1.5 Rotaevaporador

Evaporador rotativo a vácuo, composto de suporte provido de levantamento rápido, coluna de condensação vertical com serpentina dupla, 1200 cm² de área de troca, sistema de realimentação contínua e quebra vácuo, junta de acoplamento

totalmente em PTFE autocompensável aos desgastes, permite pressões menores que 4 mbar, banho de aquecimento modelo 550, cuba em aço inoxidável Ø 25 x 12 cm de altura e com capacidade de 4 litros, sistema de aquecimento de 1000 kcal/h controlado por termostato capilar de 50 a 120 °C, precisão de ± 3 °C, potência do banho: 1200 W, motor totalmente fechado, controle de rotação de 5 a 200 RPM, microprocessado programável com interface digital, indicando os RPM no display, com torque autocompensável independente da variação do vácuo, temperatura ou tensão, potência do motor: 80 W, acompanha balão de evaporação JC 24/40 e o receptor com JE 35/20 ambos de 1000 mL, garras e grampos de fixação, opcionalmente, podem ser fornecidos balões de 100 a 2000 mL, disponível em: 115 V ou 230 V (50-60 Hz), marca FISATOM.

3.1.1.6 Bomba de vácuo

Produz deslocamento de ar até 27 litros de ar por minuto; vácuo final máximo até 660 mm/hg; pressão máxima constante até 7 Kgf/cm²; regulagem de pressão e vácuo através válvula tipo agulha com indicação no manômetro e vacuômetro; manômetro com leitura de 0 a 7 Kgf/ cm²; vacuômetro com leitura de 0 à 760 mm/Hg (máxima de 660 mm/hg); possui dispositivo para retenção de Motor Compressor Hermético de pistão de 1/4 CV.

3.1.1.7 Espectrofotômetro

O T70 é um espectrofotômetro de simples feixe para leituras nas faixas UV-VIS, marca PG Instruments de procedência inglesa. Equipamento dotado de sistema ótico SPLIT BEAM, onde o zero ótico da amostra (Branco) é armazenado eletronicamente no equipamento. Como destaque de alto desempenho apresenta comprimento de onda de 190 a 1100 nm, banda espectral fixa de 2 nm ou variável de 0,5, 1, 2, 5 nm e ruído fotométrico inferior a 0,05% controlado por microprocessador garantindo excelente confiabilidade analítica nos resultados.

3.1.2 Coleta e lavagem do fungo

Inicialmente todos os materiais e vidrarias utilizados nesta pesquisa como: balões volumétricos, Béqueres, Erlenmeyer, bureta, balão de fundo redondo, funis,

Kitassato e pipetas volumétricas, foram higienizados e lavados com água destilada antes de serem utilizados.

O fungo utilizado foi coletado de uma árvore no município de Redenção, no maciço do Baturité no Ceará nas seguintes coordenadas: 4° 13' 17" S, 38° 42' 55" O e caracterizado e identificado por meio de reconhecimento de imagens no aplicativo Mushroom Identify - Automatic picture recognition, Disponível na versão Android, e comparado com os registros disponível no site do INCTE- Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. (INCTE, 2020)

3.1.3 Extração do fungo

Depois da lavagem do fungo, foram pesados 143,59 g deste material para extração com metanol. A amostra pesada foi imersa no solvente durante 1 dia. A figura 6 (A) (B) representa a imersão do material no solvente.

Figura 6: Imersão do fungo no solvente durante 1 dia



Fonte: Autor (2021).

Depois foi filtrado a vácuo e em depois levou-se no rotaevaporador. Em seguida descartaram-se os restos que estavam no papel, foi adicionado ao balão de fundo chato e acoplou-se o balão com o aparelho.

Para o solvente utilizado, o sistema demonstrado na figura 7 foi aquecido à temperatura de ebulição (metanol PA_64.7 °C).

Figura 7: Representação da extração do Fungo



Evaporador Rotativo. Modelo 801/802: (A) Entrada para sonda de temperatura, (B) Condensador, (C) Vidro de válvula, (D) Controle de rotação, (E) Motor, (F) Balão de condensação, (G) Balão de evaporação, (H) Banho de aquecimento, (I) Controle de temperatura.

Fonte: Autor (2021).

3.1.4 Teste de ecotoxicidade

Os testes de ecotoxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES; FORBES, 1994). Ensaio de toxicidade podem ser utilizados como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *cotiledone* que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982). *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizada neste trabalho como bioindicador de toxicidade. Para a realização deste experimento foram utilizados como referência os estudos de Meyer et al. (1982) e Nascimento et

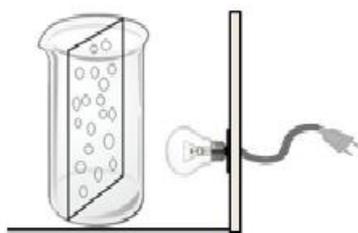
al (1999), com algumas alterações. O procedimento completo está descrito nos itens a seguir.

3.1.5 Bioensaio com *Artemia salina*

Uma solução de cloreto de sódio (NaCl), na concentração 30 g/L, foi preparada com o pH 8. Após o preparo da solução, um sistema foi montado no interior de um béquer de 1750 mL que está representado na figura 8. No interior do béquer estava contida uma tela com diâmetro de 0,02 cm de espessura. Em seguida, 1500 mL da solução salina preparada foram colocadas no sistema da figura 8. Posteriormente foram adicionados em um dos lados cerca de 50 mg de cistos de *Artemia salina* com cuidado para que os mesmos não se direcionassem para o outro lado do recipiente que continha apenas solução salina. Para isso uma lâmpada de LED de 10 W foi posicionada do outro lado que continha apenas a solução salina com o objetivo de atrair os organismos da *Artemia salina* para o outro lado do sistema proporcionando assim uma uniformidade.

Ressalta-se também, que a temperatura se manteve controlada em torno dos 28 a 30 °C por meio de um termômetro digital. Todo o recipiente foi envolvido com papel alumínio para auxiliar na eclosão dos cistos. Os cistos escolhidos para posterior utilização no estudo foram aqueles que demonstraram maior resistência, uniformidade do tamanho e que foram atraídos pela luz. Tal escolha visa a homogeneização das condições físicas dos organismos-testes. O período de incubação para estes organismos foi em torno de 48 horas, porém, evidenciou-se a presença dos cistos já nas primeiras 24 horas.

Figura 8: Sistema desenvolvido para eclosão dos cistos da *Artemia salina*



Fonte: Souza et al. (2015).

3.1.5.1 Preparação das amostras com *Artemia salina*

Após a eclosão dos náuplios, foram retirados do sistema representado na figura 8, aqueles que conseguiram ultrapassar a tela divisória que se encontrava no centro do béquer, no lado oposto que foi cultivado. Eles foram capturados com uma pipeta de Pasteur e transferidos para 12 tubos de ensaio, de modo que contivessem 10 *artemias salinas* em cada tubo. Nos tubos estavam contidos 4 mL da mesma solução salina preparada e 2 mL do extrato metanoico em diferentes concentrações, como mostra a Tabela 6. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração de extrato/composto desta análise.

Tabela 4: Representação das concentrações da *Artemia salina*

CONCENTRAÇÕES	
Branco	0,0 g/ml
1^a	1 g/ml
2^a	0,5 g/ml
3^a	0,25 g/ml
4^a	0,125 g/ml
5^a	0,85 g/ml

Fonte: Autor (2021).

3.1.5.2 Contagem das *Artemia salina*

A contagem deste ensaio biológico foi feita mediante as primeiras 24 e 48 horas após pipetagem das larvas nos tubos de ensaio. Neste estudo foram considerados os náuplios vivos, todos aqueles que apresentavam movimentos no interior do tubo e mediante atração pela luz, e mortas, aquelas que se encontravam no fundo dos tubos sem quaisquer movimentos. Utilizamos uma lupa de aumento (visual) para melhor visualização e contagem. Os resultados foram organizados em planilha.

3.1.6 Teste antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através da captura de radicais livres com o teste de DPPH. Para a realização deste procedimento foram utilizados como referências os estudos de Hegazi e El hady (2002) com algumas adaptações.

A metodologia para a atividade antioxidante se baseia na medida de extinção da adsorção do radical. Isso porque o DPPH possui a coloração purpura é reduzido/a,

formando difenilpicrilhidrazina de coloração amarelada. Para a realização deste experimento, o extrato metanólico do fungo foi o metanol, em várias concentrações diferentes como representada na Tabela 7 descrita abaixo.

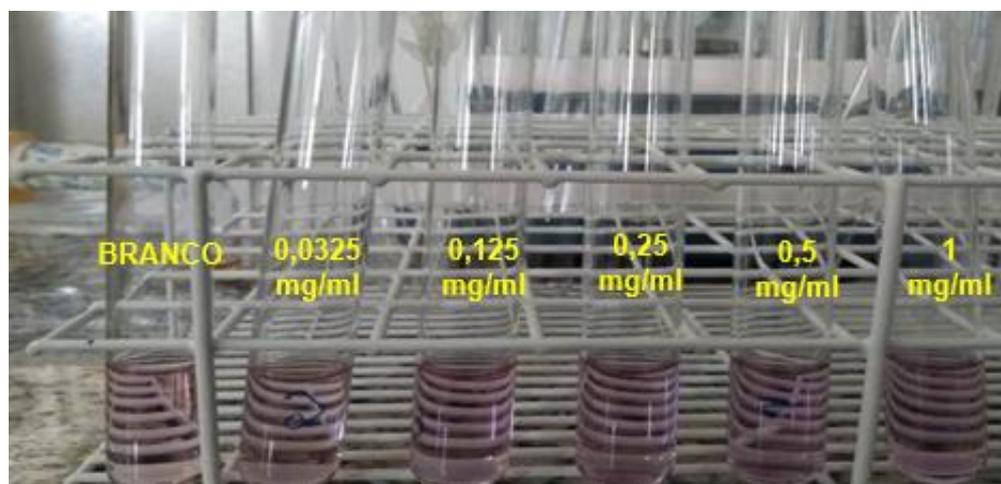
Tabela 5: Representação das concentrações das soluções do extrato metanólico utilizado no DPPH

DILUIÇÕES	
Branco	0,0 mg/ml
1^a	1 mg/ml
2^a	0,5 mg/ml
3^a	0,25 mg/ml
4^a	0,125 mg/ml
5^a	0,0325 mg/ml

Fonte: Autor(2021).

Para a realização deste experimento, o extrato metanólico do fungo foi diluído em 2 mL de metanol, em várias concentrações diferentes como representado na tabela (7). Com exceção da amostra branco/a, onde foi adicionado somente o DPPH e Metanol.

Figura 10: Captura do DPPH por antioxidante



Fonte: Autor(2021).

Para a realização desta atividade foi adicionado a cada concentração do extrato metanólico 2 mL de uma solução de DPPH, com exceção da amostra denominada BRANCO, onde foi colocada somente o solvente. Depois da adição do DPPH na ausência de luz, esperou-se durante 30 minutos para que a solução reagisse. Após isso, foi efetuada a leitura no espectrofotômetro *PG Instruments Ltd* a 520 nm.

Os valores medidos da absorbância das concentrações dos extratos foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante através da equação abaixo.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{A_{amostra}}{A_{branco}} \right) \times 100$$

Onde: $A_{amostra}$ é a absorbância da solução com DPPH;

A_{branco} é a absorbância da solução de DPPH sem a amostra.

A redução do radical DPPH' é seguida pelo monitoramento da diminuição da sua absorbância a um comprimento de onda característico durante a reação. Foram plotados os gráficos utilizando o programa Origin versão 9.0 e a partir dos valores da % de Inibição montou-se os eixos das (coordenadas) e das concentrações do extrato, montou-se os eixos das (abscissa). O valor da IC₅₀, concentração inibitória (IC), do extrato do fungo capaz de reduzir 50% do radical DPPH', foi obtido pela substituição na equação da reta ($y = ax + b$), onde $y = 50$ pelo método dos mínimos quadrados para o gráfico obtido.

3.1.7 Testes da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco

As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1.7.1 Antibiograma

A atividade antibacteriana do fungo foi avaliada utilizando o método de difusão em disco recomendado pela *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE* (CLSI, 2008). Todos os materiais utilizados neste teste foram previamente autoclavados no Laboratório de microbiologia da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

3.1.7.2 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas foram inoculadas em Ágar Mueller-Hinton e após 48 horas de incubação a 35 °C procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10⁸ microrganismos mL/L).

3.1.7.3 Semeadura das placas

O inóculo de 0,1 mL de cada cultura bacteriana foi espalhado na superfície das placas contendo Ágar Mueller-Hinton solidificado, e sobre a 53, as mesmas foram aderidas, com auxílio de uma pinça previamente flambada, pequenos discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro impregnados, individualmente, concentrações de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 do extrato metanólico do fungo, sendo pressionados levemente sobre a superfície do meio. As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 horas em uma estufa bacteriológica e a leitura dos halos de inibição foram feitas com a utilização de uma régua milimétrica.

3.1.8 Análise cromatográfica

A análise foi realizada em um sistema *Acquity UPLC (Waters)*, acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QToF, *Waters*) pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna *Waters Acquity UPLC BEH* (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis, água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

3.1.8.1 Condições de Massas de Alta Resolução - XEVO-QToF

O modo ESI⁻ foi adquirido na faixa de 110 -1180 Da., temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI⁺ foi adquirido na faixa de 110 - 1180 Da., temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. A Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software *Masslynx 4.1 (Waters Corporation)*.

3.1.9 Simulação Computacional

A simulação foi realizada por meio do código Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2009), onde se utilizou também para otimização e cálculo de visualização Auto DockTools (MORRIS et al., 2009), Avogadro (HANWELL et al., 2012) e o visualizador Discovery Studio (BIOVIA, 2015).

3.2.9.1 Obtenção da Estrutura da proteína

A Obtenção da proteína transferase do vírus da Zika, foi feita no repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/structure/5M5B>), onde a mesma se encontrou depositada com o código 5M5B, sendo esta gerada a partir de difração de raios X, com resolução de 2,01 Å, R-Value Free: 0,191, com célula unitária $a = 37,55$ Å, $b = 64,14$ Å, $c = 72,04$ Å, $\alpha = 113,05^\circ$, $\beta = 92^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$, sendo classificada como transferase, expressa em *Escherichia coli*, BL21 (COUTARD et al., 2017).

3.2.9.2. Otimização das Estruturas

Para a otimização estrutural e caracterização eletrônica da molécula, foi realizado todos os cálculos de otimização foram realizados no software Avogadro®, com um campo MFF94, o Avogadro é um software que permite, realizar cálculos teóricos (otimização de geometria, energia e propriedades) no nível de teoria MM, EHT, AM1 / PM3 e MNDO / ZINDO (BATISTA et al., 2016; HANWELL et al., 2012).

3.9.2.3 Docking Molecular

A fixação molecular dos ligantes ao receptor transferase do vírus da Zika foi realizada usando a interface gráfica AutoDock Tools (4.2.6) que executa AutoDock Vina (1.1.2).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Atividade antioxidante

Os resultados descritos abaixo são do extrato metanólico do fungo da espécie *Lentinus crinitus* perante o teste da atividade antioxidante realizado em triplicata.

Nesta perspectiva, fez-se necessário um tratamento estatístico com todos os dados coletados acerca da atividade antioxidante para verificar o percentual de inibição do DPPH e em que concentração foi maior o sequestro do radical livre DPPH. A seguir exibe-se a Tabela (8), que contém todos os dados sobre a atividade antioxidante.

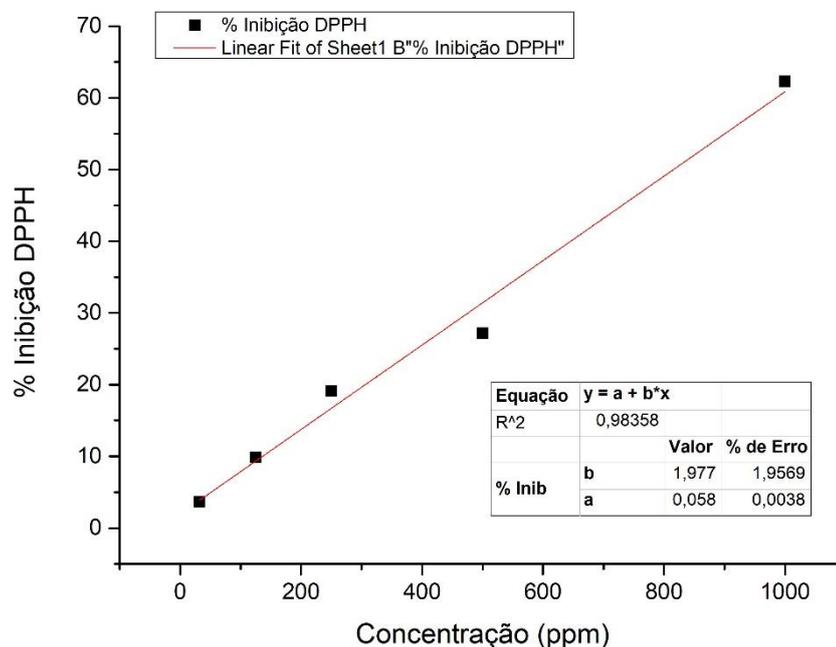
Tabela 6: Representação da concentração em mg/mL e µg/mL, da percentagem imitaria e a absorbâncias do extrato metanoico do fungo

Concentração (mg/mL)	Com. (ppm)	% Inib.	Abs.			Abs.
			x	y	z	x,y,z
1	1000	62,3	0,235	0,235	0,236	0,235
0,5	500	27,2	0,454	0,455	0,456	0,455
0,25	250	19,1	0,504	0,506	0,506	0,505
0,125	125	9,9	0,562	0,563	0,564	0,563
0,0325	32,5	3,7	0,601	0,602	0,603	0,602
DPPH			0,625			

Fonte: Autor (2021).

Em função dos dados tabelados, foi executada a construção do Gráfico (1) que expõe com maior clareza os resultados obtidos.

Gráfico 1: Representação da porcentagem inibitória do DPPH e da concentração do extrato metanólico do fungo



Fonte: Autor (2021).

Deste modo, foi possível concluir que o extrato apresenta percentuais de inibição plausíveis, o mesmo apresentou ação antioxidante de 62,3% na concentração de 1000 µg/mL.

Nas concentrações analisadas, o mesmo extrato possui o valor máximo de absorvância 0,602% na concentração de 32,5 µg/mL. De acordo com a descrição do Gráfico 1, percebe-se que quanto maior é a concentração maior será o percentual de inibição. Concordando com Nascimento *et al.* (2011), que afirma que quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior será a sua atividade antioxidante. Portanto, verifica-se de uma forma análoga, que quanto maior a concentração da amostra, menor será a absorvância, e maior será o consumo de DPPH.

E relativamente ao IC₅₀, quanto menor é o valor de IC₅₀, maior é a atividade antioxidante das amostras. IC₅₀ é a quantidade de amostra necessária para eliminar 50% dos radicais.

Assim sendo, o valor de IC₅₀ foi calculado através dos valores obtidos após a regressão linear, com a aplicação da equação da reta ($y = ax + b$) originada do gráfico acima, que já mostra a curva de concentração de extrato metanólico do fungo (µg/mL) versus a Porcentagem de Inibição do DPPH (% Inib.). E os mesmos assemelham-se

à de uma linha reta (cujos valores do intercepto e da inclinação da reta são apresentados na Tabela (9).

Tabela 7: Dados dos parâmetros obtidos da reta nos gráficos de determinação do valor de IC₅₀, do extrato *metanólico*

IC ₅₀ (µg/mL)	0,815619
a	58,878
b	1,978
y	50

Fonte: Autor (2021).

Os autores Ao e Deb (2019), ao analisarem a capacidade potencial nutricional e antioxidante de alguns cogumelos selvagens comestíveis do gênero *Lentinus Crinitus* utilizando ensaio de eliminação de DPPH com extratos metanólicos determinaram que os cogumelos apresentaram atividades antioxidantes bastante significativas. O valor de IC₅₀ foi calculado para estudar a capacidade de inibição dos cogumelos contra os radicais DPPH. Entre as dez espécies estudadas, *Lentinus tigrinus* apresentou cerca de (47,5 µg/ml, IC₅₀), exibiu o maior sequestrante de radicais DPPH, seguido por *Lentinus squarrosulus* (82,6 µg / ml, IC₅₀).

Chye *et al.* (2008), analisaram o potencial antioxidante de cinco espécies de cogumelos. As espécies foram identificadas como *Pleurotus sp.*, *Hygrocybe sp.*, *Hygrophorus sp.*, *Schizophyllum commune* e *Polyporus tenuiculust*. De cada cogumelo foram obtidos dois extratos, um com éter de petróleo e outro com metanol. Os autores concluíram que as espécies de cogumelos mostraram apreciável atividade de sequestro dos radicais DPPH, sendo o extrato de éter de petróleo do *Pleurotus sp.*, o que apresentou a maior % de inibição (83,04 %) para a concentração de 20 mg/mL (20.000 µg/mL). Essa capacidade de sequestro do radical livre DPPH foi duas vezes maior do que a de *Hygrocybe sp.*

Lima (2009), ao avaliar o potencial antioxidante do fungo *Tylopiillus balllloui*, verificou que este demonstrou ser uma fonte satisfatória de compostos com atividade antioxidante. Outros trabalhos também apresentaram bons resultados ao avaliar a atividade antioxidante de compostos produzidos por fungos, tais como *Penicillium citrinum*, os fungos endofíticos *Viscumalbum L.* e *Penicillium sp.* Todavia, na literatura

revisada foram poucos resultados encontrados acerca da atividade antioxidante do extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus*.

Elmastas *et al.* (2007), analisaram os extratos metanólicos de várias espécies de cogumelos. Por apresentarem significativa atividade antioxidante *in vitro*, os autores sugerem que os cogumelos podem ser usados como fonte natural de antioxidantes, como suplemento alimentar ou na indústria farmacêutica, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos cogumelos comestíveis.

Em comparação com antioxidantes naturais mais potentes os resultados obtidos mostram uma atividade consideravelmente alta para a fração analisada.

O presente estudo sugere que os Fungos da Espécie *Lentinus crinitus* podem ser utilizados para auxiliar no alívio de danos oxidativos em células induzidas por radicais de oxigênio e pode ser efetivamente explorado como potencial antioxidante na área médica-farmacêutica.

4.2 Identificação cromatográfica dos constituintes químicos no extrato

A cromatografia é uma técnica fundamental empregada para quantificar constituintes químicos de diversas espécies de fungos, e tem sido empregado para vários autores em diversos estudos. Puttaraju *et al.* (2006), utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, com detector de arranjo de diodos para analisar ácidos fenólicos presentes em extratos aquosos e metanólicos de cogumelos. Enquanto que Barros *et al.* (2009) e Kim *et al.* (2008), também analisaram compostos fenólicos de cogumelos com sistema CLAE e detector de arranjo de diodos. Nowacka *et al.* (2014), identificaram alguns ácidos fenólicos em 19 cogumelos da Polônia, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e espectrometria de massa por ionização por eletro-spray (LC-ESI-MS/MS).

A utilização de LC-MS de alta resolução significativamente melhora a possibilidade de obter informações valiosas de uma gama de diferentes perfis cromatográficos em um extrato (ZOU *et al.*, 2014).

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), foi aplicada com sucesso nesse estudo para identificar os constituintes químicos e seus metabolitos secundários presente no extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus*. Foi possível identificar um total de 16 compostos nos modos íon positivo e no modo

íon negativo. As Tabelas (10 e 11) mostram os dados dos compostos identificados pelo método de tentativa, em comparação com os registros da literatura baseados principalmente em seus íons moleculares, tempo de retenção e suas fragmentações apresentadas.

Tabela 8: Dados do espectro de LC-MS e tempo de retenção (tR) dos compostos detectados no extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus*, em modo de íon positivo [M-H]⁺

Pico	Rt min	[M-H] ⁺ Observada	[M-H] ⁺ Calculada	Product Ions (MS/MS)	Formula Empirica	Ppm (erro)	Nome	Referências
1	0,94	330,1699	330,1710	183; 198; 297; 223	C ₁₉ H ₂₄ NO ₄	-3,3	Epiratridinona	(AMER; SHAMMA; FREYER, 1991; FEITOSA et al., 2012)
2	1,0	314,1741	314,175	313.37, 298.32, 283.28	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	-4,8	Erisotrina	(AMER; SHAMMA; FREYER, 1991)
3	2,50	325,1070	325,1076	138.0598, 204.0835, 325.0946, 124.0075, 223.0419	C ₁₉ H ₁₆ O ₅	-1,8	Eucalyptin	(ZAPESOCHNAYA; SOKOL'SKAYA, 1984)
4	3,92	457.1365	457.1346	204.0932, 187.1129, 136.0653	C ₂₀ H ₂₅ O ₁₂	4,2	15-demethylplumeride	(HASSAN et al., 2008)
5	6,02	181.0482	181.0501	151.0436; 181.0499; 133.0827	C ₉ H ₈ O ₄	-1,1	Ácido Cafeico	(GUO et al., 2008)
6	7,32	317,0312	317,0297	219.17; 133.09, 220.17	C ₁₅ H ₉ O ₈	4,7	Gossypetin Ou 3,3', 4', 5,7,8-Hexahidroxi-flavona	(DUDEK; WARSKULAT; SCHNEIDER, 2016)
7	7,77	219,1740	219,1749	121, 181, 147, 203, 200	C ₁₅ H ₂₃ O	-4,1	(+)- Nookatone	(WU, 2009)
8	8,72	481.1358	481.1346	293.0456, 151.0406, 133.0764	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	2,5	Noidesol	(SHIMOKAWA et al., 2010)
9	9,95	403.1411	403.1393	402.13, 403.13	C ₂₁ H ₂₃ O ₈	4,5	Nobiletin	(WANG et al., 2007)
10	10,75	921.7843	921.7860	961.7476, 961.3502,	C ₆₂ H ₁₀₅ O ₇	-1,8	Não identificado	

11	12,20	340,2855	340,2852	376.3034; 358,29; 282; 370	C ₂₀ H ₃₈ NO ₃	0,9	Não identificado	
12	13,66	365.1371	365.1389	365.1406, 163.0775, 121.0993	C ₂₂ H ₂₁ O ₅	-4,9	Asperterone	(NUCLEAR et al., 2010)
13	15,07	751, 4422	751, 4421	735, 713, 695	C ₄₄ H ₆₃ O ₁₀	0,1	Não identificado	-
14	15,41	425,2108	425,2117	425.2152; 129.0172; 138.998	C ₂₉ H ₂₉ O ₃	-2,1	Não identfiicado	
15	16.73	707.5067	707.5039	599.4999, 487.3628, 256.2579, 399.3075	C ₄₈ H ₆₇ O ₄	4,0	Não identificado	
16	16.89	721.4916	721.4891	494.5688, 429.2715, 693.4830,	C ₄₁ H ₆₉ O ₁₀	3,5	Não Identificado	10
17	20.13	881.6285	881.6295	837.5701, 860.6922,	C ₅₇ H ₈₅ O ₇	-1,1	Não identificado	
18	21,59	357.1485	357.1491	318.7854, 343.1314,	C ₂₄ H ₂₁ O ₃	-1,7	Não identificado	16

Fonte: Autor (2021).

Tabela 9: Dados do espectro de LC-MS e tempo de retenção (tR) dos compostos detectados no extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus*, em modo de íon negativo [M-H]⁻

Pico	Rt min	[M-H] ⁻ Observada	[M-H] ⁻ Calculada	Product Ions (MS/MS)	Formula Empirica	Ppm (erro)	Nome	Referências
1	0,51	325,1866	325,1862	311, 325, 297, 183, 83	C ₁₄ H ₂₉ O ₈	1,2	Não identificado	
2	1,39	191,0165	191,0133		C ₁₃ H ₃ O ₂	16	Não identificado	
3	1,40	515,1248	515,1190	353.0876, 173.0453, 179.03445, 191.0559	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	2,1	3,4-di-O-Caffeoylquinic acid	(OOI et al., 2011)
4	2,50	325,1070	325,1076	325.0946, 124.0075, 223.0419	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	-1,8	Eucalyptin	(ZAPESPOCH NAYA; SOKOL'SKAY A, 1984)

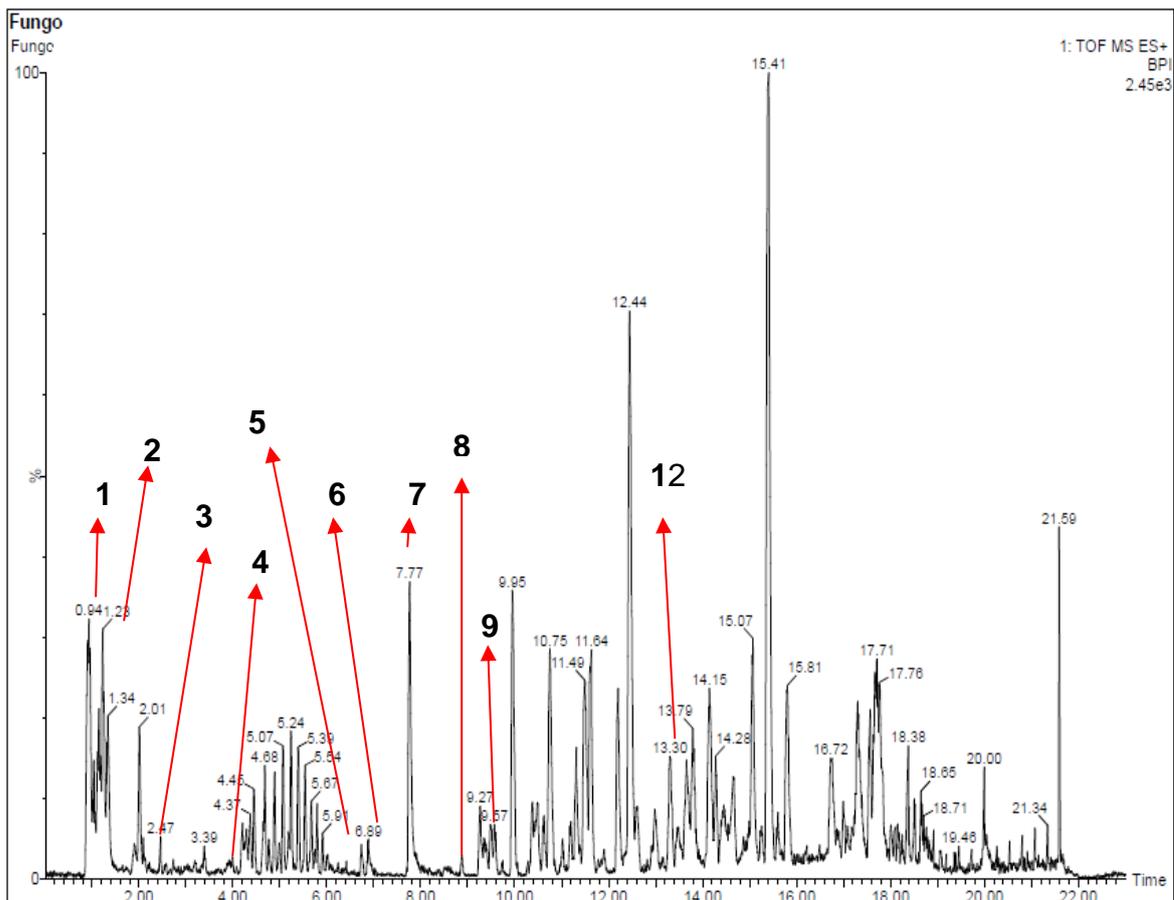
5	6,08	197.0432	197.0450	197.0398; 167.0303; 153.0456	$C_9H_9O_5$	-2,8	Ácido Siríngico	(HOFFMANN; IINUMA; HERRMANN, 2007)
6	7,35	167,0367	167.0344	131.0181; 167.0381; 116.9339	$C_8H_7O_4$	4,8	Ácido Vanílico	(HOFFMANN; IINUMA; HERRMANN, 2007)
7	9,31	329,2309	329,2328	329.2355, 199.1314, 183.0111	$C_{18}H_{33}O_5$	-5,8	Ácido Pinélico	(SUNNAM; PRASAD, 2013a)
8	12,64	315,2512	315,2535	315.2529, 183.0113	$C_{18}H_{35}O_4$	-7,3	9,10-Dihydroxystearate	(KOAY et al., 2011)
8	18.06	253.2530	253.2531	183.0066, 253.2543, 197.0254	$C_{17}H_{33}O$	-0,4	Não identificado	-
9	21,59	325,1795	325,1804	325.1822, 183.0089, 311.1673, 197.0241	$C_{21}H_{25}O_3$	0,3	Não identificado	-

Fonte: Autor (2021).

O cromatograma apresentou o equivalente a 21 picos no modo positivo, e 9 picos no modo negativo, sendo que apenas 10 picos foram identificados no modo positivo e 6 picos no modo negativo, que destaca a existência de classes químicas distintas presentes no extrato como: Alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, Ácidos fenólicos e outras classes de compostos. A presença de flavonoide e ácidos fenólicos justifica o alto teor antioxidante que o extrato apresentou.

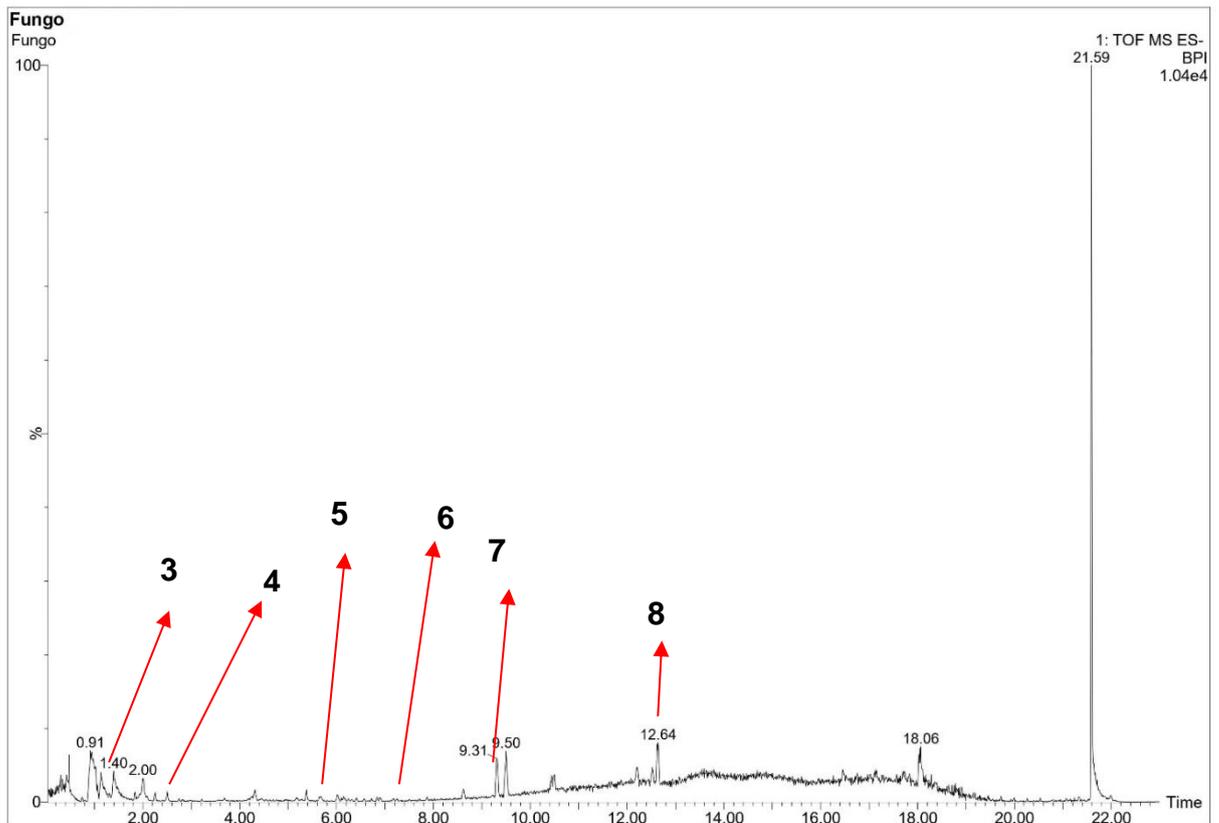
Os resultados da nossa análise apontam que o perfil químico do extrato é satisfatório, pois foram identificados compostos inéditos utilizando esta técnica, ainda não descrito na literatura até o momento. Conforme mostram as figuras (10 e 11) abaixo com base nos seus picos e tempos de retenção.

Figura 11: Espectro LC-MS/MS do Extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* no modo íon positivo [M H]⁺



Fonte: Autor (2021).

Figura 12: Espectro LC-MS/MS do Extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* no modo íon negativo $[M-H]^-$



Fonte: Autor (2021).

4.2.1 Descrição dos Picos apresentado no Cromatograma em modo positivo

O pico **1**, íon molecular, com razão massa/carga (m/z) igual 330,1699 foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, com um $t_R = 0,94$ e apresentou os fragmentos (183; 198; 297; 223), que correspondeu ao composto previamente identificado e relatado pelos autores (Amer; Shamma; Freyer, 1991; Feitosa et al., 2012; Milligton; Rinehart, 1974), denominado Epiritratidinona.

O pico **2** apresentou a m/z 314,1741 com um $t_R = 1,00$ e, apresentou os fragmentos (313.37, 298.32, 283.28), que correspondeu ao composto previamente identificado pelos mesmos autores do pico 1, sugerindo se tratar da Erisotrina. Ambos pertencentes à classe dos Alcaloides, inédito no gênero *Lentinus*, porém, a presença de alcaloides é descrita na literatura em alguns gêneros como

O pico **3**, íon molecular, com razão massa/carga igual a 325,1070. Foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, com um $t_R = 2,5$ e apresentou os fragmentos (138.0598, 204.0835, 325.0946, 124.0075, 223.0419), que correspondeu

ao composto previamente identificado e relatado na literatura pelos autores Zapesochinaya; Sokol'Skaya (1984), como: Eucalyptin ou 5-hidroxi-4', 7-dimetoxi-6,8-dimetilflavona. Pertencente à classe dos flavonoides, um composto fenólico inédito no gênero *Lentinus crinitus*. Diversos autores já relataram a ocorrência de compostos fenólicos em diversos extratos de fungos comestíveis e em zonas distintas como Portugal, Espanha, Correia e Finlândia (JAYAKUMAR; THOMAS; GERALDINE, 2009; KIM et al., 2008; PALACIOS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2008).

O pico **4**, com m/z 457.1365, foi encontrado no extrato com um $tR = 3,92$ e apresentou os fragmentos (204.0932, 187.1129, 136.0653), que correspondeu ao composto previamente identificado e relatado pelos autores Hassan et al. (2008), identificando com um novo monoterpene alcaloide denominado 15-demethylplumeride.

O pico **5** com íon molecular m/z 181.0482 foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, com um $tR = 6,02$ e apresentou os fragmentos (151.0436; 181.0499; 133.0827), que correspondeu ao Ácido cafeico, identificado por Guo et al. (2008). Um composto inédito para espécie, pois não há relatos da presença desses compostos nos materiais já tornado público. O ácido cafeico é um ácido derivado do catecol, podendo ser encontrado geralmente em várias espécies de plantas, como chás, café e flor de sabugueiro (MEINHART et al., 2017).

Quanto ao pico **6** o íon molecular com $m/z = 317,0312$, foi encontrado no extrato, com $tR = 7,32$, com os fragmentos (319.12; 219.17; 133.09, 220.17), que correspondeu com a gossipetina relatada na literatura pelos autores Dudek, Warskulat, Schneider (2016), é uma hexa-hidroxi-flavona com os grupos hidroxila colocados nas posições 3-, 3'-, 4'-, 5-7 e 8-. E funciona como metabólito vegetal. De acordo com a literatura, ainda não foi identificado um flavonoide no gênero *Lentinus crinitus*. Porém, sabe-se que os compostos fenólicos são gerados como metabólitos secundário nas plantas e nos fungos, sendo considerado um dos grupos mais importantes associados ao poder antioxidante, já tendo sido descrita a sua capacidade de quelar metais e inibir a lipoxigenase e os radicais livres (DECKER, 2009).

O pico **7**, cujo seu íon molecular obtido é $m/z = 219,1740$, foi encontrado no extrato com um $tR = 7.77$, apresentando as diversas fragmentações (121, 181, 147, 203, 200) que permitiu identificar o composto pertencente à classe dos sesquiterpenóide denominado (+) – Nootkatone. A presença de sequiterpenos no

gênero *Lentinus* foi relatada pela primeira vez por Wu (2009), que conseguiu identificar um total de 19 compostos sequiterpenos em várias espécies *Lentinus*. Os basidiomicetos são uma rica fonte terpenóides formando cogumelos (SCHMIDT-DANNERT, 2014). Os sesquiterpenóides são importantes metabólitos secundários e possuem várias propriedades farmacêuticas e nutracêuticas. Em particular os basidiomicetos superiores possuem um repertório Biosintética versátil para esses compostos bioativos (LEE et al., 2020).

O pico **8**, íon molecular com razão massa/carga igual a 481.1358, foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, com um tR = 8,72 e apresentou os fragmentos (293.0456, 151.0406, 133.0764), que correspondeu ao composto previamente identificado e relatado na literatura como Noidesol (A), que trata-se de um diidroflavonol-C-glicosídeos, que foi isolados da casca de uma planta lenhosa do gênero *Gnetum gnemonoides* (SHIMOKAWA et al., 2010).

O pico **9**, íon molecular com razão massa/carga igual a 403.1411, foi encontrado nesse estudo com o tR = 9,52, e apresentou os fragmentos (402.13, 403.13), a busca na literatura correspondeu à Nobelitina, [nome sistemático: 2-(3,4-dimetoxifenil) -5,6,7,8-tetrametoxi-4H-cromen-4-ona (WANG et al., 2007). É um flavonóide encontrado em cascas de frutas cítricas e foi relatado por mostrar uma ampla gama de propriedades fisiológicas (NOGUCHI et al., 2016). Os flavonóides cítricos como a nobelitina por exemplo, podem exibir atividades farmacológicas, incluindo dano antioxidante, anti-inflamatório e, notavelmente, ações de melhora no comprometimento da memória (HWANG; SHIH; YEN, 2015).

O pico **12**, íon molecular com razão massa/carga igual a 365.1371, extrato metanólico *Lentinus crinitus*, com um tR = 13,66, apresentou os fragmentos (365.1406, 163.0775, 121.0993), que correspondeu ao composto previamente identificado e relatado pelo autor Nuclear (2010), que o denominou como Asperterone, obtido de culturas do fungo endofítico *Aspergillus terreus*, isolado da planta com flor *Mammea siamensis*.

4.2.2- Fragmentos apresentados nos picos dos cromatogramas em modo negativo.

O pico **3**, íon molecular com razão massa/carga igual a 515.1248 foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo negativo com um tR = 1,40 e apresentou os fragmentos (353.0876, 173.0453, 179.03445, 191.0559), que

correspondeu ao composto ácido 3,4-di-O-cafeoilquinico ou Ácido 3,4-Dicafeoilquínico, isolado da planta *Elephantopus mollis* e apresentando um teor polifenólico alto (OOI et al., 2011).

O pico 4, íon molecular com m/z igual a 325,1070, foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo íon negativo com um tR = 2,50 e apresentou os fragmentos (138.0598, 204.0835, 325.0946, 124.0075, 223.0419), que correspondeu ao composto previamente identificado, já no modo positivo, e relatado na literatura como: Eucalyptin ou 5-hidroxi-4', 7-dimetoxi-6,8-dimetilflavona. Pertencente à classe dos flavanoides.

O pico 5, íon molecular com m/z igual a 325,1070, foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo íon negativo com um tR = 6,08 e apresentou os fragmentos (197.0398; 167.0303; 153.0456), que correspondeu ao Ácido Siríngico, identificado por (Hoffmann; linuma; Hermann, (2007)). O ácido siríngico desempenha um papel na comunicação entre plantas e microrganismos do solo através de alterações nas comunidades microbianas da rizosfera do solo e inibição do crescimento de mudas de pepino, e possui atividades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e antiendotóxicas (SRINIVASULU et al., 2018).

O pico 6, íon molecular com razão massa/carga igual a 329,2309, foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo negativo com um tR = 9,31 e apresentou os fragmentos (329.2355, 199.1314, 183.0111), que correspondeu ao composto de nome sistemático (9R,12R,13R,10E)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-enoic Acid ou Ácido Pinélico (SUNNAM; PRASAD, 2013b).

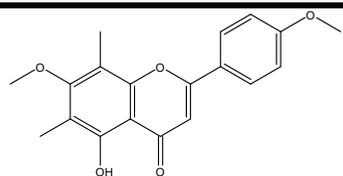
O pico 7, íon molecular com razão massa/carga igual a 167,0367, foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo negativo com um tR = 7,35 e apresentou os fragmentos (131.0181; 167.0381; 116.9339), que correspondeu ao Ácido Vanílico e identificado por Hoffmann; linuma; Herrmann, (2007). O ácido Vanílico (VA) é um composto fenólico utilizado com bastante permanência na indústria como um aromatizante, e as vezes como conservante de alimentos, podendo ser encontrado em cereais, grãos inteiros, frutas, ervas, chá verde, sucos, cervejas e possui atividades antioxidante, hepatoprotetora, cardioprotetora e antiapoptótica (ALMEIDA; CAVALCANTE; VICENTINI, 2016).

O pico 8, íon molecular com razão massa/carga igual 315,2512 foi encontrado no extrato metanólico *Lentinus crinitus*, em modo negativo com um tR = 12,64 e

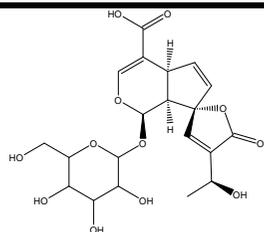
apresentou os fragmentos (315.2529, 183.0113), que correspondeu a um ácido graxo desenvolvido na Malásia de nome ácido 9,10-diidroxiestárico (KOAY et al., 2011).

A Tabela (12) abaixo descreve as possíveis estruturas dos compostos identificados.

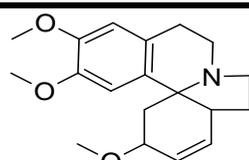
Tabela 10: Proposta das estruturas dos compostos identificados no extrato no íon positivo



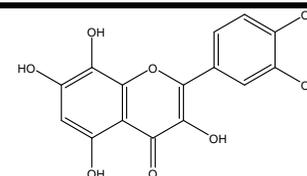
Eucalyptin



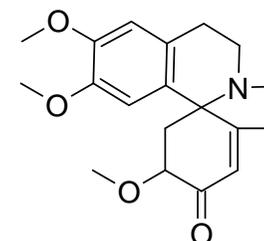
15-Demethylplumeride



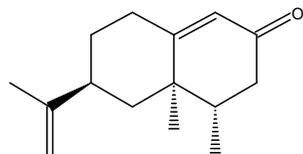
Erisotrina



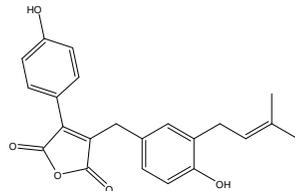
3,3',4',5,7,8-
Hexahidroxiavona



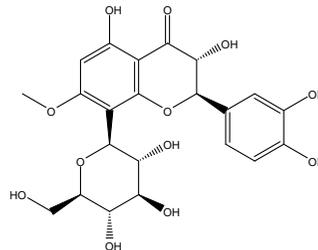
Epiratidinona



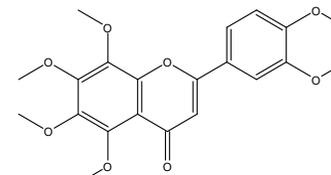
(+)- Nookatone



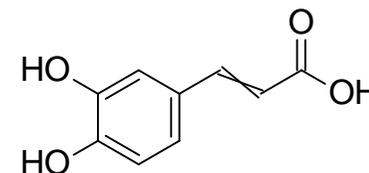
Asperterone



Noidesol



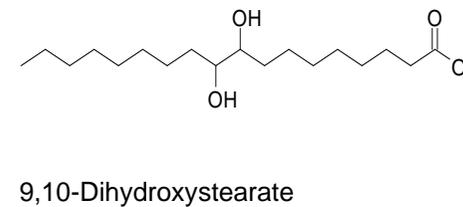
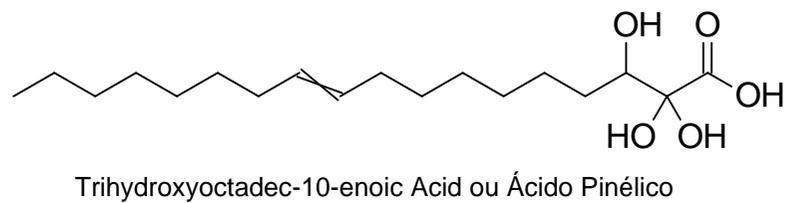
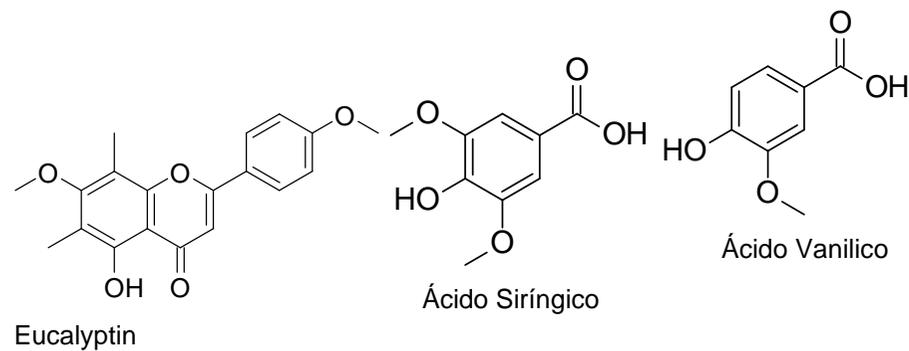
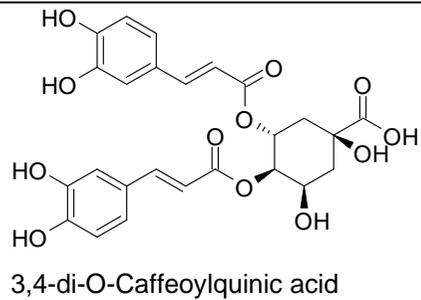
Nobiletin



Ácido Cafeico

Fonte, Autor (2021).

Tabela 11: Proposta das estruturas dos compostos identificados no extrato no íon positivo

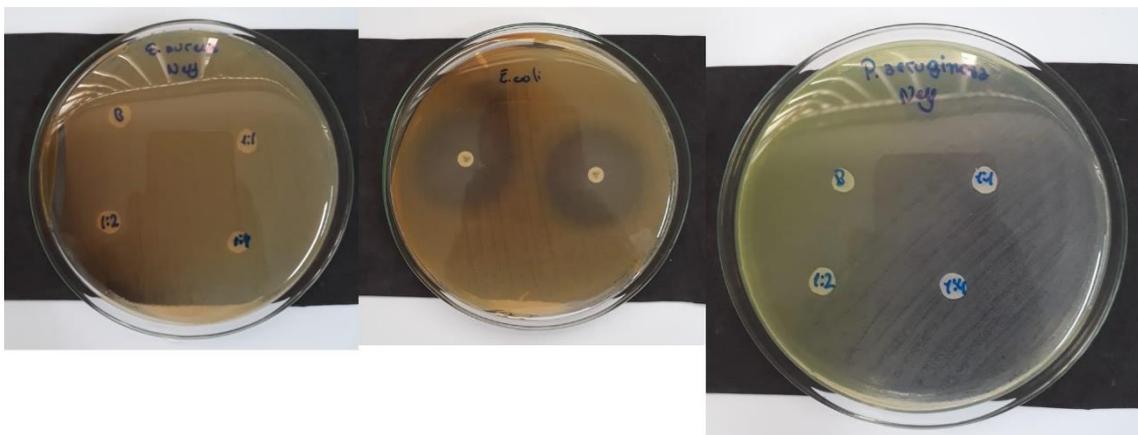


Fonte: Autor (2021).

4.3 Teste da atividade antibacteriana pelo método da difusão em disco

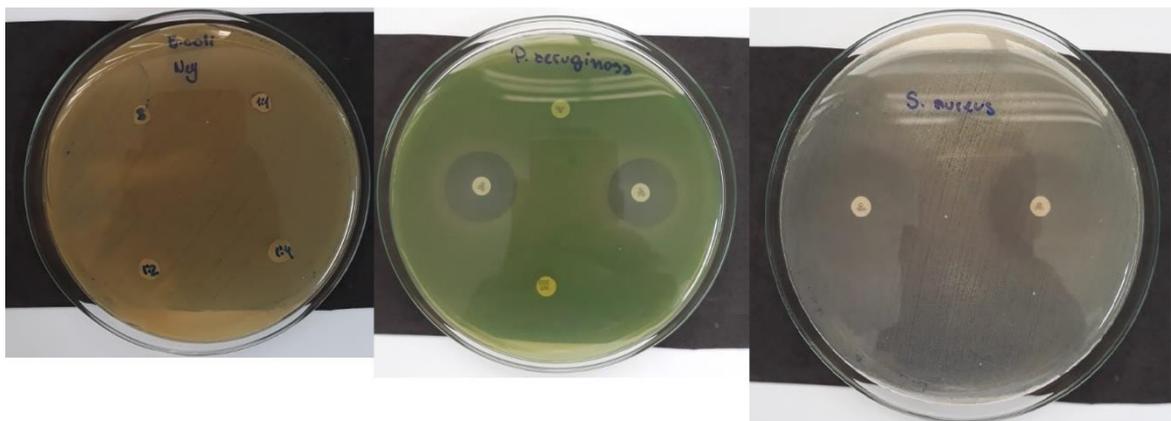
A atividade antibacteriana do extrato de metanólico do fungo foi testado pelo método da difusão em disco em relação às cepas de *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B) e *E. coli* (C), e estão apresentadas na figura 14. Para efeito de comparação, foram realizados ainda testes de suscetibilidade de tais bactérias ao seu padrão como demonstrado na Figura 13 e os resultados estão descrito na Tabela (14) abaixo.

Figura 13: Padrão de halo para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia* utilizando discos Cloranfenicol



Fonte: Autor (2021).

Figura 14: Atividade antibacteriana do extrato metanólico do fungo *Lentinus Crinitus* frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*



Fonte: Autor (2021).

Tabela 12: Resultado da Concentração Mínima Inibitória do extrato metanólico do fungo ($\mu\text{L/mL}$)

BACTÉRIAS	PADRÃO DE CONTROLE (mm)	EXTRATO METANÓLICO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	25	NI*
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	21 – 27	NI*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853		NI*

Fonte: Autor (2021).
NI* (não houve inibição)

O teste da atividade antibacteriana realizados demonstraram que o extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* não possui ações antibacterianas contra as espécies (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). O teste da atividade antimicrobiana pode ser comparado através do diâmetro do halo padrão obtido a partir de discos impregnados com o antibiótico Cloranfenicol, o mesmo foi utilizado como grupo de controle.

Krupodrova *et al.* (2016), pesquisando acerca das atividades antibacterianas de trinta espécies de cogumelos pertencentes à classe dos Basidiomycetes e Ascomycetes, cultivadas em dois meios líquidos, foram avaliadas contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) pelo método de difusão em disco. Todos os cogumelos. [...] apresentaram diferentes níveis de atividade antibacteriana - de 9,5 mm de diâmetro na zona de inibição a inibição total do crescimento da bactéria em teste.

Tal como relatamos no nosso estudo, Sousa (2012), pesquisando acerca da análise de compostos fenólicos e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos de cogumelos comestíveis produzidos no Brasil, concluiu que não houve atividade antibacteriana das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. A mesma informou que não foram inibidos pelos extratos de praticamente todos os cogumelos.

4.4 Teste de ecotoxicidade frente à *Artemia salina*

Os resultados de mortalidade das larvas de *Artemia salina* obtidas com o extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* foi examinado após a contagem de 24 e 48 horas, e estão representados na Tabela (15). Consoante a análise da toxicidade

tornou-se possível a determinação da porcentagem de *náuplios de Artemia salina* mortos e assim, determinar a CL_{50} , que é a concentração necessária para matar 50% da população das amostras (*Artemia salina*) do estrato.

O critério de classificação do extrato metanólico do extrato do fungo perante à *Artemia salina* utilizado nesse trabalho foi feito com base nos valores das DL_{50} estabelecido por Meyer et al. (1982) que utilizam o critério de avaliação em que se considera que a amostra é tóxica ou ativa as que apresentarem $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ e amostras atóxicas ou inativas as que apresentarem $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

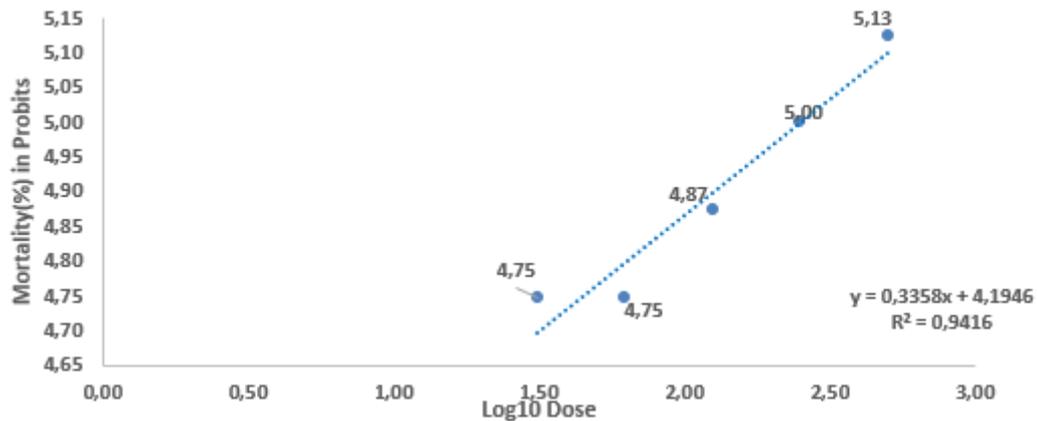
Tabela 13: Mortalidade das *Artemia salina* com extrato metanólico, com o tempo de 24 horas a 48 horas

Concentrações	<i>Artemia salina</i>			<i>Artemia salina</i>		
	Mortas			Mortas		
	24 horas		Média 24h	48 horas		Média 48h
	Tubo 1	Tubo 2		Tubo1	Tubo 2	
1,000 mg/mL	3,0	2,0	2,5	10,0	10,0	10,0
0,500 mg/mL	6,0	5,0	5,5	10,0	10,0	10,0
0,250 mg/mL	4,0	4,0	4,5	10,0	10,0	10,0
0,125 mg/mL	1,0	1,0	5,0	9,0	10,0	9,5
0,062 mg/mL	5,0	5,0	4,5	10,0	10,0	10,0
0,031 mg/mL	5,0	3,0	4,0	10,0	10,0	10,0
Branco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Fonte: Autor (2021).

Em função dos dados tabelados, foi executada a construção de um gráfico que expõe com maior clareza os resultados obtidos, tornando assim possível analisar graficamente todos os dados obtidos após os cálculos executados. O Gráfico 2 explicita os dados supracitados na Tabela 15 em relação as 24 horas, pois o mesmo extrato apresentou uma mortalidade total durante às 48 horas.

Gráfico 2: Percentagem das *Artemias Salina* mortas em diferentes concentrações, com extrato metanólico, com o tempo de 24 horas



Fonte: Autor (2021).

De acordo com o comportamento do gráfico, foi possível concluir que a mortalidades das *Artemia salina* em 24 horas aumenta linearmente conforme o aumento da concentração. Da mesma forma, foi percebido também que, quanto menor é a concentração do extrato do fungo utilizado, menor é a mortalidades das *Artemia salina*.

Desta forma, a dose letal (DL₅₀) foi calculada com base na equação da reta obtida pela regressão linear, considerando a correlação do logaritmo das concentrações e o correspondente percentual de mortalidade. Ao valor de y (coordenadas) atribui-se a metade das mortes máximas possíveis (n/2), ao resultado de x obtido (abscissas) aplica-se o antilogaritmo, resultando no valor final da DL₅₀ (SASIDHARAN *et al.*, 2012).

Por meio da construção da regressão linear, a DL₅₀ calculada foi igual a 2747,286, classificada como amostra não tóxica. A ausência de citotoxicidade frente à *Artemia salina* é um indicador de que a parte do extrato avaliado pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico, já a constatação do potencial toxicológico sinaliza a necessidade de mais estudos como testes *in vitro*, de modo a esclarecer os aspectos relacionados à toxidez (PEREIRA *et al.*, 2015). Embora a citotoxicidade represente uma preocupação com relação à segurança do uso, estudos recentes como o de Silva e Colaboradores (2015), abordam o potencial antitumoral de plantas citotóxicas.

4.5. Docking Molecular com os Compostos identificados Frente à Transferase do Zika Vírus

Nesta fase do estudo, foram realizados cálculos de *docking* para os 16 compostos recém identificados por LC-MS/MS. O alvo biológico selecionado foi o 5M5B (transferase do vírus da Zika), e o sítio ativo em que as moléculas foram encaixadas foi o mesmo do ligante nativo SAM (*S-Adenosilmetionina*), conforme mostra a tabela (15).

Figura 15: Grid do ligante nativo SAM (*S-Adenosilmetionina*) utilizado para o *Docking*

center_x	8.607370
center_y	43.187481
center_z	86.285630
size_x	40.0
size_y	40.0
size_z	40.0

Fonte: Autores (2021).

O *docking* molecular foi aplicado nesse estudo com sucesso, utilizando o programa *Autodock Vina* (TROTT; OLSON, 2009), os compostos utilizados como ligantes, percorreram todo o espaço tridimensional da grade até encontrar as posições mais favoráveis, ao final do cálculo obteve-se valores de RMSD para as poses onde os ligantes acoplaram-se que são descritas na Tabela 16, com as suas energias de afinidade e a constante de inibição que foi determinada através da energia do *docking*.

Tabela 16: Dados obtidos do *docking* com as estruturas dos compostos identificados e o ligante nativo.

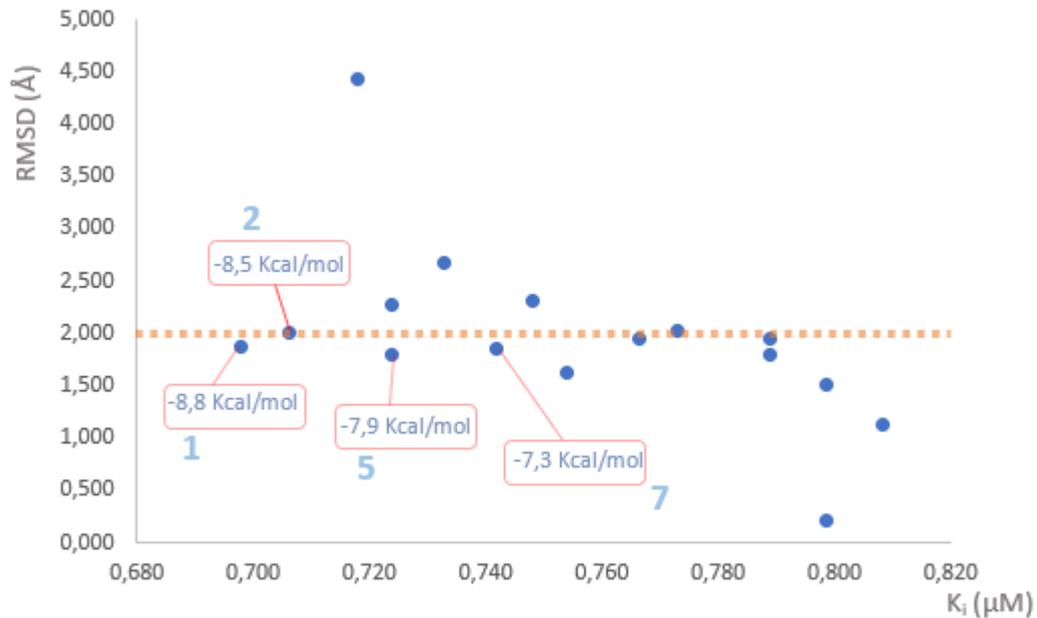
Composto número	Compostos Fitoquímico	ΔG (Kcal/mol)	K_i (μM)	RMSD (\AA)	Pose
1	3,4-di-O-Caffeoylquinic acid	-8,8	0,698	1,872	3
2	Gossypetin	-8,5	0,706	1,999	2
3	Noidesol	-8,1	0,718	4,429	5
4	15-demethylplumeride	-7,9	0,724	2,269	8
5	Eucalyptin	-7,9	0,724	1,801	3
6	Nobiletin	-7,6	0,733	2,665	2
7	SAM (redocking)	-7,3	0,742	1,856	2
8	Erysotrine	-7,1	0,748	2,315	2
9	Erythratidinone	-6,9	0,754	1,616	4
10	(+)- Nookatone	-6,5	0,767	1,955	3
11	Asperterone	-6,3	0,773	2,019	2
12	9,10-Dihydroxystearate	-5,8	0,789	1,947	2
13	Pinelic acid	-5,8	0,789	1,795	4
14	Caffeic acid	-5,5	0,799	1,514	6
15	Siringic Acid	-5,5	0,799	0,209	2
16	Vanilic acid	-5,2	0,808	1,127	5

Fonte: Autor (2021).

Como o *docking* trabalha na validação da afinidade do ligante presente em um determinado sítio ativo encontrado no receptor de interesse, para efetivar a validação do ancoramento nesse estudo, levou-se em consideração energias de afinidade menores que -8,0 Kcal/mol e desvios de RMSD menores que 2 angstroms (\AA).

A Tabela 16 mostra os 3 ligantes que apresentaram menor energia de docagem e K_i , em relação ao ligante nativo SAN, que foi *3,4-di-O-Caffeoylquinic acid*, *Gossypetin*, *Eucalyptin*. Desta forma, foi necessário desenhar o gráfico para melhor explicitar a relação entre RMSD e K_i .

Gráfico 3: Gráfico da relação entre RMSD (Desvio Quadrado Médio) e KI (Constante de Inibição)



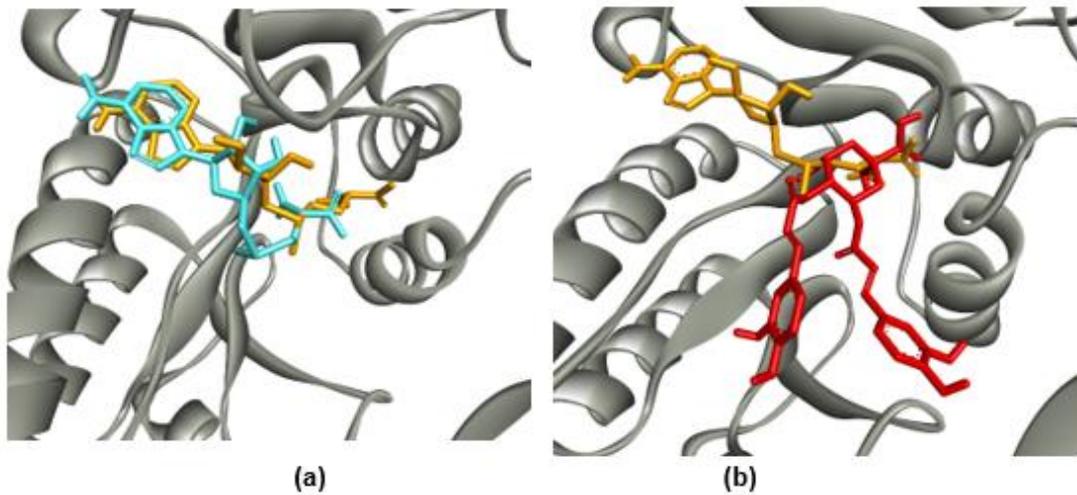
Fonte, Autor (2021).

O RMSD e a constante de inibição fornecem informações sobre a estabilidade do complexo receptor-ligante que é formado, quanto menor K_i , maior a estabilidade do complexo e conseqüentemente, maior a eficácia do ligante em inibir o receptor (JÚNIOR; DR. ARLAN, 2019).

4.5.1 Visualização das Interações do Complexo Receptor-Ligante

Para visualizar as interações do receptor-ligante nesse estudo, foi empregado o *Discovery Studio* (BIOVIA, 2015), a escolha deu-se devido a facilidade de manuseio do *software* e seus gráficos otimizados que facilitam a compreensão dos resultados de forma mais simples.

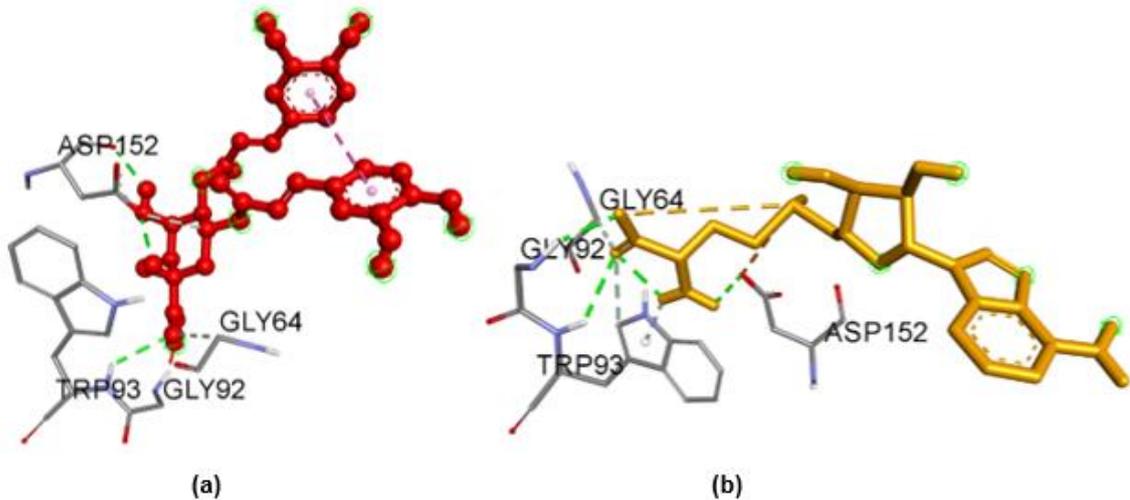
Figura 17: (a) *Redocking*: laranja a SAM na forma co-cristalizada e em azul a SAM obtida pelo *redocking*. (b) *Docking* do composto 1 (vermelho) com a proteína ancorando na mesma região da SAM (laranja)



Fonte:(BIOVIA, 2015)

Na Figura 17 (a), é possível observar o resultado obtido laranja a SAM na forma co-cristalizada e em azul a SAM obtida pelo *redocking* com a energia de afinidade igual a -7,3 Kcal/mol e o desvio no RMSD em *redocking* ligando-se no mesmo sítio. com a ligante energia de afinidade igual a - 7.3 Kcal/mol e menores desvios no RMSD com 1,856. E em (b) pode-se observar o *Docking* do composto 13,4-di-O-Caffeoylquinic acid (vermelho) com a proteína ancorando na mesma região da SAM (laranja), com valor de energia -8,8 Kcal/mol e o desvio no RMSD igual a 1,872 e a sua afinidade K_i (μM) = 0,689. O resultado é satisfatório uma vez que os ligantes se acoplaram no mesmo sítio ativo da proteína alvo.

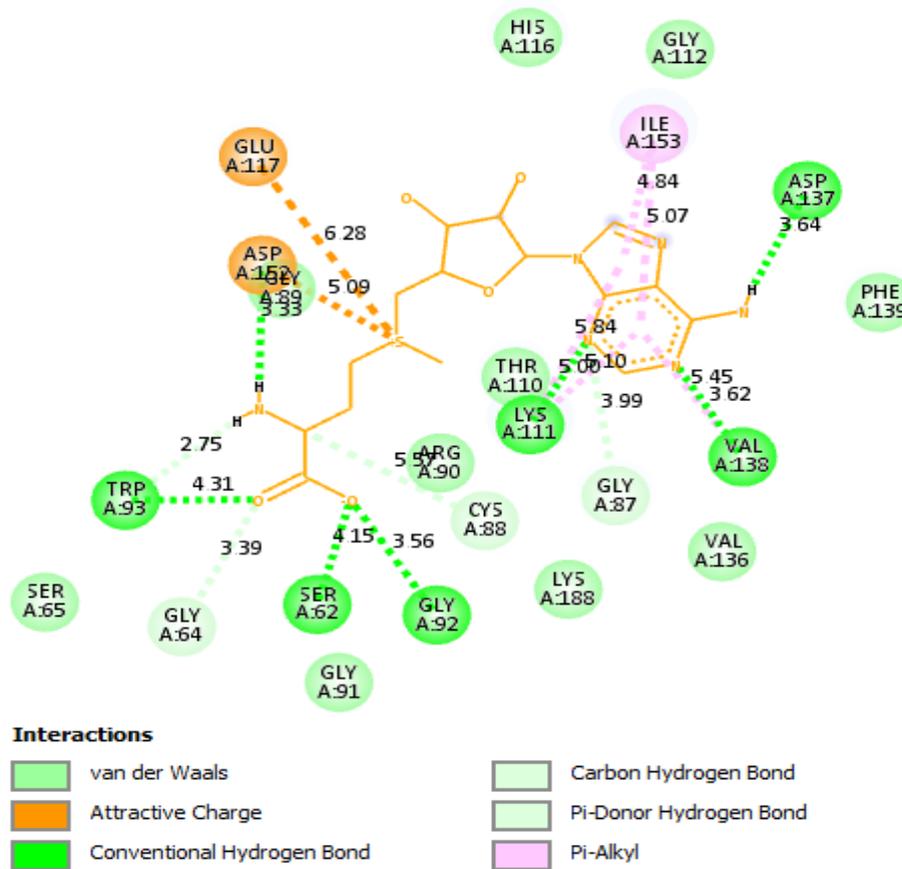
Figura 18: (a) em vermelho o composto 1 interagindo em 3D com os principais resíduos de aminoácido. (b) em laranja o ligante co-cristalizado SAM interagindo em 3D com os principais resíduos de aminoácidos



Fonte: Autores (2021).

A partir da Figura 18 é possível verificar as interações dos compostos com os principais resíduos de aminoácidos, onde destacamos a presença de ASP152, TRP93, GLY92, GLY64, para *3,4-di-O-Caffeoylquinic acid*, e para SAM. A visualização em 3D facilita na compreensão e visibilidade dos aminoácidos presente. A figura (19) abaixo especifica com mais clareza a relação destacando as distâncias em Å de forma separada para os compostos.

Figura 19: Interações receptor-ligante com os resíduos de aminoácidos e suas distâncias



Fonte: BIOVIA (2015).

A Figura 19, mostra as principais interações entre a proteína e o composto *1,4-di-O-Caffeoylquinic acid*. Destacando-se principalmente a ligação através de interações de vander Waals para: HIS A:116, GLY A:112, SER A:65, GLY A:91, LYS A:188, VAL A:136, PHE A:139, THR A:110, ARG A:90. E duas interações *pi-álquila* com o resíduo ILE A:153 (4,84 Å e 5,74 Å), e duas ligações de hidrogênio convencional entre ASP A: 137 (3,64 Å) E VAL A:138 (3,62 Å).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os objetivos propostos na elaboração do trabalho foram atingidos. Assim sendo, os resultados encontrados nesse estudo de conclusão de curso demonstraram que o extrato metanólico da espécie *Lentinus crinitus* apresenta percentuais de inibição satisfatória. O mesmo extrato apresentou um fator de inibição de 62,3% na concentração de 1000 µg/mL.

Da análise com LC-MS do extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* foram identificados no total apenas 16 compostos com base na comparação de relatos já registrados na literatura. A maioria dos compostos aqui identificados são descritos pela primeira vez no gênero *Lentinus*. Estes resultados mostraram que o *Lentinus crinitus* é produtor de diferentes classes de metabólitos secundários, biologicamente ativos.

Constatou-se que os ensaios de inibição bacteriana realizados mostraram que o extrato metanólico do fungo *Lentinus crinitus* testados em diferentes concentrações, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, não apresentou ações antibacterianas frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

A avaliação de toxicidade do extrato do fungo frente ao microcrustácea *Artemia salina* demonstrou que o extrato não apresenta toxicidade em todas as concentrações testadas já que este apresentou o $CL_{50} > 1000$ µg/mL.

O estudo de simulação por *docking* molecular permitiu a análise das energias de ligação entre os compostos identificados no extrato frente à Tranferase do Zika vírus (5M5B), os valores encontrados mostraram-se satisfatórios, com destaque ao composto 1 de nome Ácido cafeoilquínico que apresentou valores aproximados com o ligante nativo SAM, com energia -8,8 Kcal/mol e o desvio no RMSD igual a 1,872 e a sua afinidade K_i (µM) = 0,689. E que também interagiram bem com os aminoácidos que ficam próximos ao sítio ativo da proteína, exibindo várias ligações de hidrogênio. Dessa forma, em função dos resultados encontrados, o composto 1 mostrou-se como um inibidor promissor, mas precisará de uma série de estudos adicionais como parte na produção de um fármaco.

Encaminhamentos

Dar Continuidade na pesquisa na Pós-Graduação na modalidade *strictu sensu*.
Publicar um artigo científico com os dados desse manuscrito em uma Revista conceituada nos próximos meses.

REFERÊNCIAS

- ABATE, D.; ABRAHAM, W.-R. Antimicrobial metabolites from *Lentinus crinitus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1348–1350, 1994.
- ABRAHAM, W.-R.; ABATE, D. Chromanones from *Lentinus crinitus* (Basidiomycetes). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 11–12, p. 748–750, 1 dez. 1995.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, abr. 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWHEEL, M. M. **Introductory Mycology**. 4ª ed. New York: John Wiley & Sons., 1996.
- ALMEIDA, I. V.; CAVALCANTE, F. M. L.; VICENTINI, V. E. P. Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in HTC cells: cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMARAL, P. DE A. et al. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 351–363, dez. 2003.
- AMER, M. E.; SHAMMA, M.; FREYER, A. J. The Tetracyclic Erythrina Alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 329–363, mar. 1991.
- ANULIKA, N. P. et al. The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites. **Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res**, v. 4, p. 1–8, 2016.
- AO, T.; DEB, C. R. Nutritional and antioxidant potential of some wild edible mushrooms of Nagaland, India. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 2, p. 1084–1089, fev. 2019.
- AZEVEDO, J. L. DE. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. In: AZEVEDO, J. LUCIO DE; ESPOSITO, E. (Eds.). . **Genética de fungos**. 2ª ed. Caxias do Sul: Educ, 2004. p. 173–180.
- BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L .) Fr . CCB274 empregado em biorremediação de solo**. Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São paulo.p. 163 2007.
- BARROS, L. et al. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen

different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1076–1079, 2009.

BATISTA, G. DA C. et al. Softwares para o Ensino de Química: Chems sketch um Poderoso Recurso Didático. **Revista Educacional Interdisciplinar**, v. 5, n. 1, 2016.

BECKER, M. M. et al. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1108–1114, 2019.

BERG, J. M.; LUBERT, S. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BERLINK, R. et al. Aquímica de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BIOVIA. **Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5** Accelrys Software Inc. San Diego, 2015.

BLANC, D. S. et al. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 4, n. 5, p. 242–247, maio 1998.

BONONI, V. L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Icone, 1999.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, jun. 2003.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. 7ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A. Mushroom nutraceuticals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 473–476, set. 1996.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**. Disponível em: <https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf>. Acesso em: 19 mar. 2020.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. DE FATIMA B. DA. **Projeto de Pesquisa: Entenda e Faça**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Petropoles, 2014.

COTA, B. B. et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 263–270, maio 2008.

COUTARD, B. et al. Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. **Journal of Virology**, v. 91, n. 5, 1 mar. 2017.

DECKER, A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396–398, 27 abr. 2009.

DIAS, B. F. DE S. **Implementação Da Convenção Sobre Diversidade Biológica No Brasil: Desafios E Oportunidades**. Disponível em: <<http://www.iea.usp.br/publicacoes/textos/a-implementacao-da-convencao-sobre-diversidade-biologica-no-brasil-desafios-e-oportunidades>>. Acesso em: 26 set. 2019.

DUARTE, A. Bacteriologia médica: Enterobacteriaceae. In: BARROSO, H., ET AL (Ed.). **Microbiologia Médica**. Lisboa: 2014, p. 342–357.

DUDEK, B.; WARSKULAT, A.-C.; SCHNEIDER, B. The Occurrence of Flavonoids and Related Compounds in Flower Sections of *Papaver nudicaule*. **Plants**, v. 5, n. 2, p. 28, 22 jun. 2016.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 337–345, maio 2007.

ERKEL, G.; ANKE, T.; STERNER, O. Inhibition of NF- κ B Activation by Panepoxydone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 1, p. 214–221, set. 1996.

FEITOSA, L. G. P. et al. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2177–2180, 2012.

FILHO, B. A. B.; OLIVEIRA, M. DA C. FERREIRA DE. **Chemical study of the basidiomycete *Lentinus strigellus***. Tese (Doutrado)- Pós-Graduação em Química Orgânica. Universidade Federal do Ceará, 2009, p.222.

FOOK YEE CHYE; JIN YI WONG; LEE, J.-S. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 4, p. 375–384, ago. 2008.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in Theory and Practice**. 4^a ed. Londres: Chapman & Hall, 1994.

FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Effects of dietary supplementation with agaricales mushrooms and other medicinal fungus on therapy against the cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 4, n. 52, p. 363–71, 2006.

FRANCO, J. L. DE A. O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade. **História (São Paulo)**, v. 32, n. 2, p. 21–48, dez. 2013.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e

tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, dez. 2008.

GAN, Y. et al. Isolation and identification of the chemical constituents from *Lentinus giganteus* Berk. **Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi**, v. 17, p. 104–107, 2007.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GRANDI, R. A. P. Fungos. In: EVERT, R.; EICHHORN, S. E. (Eds.). . **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2007.

GUO, X. et al. LC–MS determination and pharmacokinetic study of six phenolic components in rat plasma after taking traditional Chinese medicinal-preparation: Guanxinling lyophilized powder for injection. **Journal of Chromatography B**, v. 873, n. 1, p. 51–58, set. 2008.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.

HASSAN, E. et al. A New Monoterpene Alkaloid and Other Constituents of *Plumeria acutifolia*. **Planta Medica**, v. 74, n. 14, p. 1749–1750, 30 nov. 2008.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. K. A. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities And Chemical Composition Of Propolis From Reclaimed Lands. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3–4, p. 395–402, 1 abr. 2002.

HOFFMANN, D.; IINUMA, Y.; HERRMANN, H. Development of a method for fast analysis of phenolic molecular markers in biomass burning particles using high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1–2, p. 168–175, mar. 2007.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3ª ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. Citrus Flavonoids and Effects in Dementia and Age-Related Cognitive Decline. In: **Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 869–878.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228–234, abr. 2009.

JÚNIOR, E. G. S. S.; DR. ARLAN, A. D. S. G. Estudo Por Docagem Molecular De Inibidores Da Enzima: GSK-3 β Uma Proposta Para O Tratamento Do Transtorno Bipolar. **Revista Ifes Ciência**, v. 5, n. 1, p. 243–256, 15 jun. 2019.

KIM, M.-Y. et al. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7265–7270, ago. 2008.

KIS, Z. et al. Die Struktur von Panepoxydon und verwandten Pilzmetaboliten. **Helvetica Chimica Acta**, v. 53, n. 7, p. 1577–1597, 1970.

KOAY, G. F. L. et al. Development, Characterization and Commercial Application of Palm Based Dihydroxystearic Acid and Its Derivatives: an Overview. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 5, p. 237–265, 2011.

KONTOYIANNI, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. In: [s.l: s.n.]. p. 255–266.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003–1010, 1 jan. 1994.

KRUPODOROVA, T. A. et al. Antibacterial activity of macromycetes mycelia and culture liquid. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 44, n. 3, p. 246–253, 2016.

LEE, J. et al. Ustilago maydis Serves as a Novel Production Host for the Synthesis of Plant and Fungal Sesquiterpenoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 24 jul. 2020.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 3, p. 402–6, jun. 1996.

LIMA, A. T. M. **Avaliação do potencial antioxidante e antiinflamatório de galactomanana do fungo Tylopiillus ballllouiii**. Dissertação (Mestrado)-Bioquímica, Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

LIN, Y. et al. Immune-Competent Polysaccharides from the Submerged Cultured Mycelium of Culinary-Medicinal Mushroom *Lentinus strigellus* Berk. et Curt. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 6, n. 1, p. 8, 2004.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005.

MACHADO, B.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos Gerais E Usos Em Terapias Naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105–127, 2011.

MAINIL, J. Author ' s personal copy Veterinary Immunology and Immunopathology *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 2–12, 2013.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. BAPTISTA. **Bioquímica Básica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MEINHART, A. D. et al. Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. **Food Research International**, v. 99, p. 522–530, set. 2017.

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant

Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 29 maio 1982.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

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

NEPOMUCENA, R. MARIA P. **Avaliação do Potencial Microbiano de Crescimento e Secreção de lacase do Fungo Amazônico Lentinus crinitus (L.ex Fr.) Fr.** [s.l.] Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

NOGUCHI, S. et al. Nobiletin: a citrus flavonoid displaying potent physiological activity. **Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 124–127, 1 fev. 2016.

NOWACKA, N. et al. Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 689–694, 15 dez. 2014.

NUCLEAR, P. et al. Butenolide and Furandione from an Endophytic Aspergillus terreus. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 58, n. 9, p. 1221–1223, 2010.

OLIVEIRA, L. G. DE et al. Explorando Produtos naturais Microbianos nas Fronteiras da Química e da Biologia. **Química.Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577–1586, 2013.

OOI, K. L. et al. Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 685–695, jun. 2011.

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

OTTO, M. Basis of Virulence in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 143–162, 13 out. 2010.

PALACIOS, I. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 674–678, out. 2011.

PEREIRA, E. M. et al. Potencial toxicológico frente *Artemia Salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 52, 17 mar. 2015.

PETROVA, R. D. et al. Potential Role of Medicinal Mushrooms in Breast Cancer

Treatment: Current Knowledge and Future Perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 7, n. 1–2, p. 141–156, 2005.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1–5, 2017.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, maio 2005.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, 2007.

PUTTARAJU, N. G. et al. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9764–9772, dez. 2006.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos Dos Fungos**. 2ª ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004.

RAMOS, H. P. et al. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 629–632, jun. 2010.

RIBEIRO, B. et al. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 47–56, set. 2008.

RODRIGUES, R. P. et al. Virtual Screening Strategies in Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, 2012.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Hirsutane Sesquiterpenes from the Fungus *Lentinus c onnatus* BCC 8996. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1674–1676, nov. 2005.

SARKAR, M. Indian Management Research. **Vikalpa: The Journal for Decision Makers**, v. 27, n. 4, p. 103–122, 2 out. 2002.

SASIDHARAN, S. et al. Acute toxicity impacts of *Euphorbia hirta* L extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and *Artemia salina*. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 170, 2012.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi.

biochemical engineering/biotechnology, v. 19–61, n. 1, p. 19–61, 2014.

SHIMOKAWA, Y. et al. Gneyulins A and B, Stilbene Trimers, and Noidesols A and B, Dihydroflavonol- C -Glucosides, from the Bark of *Gnetum gneumonoides*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 4, p. 763–767, 23 abr. 2010.

SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

SILVA, C. J. A. DA. ; MALTA, D. J. DO N. a Importância Dos Fungos Na Biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, p. 49–66, 2016.

SILVA, R. R. DA; COELHO, G. D. **Fungos: Principais Grupos e Aplicações Biotecnológica**. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauceane_Coelho.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2020.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2004.

SKOOG, A. D. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 9ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

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

SOUSA, J. M. S. **Análise de Compostos fenólicos e Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos Aquosos de Cogumelos Comestíveis Produzidos no Basil**. Dissertação (mestrado)- Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

SOUZA, A. R. C. DE et al. **Uso Da Artemia Salina Como Bioindicador Na Avaliação Ecotoxicológica Do Fármaco Cloridrato De Ciprofloxacina Em Solução Sintética Tratada Por Processo De Eletrocoagulação**. Disponível em: <<https://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2015/II-007.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SRINIVASULU, C. et al. Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 547–557, dez. 2018.

STUDIO, D. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5. **Accelrys Software Inc.**, 2015.

SUNNAM, S.; PRASAD, K. Total Synthesis of (+)-Pinellic Acid. **Synthesis**, v. 45, n. 14, p. 1991–1996, 2013a.

SUNNAM, S.; PRASAD, K. Total Synthesis of (+)-Pinellic Acid. **Synthesis**, v. 45, n. 14, p. 1991–1996, 17 maio 2013b.

TEIXEIRA, M. A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 42–49, jan. 2007.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

VARGAS-ISLA, R.; ISHIKAWA, N. K. Optimal conditions of in vitro mycelial growth of *Lentinus strigosus*, an edible mushroom isolated in the Brazilian Amazon. **Mycoscience**, v. 49, n. 3, p. 215–219, jun. 2008.

VICTOR, M. M. Química Orgânica no Brasil: Sua contribuição na síntese total de produtos naturais desde a fundação da SBQ. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 701–705, 2017.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WANG, D. et al. Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 63–69, maio 2007.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, n. 1, p. 31–62, 1999.

WU, S. Progresso da pesquisa sobre compostos naturais de sabor voláteis produzidos por cogumelos comestíveis. **AFS, Advances in Food Sciences**, v. 28, n. 1, p. 54–60, 2009.

ZAPESOCHNAYA, G. G.; SOKOL'SKAYA, T. A. Spectral characteristics of C-methylflavones. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 20, n. 3, p. 284–287, 1984.

ZOU, D. et al. UPLC-MS coupled with a dynamic multiple data processing method for the comprehensive detection of the chemical constituents of the herbal formula San-Miao-Wan. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 2848, 2014.