



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOÃO FRANCISCO CÂMARA NETO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DE EXTRATOS DO *Agaricus brasiliensis***

FORTALEZA

2019

JOÃO FRANCISCO CÂMARA NETO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DE EXTRATOS DO *Agaricus brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C173c Câmara Neto, João Francisco.

Caracterização química e avaliação da atividade gastroprotetora de extratos do *Agaricus brasiliensis* / João Francisco Câmara Neto. – 2019.

109 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

Coorientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

1. *Agaricus blazei* Murill. 2. Metabólitos secundários. 3. UPLC-QTOF-MS^E. 4. Úlcera gástrica. I. Título.

CDD 540

JOÃO FRANCISCO CÂMARA NETO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DE EXTRATOS DO *Agaricus brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovada em: 26/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo
EMBRAPA

Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Raimundo Rafael de Almeida
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus.

Aos meus pais, Rúsvelin Oliveira Câmara e
Juracy Vasconcelos Barros. Aos meus irmãos.
À minha amada companheira Vanessa Nicolau
de Araújo e minhas filhas do coração Maria
Eduarda e Ana Sophia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, me amparando nos momentos difíceis, me dando força interior para superar as dificuldades, além de mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, Rúsvelin Oliveira Câmara e Juracy Vasconcelos Barros, pelo amor incondicional, por sempre estarem ao meu lado, por contribuírem para a minha formação me apoiando e incentivando a realizar todos os meus sonhos. Agradeço também a todos os meus irmãos pelo incentivo direto ou indireto nos momentos de dificuldades.

A minha companheira Vanessa Nicolau de Araújo, por ser minha melhor amiga, me incentivando, aguentando e partilhando com paciência cada conquista no desenvolvimento deste trabalho. Ainda mais por estar sempre presente e pela compreensão nos momentos de ausência dedicados à minha pós-graduação. As minhas filhas do coração Maria Eduarda e Ana Sophia pelos muitos questionamentos/reflexões feitos a mim em momentos aleatórios, me fazendo despertar muita alegria em saber que o conhecimento liberta.

Agradeço enormemente à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro e coorientadora Prof^ª. Dr^ª. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo por todos os ensinamentos, por todos os conhecimentos transmitidos e pela grande importância para minha formação acadêmica e profissional. Obrigado também pela confiança depositada a mim para realização desta pesquisa, bem como a enorme atenção, amizade e paciência ao longo deste período.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório (Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais - LABPIM) pelo auxílio, companheirismo e por tantos momentos inesquecíveis durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de cursar uma pós-graduação, a coordenação de Pós-Graduação em Química pelas informações e orientações, a todos os professores pela transmissão dos seus conhecimentos, a todos os funcionários terceirizados da universidade, que porventura tornaram os ambientes propícios tanto para alimentação, estudo, bem como para o trabalho laboral.

Ao financiamento dado ao presente trabalho, a qual foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente nesta minha nova jornada acadêmica. Meus sinceros agradecimentos e muito obrigado!!!

“Eu vou desdizer aquilo tudo que eu lhe disse
antes,

Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante,
Do que ter aquela velha opinião formada sobre
tudo...”

(Raul Seixas)

RESUMO

No cenário contemporâneo, cerca de 4 milhões de pessoas por ano são acometidas por úlcera péptica em todo o mundo, tratando-se de um grave problema de saúde pública. Nos últimos anos, extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* têm se tornado cada vez mais populares devido à sua longa história para tratamentos de doenças devido seus efeitos anticâncer, imunomoduladores, anti-inflamatórios, antitumorais, antiviral e propriedades antioxidantes. Dessa forma, este trabalho visa estudar extratos do cogumelo *A. brasiliensis*, quanto sua composição química e atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, visando avaliar sua atividade gastroprotetora. Realizou-se o preparo de três extratos do cogumelo, um hidroalcolólico (70%) (EEAb), os demais aquosos contendo (EAAb) ou não (EASP) os polissacarídeos do cogumelo. A estes realizou-se as identificações das principais classes de metabólitos secundários (qualitativamente, putativamente e estruturalmente), composição química, quantificação do composto majoritário, bem como dos teores de compostos fenólicos e pôr fim a avaliação da atividade antioxidante. Ademais, para o extrato mais promissor (mediante os resultados obtidos nas análises supracitadas) foi avaliado o seu efeito gastroprotetor e as possíveis *vias* de atuação. Os rendimentos obtidos para os extratos foram de 53,53% (EEAb), 54,08% (EAAb) e 51,50% (EASP), garantindo a estes a presença de diversas classes de metabólitos secundários, como os alcalóides, catequinas, cumarinas, esteroides livres, fenóis, flavonoides, resinas, saponinas e xantonas (de forma qualitativa). A quantificação de CHNS-O pela análise elementar se mostrou bastante similar para os extratos, apresentando leves variação nos teores de enxofre e oxigênio. Dentre os muitos compostos putativamente identificados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC-QTOF-MS^E) destacam-se a presença do manitol, ácido málico, ácido piroglutâmico, *L*-agaritina e *L*-valina. Pelos resultados dos espectros das análises feita por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), observou-se sinais intensos similares ao do manitol, confirmado posteriormente também pela análise do padrão de manitol na técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) para os extratos. A quantificação do manitol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nos extratos obteve teores de $40,81 \pm 0,74\%$, $31,25 \pm 1,25\%$ e $73,10 \pm 0,24\%$ para os EEAb, EAAb e EASP, respectivamente. Em relação aos teores de fenóis totais (mg EAG/g) e flavonoides (mg EQ/g) para os extratos foram obtidos $89,23 \pm 2,56$ e $14,33 \pm 0,07$ para o EEAb, $60,17 \pm 3,92$ e $9,37 \pm 0,18$ para o EAAb e $55,04 \pm 1,48$ e $8,11 \pm 0,18$ para o EASP, respectivamente. Estes resultados corroboraram com as boas atividades antioxidantes em termos de concentração eficiente (CE₅₀) para os extratos, sendo $117,04 \pm 0,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, $156,95 \pm 4,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $290,98 \pm 6,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os EEAb, EAAb e EASP, respectivamente. Para os

resultados de capacidade de quelação do íon ferroso ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foram obtidos $619,25 \pm 1,59$ para o EEAb, $675,14 \pm 1,82$ para o EAAb e $2206,45 \pm 14,07$ para o EASP, respectivamente. Mediante os resultados mais promissores, o EEAb foi escolhido para seguir com o estudo bioguiado para o teste de úlcera gástrica (nas doses de 5, 25 e 50 mg kg^{-1}), assim como avaliar as possíveis *vias* de atuação. O EEAb nas doses de 25 e 50 mg kg^{-1} apresentaram boa resposta gastroprotetora no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto. A dose de 25 mg kg^{-1} do EEAb foi escolhida para o estudo das *vias*, o que apresentou modulação/atuação nas *vias* do óxido nítrico (NO) e das prostaglandinas. Desta forma, conclui-se que o EEAb apresentou atividade gastroprotetora mediante a redução do estresse oxidativo, redução dos parâmetros histopatológicos e diminuição da mastocitose, devido seus metabólitos secundários atuarem nas *vias* do óxido nítrico (vasodilatação) e das prostaglandinas (produção de muco e bicarbonato).

Palavras-chave: *Agaricus blazei* Murill; metabólitos secundários; UPLC-QTOF-MS^E; úlcera gástrica.

ABSTRACT

In the contemporary scenario, about 4 million people a year are affected by peptic ulcer worldwide, which is a serious public health problem. In recent years, extracts from the mushroom *Agaricus brasiliensis* have become increasingly popular due to its long history for treating diseases due to its anticancer, immunomodulatory, anti-inflammatory, antitumor, antiviral and antioxidant properties. Thus, this work aims to study extracts from the mushroom *A. brasiliensis*, regarding their chemical composition and biological activities *in vitro* and *in vivo*, in order to evaluate their gastroprotective activity. Three extracts of the mushroom were prepared, one hydroalcoholic (70%) (EEAb), the other aqueous containing (EAAb) or not (EASP) the mushroom polysaccharides. These were carried out to identify the main classes of secondary metabolites (qualitatively, putatively and structurally), chemical composition, quantification of the major compound, as well as the levels of phenolic compounds, and put an end to the evaluation of antioxidant activity. Furthermore, for the most promising extract (through the results obtained for the aforementioned analyses) its gastroprotective effect and possible ways of action were evaluated. The yields obtained for the extracts were 53.53% (EEAb), 54.08% (EAAb) and 51.50% (EASP), guaranteeing them the presence of several classes of secondary metabolites, such as alkaloids, catechins, coumarins, free steroids, phenols, flavonoids, resins, saponins and xanthenes (qualitatively). The quantification of CHNS-O by elemental analysis proved to be very similar for the extracts, with slight variations in sulfur and oxygen contents. Among the many compounds putatively identified by Ultra Efficiency Liquid Chromatography (UPLC-QTOF-MS^E) stand out the presence of mannitol, malic acid, pyroglutamic acid, *L*-agaritin and *L*-valine. From the results of the spectra of the analyzes performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, intense signals similar to those of mannitol were observed, confirmed later also by the analysis of the mannitol pattern in the thin layer chromatography (TCD) technique for the extracts. The quantification of mannitol by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the extracts obtained levels of $40.81 \pm 0.74\%$, $31.25 \pm 1.25\%$ and $73.10 \pm 0.24\%$ for EEAb, EAAb and EASP, respectively. Regarding the contents of total phenols (mg EAG/g) and flavonoids (mg EQ/g) for the extracts, 89.23 ± 2.56 and 14.33 ± 0.07 for EEAb, 60.17 ± 3.92 and 9.37 ± 0.18 for the EAAb and 55.04 ± 1.48 and 8.11 ± 0.18 for the EASP, respectively. These results corroborate the good antioxidant activities in terms of efficient concentration (EC₅₀) for the extracts, being $117.04 \pm 0.76 \mu\text{g mL}^{-1}$, $156.95 \pm 4.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $290.98 \pm 6.77 \mu\text{g mL}^{-1}$ for EEAb, EAAb and EASP, respectively. For the ferrous ion chelation capacity ($\mu\text{g mL}^{-1}$) results, 619.25 ± 1.59 were

obtained for EEAb, 675.14 ± 1.82 for EAAb and 2206.45 ± 14.07 for EASP, respectively. Due to the most promising results, the EEAb was chosen to proceed with the bioguided study for the gastric ulcer test (at doses of 5, 25 and 50 mg kg^{-1}), as well as to evaluate the possible routes of action. EEAb at doses of 25 and 50 mg kg^{-1} showed a good gastroprotective response in the model of gastric ulcer induced by absolute ethanol. The dose of 25 mg kg^{-1} of EEAb was chosen for the study of the pathways, which showed modulation/action on the nitric oxide (NO) and prostaglandin pathways. Thus, it is concluded that EEAb presented gastroprotective activity by reducing oxidative stress, reducing histopathological parameters and decreasing mastocytosis, due to its secondary metabolites acting in the nitric oxide (vasodilation) and prostaglandins (mucus and bicarbonate production) pathways.

Keywords: *Agaricus blazei* Murill; secondary metabolites; UPLC-QTOF-MS^E; gastric ulcer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i>	20
Figura 2 - Representação da reação de fenóis redutores com o reagente de folin-ciocalteu e da reação de complexação da quercetina com o cloreto de alumínio.....	30
Figura 3 - Quelação do íon ferroso pela molécula de ferrozina.....	32
Figura 4 - Fluxograma da preparação dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	35
Figura 5 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	50
Figura 6 - Estrutura molecular do manitol.....	55
Figura 7 - Espectros de RMN dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	56
Figura 8 - Análise de confirmação de manitol em extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	58
Figura 9 - Quantificação de manitol nos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	59
Figura 10 - Representação da reação de inibição do radical livre do DPPH.....	64
Figura 11 - Representação das médias \pm E.P.M das percentagens das áreas gástricas ulceradas para os grupos.....	68
Figura 12 - Efeito do EEAb sobre a mucosa gástrica dos camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol.....	72
Figura 13 - Efeito do tratamento com EEAb na mastocitose da mucosa gástrica.....	74
Figura 14 - EEAb reduz o número de mastócitos na mucosa gástrica induzida por etanol.....	75
Figura 15 - Possíveis <i>vias</i> de atuação na gastroproteção do EEAb-25.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rendimento dos extratos do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i>	45
Tabela 2 -	Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	46
Tabela 3 -	Análise elementar para os extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	48
Tabela 4 -	Anotações dos metabólitos identificados putativamente para o EEAb.....	51
Tabela 5 -	Anotações dos metabólitos identificados putativamente para o EAAb.....	53
Tabela 6 -	Quantificação dos fenóis totais e flavonoides de extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	61
Tabela 7 -	Valores de CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	63
Tabela 8 -	Capacidade de quelação do íon ferroso de extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	67
Tabela 9 -	Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol, pré-tratados ou não com EEAb e NAC.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[M-H] ⁻	Fragmentação de ânions
CE ₅₀	Concentração eficiente de amostra para reduzir a concentração de DPPH [·] inicial em 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAAb	Extrato aquoso do <i>Agaricus brasiliensis</i> (Com os polissacarídeos)
EASP	Extrato aquoso do <i>Agaricus brasiliensis</i> (Sem os polissacarídeos)
EEAb	Extrato hidroalcoólico do <i>Agaricus brasiliensis</i> (70:30, v v ⁻¹)
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
KGy	Unidade no sistema internacional de unidades de dose absorvida
mg EAG/g	Miligramas equivalente ác. gálico por grama de extrato
mg EQ/g	Miligramas equivalente quercetina por grama de extrato
MS/MS	Espectrometria de massas
<i>m/z</i>	Relação massa carga
NAC	Fármaco N-acetilcisteína
ppm	Partes por milhão
QTOF	Sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo
rpm	Rotações por minuto
T _r (min)	Tempo de retenção em minutos
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
UPLC-QTOF-MS ^E	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Cogumelos.....	18
2.1.1	<i>Cogumelo Agaricus brasiliensis</i>	19
2.2	Metabólitos secundários.....	21
2.2.1	<i>Metabólitos secundários em fungos</i>	22
2.2.2	<i>Prospecção Fitoquímica e as principais classes dos metabólitos secundários</i>	23
2.3	Técnicas analíticas de identificação e quantificação de compostos químicos.....	27
2.4	Ensaio biológico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
2.4.1	<i>Quantificações de compostos fenólicos</i>	29
2.4.2	<i>Atividades Antioxidantes</i>	30
2.4.3	<i>Úlcera gástrica</i>	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.1	Obtenção dos extratos.....	35
4.2	Prospecção fitoquímica.....	36
4.3	Análise elementar CHNS-O.....	36
4.4	Análises e condições realizadas em UPLC-QTOF-MS ^E	36
4.4.1	<i>Condições do massas de alta resolução - XEVO-QTOF</i>	36
4.4.2	<i>Identificação estrutural dos compostos</i>	37
4.5	Caracterização dos extratos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	37

4.5.1	<i>RMN ¹H, RMN ¹³C e DEPT¹³⁵ dos extratos.....</i>	37
4.6	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
4.7	Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	38
4.7.1	<i>Preparação das amostras.....</i>	38
4.7.2	<i>Sistema cromatográfico.....</i>	38
4.8	Quantificação de compostos fenólicos.....	38
4.8.1	<i>Quantificação de fenóis totais.....</i>	38
4.8.2	<i>Quantificação de flavonoides totais.....</i>	39
4.9	Ensaio Antioxidantes.....	39
4.9.1	<i>Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....</i>	39
4.9.2	<i>Capacidade de quelação do íon ferroso.....</i>	40
4.10	Avaliação da atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzido por etanol.....	40
4.10.1	<i>Animais.....</i>	40
4.10.2	<i>Aspectos éticos da experimentação animal.....</i>	40
4.10.3	<i>Grupos experimentais.....</i>	41
4.10.4	<i>Avaliação da atividade gastroprotetora.....</i>	41
4.10.4.1	<i>Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....</i>	41
4.10.4.2	<i>Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos.....</i>	41
4.10.4.3	<i>Determinação da concentração de mastócitos.....</i>	42
4.10.5	<i>Vias de atuação do EEAb no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.....</i>	42
4.10.5.1	<i>Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EEAb.....</i>	42
4.10.5.2	<i>Papel do Guanilato Monofosfato Cíclico (GMPc) no efeito gastroprotetor do EEAb.....</i>	43
4.10.5.3	<i>Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor do EEAb.....</i>	43
4.10.5.4	<i>Envolvimento dos canais de K⁺_{ATP} no efeito gastroprotetor do EEAb.....</i>	43
4.11	Análise estatística.....	44

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Rendimento dos extratos do cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i>	45
5.2	Prospecção fitoquímica	46
5.3	Análise elementar CHNS-O	48
5.4	Caracterização por UPLC-QTOF-MS^E dos extratos	48
5.5	Caracterização dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	54
5.6	Cromatografia em camada delgada (CCD)	57
5.7	Quantificação do manitol em extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i> por CLAE	58
5.8	Quantificação dos fenóis totais e flavonoides totais	60
5.9	Atividades antioxidantes dos extratos de <i>Agaricus brasiliensis</i>	63
5.9.1	<i>Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH</i>	63
5.9.2	<i>Capacidade de quelação do íon ferroso</i>	66
5.10	Investigação do efeito gastroprotetor do EEAb no modelo experimental de úlcera gástrica	68
5.10.1	<i>EEAb reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas</i>	68
5.10.2	<i>EEAb reduz os escores dos parâmetros histopatológicos de lesão gástrica</i>	70
5.10.3	<i>EEAb reduz o número de mastócitos na submucosa de estômagos de camundongos</i>	73
5.10.4	<i>Efeito gastroprotetor do EEAb-25 e possíveis mecanismos de ação</i>	75
6	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O estômago é um dos principais órgãos componentes do sistema gastrointestinal, dividindo-se anatomicamente em quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e piloro (MAHADEVAN, 2017). Em condições fisiológicas, exerce a digestão química e enzimática do bolo alimentar, a partir da liberação de HCl e pepsina, respectivamente. Ademais, realiza funções hormonais, a partir da secreção do fator intrínseco, estando sua ausência relacionada com a anemia perniciosa (VAN DRIEL; TU; GLEESON, 2014). Dentre as principais patologias que acometem esse órgão, tem-se: gastrites, pólipos gástricos, hérnia de hiato, úlcera péptica e as neoplasias gástricas (KEMPENICH; SIRINEK, 2018; LANAS; CHAN, 2017).

No cenário contemporâneo, cerca de 4 milhões de pessoas por ano são acometidas por úlcera péptica em todo o mundo, tratando-se de um grave problema de saúde pública (CHAO *et al.*, 2019), além de ser o terceiro câncer que mais mata e o quinto diagnosticado (VENERITO *et al.*, 2019). De modo geral, as úlceras gástricas são lesões que se desenvolvem no estômago e duodeno proximal, sendo uma doença que afeta cerca de 10% dos adultos pelo menos uma vez na vida (KUNA *et al.*, 2019). O seu aparecimento está relacionado com infecções por *Helicobacter pylori*, tabagismo, etilismo, uso prolongado dos anti-inflamatórios não-esteroidais e aumento do estresse oxidativo (OPPONG *et al.*, 2015). Além disso, estudos apontam que há um estreito vínculo entre a úlcera péptica e o adenocarcinoma gástrico (PROCTOR; DEANS, 2014).

Contudo, com as recorrências em hospitais após os exaustivos tratamentos e os efeitos colaterais indesejáveis no decorrer do tratamento, vivenciado por pacientes, têm-se impulsionado a busca por medicamentos antiulcerosos que diminuam as incidências de recorrências destes nos hospitais, bem como ofereçam melhores proteção contra as úlceras gástricas (SHEN *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2018).

Devido a boa compatibilidade, baixa toxicidade e mínimos efeitos colaterais, tem-se estimulado estudos com produtos naturais buscando a descoberta de novos compostos com atividades diversas para a área farmacológica, inclusive compostos com atividade gastroprotetora (AHMAD, *et al.*, 2019a; SANTOS *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, os extratos e polissacarídeos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* têm se tornado cada vez mais populares devido à sua longa história com tratamentos para doenças, associados a seus efeitos anticâncer, imunomoduladores, anti-inflamatórios, antitumorais, antioxidantes e propriedades antivirais (LIMA; GRIS; KARNIKOWSKI, 2016; ZHAI; WANG; HAN, 2015). As atividades de redução do colesterol, úlceras gástricas e problemas

digestivos também são relatadas na literatura para espécie, sendo seus mecanismos de ação ainda desconhecidos. A intensa divulgação na web e nos meios de comunicação de massa para fins comerciais leva muitas pessoas a utilizá-lo para esses tipos de doenças sem nenhum conhecimento científico ainda elucidado para o cogumelo (FIRENZUOLI; GORI; LOMBARDO, 2008).

Além disso, extratos aquosos e alcalinos do cogumelo *A. brasiliensis* provindos da empresa AndoSan™, (ACE Co. Ltd., Gifu-ken, Japão) apresentaram muitos compostos com atividades farmacológicas de grande interesses, como os β -imunomoduladores, α -glucanos, proteoglicanos, lectinas, ergosterol (provitamina D2), agaritina, isoflavonóides, substâncias antioxidantes, substâncias antiinflamatórias e o esteróide 4-hidroxi-17-metilincisterol (4-HM) (THERKELSEN *et al.*, 2016a). Neste mesmo trabalho os extratos foram administrados em um modelo duplo-cego controlado por placebo (em cinquenta pacientes com colite ulcerativa sintomática por um período experimental de vinte e um dias) e conseguiram comprovar a melhora na qualidade de vida em pacientes, devido ao efeito imunomodulador dos metabólitos presentes nos extratos (THERKELSEN *et al.*, 2016a).

Além dos diversos usos do *A. brasiliensis*, Sui *et al.* (2010) também demonstraram que os polissacarídeos desta espécie têm eficácia no tratamento de feridas (oral, 100 mg kg⁻¹), obtendo uma regeneração de 63,2% em queimaduras de pele de ratos Sprague-Dawley. Assim, apesar da falta de relatos sobre o efeito gastroprotetor do cogumelo *A. brasiliensis*, o potencial terapêutico deste cogumelo não deve ser desconsiderado, pois já é amplamente utilizado na medicina tradicional e apresenta propriedades farmacológicas relacionadas a esse efeito. Diante do problema de saúde pública apresentado, seu uso de forma profilática, em terapia adjuvante contra algumas doenças, e o relato da comprovada propriedade cicatrizante do cogumelo, este trabalho tem como objetivo realizar estudos com extratos do cogumelo *A. brasiliensis* a fim de avaliar seu potencial efeito gastroprotetor *in vivo*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cogumelos

A micologia é a ciência que estuda os fungos, e inicialmente fora considerada um ramo da botânica. Os fungos eram denominados de plantas primitivas, mas, posteriormente, identificaram-se diferenças, tais como: a decomposição da matéria orgânica, a ausência de clorofila e do processo de fotossíntese, a presença de ergosterol e quitina (um polissacarídeo derivado da glucose ausente nas plantas) (FEENEY; MILLER; ROUPAS, 2014a). Na atualidade sabe-se que os cogumelos dependem de inúmeros fatores para se desenvolverem, sendo os principais deles as condições climáticas, a quantidade de matéria orgânica para se nutrirem bem como as demais espécies que abroham ao seu redor (COLLADO *et al.*, 2019).

Os estudos desses fatores, assim como as propriedades que determinadas espécies de cogumelos apresentam, vêm proporcionando nas últimas décadas a produção e comercialização em larga escala desses tipos de fungos (BANASIK *et al.*, 2019). Além disso, os cogumelos cultivados tornaram-se uma das culturas mais importantes na agricultura mundial, sendo a China o maior produtor de cogumelos comestíveis do mundo, atingindo um rendimento anual estimado de 38,42 milhões de toneladas em 2017. Isso representa cerca de 75% da produção global total (CHINA BUSINESS RESEARCH INSTITUTE, 2017).

A literatura ainda relata que existe a possibilidade da reutilização da matéria orgânica empregada para proliferação desse tipo de fungo para produção de biogás, reduzindo assim os agro-resíduos e aumentando a produção de alimentos (PÉREZ-CHÁVEZ; MAYER; ALBERTÓ, 2019). Dessa forma os cogumelos atraíram a atenção das indústrias alimentícias, biotecnológicas e principalmente como material de estudo para o desenvolvimento de novos medicamentos (RATHORE *et al.*, 2019).

Os cogumelos medicinais já possuem uma longa história estabelecida do uso etnofarmacológico em terapias orientais tradicionais, devido esse tipo de alimento já ser bastante incorporado nas suas culturas (HUANG *et al.*, 2019). Algumas análises clínicas modernas no Japão, China, Coreias e em outros países asiáticos, continuam a realizar estudos com preparações derivadas de cogumelos até os dias atuais. E isto se dá justamente pelos diversos efeitos medicinais que já foram demonstrados para muitos cogumelos tradicionalmente usados nestes países (WEN *et al.*, 2019).

Tradições orientais antigas enfatizaram a importância de várias espécies de cogumelos, nomeadamente, Ling Zhi (em chinês) ou Reishi (em japonês) [*Ganoderma lucidum*] e cogumelos Shiitake [*Lentinus edodes*], uma vez que a utilização dessas espécies de forma

profilática já é bem evidenciada nessa região. Outras espécies de cogumelos que desempenham um papel importante, sejam no tratamento de doenças que afetam as populações rurais dos países da Europa ou nos seus usos por parte da medicina moderna, são os cogumelos *Fomitopsis officinalis*, *Piptoporus betulinus* e *Fomes fomentarius* (GRIENKE *et al.*, 2014; PINYA *et al.*, 2019). Este estudo demonstrou que estas espécies de cogumelos tradicionais para essa região, apresentaram características etnomédicas, possuindo assim um eficaz potencial farmacológico.

Além disso, há relatos que estas espécies são usadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais, em várias formas de câncer, bronquite asmática, suores noturnos, dentre outras doenças. Há também uma longa história de uso tradicional de cogumelos como curativos na Mesoamérica (especialmente para espécies do gênero *Psilocybe*), África (populações Yoruba na Nigéria e Benin), Argélia e Egito. Um papel muito especial para o cogumelo trivialmente conhecido como agaric de mosca (*Amanita muscaria*), encontrado na Sibéria, é seu uso no xamanismo tibetano, no budismo e nos mitos celtas (CHANG; WASSER, 2012; RESHETNIKOV; WASSER; TAN, 2001; VAN GRIENSVEN, 2009; WASSON, 1968), tradições essas seguidas até os dias atuais. Para os cogumelos do gênero *Agaricus*, por exemplo, tem-se como primeiros relatos de uso pelos humanos a sua utilização para o tratamento de algumas doenças, como as úlceras, no período bizantino (RAMOUTSAKI *et al.*, 2002).

Pesquisas ao longo das últimas décadas têm revelado o papel de cogumelos como sendo excelentes componentes nutricionais em dietas por serem ótimas fontes de riboflavina, ácido ascórbico, ergosterol, selênio, ferro, cobre, potássio, fósforo, precursores da vitamina D, fibra dietética, quitina, β -glucanas (principais constituintes da parede celular fúngica) dentre outros, além de possuírem baixos teores de gorduras (FEENEY *et al.*, 2014b; KUMAR, 2015).

Dentre as áreas e muitas utilizações dos cogumelos, destacam-se as de biomateriais (KHALIL, 2016), nutracêuticos (RATHORE; PRASAD; SHARMA, 2017; REIS *et al.*, 2017), controle de pragas (CHELELA *et al.*, 2014), micorremediação (THAKUR, 2019a), alucinógenos (CAVANAGH; SMITH, 2018), rituais religiosos (BORHEGYI; BORHEGYI-FORREST, 2019), tratamento de feridas (JESUS *et al.*, 2018), dentre muitas outras.

2.1.1 Cogumelo *Agaricus brasiliensis*

Um dos cogumelos mais estudados no mundo devido seus inúmeros benefícios é o *A. brasiliensis* (conhecido como “Cogumelo do Sol[®]”) (FIGURA 1), a qual se trata de um basidiomiceto que pertence a ordem *Agaricales* e família *Agaricaceae*. É um cogumelo nativo do Brasil que nas últimas décadas tem sido produzido e comercializado não só nos mercados brasileiros, mas nos internacionais, especialmente. É um dos mais importantes

cogumelos comestíveis e medicinais do mundo (AKIYAMA *et al.*, 2011), devido suas diversas aplicabilidades. Além desse nome é também relatado na literatura como 'Cogumelo Piedade', além de ser amplamente relatado como *Agaricus blazei* Murill (ABM) (RUBEL *et al.*, 2018; SOKOVIC *et al.*, 2014).

Cepas deste cogumelo foram levadas para o Japão em 1965, sendo produzidas artificialmente no Iwade Mushroom Institute (MIZUNO *et al.*, 1990). Desde então, o ABM passou a ser amplamente consumido como alimento ou chá (KUROZAWA *et al.*, 2011), suplementos alimentares (MAHMOOD *et al.*, 2019), bem como aplicações nutracêuticas e cosmeceúticas (TAOFIQ *et al.*, 2019), sendo cultivado e amplamente apreciado em países como Japão, Coréia e China (KOZARSKI *et al.*, 2014).

Figura 1 - Cogumelo *Agaricus brasiliensis*



Fonte: FERREIRA, (2019).

Atualmente, em vários países orientais, do ponto de vista etnofarmacológico, é consumido como um cogumelo comestível, respeitável como alimento funcional e bastante usado para fins terapêuticos, especialmente na prevenção e tratamento de cânceres (SILVA *et al.*, 2017; STOJKOVIC *et al.*, 2014), tumores, hepatite crônica, diabetes, aterosclerose, hipercolesterolemia (WANG; FU; HAN, 2013a), além de ser empregado também para outros fins, devido seus compostos antioxidantes (SÁ-NAKANISHI *et al.*, 2014) e a sua rica composição fitoquímica.

Muitas atividades biológicas interessantes são relatadas na literatura para o *A. brasiliensis*, as quais relacionam à presença de glucanas de diferentes formas estruturais (α e β) isoladas a partir dos polissacarídeos dos corpos frutíferos do cogumelo (GONZAGA *et al.*,

2013). Muitos dos seus compostos biologicamente ativos têm demonstrado um grande potencial para uso em terapia contra cânceres (BERVEN *et al.*, 2015; WASSER *et al.*, 2002), devido os mesmos proporcionarem uma redução na atividade da protease associadas ao tumor em células RAW 264.7 (vírus da leucemia murina Abelson).

Das muitas atribuições dadas ao cogumelo, destacam-se seus polissacarídeos, os quais apresentaram uma resposta satisfatória na cicatrização de ferimentos gerados por queimaduras através da rápida epitelização e colagenização. A taxa de recuperação da pele ferida aumentou com o aumento da dosagem dos polissacarídeos, indicando assim que os polissacarídeos do cogumelo podem ser úteis na promoção da cicatrização de ferimentos (SUI *et al.*, 2010).

Além disso, muitos outros trabalhos utilizaram extratos de *A. brasiliensis* em testes *in vivo*, a fim de obter respostas contra muitas doenças degenerativas, como foi o caso do trabalho de Hetland *et al.* (2016), que obteve resposta contra o desenvolvimento de cancro intestinal, a qual atribuiu o seu bom potencial aos compostos antioxidantes e anti-inflamatórios presentes no mesmo.

A toxicidade de muitos cogumelos do gênero já foram relatadas na literatura, como é o caso das espécies, *Leucoagaricus*, *A. bernardii*, *A. xanthodermus*, *A. campestris*, *A. bisporus* (BOROVIČKA *et al.*, 2014; ZSIGMOND *et al.*, 2018), porém grande parte da toxicidade encontrada pode ter se dado devido ao caráter biorremediador dos cogumelos (STOKNES *et al.*, 2019), que proporciona um forte acúmulo de metais pesados, o qual os mesmos tendem a absorver quando em solo contaminados (Cd, Pb, dentre outros). Fato esse que amplia ainda mais os estudos realizados com o gênero em áreas diversas, como a de micorremediação, que utiliza cogumelos a fim de desintoxicação dos solos (BARRECH; ALI; TAREEN, 2018). Ademais, as várias atividades que são relatadas para a espécie do cogumelo na literatura se dão devido a sua rica composição química, bem como a presença de diferentes classes de metabólitos secundários.

2.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são moléculas estruturalmente heterogêneas de massa molecular baixa que, diferentemente dos metabólitos primários, não são diretamente necessárias para garantir o crescimento dos organismos que as produzem. Esses compostos são, em sua maioria, codificados e produzidos por *vias* do metabolismo secundário (PYE *et al.*, 2017) de plantas, animais, bactérias, fungos, e organismos marinhos (PANG *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em quatro classes principais: as substâncias fenólicas (flavonoides, lignina, ácidos orgânicos e taninos) (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2019), os terpenos (carotenoides, esteróides, triterpenos livres e óleos essenciais) (TETALI, 2019), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) (WINK, 2018) e os alcalóides (MASCI *et al.*, 2019).

Para as plantas, esses tipos de metabólitos desempenham um papel de proteção, principalmente contra fitopatógenos, pragas, insetos e herbívoros. Além disso, tais substâncias atuam como defensivos químicos e na interação das plantas com o meio ambiente que estão inseridas, não possuindo assim nenhuma relação desses compostos com a manutenção dos processos vitais fundamentais das mesmas (THAKUR *et al.*, 2019b).

Diante das diversas classes desses metabólitos secundários, estudos visam a descoberta de novos compostos ativos, com o intuito de ampliar o conhecimento acerca de determinadas substâncias para a realização de tratamentos alternativos para várias doenças (CHAKRABORTY, *et al.*, 2018; ZÁLEŠÁK; BON; POSPÍŠIL, 2019). Sabe-se que os compostos fenólicos dentre suas principais atividades biológicas se destacam por suas propriedades antioxidantes, devido estarem susceptíveis a inibição dos radicais livres provindos do estresse oxidativo bem como pela peroxidação lipídica (AHANGARPOUR; SAYAHI; SAYAHI, 2019).

2.2.1 Metabólitos secundários em fungos

Os metabólitos secundários fúngicos têm se mostrado uma alternativa nos últimos anos, podendo estes serem divididos em quatro classes químicas principais: policetídeos, terpenóides, compostos derivados do ácido xiquímico e peptídeos não ribossômicos. Além disso, metabólitos híbridos compostos de metades de diferentes classes são comuns, como nos meroterpenos, que são fusões entre terpenos e policetídeos. A análise dos genomas fúngicos disponíveis revelou que os ascomicetes têm mais genes do metabolismo secundário do que os basidiomicetes, arqueo-ascomicetes e quitridiomycetes, enquanto os hemi-ascomicetes e zigomicetes não possuem nenhum (BLUNT *et al.*, 2018; NIELSEN; LARSEN, 2015).

As substâncias dos metabólitos secundários, por apresentarem propriedades farmacológicas de grande importância, são muito comercializadas nos setores alimentícios, agrônomo, de perfumaria e principalmente farmacêutico. Vale ressaltar que devido à grande importância, estes têm despertado o interesse da comunidade científica, pois constituem promissoras fontes de moléculas potencialmente úteis ao homem em diversas aplicações distintas (ALAMGIR, 2017). Dentre as principais classes de metabólitos secundários que

apresentam bioatividade, a qual já se tem relatos na literatura, seja pela identificação ou quantificação do metabólito em extratos de cogumelos destacam-se os polifenóis (flavonoides, taninos, etc) (GARRAB *et al.*, 2019; OGBOMIDA *et al.*, 2018), alcalóides (BOYCE *et al.*, 2019; HOEFGEN *et al.*, 2018), terpenos (DUAN *et al.*, 2018; YAO *et al.*, 2018) e saponinas (KHAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

2.2.2 Prospecção fitoquímica e as principais classes dos metabólitos secundários

Os testes fitoquímicos são de fundamental importância para identificar as classes de metabólitos e na descoberta de novos constituintes químicos de espécies de plantas ou fungos que poderão ter uso terapêutico. Eles podem ser realizados para identificar as mais diferentes classes de compostos orgânicos, podendo ser diversificados para diferentes tipos de extratos (SILVA; BIZERRA; FERNANDES, 2018a).

Dentre as técnicas mais usadas para obtenção ou fracionamento de metabólitos secundários em extratos, destaca-se a partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, como métodos de extrações líquido/líquido, resultando assim nas suas separações (TOMSIK *et al.*, 2016). Os metabólitos secundários presentes em cada extrato, após essa partição por solventes, tendem extrair substâncias mais apolares como lipídios, ceras, furanos, cumarinas, entre outras, quando utiliza-se solventes de baixa polaridade, já solventes mais polares tendem extrair substâncias como taninos, alcalóides, proteínas e fenólicos (GOLDSMITH *et al.*, 2014).

Em sistemas biológicos vivos, onde os danos oxidativos produzidos por espécies de oxigênio reativas são uma das principais causas de várias doenças degenerativas (SANDERS; GREENAMYRE, 2013; WANG *et al.*, 2013b), tem-se intensificado estudos com a finalidade do combate ou mesmo o retardamento das mesmas, através de tratamentos com classes específicas de metabólitos secundários.

Os compostos fenólicos, em particular, são considerados como uma das mais importantes classes de antioxidantes naturais, os quais combatem esses danos gerados pelo estresse oxidativo. Suas moléculas são geralmente formadas por um ou mais anéis aromáticos e grupos hidroxila. Quimicamente, os polifenóis podem ser divididos em várias classes, tais como os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonois, flavonoides, antocianinas), isoflavonoides (isoflavonas, coumestanos), os estilbenos, os lignanos, e fenólicos de polímeros (proantocianidinas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis) (ROSA *et al.*, 2019; VUOLO, LIMA, MARÓSTICA-JUNIOR, 2019).

Estes por possuírem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila (flavonoides, taninos, etc), geralmente, apresentam boas respostas como antioxidantes, pois atuam no combate dos radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio dos grupos hidroxilas (OH^-), quelando íons metálicos (como Fe^{2+} e Cu^+), interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio e reparando lesões das moléculas atacadas pelos radicais livres (GAWEL-BEBEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2018; LUNA-GUEVARA *et al.*, 2018; MANEESH, CHAKRABORTY, MAKKAR, 2017; METSÄMUURONEN, SIRÉN, 2019).

Ademais, os polifenóis são de grande interesse devido às suas atividades antioxidante (OLSZOWY, 2019), efeitos anti-inflamatórios, bem como anticancerígenos em humanos (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2019). Dentre estes, destacam-se os flavonoides, uma das principais classes de metabólitos secundários que apresentam diversos benefícios e atividades para a promoção da saúde (TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018). Numerosos estudos mostraram que os flavonoides têm muitos efeitos biológicos, tais como propriedades antidiarreicas, anti-inflamatórias, antialérgicas (CHEN *et al.*, 2014), antivirais, antiplaquetárias (LAGO *et al.*, 2014) e antitumorais (DU *et al.*, 2016).

Além disso, há mais de 15 anos, os flavonoides se tornaram amplamente estudados por causa de seus nutracêuticos e benefícios para a saúde (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018). As catequinas são uma das subclasses mais importantes da classe dos flavonoides, geralmente são reconhecidas como bons antioxidantes e fortes inibidoras de radicais livres (MAHMOUD *et al.*, 2013). A (+)-catequina demonstrou aumentar a secreção de insulina das células beta pancreáticas, demonstrando benefícios para a saúde daqueles que sofrem de diabetes tipo 2 (KANG *et al.*, 2019).

As leucoantocianidinas são flavan-3,4-dióis incolores relacionadas as antocianinas e proantocianidinas, que também são conhecidas como taninos condensados na via de biossíntese de flavonóides em plantas. A via biossintética que leva às antocianinas e proantocianidinas se ramifica nos níveis das leucoantocianidinas, intermediário comum dessas duas *vias* (RAUF *et al.*, 2019). Inúmeros estudos estão sendo conduzidos para elucidar seus potenciais efeitos promotores de saúde, desde atividade antioxidante, efeitos antiinflamatórios (VELDE *et al.*, 2016), propriedades antidiabéticas e atividade antimicrobiana (AZEVEDO *et al.*, 2014).

Os taninos são uma das classes dos compostos fenólicos, a qual pode ser dividido basicamente em três grupos, os taninos hidrolisáveis (subdivididos em galotaninos e elagitaninos), taninos condensados e os taninos complexos (ÇAKAR *et al.*, 2016; SMERIGLIO *et al.*, 2017). Os galotaninos formam ácido gálico e açúcares na hidrólise, e os elagitaninos na

hidrólise não produzem apenas açúcar e ácido gálico, mas também o ácido elágico (CRESTINI; LANGE, 2015; LAMY *et al.*, 2016). Os taninos complexos são originados principalmente por interações hidrofóbicas com uma ampla variedade de compostos (GIRARD *et al.*, 2018), incluindo os polissacarídeos, proteínas, minerais (AHNERT *et al.*, 2015), alcalóides e saponinas (MACADAM; VILLALBA, 2015).

Os taninos exercem seus efeitos biológicos não apenas como uma estrutura complexa inabsorvível (altos pesos moleculares), com efeitos locais no trato gastrointestinal, mas também como taninos absorvíveis (dímeros e trímeros), com seus metabólitos produzindo efeitos sistêmicos (JIMÉNEZ *et al.*, 2014a; NUÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; OU; GU, 2014; SIENIAWSKA, 2015; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Além de sua bem documentada atividade de remoção de radicais livres e antioxidantes, os taninos parecem capazes de exercer efeitos antibacterianos, antivirais, anticarcinogênicos, antiinflamatórios, antialérgicos e vasodilatadores (BLUMBERG *et al.*, 2013; HOLT *et al.*, 2012; NILE; PARK, 2014; SALVADÓ *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

Os terpenos e terpenóides (os derivados oxigenados dos terpenos) são os compostos químicos que representam a maioria das moléculas na composição dos óleos essenciais. Esta classe de compostos são caracterizadas pela combinação de unidades de isopreno em suas estruturas (C_5H_8) (BILIA *et al.*, 2014; SAPRA; JAIN; TIWARY, 2008). Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em sua estrutura (por exemplo, hemiterpenos são formados por uma unidade de isopreno, monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno, sesquiterpenos por três unidades de isopreno e diterpeno formado por quatro unidades) (AHMED *et al.*, 2017; SCHWAB; FISCHER; WÜST, 2015).

Os óleos essenciais são relatados na literatura como sendo misturas complexas de vários metabólitos secundários voláteis, destacando-se entre estes os componentes alifáticos, componentes aromáticos, derivados de fenol e terpenóides. Dentre as principais áreas de estudo e aplicações destes metabólitos tem-se as indústrias agrícola, cosmética, sanitária e farmacêutica (BILIA *et al.*, 2014; GUIMARÃES; SOUSA; FERREIRA, 2010). Ademais, suas principais atividades relatadas na literatura são diversas, podendo destacar suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana (YI *et al.*, 2019), imunomoduladora (LANG *et al.*, 2019), anestésica (BATISTA *et al.*, 2018) e repelente (AZEEM *et al.*, 2019).

As saponinas são outra grande classe de metabólitos secundários integrando uma diversidade de constituintes que divergem bastante estruturalmente, além de serem amplamente difundidos. Os metabólitos que compõem esta classe podem ser classificados por conterem um

esqueleto derivado de 30 átomos de carbonos (2,3-oxidoesqualeno) (GHOSH, 2016). Apesar de apresentarem complexidade estrutural e alta diversidade, as saponinas podem ser divididas em dois subgrupos, de acordo com seus núcleos não polares, conhecidas por saponinas triterpênicas ou esteróidais (MOREAU *et al.*, 2018). A este núcleo não polarizado, geralmente estão ligados um ou mais grupos de moléculas de açúcares (resíduos), conferindo assim uma das principais características para estes compostos (caráter anfifílico), tornando possível a formação de espuma em soluções aquosas (SALEEM *et al.*, 2019).

As saponinas esteroidais consistem de uma aglicona esteroidal, um esqueleto de espirostanos (27 carbonos), geralmente compreendendo uma estrutura de seis anéis. Em alguns casos, o grupo hidroxila na posição 26 é acoplado em uma ligação glicosídica, e assim a estrutura de aglicona permanece pentacíclica (esqueleto de furostano). As saponinas triterpenoides consistem de uma glicona triterpenóide, que consiste em um esqueleto de 30 carbonos, compreendendo uma estrutura pentacíclica (MAI *et al.*, 2017; SIDANA; SINGH; SHARMA, 2016).

Outras características para esta classe de metabólitos se dar devido suas variações de caráter (neutro, básico e ácido), bem como pela alteração dos ligantes centrais da aglicona conjugada (SINGH *et al.*, 2017). Elas foram documentadas como possuidoras de propriedades antifúngica, antibacteriana e repelente, além de contribuírem para o desenvolvimento e defesa das plantas contra patógenos (MOSES; PAPADOPOULOU; OSBOURN, 2014). Outras atividades relatadas na literatura, sugerem efeitos neuroprotetores significativos na atenuação de distúrbios do sistema nervoso central, tais como acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington (SUN *et al.*, 2015).

Os alcalóides compreendem uma outra grande classe de metabólitos secundários. Os alcalóides constituem um grupo muito grande de compostos contendo nitrogênio farmacologicamente ativos. De fato, mais de 12.000 alcalóides foram descritos na literatura, sendo definidos como compostos básicos sintetizados por plantas ou fungos que contenha um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclico na sua estrutura. Geralmente, são derivados de aminoácidos, e alguns deles de bases terpênicas ou purinas e pirimidinas (pseudo-alcalóides). Dentre os compostos que fazem parte dos alcalóides que são mais conhecidos na atualidade são a cafeína, nicotina e cocaína (CHOWAŃSKI *et al.*, 2016; MARIENHAGEN; BOTT, 2013).

Esta classe desempenha um importante papel na defesa contra vários microrganismos, demonstrando assim não só uma eficácia, mas também uma variedade de atividades farmacológicas (JOOSTEN; VAN-VEEN, 2011). Alguns trabalhos na literatura relatam que os alcalóides possuem atividade citotóxica, antiviral e uma ampla gama de outros efeitos

fisiológicos, como ações inibitórias, antiinflamatórias, antibacterianas e acetilcolinesterase (DING *et al.*, 2017; WANSI *et al.*, 2013). Devido as diversas classes de metabólitos secundários relatados na literatura torna-se necessários estudos que empregam técnicas analítica de identificação visando diferencia-los de forma mais eficazes.

2.3 Técnicas analíticas de identificação e quantificação de compostos químicos

A identificação e a quantificação de metabólitos (separação, detecção, caracterização e quantificação) de um modo geral (aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas, etc) vem a cada ano sendo refinada, devido ao melhoramento de equipamentos (técnicas), bem como por uma variedade de plataformas analíticas que ajudam a uma melhor interpretação dos dados obtidos. Ainda mais, o uso combinado de várias técnicas analíticas aumentou ainda mais a probabilidade de uma identificação e caracterização mais correta, fator esse bastante utilizado em estudos metabolômicos (ZHANG *et al.*, 2012a).

Uma das análises de identificação qualitativa bastante empregada nos estudos observados na literatura é a prospecção fitoquímica, que visa a identificação das diversas classes de metabólitos secundários obtidos em extratos vegetais, óleo essencial, dentre outros. Além dessa, corroborando com uma análise prévia tem-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), que consiste na separação dos constituintes por eluição de uma fase estacionária por uma fase móvel (solvente), princípios esses que também são utilizados nas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), Cromatografia Gasosa (CG), dentre outras (FANG *et al.*, 2016; MARSTON, 2011).

Como forma de diminuir as diferenças nos resultados obtidos para um dado metabólito através das eluições com diferentes solventes (ou proporção) e fases estacionárias convencionou-se um parâmetro comparativo (visando torna-los constantes), sendo este o “fator de retenção” (R_f , forma abreviada), tornando assim uma identificação por CCD mais precisa. Sua definição se dar pela razão das distâncias percorrida do metabólito (d_m) em questão pela do eluente (d_e) ($R_f = d_m/d_e$) (ARAL *et al.*, 2017; EL’TEKOV; EL’TEKOVA; EL’TEKOV, 2014).

Outras técnicas de identificação que são empregadas para uma caracterização mais precisa são as análises quantitativas, sendo estas tidas como mais robustas. A análise elementar se mostra como uma técnica bastante importante acerca dos percentuais de determinado elemento químico nas amostras estudadas, sendo os principais os elementos analisados o carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio (CHNS/O) (AHMAD *et al.*, 2019b). Se trata de uma técnica um pouco limitada a cerca de uma caracterização estrutural e de pureza, por exemplo.

Esta técnica é bastante empregada em complemento de detectores específicos, o que garante a quantificação composicional em diversos materiais de estudos, desde uma molécula simples à misturas de constituintes em matrizes complexas, como os extratos vegetais. Diante disso, torna-se uma análise que pode ser empregada na investigação da composição de diferentes amostras que passaram por extração ou que foram isoladas (BRAUN; PANTANO, 2014; CARRIE; SANEI; STERN, 2012).

Tratando-se da quantificação dos metabólitos propriamente dito destacam-se as técnicas cromatográficas quantitativas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), à qual apresentam as seguintes terminologias em inglês, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) e Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC), respectivamente. Estas técnicas são amplamente empregadas nesse quesito devido serem capazes de realizar a separação, identificação e quantificação de diversos metabólitos secundários em uma única análise (SAHU *et al.*, 2018).

O acoplamento de algumas outras técnicas a esses equipamentos proporciona uma caracterização química mais robusta, uma vez que permite traçar um perfil metabólico das amostras com mais informações. Dentre estes, destacam-se os detectores de ultravioleta (ZIVOVINOVIC *et al.*, 2018), fluorescência (HUERTAS-PÉREZ *et al.*, 2018), eletroquímica (LOMAE *et al.*, 2019), espectrometria de massas (CHENG *et al.*, 2017), dentre outras. Entre os métodos analíticos em crescimento, o UPLC acoplado ao QTOF-MS/MS tornou-se uma ferramenta muito poderosa tanto na identificação do perfil de metabólitos como para os componentes ditos complicados da fitoterapia (ARMAH *et al.*, 2018). As áreas de aplicação para essas técnicas são bastante diversas, sendo bastante empregadas nas indústrias de produtos alimentícios, farmacêutica, cosmética e têxteis (ROVINA; SIDDIQUEE; SHAARANI, 2017).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) consiste em um método inerentemente e ideal para a obtenção de dados quantitativos, devido a sensibilidade em detectar sinais específicos de compostos com alta concentração e, desse modo, evitando complicações adversas no tratamento dos dados (SOININEN *et al.*, 2015). A espectroscopia de RMN convencional baseia-se na detecção da fraca magnetização de um conjunto termicamente polarizado de spins nucleares e, portanto, requer tipicamente campos magnéticos elevados e quantidades de amostras macroscópicas (LOVCHINSKY *et al.*, 2016; TAYLER *et al.*, 2017).

O caráter não destrutivo, e a alta precisão e reprodutibilidade das análises de RMN, que muitas das vezes são realizadas sem o uso de etapas de separação e purificação, fornecem um enorme potencial para analisar sistemas multicomponentes. Além disso, a espectroscopia

de RMN é uma técnica quantitativa onde, sob certas condições, a área do sinal de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos que produzem o sinal, podendo vários núcleos serem usados para análise da natureza dos compostos presentes (BHARTI; ROY, 2012; GIRAUDEAU, 2014; OHTSUKI *et al.*, 2016; OTTE *et al.*, 2014).

2.4 Ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*

2.4.1 Quantificações de compostos fenólicos

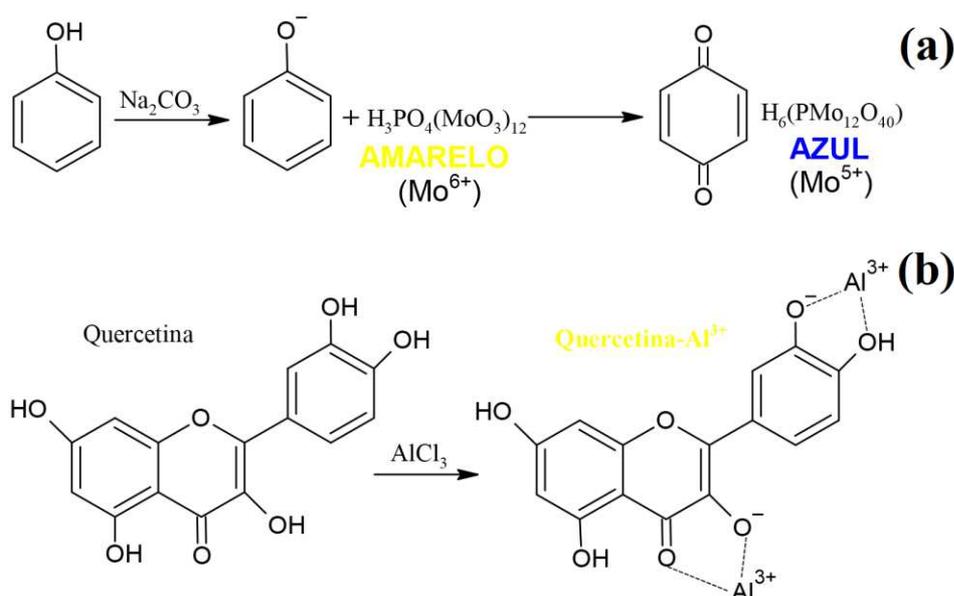
Os ensaios descritos na literatura para a quantificação de algumas classes de metabólitos secundários são diversos, porém os métodos que utilizam a espectrofotometria são bastante encontrados e relatados como sendo importantes, devido suas facilidades em execução, baixo custo e de baixo gasto de material, favorecendo assim a determinação de baixas quantidades de analito. Devido isso, são bastante empregados em pesquisas e análises nas áreas farmacêutica, alimentícia, dentre outras (PASSOS, SARAIVA, 2019).

Os métodos colorimétricos que utilizam a espectrofotometria tornam-se muitas vezes os mais utilizados a primeiro modo, uma vez que ocorrem de forma mais facilmente identificável, podendo ser quantificados com procedimentos não tão complexos. Dentre esses métodos, o de quantificação de fenóis totais pelo reagente folin-ciocalteu é bastante empregado (VÁZQUEZ *et al.*, 2015).

A reação química que ocorre para que essa quantificação seja possível se dá entre os compostos fenólicos (ânion fenilato) redutores com os óxidos de molibdênio (Mo_8O_{23}) e óxido de tungstênio (W_8O_{23}) (coloração azul) que são gerados após a incubação para os diferentes métodos que utilizam o reagente folin-ciocalteu (mistura de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$)). Esses óxidos gerados possuem absorvância de lambda máximo em torno de 760 nm (em meio alcalino), o que possibilita a quantificação dos compostos fenólicos redutores por espectrofotometria (FIGURA 2a) (GAO *et al.*, 2019; GUPTA, 2015).

Sabe-se que os flavonoides reagem com vários íons metálicos ocasionando a formação de complexos metálicos através de processos redox. Para formação desses complexos metálicos de flavonoides em solução, dependerá da quantidade de grupos doadores de elétrons disponíveis, normalmente atribuída aos grupos carbonilas e hidroxilas (FIGURA 2b). Essa coordenação de íons metálicos às moléculas de flavonoides afetam as suas propriedades, como por exemplo, cor, fluorescência, estabilidade, e estado de oxidação (KASPRZAK; ERXLEBEN; OCHOCKI, 2015; OLSZOWY, 2019).

Figura 2 - Representação da reação de fenóis redutores com o reagente de folin-ciocalteu e da reação de complexação da quercetina com o cloreto de alumínio



Fonte: adaptada de Radulescu *et al.*, (2019).

Devido a estes fenômenos, a formação de tais complexos tem sido amplamente utilizada em química analítica (espectrofotométrica e métodos espectrofluorimétricos), fotoquímica e tingimento têxtil (KASPRZAK; ERXLEBEN; OCHOCKI, 2015; OLSZOWY, 2019).

2.4.2 Atividades Antioxidantes

As atividades antioxidantes dos metabólitos secundários bem caracterizado torna-se de suma importância para uma maior compreensão da rota de atuação de um composto isolado ou em uma formulação farmacêutica. Com isso, tem-se uma série de estudos de diversas classes de metabólitos com uma gama de métodos antioxidantes diferentes (LEWOYEHU; AMARE; YILDIZ, 2019). Estes métodos consistem na inibição direta dos radicais livres em compostos orgânicos sintéticos (ABTS, DPPH), pela quantificação de espécime geradas pela peroxidação lipídica [ácido tiobarbitúrico, LDL, β -caroteno], pela quelação/redução de íons metálicos (FRAP, CUPRAC), dentre outros.

Para o método que se utiliza do DPPH, sabe-se que ele é um radical livre estável que apresenta uma cor púrpura escura e uma banda de absorção forte no intervalo de 515 à 525 nm. Dentre muitas outras técnicas geralmente torna-se o primeiro método para avaliar o potencial antioxidante de uma amostra, seja ela pura ou de matriz complexa, como os extratos. Na presença de compostos antioxidantes, o DPPH radicalar pode aceitar um elétron ou um átomo

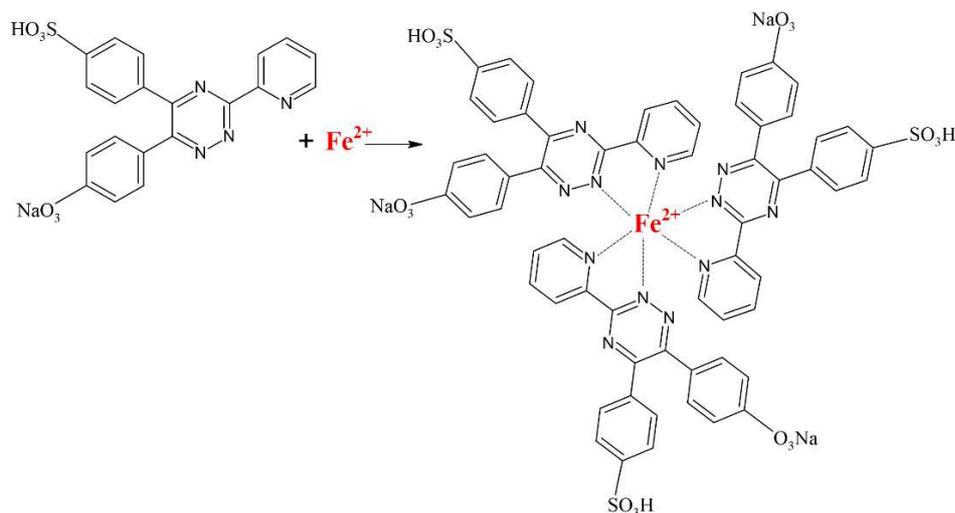
de hidrogênio para ser convertido em uma molécula de DPPH mais estável. Como a forma reduzida de DPPH é de cor amarela, torna-se possível a determinação de sua atividade antioxidante por meio da técnica de espectrofotometria (JIMÉNEZ *et al.*, 2014b; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Quanto maior for a capacidade inibitória de radicais livres de um composto antioxidante, menor será a concentração de DPPH da cor púrpura na amostra. Os resultados são normalmente expressos como concentração eficiente (CE_{50}), a qual é definida como a quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração de DPPH inicial em 50%. O parâmetro de CE_{50} foi introduzido por Brand-Williams, Cuvelier e Berset, (1995), Molyneux (2004), Kedare e Singh (2011) (também chamado de IC_{50}), e é muito útil para a comparação de resultados.

Seguindo a mesma linha, a avaliação de propriedades fitoterápicas, como quelantes e antioxidantes, é considerada muito importante e útil, especialmente por sua abundante utilização na medicina popular. Devido conseguirem expressar grandes fontes de substâncias biologicamente ativas, são objeto de numerosos estudos, *in vivo* e *in vitro* (SELLAL *et al.* 2016). A capacidade quelante de metais pode estar envolvida na atividade antioxidante ou afeta outras funções que contribuem para a atividade antioxidante.

Os íons ferrosos (Fe^{2+}) são os pró-oxidantes mais favoráveis no sistema alimentar, o Fe^{2+} pode estimular a peroxidação lipídica e acelerar a oxidação dos compostos lipídicos através da reação de Fenton. Portanto, o efeito de substratos em íons ferrosos pode afetar as outras atividades dos radicais livres para proteger organismos contra os estresses oxidativos (BENEDET; SHIBAMOTO, 2008; JIANG *et al.*, 2015). A Figura 3 representa a quelação do íon ferroso pela molécula de ferrozina.

Figura 3 - Quelação do íon ferroso pela molécula de ferrozina



Fonte: Adaptado de MORESCO *et al.*, (2011).

Neste aspecto, a capacidade de quelar metais de transição é considerada um mecanismo secundário para estimar a atividade antioxidante de um extrato/composto, e estudos recentes demonstraram repetidamente que alguns metais de transição, e especialmente Fe^{2+} e Cu^{2+} , estão envolvidos no deslocamento de algumas doenças degenerativas, como Alzheimer, Parkinson e Wilson, bem como doenças cardiovasculares e no estresse oxidativo (BANDMANN; WEISS; KALER, 2015; DUSEK *et al.*, 2015; INOUE *et al.*, 2018; LOEF; WALACH, 2012).

2.4.3 Úlcera gástrica

A utilização de modelos de úlcera péptica induzida por etanol tem sido uma ferramenta eficaz na pesquisa de novas moléculas ou metabólitos com atividade gastroprotetora (SONG *et al.*, 2018). Estudos apontam que os mecanismos patogênicos da lesão gástrica que são originadas pelo etanol estão relacionados com três vias principais: aumento do estresse oxidativo, indução da apoptose e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (LIANG *et al.*, 2018). A liberação de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e íons peroxinitrito, desencadeiam lesões irreversíveis nas estruturas celulares, incluindo o DNA (LINGAPPAN, 2018). Além disso, sua concentração encontra-se aumentada nas doenças inflamatórias, incluindo a úlcera gástrica, representando uma importante *via* na manutenção do processo ulcerogênico (SALES *et al.*, 2018).

De modo paralelo, verifica-se o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF), que desencadeiam uma

resposta inflamatória, com aumento da produção de proteínas de fase aguda, alterações da permeabilidade vascular, quimiotaxia de leucócitos, lesão tecidual e perda de função (HABIBZADEH *et al.*, 2018; TOURANI *et al.*, 2018).

O estômago pode sofrer bastante influência de substâncias que são ingeridas/consumidas ao longo dos anos, ocasionando assim uma série de desregulação no organismo. Dentre os principais agentes agressores da mucosa gástrica destacam-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e o etanol (ZHENG *et al.*, 2016). Desta forma, alguns mecanismos de defesa pelo organismo são originados de forma dinâmica, estimulando assim por exemplo um aumento da secreção de muco e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo, resposta do sistema imunológico, dentre outras, retardando assim os processos inflamatórios (GALURA *et al.*, 2019).

A estratégia básica subjacente à imunomodulação é identificar aspectos da resposta do hospedeiro que podem ser aumentados ou suprimidos de forma a aumentar ou complementar uma resposta imune desejada. Se certos compostos aumentam ou suprimem as respostas imunes irá depender de vários fatores, incluindo dose, via de administração, momento de administração do composto, mecanismo de ação e local da atividade. O conhecimento dos componentes específicos das redes de citocinas e das vias de sinalização e seu papel na regulação das respostas imunes é importante no planejamento de estratégias para aumentar essas respostas. (WASSER; WEIS, 1999; ZAIDMAN *et al.*, 2005).

Contudo, torna-se importante salientar o grande papel desempenhado pelos modelos que utilizam animais, visando a busca/descoberta de novas drogas que venham apresentar atividade gastroprotetora. Ademais, considerando que a etiologia das úlceras é multifatorial, as lesões na mucosa gastrintestinal podem ser induzidas por diferentes modelos experimentais, bem como utilizar diversos mecanismos de atuações para atenuar as lesões geradas pelos agentes agressores (JOHNSON; MEERVELD, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* quanto sua composição química e atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o preparo de extratos a partir do cogumelo *Agaricus brasiliensis*;
- Identificar os metabólitos secundários dos extratos produzidos qualitativamente;
- Realizar uma caracterização química dos extratos produzidos, bem como a quantificação do composto majoritário;
- Determinar os teores dos compostos fenólicos, bem como as atividades antioxidantes dos extratos produzidos;
- Avaliar a atividade gastroprotetora, bem como a modulação de algumas *vias* de atuação com o extrato mais promissor.

4.2 Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram realizados seguindo a metodologia proposta por Matos (2009), para as identificações das principais classes metabólitos secundários nas amostras (EEAb, EAAb e EASP).

4.3 Análise elementar CHNS-O

Os teores de carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram determinados para as amostras (EEAb, EAAb e EASP) por microanálise elementar utilizando o equipamento 2400 Series II CHNS/O Analyser da Perkin Elmer. Os dados foram obtidos em triplicata para os extratos.

4.4 Análises e condições realizadas em UPLC-QTOF-MS^E

As análises foram realizadas em sistema cromatográfico *Acquity* UPLC (*Waters*), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF, *Waters*) localizado no laboratório de produtos naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna cromatográfica *Waters Acquity* UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 μm), temperatura fixa de 40 °C, fase móvel: água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (21 min), fluxo de 0,4 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5 μl .

4.4.1 Condições do massas de alta resolução - XEVO-QTOF

O modo negativo (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⁻¹, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo positivo (ESI⁺) foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500 L h⁻¹ e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi MS^E. O arquivo gerado foi controlado pelo *software Masslynx 4.1* (*Waters Corporation*). As amostras (EEAb, EAAb e EASP) foram injetadas em triplicatas nos modos de ionização positivo e negativo, obtendo assim um conjunto de cromatogramas e espectros de massas para cada extrato.

4.4.2 Identificação estrutural dos compostos

Para a identificação estrutural, foram consideradas as fórmulas moleculares e os valores de m/z obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade. A partir de cada fórmula o *software* determina o erro relativo em ppm para cada possível componente. Somente fórmulas moleculares com valores inferiores a 10 ppm de erro foram consideradas para estudos posteriores em MS/MS. As propostas estruturais das moléculas foram realizadas através dos dados de MS/MS, por meio do estabelecimento de padrões de fragmentação racionais (BOUSLIMANI *et al.*, 2014; YULIANA *et al.*, 2013).

4.5 Caracterização dos extratos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

4.5.1 RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 135 dos extratos

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C e DEPT 135) foram obtidos a partir de um equipamento Bruker Avance-DRX 500 (USA, Califórnia), com transformada de Fourier, localizado no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN). O equipamento possuía uma sonda de detecção inversa, operando em 499.9 MHz e 125 MHz, numa janela espectral de 20 ppm e 200 ppm para as análises de RMN de próton (^1H) e carbono (RMN ^{13}C e DEPT 135), respectivamente. O experimento foi realizado a partir da dissolução de 20 mg das amostras (EEAb, EAAb e EASP) em 0,6 mL de água deuterada. Sendo a análise realizada em tubos de 5 mm, sendo os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

4.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para análise de CCD das amostras (EEAb, EAAb e EASP) utilizou-se placas de gel de sílica (Macherey-Nagel/DC-Fertigfolien ALUGRAM^R Xtra SIL G/UV₂₅₄), fase móvel de acetonitrila:acetato de etila:propanol:água (85:20:20:15, v v⁻¹) e como solução reveladora uma solução de 0,5% KMnO₄ em NaOH (1 mol L⁻¹) (DULERMO *et al.*, 2010). Concentrações de 1 mg mL⁻¹ do padrão manitol e de cada extrato foram solubilizados em metanol:água (9:1 v v⁻¹), sendo retiradas aliquotas de 5 μL para adição na cromatoplaça. A formação da cor amarelada na cromatoplaça após as eluições demonstram/indicam a presença do açúcar (manitol) nas amostras, podendo-se realizar uma comparação dos valores de fator de retenção (Rf) do padrão com os dos extratos analisados.

4.7 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.7.1 Preparação das amostras

As análises quantitativas do manitol nos extratos foram realizadas por análise de CLAE. Foram pesados 100 mg das amostras (EEAb, EAAb e EASP) e diluídos em água deionizada em balões volumétricos de 10 mL, obtendo assim concentrações finais de 10 mg mL⁻¹ para os extratos. As soluções proporcionadas foram filtradas através de uma membrana Milipore® 0,45 µm.

4.7.2 Sistema cromatográfico

Os perfis cromatográficos das amostras (EEAb, EAAb e EASP) foram determinados em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com um detector de índice de refração RID-10A a 40 °C. As análises foram realizadas utilizando uma coluna (Kromasil 100-5-NH2 4,6 × 150 mm) eluída a uma taxa de 1,25 mL/min com uma mistura de solventes I: II (I: água deionizada; II: acetonitrila), mantendo-se a proporção de 30% I e 70% II para toda a análise. Um padrão de manitol (≥ 98%) foi usado para obter as curvas de calibração, sendo este composto dissolvido em água deionizada em diferentes concentrações (10, 5, 2 e 1 mg mL⁻¹) para comparativo com as amostras em estudo (MIKI *et al.*, 1996). Todas as análises ocorreram em triplicata.

4.8 Quantificação de compostos fenólicos

4.8.1 Quantificação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presente nas amostras (EEAb, EAAb e EASP) foram feitas por meio de espectroscopia na região do visível pelo método de folin-ciocalteu com algumas adaptações (SOUSA *et al.*, 2007). Preparou-se uma curva padrão com ácido gálico, onde a faixa das concentrações na curva de calibração variou de 10 a 500 mg L⁻¹. Os extratos (7,5 mg) foram dissolvidos em metanol P.A, em seguida, transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume final completado com metanol P.A. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi agitada com 500 µL de folin-ciocalteu por 30 s, em seguida acrescentados 6 mL de água destilada e 2 mL de Na₂CO₃ a 15%, sendo a mistura agitada por 1 min posteriormente. Por último completou-se o volume para 10 mL com água destilada. Após 2 h sob armazenamento ao abrigo de luz foi medida a absorbância das amostras a 750 nm utilizando cubetas de quartzo, tendo como controle o metanol e todos os demais reagentes, exceto as amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8.2 *Quantificação de flavonoides totais*

Utilizou-se a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006). Preparou-se uma curva padrão com quercetina, onde a faixa das concentrações na curva de calibração variou de 4 a 12 mg L⁻¹. Para a quantificação de flavonoides nas amostras (EEAb, EAAb e EASP) foram utilizados 2 mL de solução destes extratos na concentração de 2 mg mL⁻¹ (obtida pela dissolução de 20 mg em 10 mL de etanol P.A), sendo misturados posteriormente com 1 mL de uma solução aquosa de cloreto de alumínio (2,5%) em balão de 25 mL, respectivamente, aferidos em seguida com etanol P.A. Decorridos 30 min destes procedimentos, foi realizada a leitura de cada solução a 425 nm em espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9 **Ensaio Antioxidantes**

4.9.1 *Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH*

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi utilizado o método de varredura do radical livre DPPH, descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset, (1995) com algumas modificações. Dissolveu-se 15 mg das amostras (EEAb, EAAb e EASP) em 1,5 mL (10000 ppm) de metanol/DMSO (1:1, v v⁻¹), e a partir desta solução foram feitas as concentrações de 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm para as amostras. Preparou-se uma solução metanólica de DPPH (2,6 mg de DPPH em 100 mL de metanol P.A), ajustando a absorbância para manter-se entre 600 - 700 nm em um espectrofotômetro. Em tubos de ensaio foram misturados 0,1 mL de metanol P.A (controle) ou das concentrações das amostras, com 3,9 mL da solução de DPPH. Após 1 h de armazenamento em ambiente escuro foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 515 nm. O índice de varredura (IV%) foi calculado a partir da Equação 1:

$$IV\% = (A_{DPPH} - A_{AMOSTRA}/A_{DPPH}) \times 100 \quad (1)$$

Onde: A_{DPPH} corresponde as absorbâncias obtidas para o controle e A_{AMOSTRA} as absorbâncias encontradas para cada concentração das amostras (250 - 0,125 ppm). Após o teste calculou-se a concentração eficiente (CE₅₀) por regressão linear, obtida pelas concentrações finais e seus respectivos IV%, respectivamente. Utilizou-se o ácido ascórbico como substância de referência para o teste. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração.

4.9.2 Capacidade de quelação do íon ferroso

O ensaio de quelantes de íons ferrosos foi adaptado de um método descrito por Gülçin (2005). Resumidamente, foi realizado uma mistura de 1 mL de uma solução de FeSO₄ (0,1 mmol L⁻¹) com 1 mL água ultrapura (controle) ou várias diluições (0,5 - 4,0 mg mL⁻¹) das amostras (EEAb, EAAb e EASP) em tubos de ensaios, seguido de agitação constante (sem aquecimento) por 5 min. Após esse período de tempo foi adicionado 1 mL de uma solução aquosa de ferrozina (0,25 mmol L⁻¹) a cada tubo de ensaio, deixando-os em repouso ao abrigo da luz durante 10 min. Decorrido esse tempo foram realizadas as medições de absorvância a 562 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade quelante de acordo com a Equação 2:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100 \quad (2)$$

Onde, **A₀**: corresponde as absorvâncias da mistura reacional das soluções de FeSO₄ + Água ultrapura + ferrozina; **A**: corresponde as absorvâncias da mistura reacional das soluções de FeSO₄ + Amostras + ferrozina e **A_b**: corresponde as absorvâncias das concentrações das amostras a 562 nm.

4.10 Avaliação da atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzido por etanol

4.10.1 Animais

No protocolo experimental, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, machos, com massa corpórea entre 25 a 30 g, que foram randomicamente distribuídos em grupos de n = 8, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) – Fortaleza, Ceará. Os camundongos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha, trocadas duas vezes por semana. Durante todo o experimento, os animais estavam em um ambiente com temperatura de 23 ± 2 °C num ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a água e ração padrão.

4.10.2 Aspectos éticos da experimentação animal

Em todos os experimentos foram observados os princípios éticos da experimentação animal normatizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC

para uso de animais experimentais. Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC) sob número CEUA n° 2071010219.

4.10.3 Grupos experimentais

Todos os grupos experimentais possuíam 8 animais. Os animais do grupo controle receberam solução salina (0,9%) previamente, antes da administração do agente agressor para gerar as lesões gástricas. Foram separados três grupos para receber as doses de 5 mg kg⁻¹ (EEAb-5), 25 mg kg⁻¹ (EEAb-25) e 50 mg kg⁻¹ (EEAb-50) (mais o veículo utilizado para diluir o extrato) do EEAb, respectivamente. Além desses, foi feito um estudo com o fármaco N-acetilcisteína, 300 mg kg⁻¹, (NAC-300) (mais o veículo utilizado para diluir o fármaco). As doses para cada grupo foram administradas por *via* oral, 60 min antes da gavagem do agente agressor etanol P.A.

4.10.4 Avaliação da atividade gastroprotetora

4.10.4.1 Lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos

Os camundongos foram pré-tratados com EEAb (5, 25 e 50 mg kg⁻¹, v.o.) (doses baseadas em estudos da literatura, Sui *et al.* (2010), Xin. (2019) e Nakajima *et al.* (2002)) por 1 h, antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico (cetamina 300 mg kg⁻¹ e xilazina 30 mg kg⁻¹), os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina (0,9 %) e comprimidos entre dois vidros de relógio para uma melhor visualização das úlceras gástricas geradas. O percentual da face glandular gástrica lesionada foi determinado com o auxílio de um programa de planimetria computadorizada (*ImageJ*[®]). A área ulcerada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (ROBERT *et al.*, 1979).

4.10.4.2 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica de camundongos

Para o estudo histopatológico, fragmentos dos estômagos foram fixadas em solução de formol 10% tamponado, onde permaneceram por 24 h. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Logo após, os materiais biológicos foram seccionados e embebidos e fixados em parafina (blocos). Posteriormente, foram feitos cortes de cinco micrometros nesses

blocos, colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina para o estudo em microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein (1988), sendo avaliado a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Todas as avaliações histopatológicas foram realizadas através de um estudo cego.

4.10.4.3 Determinação da concentração de mastócitos

Os blocos de parafina com amostra do tecido gástrico foram selecionados para a coloração com azul de toluidina. A coloração de azul de toluidina foi realizada após a desparafinização da lâmina com xilol e hidratação com álcool absoluto e uma série de álcool diluídos (90%, 80% e 70%). Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com azul de toluidina por 8 min, lavadas com água destilada e colocadas em estufa a 60° C por 1 h para secar. Após a secagem, as lâminas foram clareadas com uma série de xilol para serem finalmente montadas. A contagem de mastócitos (na mucosa gástrica) de cada lâmina foi realizada utilizando uma escala de 100 µm (x 200), usando um microscópio óptico. Para a análise computacional imagens digitais foram capturadas em microscópio binocular acoplado a uma câmera, ligada a um computador, sendo realizada a contagem de 10 campos seguidos. Os resultados foram expressos representando a média de 10 campos de cada grupo (Michalany, 1998).

4.10.5 Vias de atuação do EEAb no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol

4.10.5.1 Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EEAb

Os camundongos foram tratados com veículo EEAb-25 (v.o.) 60 min antes, ou L-Arginina (600 mg kg⁻¹, i.p.) ou NG-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) (10 mg kg⁻¹, s.c.) (CHANDRANATH; BASTAKI; SINGH, 2002; GÜRBÜZ *et al.* 1999), 15 min antes, da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Para avaliar o papel do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do EEAb, também foram realizadas combinações onde, L-NAME (20 mg kg⁻¹, s.c.) foi administrado 15 min antes do EEAb-25 (v.o.) ou L-Arginina (600 mg kg⁻¹, i.p.), sendo 1 h depois induzida a lesão com etanol. Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica.

4.10.5.2 Papel do Guanilato Monofosfato Cíclico (GMPc) no efeito gastroprotetor do EEAb

O envolvimento do GMPc foi avaliado pela administração de ODQ (10 mg kg⁻¹, i.p.), inibidor específico da guanilato ciclase, 30 min antes da administração do EEAb-25 (i.p.). A lesão gástrica foi induzida com etanol 30 min após o tratamento com o extrato. Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica (Díaz-Triste *et al.*, 2014).

4.10.5.3 Papel das prostaglandinas (PGs) no efeito gastroprotetor do EEAb

Para avaliar a possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor, os animais foram tratados com veículo EEAb-25 (v.o.) ou misoprostol (70 µg kg⁻¹, v.o.) 1 h antes da administração de etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.). Combinações também foram realizadas com indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o., dose em que inibe a síntese de prostaglandinas, mas não induz lesão gástrica). Foi administrada 2 h antes da administração do EEAb-25 (v.o.) ou do misoprostol (70 µg kg⁻¹, v.o.) e 1 h depois foi induzida a lesão com etanol. Após 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos foram removidos e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

4.10.5.4 Envolvimento dos canais de K⁺_{ATP} no efeito gastroprotetor do EEAb

Os camundongos foram tratados com veículo EEAb-25 (v.o.) ou diazóxido (3 mg kg⁻¹, i.p.) 60 min ou 30 min, respectivamente, antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Para avaliar a possível participação dos canais de K⁺_{ATP} no efeito gastroprotetora foram realizadas combinações nas quais glibenclamida (5 mg kg⁻¹, i.p.) (PESKAR *et al.*, 2002) foi administrada 15 min antes do tratamento com EEAb-25 (v.o.) ou diazóxido (3 mg kg⁻¹, i.p.), sendo 1 h após induzida a lesão com etanol. Após 30 min da administração do etanol absoluto, os animais foram sacrificados, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura e em seguida procedeu-se como descrito anteriormente no que concerne a análise do percentual de lesão gástrica (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

4.11 Análise estatística

Para o tratamento dos dados (*software GraphPad Prism*, versão 6.0) foram primeiramente realizados testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) seguidos de Análise de variância (ANOVA one-way) com pós-teste de Tukey (para valores de médias normal) ou teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's (para valores de média não normal). O intervalo de confiança adotado foi de 95% (*p <0,05) para serem considerados estatisticamente significantes (sendo considerado também os demais níveis de significância, **p <0,01, ***p <0,001 e ****p <0,0001). Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) ou média \pm desvio padrão (exceto para os scores histopatológicos que foram apresentados pelos valores de mediana).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis*

Após a aplicação do método de extração e concentração para cada um dos extratos (EEAb, EAAb e EASP), estes foram cuidadosamente pesados e seus rendimentos foram calculados, podendo ser observados esses resultados na Tabela 1. É possível observar que os extratos apresentaram altos valores de rendimentos (53,53%, 54,08% e 51,50%, para mesma ordem descrita acima, respectivamente), indicando assim que os solventes utilizados no preparo foram capazes de interagirem com os metabólitos de mesma polaridade do cogumelo.

Tabela 1 - Rendimento dos extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis*

Extratos	Massa de material utilizado (grama)	Massa de extrato obtido (grama)	Rendimento (%)
EEAb	25,93	13,88	53,53
EAAb	20,21	10,93	54,08
EASP	10,00	5,15	51,50

Fonte: Próprio autor.

Alguns trabalhos encontrados na literatura, como é o caso do trabalho de Stojkovic *et al.* (2019), obtiveram um rendimento de 14,24% para um extrato metanólico de *A. blazei*, partindo de uma massa de 5 g de material para 150 mL solvente. Rendimentos de $31,65 \pm 3,67\%$ foram obtidos no trabalho de Soares *et al.* (2009), partindo-se de 5 g em 100 mL de solvente (metanol), a qual foi deixado sob temperatura ambiente por 24 h. Esses resultados indicam que o metanol puro usado na preparação dos extratos não demonstrou uma efetividade tão boa no arraste dos metabólitos quando comparado a mistura de solventes (etanol/água 70:30 v v⁻¹), bem como quando usado apenas a água, como foi empregado no presente trabalho.

Tsai, Tsai e Mau, (2007) obtiveram em seus extratos etanólico e aquoso, rendimentos de $15,57 \pm 0,22$ e $47,28 \pm 0,63$ (g/100 g), respectivamente. Altos rendimentos de extração foram obtidos a partir do uso de etanol:água (70:30) para corpos de frutificação do *A. brasiliensis* no trabalho de Carvajal *et al.*, (2012), resultando em extratos hidroalcoólicos com $42,5 \pm 1,4$; $48,3 \pm 1,8$ e $44,9 \pm 1,2$ (g/100 g) dos corpos de frutificação, micélios ‘jovens’ e micélios ‘velhos’, respectivamente. Estes resultados apresentaram bastante semelhanças aos obtidos no presente trabalho, podendo diferenciar-se um pouco devido a origem dos micélios dos cogumelos utilizados em ambos trabalhos.

5.2 Prospecção fitoquímica

Os resultados da análise fitoquímica qualitativa (TABELA 2) indicaram as presenças de diversas classes de metabólitos secundários nos extratos do cogumelo *A. brasiliensis*. Como já era de se esperar, o EEAb demonstrou positividade para uma maior quantidade de classes de metabólitos secundários se comparado com os demais extratos, podendo justificar-se pela forma de sua obtenção. Como o EEAb é formado da mistura de etanol/água, sua polaridade o levou a atrair compostos mais polares, como a atração por parte dos fenóis (SEZER; SÜFER; SEZER, 2017), flavonoides (VITAL *et al.*, 2017), catequinas (SÁNCHEZ, 2017), alcalóides (MISGIATI; SUKARDIMAN; WIDYAWARUYANTI, 2017) e saponinas (VEERAPPAN *et al.*, 2018), devido suas alta atração pela água, sendo possível também a solubilização de açúcares e polissacarídeos.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica dos extratos de *Agaricus brasiliensis*

Metabólitos Secundários	EEAb	EAAb	EASP
Alcalóides			
<i>Solução de Dragendorff</i>	+	+	+
<i>Solução de Mayer</i>	+	+	+
Catequinas	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Esteroides livres	+	+	+
Fenóis	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Resinas	+	-	-
Saponinas	+	+	+
Xantonas	+	-	-

(+): Positivo para o teste; (-): Negativo para o teste

Fonte: Próprio autor.

Essa mistura também pode ter proporcionado a interação de compostos como cumarinas (COSTA; TAVARES; OLIVEIRA, 2016), esteroides livres (CORRÊA *et al.*, 2018), resinas e xantonas (AHAD; TANVEER; MALIK, 2014). Os EAAb e EASP apresentaram resultados semelhantes para prospecção fitoquímica, uma vez que a obtenção desses extratos se dá de forma muito similar, diferenciando-se apenas na presença dos polissacarídeos que estão apenas no EAAb. Observou-se que a utilização do etanol para o preparo do EEAb tornou possível a identificação qualitativamente de resinas e xantonas, a qual não foram evidenciadas nos demais extratos.

Alguns trabalhos na literatura já relataram diversas classes de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, alcalóides, saponinas, flavonoides, taninos, esteróis, triterpenos,

cumarinas e glicosídeos cianogênicos em cogumelos da ordem *Agaricales* (ADEBAYO *et al.*, 2012). Zhang *et al.*, (2012b) conseguiram identificar a presença de compostos fenólicos na espécie *A. brasiliensis* por meio de uma otimização do processo de extração assistida por micro-ondas, indicando assim a presença desses metabólitos na espécie estudada. Saponinas e alcalóides também já foram relatadas em extratos aquosos para a espécie, como é o caso do trabalho de Naso *et al.*, (2010), a qual conferiu ao mesmo atividades antioxidantes nos ensaios de captura do radical do DPPH e hipoxantina/xantina oxidase.

Esteroides isolados de *A. brasiliensis* são bem documentados no estudo feito por Itoh, Ito e Hibasami (2008). Este metabólito apresentou resposta contra cancro de pulmão (LU99) e cancro de estômago (KATO III) em humanos. Costa, Tavares e Oliveira (2016) relatam bem a presença de cumarinas em várias espécies do gênero *Agaricus* (*A. bisporus*, *A. bernardii*, *A. arvensis*, *A. porphyrocephalus*, *A. silvicola*, etc). Apesar da identificação de forma qualitativa das classes de metabólitos catequina, cumarinas, resinas e xantonas para os extratos estudados, não foi possível encontrar na literatura estudos que viessem corroborar com esses dados para espécie, podendo sugerir assim alguma interferência de alguma outra classe de metabólito.

Contudo, testes fitoquímicos com extrato etanólico (50%) do cogumelo *A. bisporus* já foram observadas diversas classes de metabólitos secundários como esteróis, saponinas, glicosídeos de cumarina e resinas (ASHOK; SHABUDEEN, 2015). Ademais, catequinas identificadas nesta espécie de cogumelo foram relatadas como sendo um dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante frente ao radical DPPH (VAIRAMUTHU *et al.*, 2018). Em alguns extratos etanólicos (100%) com espécies de *Agaricus* (sp.) foram possíveis identificar pelos testes fitoquímicos as classes dos fenóis, flavonoides, taninos, esteroides, saponinas e também glicosídeos. Além desses, conteúdos de polissacarídeos e proteínas (6,16 e 1,52 g/L, respectivamente) foram quantificadas (MAKTOOF; ALRUBAYAE; ALMANSORII, 2019). Desta forma, conjectura-se que a variação de uma dada espécie, local de cultivo dos cogumelos, bem como os solventes utilizados para preparação dos extratos, garantem uma distribuição não homogênea para a identificação de algumas classes de metabólitos secundários, o que torna a utilização desses ensaios bastante importante para uma ideia inicial das classes de compostos presente nos mesmos.

5.3 Análise elementar CHNS-O

Após a identificação qualitativa das várias classes de metabólitos secundários nos extratos estudados (EEAb, EAAb e EASP), realizou-se uma quantificação em termos percentuais (%) de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio, resultados esses que são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise elementar para os extratos de *Agaricus brasiliensis*

Amostras	C	H	N	S	O
EEAb	37,72 ± 0,17	7,55 ± 0,06	4,98 ± 0,22	1,83 ± 0,05	47,92 ± 0,16
EAAb	35,19 ± 0,10	6,94 ± 0,15	5,88 ± 0,14	1,68 ± 0,27	50,31 ± 0,16
EASP	27,48 ± 0,76	5,51 ± 0,03	3,82 ± 0,15	2,11 ± 0,90	60,98 ± 1,84

C: carbono (%); H: hidrogênio (%); N: nitrogênio (%); S: enxofre (%); O: oxigênio (%)

Fonte: Próprio autor

A quantificação em porcentagem (%) de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio foi realizado por meio de análise elementar. Os resultados obtidos mostram níveis mais elevados de oxigênio (47,92 ± 0,16%) e carbono (37,72 ± 0,17%), seguido de hidrogênio (7,55 ± 0,06%) e nitrogênio (4,98 ± 0,22%) para o EEAb. Baixo teor de enxofre (1,83 ± 0,05%) foi observado neste extrato. Nos demais extratos foi possível observar teores bem semelhantes aos encontrados no EEAb, tendo uma leve variação a mais nos teores de enxofre e oxigênio para o EASP. Na literatura, trabalhos que utilizaram água como solução no preparo do extrato de ABM apresentaram teores de carbono e nitrogênio de 40,9 e 6,1%, respectivamente, correspondendo à presença de carboidratos e proteínas (YAMANAKA *et al.*, 2012).

Cardozo *et al.* (2013) analisando os polissacarídeos de *A. brasiliensis* obteve teores de carbono (34,42%), hidrogênio (5,56%) e nitrogênio (2,50%) semelhante ao deste estudo. Além disso, quando isolaram os polissacarídeos dos micélios desta espécie, observou-se teores de 32,07% (C), 4,36% (H) e 1,63% (N). Devido ao uso da água como solvente na preparação dos extratos neste trabalho, pode-se sugerir a presença dos polissacarídeos nas suas composições, considerando que essas macromoléculas são bastante hidrofílicas.

5.4 Caracterização por UPLC-QTOF-MS^E dos extratos

A literatura apresenta alguns estudos a qual muitos compostos fenólicos foram identificados e quantificados no cogumelo *A. brasiliensis*, dentre esses, o pirogalol e os ácidos ferúlico, salicílico, protocatecuico, gentísico, siríngico, cinâmico, gálico, benzóico (KIM *et al.*, 2008). Ainda neste estudo com cinco espécies de cogumelos comestíveis e cinco medicinais

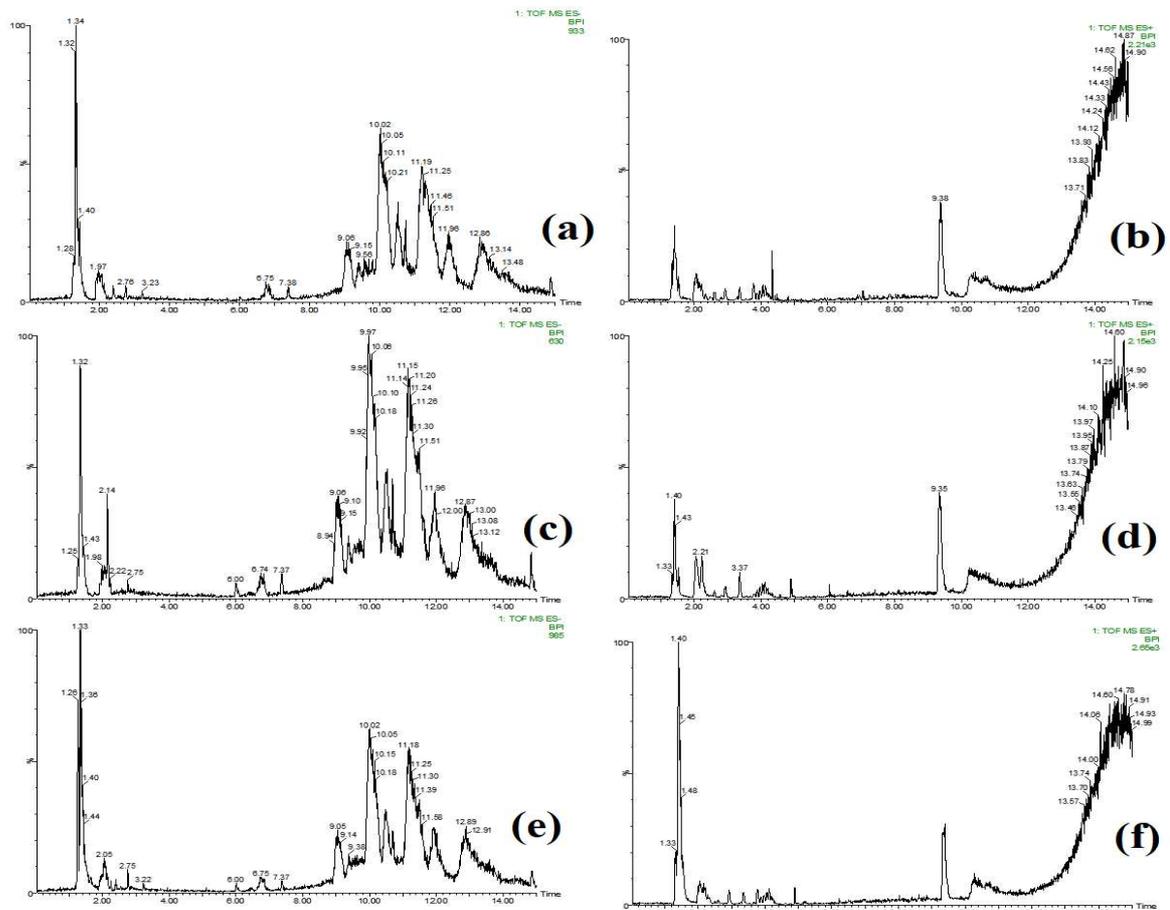
(comumente cultivados na Coréia) foi evidenciado a presença de flavonoides como, catequina, miricetina e quercetina para o *A. brasiliensis*. Flavonoides esses que possuem muitas atividades relatadas na literatura.

Li *et al.* (2014) também por CLAE quantificou e relatou a presença dos ácidos tartárico, málico, cítrico, fumárico e succínico, não sendo identificado a presença do ácido ascórbico neste trabalho. Além desses foi realizada também a quantificação de açúcares solúveis presentes no cogumelo, sendo observada a presença de glicose, manose, manitol, trealose. No trabalho de Gasecka *et al.* (2018) foram quantificado (CLAE) diversos ácidos fenólicos (caféico, p-hidroxibenzóico, p-cumarico, clorogênico, gálico, siríngico, cinâmico e protocatequina) e ácidos orgânicos (cítrico, fórmico, fumarico, láctico, malônico, oxálico, succínico), demonstrando assim uma rica mistura de metabólitos nesta espécie.

Tendo isso em vista, realizou-se um estudo mais aprofundado do perfil dos metabólitos secundários encontrado nos extratos de *A. brasiliensis* deste trabalho (baseando-se em estudos de compostos presentes já relatados na literatura para o mesmo gênero, espécie e família do cogumelo) através da técnica UPLC-QTOF-MS^E, a fim de propor possíveis identificações para as substâncias presentes nos mesmos. Pode-se observar os cromatogramas no modo negativo e positivo obtidos para o EEAb, EAAb e EASP na Figura 5.

No cromatograma (FIGURA 5) foi possível observar que muitas substâncias se ionizam no modo negativo e positivo. Cada pico do cromatograma (FIGURA 5) apresenta espectros de massas que foram devidamente analisados, bem como foram feitos espectros de MS e MS/MS, além do estudo aprofundado dos fragmentos das moléculas nos EEAb, EAAb e EASP. De acordo com os resultados obtidos foram propostos a identificação de alguns compostos (putativamente), baseado nas suas fragmentações sendo considerado apenas metabólitos que apresentassem baixíssimo erro (ppm <10). É possível observar na Tabela 4 os compostos identificados pelo modo negativo e positivo para o EEAb.

Figura 5 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de *Agaricus brasiliensis*



Cromatogramas obtidos no modo negativo e positivo dos extratos de *Agaricus brasiliensis*: a) modo negativo do EEAb, b) modo positivo do EEAb, c) modo negativo do EAAb, d) modo positivo do EAAb, e) modo negativo do EASP, f) modo positivo do EASP.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 - Anotações dos metabólitos identificados putativamente para o EEAb

Pico	t_R (min)	Anotação de metabólito	Formula Molecular	Modo negativo (ESI ⁻)			Modo positivo (ESI ⁺)			Referência
				[M-H] ⁻	Íons fragmentos (MS/MS)	Erro (ppm)	[M+H] ⁺	Íons fragmentos (MS/MS)	Erro (ppm)	
1	1,32	Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	[M+Cl] ⁻ 217,0475	181,0708; 96,9655; 89,0205; 71,0111	-1,8	-	-	-	(AMMAR <i>et al.</i> , 2017; KLEWICKI <i>et al.</i> , 2017)
2	1,45	Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	133,0128	71,0147; 89,0250; 115,0013	0,0	-	-	-	(DELGADO- POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)
3	2,06	Ácido piroglutâmico	C ₅ H ₇ NO ₃	128,0348	82,0286; 128,0357	0,0	-	-	-	(DELGADO- POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)
4	2,10	<i>L</i> -Agaritina	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	-	-	-	268,1283	84,0681	-5,2	(DELGADO- POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)
5	3,37	<i>L</i> -Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	-	-	-	118,0875	72,0917	5,9	(DELGADO- POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Próprio autor.

Os fragmentos identificados (TABELA 4) no EEAb (FIGURA 5a e 5b) para o espectro MS do composto 1 mostram um aduto de cloro $[M+Cl]^-$ em m/z 217,0475 Da ($C_6H_{14}O_6Cl$), que foi supostamente identificado como manitol. O metabólito apresenta uma perda de 36 Da $[M+Cl-36]^-$ que pode ser relativa ao monossacarídeo em sua forma neutra m/z 181,0708 Da ($C_6H_{14}O_6$). Além disso, o espectro MS² mostra a presença de outros três picos em m/z 96,9655 Da $[C_6H_{14}O_6-84]^-$, 89,0205 Da $[C_6H_{14}O_6-92]^-$ e 71,0111 Da $[C_6H_{14}O_6-110]^-$ (AMMAR *et al.*, 2017; KLEWICKI *et al.*, 2017).

Os compostos 2 e 3 apresentaram um íon molecular $[M]^-$ em m/z 133,0128 e 128,0348, supostamente identificados como ácido málico e ácido piroglutâmico de fórmula molecular $C_4H_6O_5$ e $C_5H_7NO_3$, respectivamente. Os fragmentos desses metabólitos observados no espectro MS² apresentaram perdas de 18 Da $[M-H_2O]^-$, 44 Da $[M-CO_2]^-$ e 62 Da para o ácido málico, enquanto fragmentos de 128 Da e 46 Da foram evidenciados para ácido piroglutâmico (DELGADO-POVEDANO *et al.*, 2016). O composto 4 (*L*-agaritina) e o composto 5 (*L*-valina) apresentaram seus íons moleculares no modo positivo em m/z 268,1283 Da ($C_{12}H_{17}N_3O_4$) $[M+H]^+$ e m/z 118,0875 Da ($C_5H_{11}NO_2$) $[M+H]^+$, respectivamente. Os fragmentos desses metabólitos observados no espectro MS² apresentaram perdas de 184 Da e 46 Da na mesma ordem descrita acima para o composto 4 e composto 5 (DELGADO-POVEDANO *et al.*, 2016).

Para os cromatogramas do modo negativo e positivo do EAAb observou-se um perfil bastante similar ao do EEAb (FIGURA 5c e 5d), tendo variações apenas em intensidades em algumas regiões do cromatograma. É possível observar na Tabela 5 os compostos identificados por ambos os modos para o EEAb. Os fragmentos identificados no EAAb (TABELA 5) para o espectro MS do composto 1 (putativamente identificado como manitol) mostram um aduto de cloro $[M+Cl]^-$ em m/z 217,0475 Da ($C_6H_{14}O_6Cl$). As perdas observadas para este metabólito foram bem semelhantes ao EEAb, m/z 181,0711 Da $[M+Cl-36]^-$, m/z 96,9670 Da $[C_6H_{14}O_6-84]^-$, 89,0226 Da $[C_6H_{14}O_6-92]^-$ e 71,0183 Da $[C_6H_{14}O_6-110]^-$ (AMMAR *et al.*, 2017; KLEWICKI *et al.*, 2017).

O composto 2 foi supostamente identificado como ácido piroglutâmico ($C_5H_7NO_3$) e apresentou um íon molecular $[M-H]^-$ em m/z 128,0342 Da. Os fragmentos desse metabólito no espectro MS² apresentou perda de m/z 46 Da, além de ainda ser possível a observação de seu íon molecular no estado neutro m/z 128,0353 Da, indicando assim a grande presença desse metabólito no EAAb (DELGADO-POVEDANO *et al.*, 2016). O composto 3 (*L*-agaritina) apresentou seu íon molecular no modo positivo em m/z 268,1279 Da ($C_{12}H_{17}N_3O_4$) $[M+H]^+$ e fragmento no espectro MS² com perda de 184 Da (DELGADO-POVEDANO *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Anotações dos metabólitos identificados putativamente para o EAAb

Pico	t_R (min)	Anotação de metabólito	Formula Molecular	Modo negativo (ESI ⁻)			Modo positivo (ESI ⁺)			Referência
				[M-H] ⁻	Íons fragmentos (MS/MS)	Erro (ppm)	[M+H] ⁺	Íons fragmentos (MS/MS)	Erro (ppm)	
1	1,34	Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	[M+Cl] ⁻ 217,0475	181,0711; 96,9670; 89,0226; 71,0183	-3.7	-	-	-	(AMMAR <i>et al.</i> , 2017; KLEWICKI <i>et al.</i> , 2017)
2	2,01	Ácido piroglutâmico	C ₅ H ₇ NO ₃	128,0342	82,0286; 128,0357	-4.7	-	-	-	(DELGADO-POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)
3	2,04	L-Agaritina	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	-	-	-	268,1279	84,0687	-6.7	(DELGADO-POVEDANO <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Próprio autor.

Para o cromatograma dos modos negativo e positivo do EASP (FIGURA 5e e 5f) é possível observar um perfil bastante semelhante aos dos demais extratos (EEAb e EAAb) (FIGURA 5). O manitol ($C_6H_{14}O_6$) que também foi possível identificar no extrato apresentou os seguintes parâmetros: t_r : 1,34 min; $[M+Cl]$: 217,0479; íons fragmentos (MS/MS): 181,0726; 96,9658; 89,0223; 71,0124 e erro (ppm): -2,8 para o modo negativo. O ácido piroglutâmico ($C_5H_7NO_3$) neste mesmo modo apresentou t_r : 2,01 min; $[M-H]$: 128,0339; íons fragmentos (MS/MS): 181,0726; 96,9658; 89,0223; 71,0124 e erro (ppm): -7,0. A presença do íon molecular no modo positivo de m/z 268,1273 Da $[M+H]^+$ em 2,04 min (t_r) pode ser atribuído a *L*-agaritina ($C_{12}H_{17}N_3O_4$, erro de -9,0 ppm). Como fragmento foi obtido no MS² um íon m/z 84,0691 Da referente a perda de 184 Da (AMMAR *et al.*, 2017; KLEWICKI *et al.*, 2017; DELGADO-POVEDANO *et al.*, 2016).

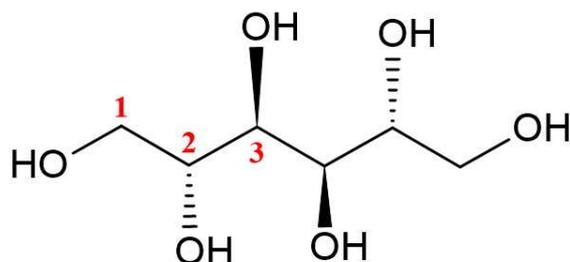
Apesar de não haver muitos trabalhos que utilizaram a técnica de UPLC-QTOF-MS^E para realizar uma caracterização completa dos metabólitos presentes em extratos do cogumelo *A. brasiliensis*, o trabalho de Mokochinski *et al.* (2015) conseguiu identificar uma diversidade de ácidos graxos na espécie, sendo os compostos identificados por eles no modo negativo: ácido palmítico (t_r : 10,01 min) m/z 255,2330 Da $[M-H]^-$, ácido linolênico (t_r : 8,78 min) m/z 277,2173 Da $[M-H]^-$, ácido linoleico (t_r : 9,38 min) m/z 279,2325 Da $[M-H]^-$ e ácido oleico (t_r : 9,35 min) m/z 281,2481 Da $[M-H]^-$. Esses compostos por possuírem cadeias carbônicas muito elavadas apresentam caráter hidrofóbico, sendo identificados assim próximos ao termino das corridas das análises (altos tempos de retenção) (MOKOCHINSKI *et al.*, 2015). Mesmo com a exaustiva tentativa de identificação de outros metabólitos além dos relatados na Tabela 4, ainda pode-se presumir a presença desses ácidos graxos nos EEAb, EAAb e EASP, uma vez que há uma elevada intensidade nos cromatogramas na faixa de 9 à 12 min (FIGURA 5), além destes serem bem relatados na espécie estudada, podendo esses estarem na forma de adutos, o que dificultou suas identificações no presente trabalho.

5.5. Caracterização dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para atribuições dos sinais obtidos para o EEAb, EAAb e EASP, levou-se em consideração os espectros representativos de ressonância magnética nuclear de 1H , visando identificar a região espectral de maior intensidade para os resultados das análises. Após a realização e verificação das mesma observou-se que grande parte dos sinais de alta intensidade ficaram correspondidos entre as regiões de 3,5 – 4,0 ppm, regiões essa bastante característica para açúcares (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010). Correlacionando os resultados obtidos nas análises de RMN para os açúcares com os tentativamente identificados por UPLC-QTOF-MS^E,

atribuiu-se os sinais de mais alta intensidade ao manitol (FIGURA 6), devido à similaridade com espectros já relatados na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2010) para este açúcar.

Figura 6 - Estrutura molecular do manitol

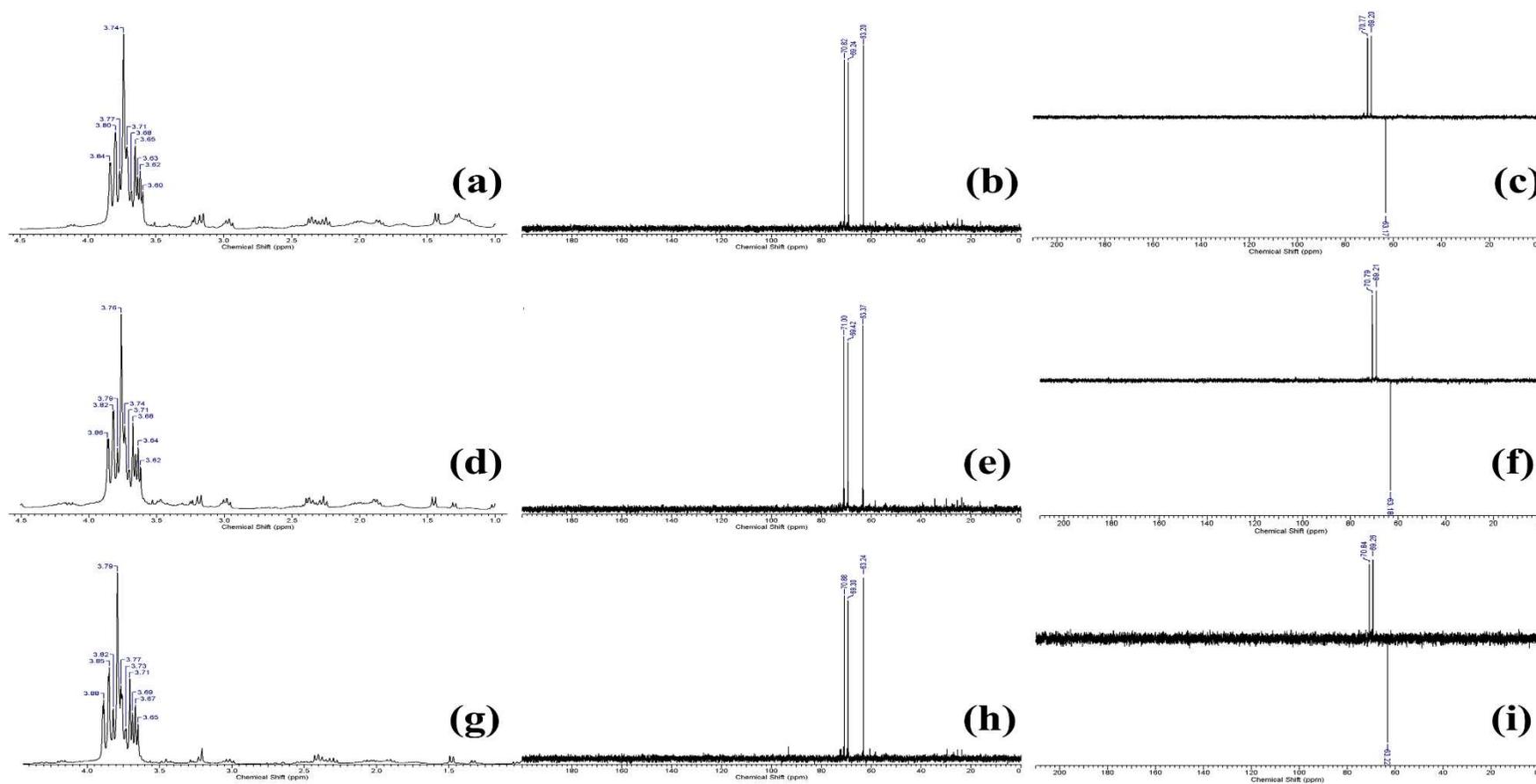


Fonte: Próprio autor.

Os espectros de RMN de ^1H apresentaram bastante similaridade para os extratos do cogumelo produzidos, exibindo sinais em δ 3,80 ppm atribuído ao H-1, seguidos para H-2 e H-3 sinais em δ 3,63 e δ 3,74 ppm, respectivamente, para o EEAb. Os sinais em δ para o espectro de RMN de ^1H para o EAAb demonstraram-se em 3,82; 3,76 e 3,64 ppm para a seguinte ordem dos átomos de hidrogênios, H-1, H-2 e H-3, respectivamente. Os sinais em δ para o espectro de RMN de ^1H para o EASP foram em torno de 3,85; 3,79 e 3,67 ppm para a seguinte ordem H-1, H-2 e H-3 dos átomos de hidrogênios, respectivamente. Sinais esses bastantes similares aos trabalhos relatados na literatura (PAULA *et al.*, 1998). Não foi possível realizar as atribuições dos sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas nos espectros dos extratos uma vez que ocorre uma alta sobreposição de sinais nesta região (3,5 – 4,0 ppm).

Branco *et al.* (2010) estudando *D*-manitol de resíduos de biomassa de *Agave sisalana* realizou as seguintes atribuições para os cristais de manitol obtidos através da análise em DMSO e utilizando um equipamento de 300 MHz para os RMN de ^1H : δ 4,38 (HO, 1 e 6), δ 4,29 (HO, 2 e 5), δ 4,11 (HO, 3 e 4), δ 3,54 (H, 1 e 6), δ 3,61 (H, 3 e 4), δ 3,45 (H, 2 e 5) e δ 3,39 (H, 1 e 6). Estes sinais se assemelham bastante aos obtidos no presente trabalho (sinais mais intensos), com leves variações nos deslocamentos químicos referentes ao emprego dos diferentes solventes das análises. Babenko *et al.* (2019) atribuiu os sinais de RMN de ^1H para o manitol dissolvido em D_2O em, δ 3,769 (H-1); δ 3,710 (H-2); δ 3,659 (H-3) e δ 3,581(H-4) em seu trabalho na quantificação de sacarídeos em formulações de inaladores de pó seco. Esses resultados demonstram mais similaridades aos obtidos no presente trabalho. Pode-se observar os espectros de RMN de ^1H para os extratos na Figura 7 (a, d e g).

Figura 7 - Espectros de RMN dos extratos de *Agaricus brasiliensis*



Espectros de RMN dos extratos de *Agaricus brasiliensis*: a) RMN de ^1H do EEAb, b) RMN de ^{13}C do EEAb, c) RMN de DEPT do EEAb, d) RMN de ^1H do EAAb e) RMN de ^{13}C do EAAb, f) RMN de DEPT do EAAb, g) RMN de ^1H do EASP, h) RMN de ^{13}C do EASP e i) RMN de DEPT do EASP.

Fonte: Próprio autor.

Os espectros de ^{13}C apresentaram apenas três sinais (devido a molécula do manitol ser centro simétrica) em δ 70,82; 69,24 e 63,20 ppm, sendo os de maiores deslocamentos associados aos C-2 e C-3 e o mais protegido ao C-1 para o EEAb, respectivamente. Os sinais em δ para o espectro de RMN de ^{13}C para o EAAb foram 71,00; 69,42 e 63,27 ppm, associados aos C-2 e C-3 e C-1, respectivamente. Os sinais em δ para o espectro de RMN de ^{13}C para o EASP foram 70,88; 69,30 e 63,24 ppm, associados aos C-2 e C-3 e C-1 respectivamente. Rodrigues *et al.* (2010) obtiveram valores bastante similares ao do presente trabalho. Os espectros de RMN de ^{13}C para os extratos podem ser observados na Figura 7 (b, e e h). Branco *et al.* (2010) apresentou os seguintes resultados de deslocamentos químicos para o manitol em relação ao RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO): 64,15 (C,1 e 6), 71,58 (C, 2 e 5) e 69,94 (C, 3 e 4), demonstrando-se assim valores bem semelhantes aos obtidos nos extratos.

O mesmo pode ser observado nos resultados de Pisklak *et al.* (2016), a qual estudando os excipientes farmacêuticos mais comuns encontrados nas formulações de medicamentos sólidos detalhou os deslocamento químico de ^{13}C para os átomos de carbono do manitol, 62,01 (C-1), 71,16 (C-2), 66,84 (C-3), 68,70 (C-4), 68,89 (C-5) e 63,58 (C-6) ppm. Estes resultados estão de acordo com as atribuições feitas no presente trabalho, além de ainda demonstrar que a técnica utilizada para caracterização se mostrou bastante precisa, uma vez que os resultados apresentaram valores bem próximos.

Os resultados dos espectros de DEPT corroboraram com os resultados de RMN de ^{13}C para o manitol nos extratos [EEAb (70,77; 69,20 e 63,17 ppm); EEAb (70,79; 69,21 e 63,18 ppm) e EESP (70,84; 69,26 e 63,22 ppm)], para os carbonos C-2 e C-3 e C-1, respectivamente, assim como no trabalho de Rodrigues *et al.* (2010) que obtiveram o mesmo perfil para o manitol isolado da *Stemodia marítima*. Os resultados da análise de DEPT para os extratos de *A. brasiliensis* podem ser observados na Figura 7 (c, f e i). O manitol foi considerado o composto majoritário nos extratos uma vez que os sinais para esta análise (mais intensos), bem como as atribuições em comparação com os sinais desse metabólito na literatura se mostraram sustentáveis.

5.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para uma maior clareza acerca da real identificação do manitol nos extratos foi que se procedeu com a respectiva análise. Após a realização da análise nas cromatoplacas com a metodologia estabelecida, calculou-se os valores de fatores de retenção (Rf) para cada um dos extratos e foi traçado um comparativo com os valores de Rf do padrão de manitol. Os valores obtidos após as análises foram 0,3244, 0,3217, 0,3204 e 0,3197 para o manitol, EEAb, EAAb

e EASP, respectivamente. Esses valores de Rfs para os extratos demonstraram bastante similaridade ao do padrão manitol.

Ao fazer os comparativos dos Rfs calculados para cada eluição dos extratos (EEAb, EAAb e EASP), observa-se que estão dentro da mesma faixa valores, o que pressupõe a confirmação obtida pelos espectros de RMN e na análise de UPLC-QTOF/MS^E na identificação desse metabólito. Apesar de ser uma técnica dita bastante simples, ela se mostrou bastante eficaz na avaliação qualitativa na identificação do manitol. A Figura 8 apresenta o resultado da eluição da análise para o padrão (manitol) e para os extratos testados.

Figura 8 - Análise de confirmação de manitol em extratos de *Agaricus brasiliensis*



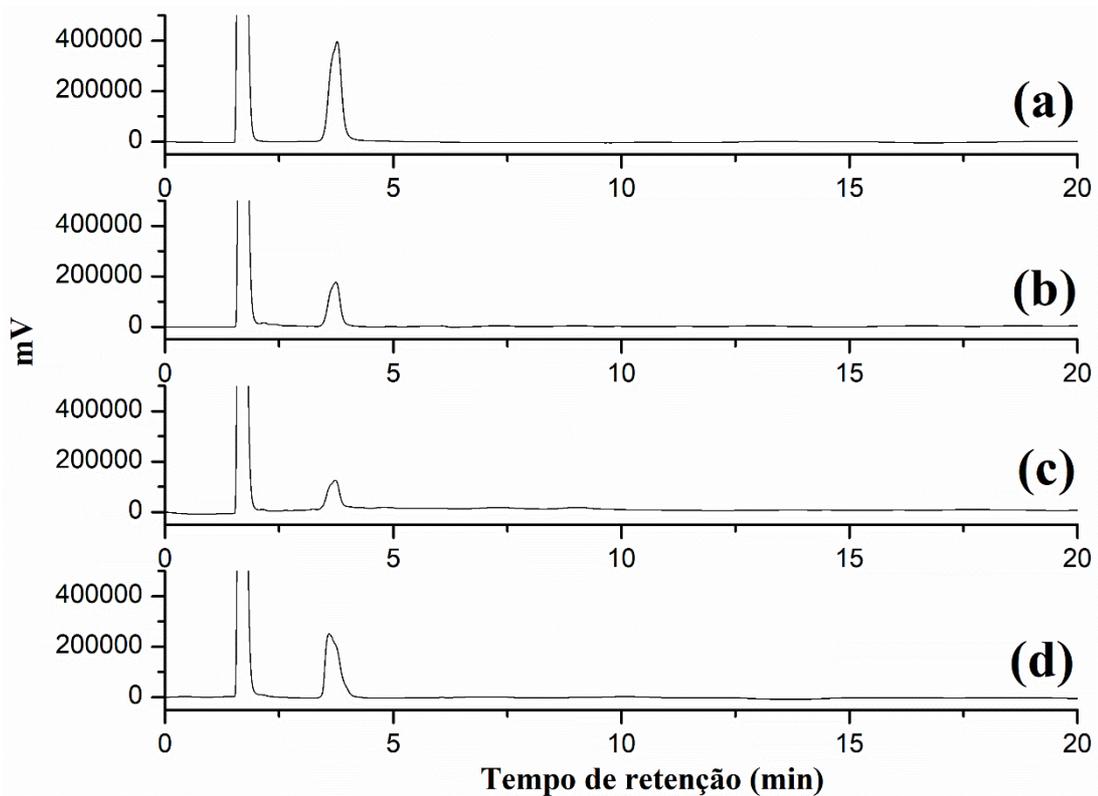
Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de ABM: a) Padrão manitol; b) EEAb; c) EAAb e d) EASP. Próprio autor.

5.7 Quantificação do manitol em extratos de *Agaricus brasiliensis* por CLAE

Após a putativa identificação do manitol por UPLC-QTOF/MS^E, RMN e CCD tornou-se apropriado a quantificação desse metabólito nos extratos do cogumelo *A. Brasiliensis* com a utilização de uma técnica mais robusta. A identificação do manitol nos extratos foi possível mediante o cromatograma do padrão manitol (por CLAE), obtido pela injeção do produto, sendo observado um tempo de retenção de 3,772 min. A curva de calibração foi construída nas concentrações 1-10 mg mL⁻¹. A equação da curva gerada com os resultados obtidos foi $y = 775732x - 27107$ ($R^2 = 0,9992$), sendo esta utilizada para determinar os teores de manitol nos extratos estudados.

Os cromatogramas mostraram a presença de manitol em todos os extratos analisados, comprovado pelo tempo de retenção quando comparado ao do padrão. Foi possível observar um tempo de retenção de 3,77 para o padrão manitol, 3,75 min para o EEAb, 3,75 min para o EAAb e 3,59 min para o EASP, respectivamente. A sobreposição dos sinais das análises feitas pode ser comparada conforme exposto na Figura 9.

Figura 9 - Quantificação de manitol nos extratos de *Agaricus brasiliensis*



Quantificação de manitol nos extratos de *Agaricus brasiliensis*: a) Padrão de manitol; b) EEAb; c) EAAb e d) EASP

Fonte: Próprio autor.

Foi obtido teores de $40,81 \pm 0,74\%$, $31,25 \pm 1,25\%$ de manitol nos EEAb e EAAb respectivamente, o que correspondeu a 408,14 e 312,58 mg de manitol/g de extrato bruto para mesma ordem dos extratos. Observou-se para quantificação de manitol para o EASP teores correspondentes a $73,10 \pm 0,24\%$ (731,00 mg de manitol/g), demonstrando assim um alto teor do açúcar para o extrato comparando-se aos demais extratos (EEAb e EAAb). Este fator pode ser atribuído uma vez que a solução remanescente após a precipitação dos polissacarídeos encontra-se rica na presença desse metabólito, o que após a sua total secagem (obtenção do extrato bruto) irá denotar altos teores do mesmo. Ao realizar a comparação do EEAb com o EAAb foi possível constatar que a utilização do etanol como solvente na mistura para o seu

preparo facilitou as interações intermoleculares na sua extração (manitol), quando comparado com a utilização apenas da água como solvente (EAAb).

Encontram-se alguns trabalhos na literatura que quantificaram o manitol em extratos de *A. brasiliensis*, como foi o caso do trabalho de Tsai, Tsai e Mau, (2008), a qual obtiveram resultado de 79,43 mg/g de extrato bruto, que corresponde aproximadamente cinco vezes menos se comparado com o EEAb, quatro vezes ao EAAb e cerca de nove vezes ao EASP. Essa diferença de resultados pode estar associada à forma como os extratos foram obtidos, uma vez que, na metodologia utilizada por Tsai, Tsai e Mau, (2008) partiu-se de 50 mL de uma solução de etanol (80%) para extração, seguida de agitação (45 min), lavagem e filtração. A metodologia utilizada no presente trabalho, além de um maior tempo de contato entre a matéria-prima (cogumelo macerado) com solução extratora foi também usado um volume maior de solvente para a preparação dos extratos, resultando assim em uma maior interação entre o manitol presente no cogumelo com os solventes empregados.

Outro estudo que realizou essa quantificação foi o de Lo *et al.* (2016), que obtiveram altos níveis de manitol em relação a outros açúcares que também foram quantificados na espécie de ABM (arabinitol, glicose, mio-inositol e trealose). Alguns outros trabalhos mostram que o manitol é bastante recorrente em cogumelos deste gênero (*Agaricus*), sendo relatadas na literatura a presença desse metabólito para as espécies de *A. bisporus* (CARDOSO *et al.*, 2019), *A. meleagris* (RAFIGHI *et al.*, 2019), *A. campestris* (JEDIDI *et al.*, 2016), *A. bitorquis* e *A. macrosporus* (GLAMOCLIJIA *et al.*, 2015). A presença de manitol nos extratos se mostraram muito importante devido este composto ter papéis bastante importantes no corpo humano, como papéis metabólicos na tolerância ao sal, osmótica e combate ao estresse oxidativo, a qual favorece a proteção contra os oxigênios reativos (TAKSHAY; WILLIAMSON, 2016).

5.8 Quantificação dos fenóis totais e flavonoides totais

Os resultados dos fenóis totais e flavonoides presentes nos extratos podem ser vistos na Tabela 6. Sendo os valores de fenóis totais representados em miligramas equivalentes ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) ($y = 0,0013x - 0,0108$) e os flavonoides representados como miligramas equivalentes quercetina por grama de extrato (mg EQ/g) ($y = 0,0529x - 0,009$).

Tabela 6 - Quantificação dos fenóis totais e flavonoides de extratos de *Agaricus brasiliensis*

Amostras	Fenóis totais mg EAG/g	Flavonóides mg EQ/g
EEAb	89,23 ± 2,56	14,33 ± 0,07
EAAb	60,17 ± 3,92	9,37 ± 0,18
EASP	55,04 ± 1,48	8,11 ± 0,18

Fonte: Próprio autor.

No presente trabalho observa que para os valores de fenóis totais obtidos teve-se melhor resultado o EEAb, obtendo valores de 89,23 mg EAG/g (correspondente a um teor de 8,92% de fenóis totais), seguido do EAAb que obteve 60,17 mg EAG/g (correspondente a um teor de 6,02% de fenóis totais) e o EASP 55,04 mg EAG/g (correspondente a um teor de 5,50% de fenóis totais). A diferença entre os fenóis totais quantificados no EEAb com o EAAb foi em torno de 29,06 (mg EAG/g), representando quase 32,57% de diferença. Se levarmos em consideração o EASP tem-se uma diferença de 34,19 (mg EAG/g), cerca de 38,32% a menos comparando-se com o EEAb.

Essa discrepância de valores nos mostra que a utilização do solvente orgânico na preparação do EEAb mostrou-se mais efetiva, pelo fato de interagir com uma maior quantidade de substâncias presente no cogumelo, quanto a extração realizada do EAAb e EASP. Alguns trabalhos na literatura também quantificaram os teores de fenóis totais em extratos de *A. brasiliensis*. No trabalho de Tsai, Tsai e Mau, (2007), o qual utilizou extratos aquosos e etanólicos (95%) do mesmo, foi possível observar valores de $5,67 \pm 0,09$ e $5,80 \pm 0,05$ mg/g para os extratos aquoso e etanólicos, respectivamente. Essas diferenças nos resultados podem ser explicadas pelo fato de que a interações moleculares desses componentes são mais fortes com o mistura de solventes quando comparado com extrações apenas com água ou etanol, no momento de sua extração (preparação dos extratos).

Já no trabalho de Gan, Nurul e Asmah, (2013) ele obteve resultados melhores que os de Tsai, Tsai e Mau, (2007), o mesmo preparou quatro extratos, sendo dois deles do cogumelo *A. brasiliensis* e os outros dois do cogumelo *A. bisporus*. Para ambos os cogumelos foram feitos extratos etanólicos (60%) e aquosos. Eles obtiveram teores de fenóis de $12,50 \pm 0,22$ e $15,79 \pm 0,25$ mg EAG/g para os extratos etanólicos e aquosos do cogumelo, respectivamente e $10,25 \pm 0,22$ e $10,25 \pm 0,22$ mg EAG/g para os extratos etanólicos e aquosos do *A. bisporus*, respectivamente. Valores esses diferiram com os observados no presente trabalho, podendo-se justificar pelas metodologias empregues em cada trabalho.

Outro trabalho que se baseia no mesmo método foi o trabalho de Guo *et al.* (2012), onde avaliaram os teores de fenóis totais em 49 cogumelos diferentes. Os autores realizaram a preparação de extratos a base de solvente apolar (tetra-hidrofurano) e solventes mais polares (metanol / ácido acético /água). Para o extrato mais hidrofóbico foi obtido um teor de $3,344 \pm 0,048$ (mg EAG/g), enquanto que para o extrato mais hidrofílico $5,004 \pm 0,035$ (mg EAG/g), fornecendo um teor total de $8,348 \pm 0,084$ (mg EAG/g) para o estudo com o cogumelo *A. brasiliensis*, mostrando assim a influência do solvente com a interação com essa classe de metabólito. Buruleanu *et al.* (2018) obteve em seus resultados níveis mais elevados de fenóis totais para extratos etanólicos (50%) ($21,23 \pm 0,01$ e $69,65 \pm 0,23$ mg EAG/g) quando comparado com extratos aquosos ($11,30 \pm 0,01$ e $17,50 \pm 0,01$ mg EAG/g) para as espécies de *A. bisporus* e *A. campestris*, respectivamente. A porcentagem de fenóis totais obtidos para o extrato de *A. campestris* (6,96%) foi bastante semelhante ao do presente estudo (8,92%), porém um pouco menor.

No presente trabalho, os teores de flavonoides foram de $14,33 \pm 0,07$ mg EQ/g (correspondente a um teor de 1,43% de flavonoides) para o EEAb, $9,37 \pm 0,18$ mg EQ/g (correspondente a um teor de 0,94% de flavonoides) para o EAAb e $8,11 \pm 0,18$ mg EQ/g (correspondente a um teor de 0,81% de flavonoides) para o EASP. Novamente foi evidenciado um maior teor, assim como nos fenóis para o EEAb. Não houve muita discrepância nos resultados obtidos para o EAAb e EASP, mostrando-se bastante similares.

A diferença entre os teores de flavonoides do EEAb com o EAAb foi de 4,96 mg EQ/g, representando 34,61% a mais do que o mesmo. Se levarmos em consideração o EASP a diferença foi cerca de 43,40% a menos que o EEAb. Essa grande variação de valores nos mostra que a utilização da mistura de solventes na preparação do extrato interagiu mais fortemente com substâncias presente no cogumelo, quanto a extração realizada com os EAAb e EASP.

Para os teores totais de flavonoides (BURULEANU *et al.*, 2018), esses extratos (na mesma ordem das espécies mencionadas acima, respectivamente) apresentaram resultados inferiores (0,83% e 0,65% mg EQ/g) quando comparado ao EEAb (1,43%) e valores bem próximos aos EAAb e EASP. Outro estudo que trabalhou com um extrato metanólico de *A. blazei* obteve teores de flavonoides de $0,327 \pm 0,01$ (mg EQ/g) (VITAL *et al.*, 2017), o que sugere que a mudança de solvente de extração associado a uma determinada metodologia resultará em diferentes níveis de compostos fenólicos extraídos, uma vez que suas forças intermoleculares serão necessariamente diferentes. Os baixos níveis de flavonoides obtidos nos

extratos podem justificar o fato destes não terem sido identificados na análise de UPLC-QTOF-MS^E.

5.9 Atividades antioxidantes dos extratos de *Agaricus brasiliensis*

5.9.1 Atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH para os extratos podem ser observados na Tabela 7. No presente trabalho, as atividades antioxidantes dos extratos apresentaram os seguintes valores, o EEAb obteve o melhor valor de $117,04 \pm 0,76$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido do EAAb $156,95 \pm 4,80$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e EASP $290,98 \pm 6,77$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se comparados com o padrão ácido ascórbico $18,53 \pm 0,75$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos não apresentaram valores próximo ao padrão (cerca de 6 vezes superior ao EEAb), porém obtiveram bons valores para atividade antioxidante, tendo em vista a baixa quantidade de material necessário para inibir 50% dos radicais do DPPH no teste.

Tabela 7 - Valores de CE₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para extratos de *Agaricus brasiliensis*

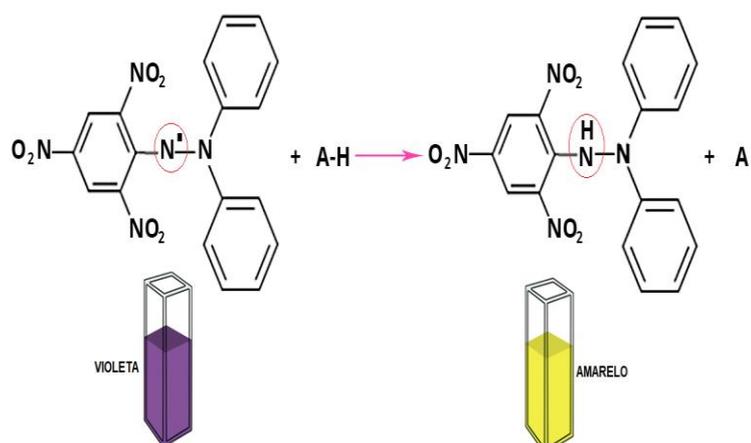
Amostras	CE ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido ascórbico (Padrão)	$18,53 \pm 0,75$
EEAb	$117,04 \pm 0,76$
EAAb	$156,95 \pm 4,80$
EASP	$290,98 \pm 6,77$

Fonte: Próprio autor.

O fato que pode ter proporcionado essa diferença para os extratos comparando-se ao padrão, pode estar associada a utilização do padrão puro para a análise, se comparado a mistura de várias classes de metabólitos encontradas para os extratos (EEAb, EAAb e EASP). Trabalhos na literatura relatam a alta atividade antioxidante apresentada pelo ácido ascórbico (BASCHIERI *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019). Melhor atividade já era esperado para o EEAb, tendo em vista os resultados que demonstraram maiores teores de fenóis totais e flavonoides. O EAAb obteve valores melhores do que o EASP, fato esse que pode estar relacionado com o isolamento dos polissacarídeos. Isso leva-nos a pensar que os polissacarídeos do cogumelo possuem grande importância na atividade antioxidante do cogumelo. Estudos a respeito da atividade antioxidante DPPH dos polissacarídeos do cogumelo em estudo já foram relatados, sendo os resultados considerado satisfatórios (JIA *et al.*, 2013; KOZARSKI *et al.*, 2011).

No trabalho de Dutta *et al.* (2018), a qual submeteu-se o manitol puro ao método de sequestro do radical DPPH (HAZRA *et al.*, 2010; MAHAKUNAKORN *et al.*, 2004), obteve-se um resultado similar ao EASP (teor de 71,86% de manitol), precisando cerca de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para inibição de 50% dos radicais livre de DPPH. Esse resultado corrobora com a quantificação de manitol feita por CLAE no EASP, uma vez que suas atividades antioxidantes se mostraram bastante similares. Os muitos compostos fenólicos presentes nos extratos, principalmente para o EEAb, conseguiram estabilizar de forma mais eficaz os radicais livres na molécula de DPPH, ocasionando assim sua maior estabilidade. O mecanismo de inibição do radical DPPH pelos compostos fenólicos presentes nos extratos pode ser sugerido de acordo com a Figura 10, onde A-H representa os compostos fenólicos com diposição da doação de um átomo de hidrogênio radicalar presentes nos extratos.

Figura 10 - Representação da reação de inibição do radical livre do DPPH



Fonte: adaptada de CHIM ACTIVE (2018).

Geralmente, ocorre a doação de elétrons ou de um hidrogênio radicalar por parte dos fenólicos para ocasionar a inibição do radical DPPH. No trabalho de Popescu *et al.* (2017) foi preparado um extrato aquoso do cogumelo *A. brasiliensis* sendo avaliado seu potencial antioxidante frente ao radical de DPPH. O resultado obtido para o CE_{50} (mg mL^{-1}) do extrato foi de $1,3727 \pm 0,2641$, resultado esse menos efetivo em comparação aos dos extratos deste trabalho. Essa diferença pode ser relacionada pelas quantidades dos metabólitos nos extratos (o que reduziu sua atividade), bem como na forma como os autores prepararam seu extrato. Os mesmos foram preparados a partir de 5 g de cogumelo aquecido em condensador de refluxo com 100 mL de água por 15 min. Talvez o volume de solvente e tempo na metodologia utilizada possa ter ocasionado uma supersaturação da solução muito rápida, impedindo assim o arraste de mais compostos fenólicos pela solução (POPESCU *et al.*, 2017).

Gan *et al.* (2013) trabalhando com extratos de *A. brasiliensis*, obteve CE_{50} (mg mL^{-1}) para seus extratos etanólicos (60%) e aquoso de $1,67 \pm 0,21$ e $3,80 \pm 0,72$ respectivamente. Gan *et al.* (2013) utilizou uma metodologia bastante similar à de Popescu *et al.* (2017), partindo de 5 g de amostras em agitação com 100 mL de metanol, à temperatura ambiente e a rotação de 130 rpm por 24 h. O fato de não ter utilizado a temperatura na obtenção dos extratos pode ter proporcionado uma redução no arraste de muitas substâncias presente no cogumelo. No presente trabalho, a não utilização de temperatura foi comutado pela quantidade de tempo (7 dias) em que o material ficou sob agitação constante com o solvente extrator, bem como pela quantidade de volume da mistura de solventes (1 L), permitindo assim uma maior interação das substâncias presente no cogumelo com a solução.

Huang e Mau, (2006) trabalharam com diversos extratos metanólicos de *A. brasiliensis* sob influência de radiação- λ , visando analisar se a quantidade de kGy influiria sobre a atividade antioxidante dos extratos nos radicais DPPH. O estudo não demonstrou nenhuma relação direta, porém foi citado pelo autor que alguns legumes como repolho chinês, algumas espécies de trufas e a soja tiveram diminuição de seus compostos fenólicos quando submetidos a radiação. Foi observado valores de CE_{50} (mg mL^{-1}) bastante similares para seus extratos, sendo o valor de $0,26 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ para o extrato que não foi submetido a nenhuma espécie de radiação. Esse valor relatado foi bastante similar ao obtido no EASP do presente trabalho.

Carvajal *et al.* (2012), analisou extratos etanólicos (70%), feitos a partir dos corpos de frutificação, micélios ‘jovens’ e micélios ‘velhos’ do cogumelo *A. brasiliensis*. Seus resultados de CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) mostraram-se bastante eficientes quanto as inibições dos radicais DPPH, sendo eles 305 ± 14 para os corpos de frutificação, 1413 ± 52 para os micélios ‘jovem’ e 599 ± 35 micélios ‘velhos’. Tais valores de CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) se mostraram bastante diferentes da literatura e também do presente trabalho. Acerca dos trabalhos analisados, observou-se valores bastantes similares em cada trabalho, tendo uma discrepância maior de valores de CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) apenas para o trabalho de Carvajal *et al.* (2012). Os extratos do cogumelo *A. brasiliensis* mostraram uma boa atividade antioxidante em diferentes extratos e formas de obtenção dos mesmos.

No trabalho de Veerappan *et al.* (2018) a qual utilizou-se um extrato metanólico de *A. brasiliensis* foi observada apoptose induzida em células de neuroblastoma (SH-SY5Y), a qual se justificou pela eficácia da atividade antioxidante do cogumelo, ocorrendo o mesmo no trabalho de Sá-Nakanishi (2014), que administrou extrato aquoso dessa mesma espécie e observou a proteção do cérebro de ratos idosos contra o estresse oxidativo. Além desses,

muitos outros trabalhos realizados com a espécie demonstram que essa boa atividade antioxidante é uma das principais responsável para êxito em testes como o de artrite reumatoide (SOUZA *et al.*, 2018), diabetes mellitus (YURKIV *et al.*, 2015), doença de Crohn e colite ulcerosa (THERKELSEN *et al.*, 2016b), hepatoprotetora (AL-DBASS; AL-DAIHAN; BHAT, 2012) e as que envolvem o processo de estresse oxidativo (HAKIME-SILVA *et al.*, 2013), dentre outros.

5.9.2 Capacidade de quelação do íon ferroso

O ensaio de capacidade de quelante de ferro foi utilizado para avaliar a capacidade de formação de complexos de ferro²⁺ com os compostos fenólicos presente nos extratos (EEAb, EAAb e EASP). O padrão EDTA mostrou-se bastante efetivo em complexar os íons ferrosos, obtendo um baixíssimo valor necessário de material ($0,0031 \pm 0,00015$) para complexar os íons ferrosos em solução. A atividade quelante de ferro mais forte para os extratos, foi observada na concentração de 4 mg mL^{-1} (96,75%) para o EEAb, enquanto a concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, para o mesmo apresentou a menor atividade (12,97%).

Para o EAAb obteve-se um percentual médio de atividade de quelação de 92,77% para concentração de 4 mg mL^{-1} e 12,01% para concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. O EASP não apresentou bons resultados para o teste, tendo uma baixa capacidade de quelação para a concentração mais elevada (4 mg mL^{-1}), obtendo um percentual de quelação de 30,69% enquanto para menor concentração ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) um percentual de 4,64%.

O ácido ascorbico não obteve resultados muito satisfatórios para a atividade de quelação do íon ferroso, tendo como percentual quelante para a maior concentração (4 mg mL^{-1}) apenas o valor de 12,03%, resultado bastante similar a quelação das menores concentrações do EEAb e EAAb. Para sua menor concentração ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) evidenciou-se uma quelação média de 4,48% de íons Fe^{2+} . O EEAb e EAAb apresentaram melhores resposta para este método em comparativo com o mesmo, a qual já possui boa atividade antioxidante em outros ensaios relatados na literatura (MURIPITI *et al.*, 2019). Resultados esses podem ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Capacidade de quelação do íon ferroso de extratos de *Agaricus brasiliensis*

Amostras	Capacidade de quelação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EDTA (Padrão)	0,0031 \pm 0,00015
Ácido ascórbico	7214,65 \pm 592,84
EEAb	619,25 \pm 1,59
EAAb	675,14 \pm 1,82
EASP	2206,45 \pm 14,07

Fonte: Próprio autor.

Sabe-se que os flavonoides são as principais classes de compostos que reagem com os íons metálicos ocasionando a formação de complexos metálicos através de processos redox (KASPRZAK; ERXLEBEN; OCHOCKI, 2015), dessa forma houve coerência para os resultados, tendo em vista que o EEAb apresentou maiores teores de fenóis e flavonoides, seguido dos EAAb e EASP, respectivamente.

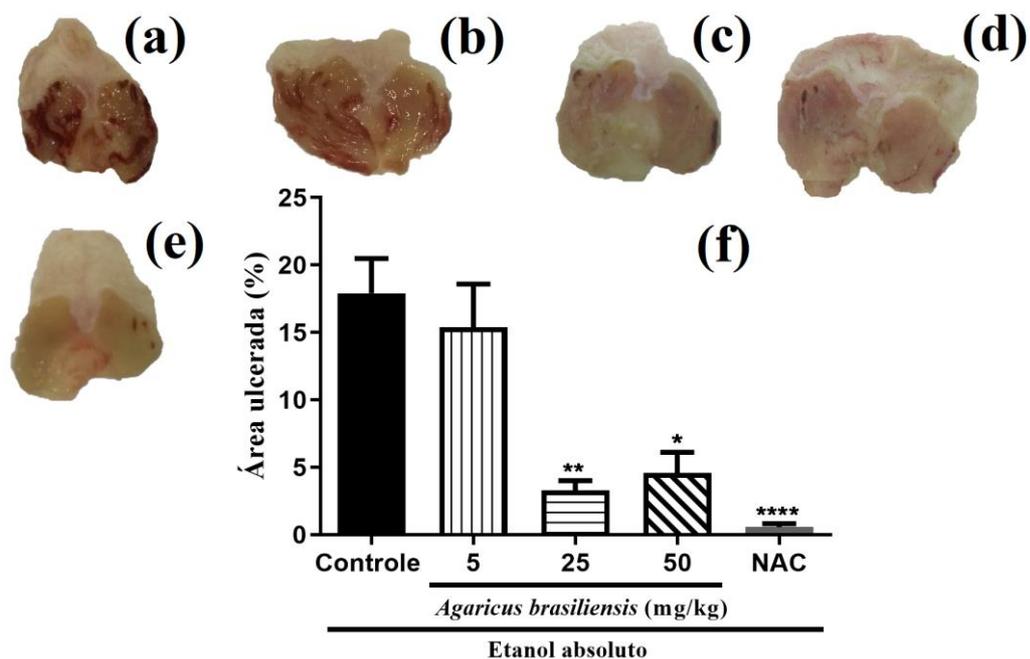
No trabalho de Carvajal *et al.* (2012) a qual trabalharam com três extratos hidroetanólicos (70%) de *A. brasiliensis* (micélios maduros, micélios novos e micélios antigos), apresentaram resultados similares ao do presente trabalho, sendo eles 1002 \pm 67 ($\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,325 \pm 89 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e 438 \pm 34 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os micélios maduros, micélios novos e micélios antigos, respectivamente. Além disso, com a estrutura e conformação dos α -glucanos bem elucidado por Zhang *et al.* (2018) e os β -glucanos extraídos do ABM, pode-se sugerir que ambos os polissacarídeos atuaram em sinergismo com manitol (e demais metabólitos secundários presentes no EEAb), proporcionando resultados satisfatórios, assim como os observados por outros autores para atividade antioxidante e capacidade quelante de íons ferrosos (WEI *et al.*, 2019; KOZARSKI *et al.*, 2011; KOZARSKI *et al.*, 2014). O EEAb demonstrou ser o mais promissor dos extratos estudados, sendo este escolhido para avaliação da atividade gastroprotetora nas doses de 5 mg kg⁻¹ (EEAb-5), 25 mg kg⁻¹ (EEAb-25) e 50 mg kg⁻¹ (EEAb-50) (doses baseadas em estudos da literatura, Sui *et al.* (2010), Xin. (2019) e Nakajima *et al.* (2002).

5.10 Investigação do efeito gastroprotetor do EEAb no modelo experimental de úlcera gástrica

5.10.1 EEAb reduz de forma dose-dependente as lesões gástricas

A administração de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica, as quais foram reduzidos nos animais pré-tratados com EEAb (25 e 50 mg kg⁻¹), de uma forma dose-dependente 75-81%. A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração do EEAb, por via oral nas doses de 25 mg kg⁻¹ (3,28 ± 0,72 %, p <0,01) e 50 mg kg⁻¹ (4,60 ± 1,51%, p <0,05). Com a dose de 5 mg kg⁻¹ (15,39 ± 3,20%) não foram observados efeitos significativos para o tratamento. A N-acetilcisteína (NAC, 300 mg kg⁻¹) (0,57 ± 0,11%, p <0,0001), utilizado como fármaco de referência, também reduziu significativamente as lesões gástricas em 95%, quando comparados com o grupo controle (17,91 ± 2,56%) (FIGURA 11).

Figura 11 - Representação das médias ± E.P.M das percentagens das áreas gástricas ulceradas para os grupos



Os valores foram apresentados como média ± EPM da superfície das áreas ulceradas. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do Teste de Tukey. Onde: * p <0,05 vs controle; a) Estômago tratado apenas com etanol absoluto; b) Estômago tratado com a dose de 5 mg kg⁻¹; c) Estômago tratado com a dose de 25 mg kg⁻¹; d) Estômago tratado com a dose de 50 mg kg⁻¹; e) Estômago tratado com o NAC 300 mg kg⁻¹; f) área das lesões gástricas (%).

Fonte: Próprio autor.

Shaik, (2018) em estudos com extrato metanólico de *A. bisporus* nas doses de 250 e 500 mg kg⁻¹ também foi observado resultados significativos no tratamento de úlceras gástricas induzidas pela ligadura do piloro em ratos. Ao comparar esses resultados (desse cogumelo do mesmo gênero) com o presente estudo, nota-se que uma dose menor de EEAb (cerca de dez vezes) foi necessária para obter respostas significativas no tratamento das úlceras gástricas. O mesmo ocorre no trabalho de Padilha *et al.* (2009), que estudaram dois extratos de ABM (aquoso e alcalino) na dose de 400 mg kg⁻¹ por 15 dias, obtiveram diminuição da ulceração em 21,88% e 28,63%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Comparado com o presente estudo, o EEAb-25 apresentou maior redução na ulceração e diminuição na dose (cerca de dezesseis vezes) para demonstrar diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Resultados semelhantes foram obtidos em vários estudos que investigaram o potencial efeito gastroprotetor de extratos de cogumelos contra úlceras gástricas induzidas por etanol (XIN *et al.*, 2019; JEONG *et al.*, 2019). No entanto, em nosso estudo, a dose eficaz na proteção do dano gástrico induzidas pelo etanol foram significativamente menores do que nos outros estudos relatados acima. Além disso, a composição química do extrato, pode ter potencializado seu efeito antiulcerogênico, uma vez que estudos mostram a estreita relação entre o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio e a ocorrência de lesão gástrica (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

Gharzouli *et al.* (2001) demonstrou que a ação gastroprotetora do manitol (majoritário no EEAb) tem relação diretamente proporcional com o aumento da osmolaridade luminal. Isso se deve ao aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, o que pode reverter os efeitos necróticos gerados por agentes agressivos que desencadeiam úlceras. Além disso, um estudo clínico com vinte e cinco indivíduos descobriu que a incorporação de manitol em bebidas alcoólicas pode prevenir danos causados por espécies radicais geradas pelo consumo excessivo de álcool. Esta droga demonstrou um efeito hepatoprotetor contra administração de etanol em ratos, cujos biomarcadores de dano hepático foram significativamente reduzida e as enzimas antioxidantes endógenas aumentadas (CHIGURUPATI *et al.*, 2016). Tais resultados mostraram que o manitol pode reverter os efeitos deletérios agudos e crônicos causados pelo etanol, sendo este o principal atuante na gastroproteção apresentada no EEAb.

5.10.2 EEAb reduz os escores dos parâmetros histopatológicos de lesão gástrica

Os resultados referentes as análises histopatológicas da mucosa gástrica dos camundongos estão demonstrados na Tabela 9. Os animais pré-tratados com EEAb (25 e 50 mg kg⁻¹, v.o.) (FIGURA 12) apresentaram grande diferença macroscópica e microscópica da mucosa gástrica lesada, evidenciando a gastroproteção, quando comparado ao controle tratado apenas com o etanol (FIGURA 12). Para este grupo foi observada lesão severa caracterizada por dano hemorrágico, edema, perda de células epiteliais e presença de células inflamatórias. O pré-tratamento com NAC-300 também inibiu o dano induzido por etanol na dose testada (FIGURA 12).

A Tabela 9 apresenta os resultados dos somatórios dos escores de todos os parâmetros histopatológicos avaliados, ou seja, da hemorragia (0-4 escores), do edema (0-4 escores), da perda de células epiteliais (0-3 escores) e do infiltrado inflamatório (0-3 escores). Verifica-se que o EEAb (25 e 50 mg kg⁻¹) diminuíram, significativamente, os efeitos do etanol sobre esses parâmetros, de forma semelhante ao NAC-300.

A partir das análises histopatológicas apresentadas na Tabela 9, infere-se que o uso do etanol absoluto se mostrou efetivo na promoção das ulcerações gástricas, o que pode ser evidenciado a partir da presença de edema e danos hemorrágicos, que estão estreitamente vinculados ao processo inflamatório (controle) (FIGURA 12). Ademais, verifica-se destruição de células epiteliais, que está atrelada à perda da função tecidual. Isso se deve ao fato de que o etanol aumenta a expressão de óxido nítrico sintase, bem como diminui a secreção de muco e bicarbonato, além de promover alterações na fisiologia celular (BOUTEMINE *et al.*, 2018).

O surgimento das úlceras gástricas estão associados a um desequilíbrio entre fatores agressivos e protetores do estômago, onde fatores prejudiciais [secreção de ácido clorídrico e pepsina, estresse, espécies de oxigênio (ROS), anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e *H. pylori*], destacam-se do sistema de defesa da mucosa gástrica [barreira mucobicarbonato, prostaglandinas (PG), fluxo sanguíneo da mucosa, reservas de sistemas antioxidantes, níveis adequados de óxido nítrico (NO)] (JEONG *et al.*, 2019; ZAKARIA *et al.*, 2016).

Tabela 9 - Escores das alterações histopatológicas na mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol, pré-tratados ou não com EEAb e NAC

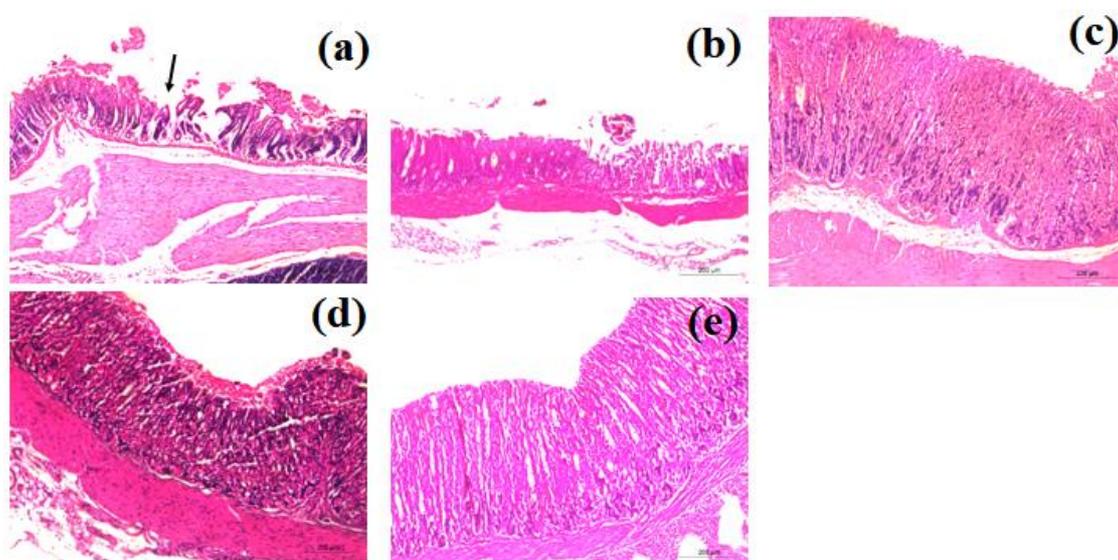
Grupo Experimental	Perda de Células Epiteliais (escores 0-3)	Edema (escores 0-4)	Hemorragia (escores 0-4)	Células Inflamatória (escores 0-3)	Total (escores 0-14)
Controle (Etanol P.A)	2,9 (2 – 3)	2,5 (2 – 3)	2 (2 – 4)	0 (0 – 1)	7,4
EEAb-5	2,5 (1 – 3) ^{ns}	2,5 (2 – 3) ^{ns}	2 (2 – 3) ^{ns}	0 (0 – 0) ^{ns}	7
EEAb-25	1,1 (0 – 2) ^{***}	1 (1 – 2) ^{****}	1 (0 – 2) ^{****}	0 (0 – 0) ^{ns}	3,1
EEAb-50	1 (0 – 2) ^{***}	1 (1 – 2) ^{****}	1 (0 – 2) ^{***}	0 (0 – 0) ^{ns}	3
NAC-300	0 (0 – 0) ^{****}	1 (1 – 1) ^{***}	0,5 (0 – 1) ^{****}	0 (0 – 0) ^{ns}	1,5

Os animais foram tratados oralmente com veículo (salina a 0,9% v.o.), *Agaricus brasiliensis* (5, 25 e 50 mg kg⁻¹, v.o.), ou N-acetilcisteína (NAC 300 mg kg⁻¹, v.o.), 60 min antes da administração de etanol (0,2 mL, v.o.). As alterações histopatológicas da porção glandular dos estômagos foram avaliadas de acordo com os critérios descritos por Laine e Weinstein (1988): 1- Edema (score 0-4), 2 – dano Hemorrágico (score 0-4), e 3 – perda de Células epiteliais (score 0-3). Os resultados são apresentados como mediana, com valores máximos e mínimos mostrados entre parênteses (n = 8), p < 0,05 vs controle.

Fonte: Próprio autor.

Outro fator crítico na patogênese das úlceras gástricas é a ingestão de álcool. O etanol absoluto foi considerado um potente agente agressor da mucosa gástrica, capaz de interromper a formação do muco gástrico, o que culmina em distúrbio da mucosa epitelial superficial, início do estresse oxidativo, inibição da produção de prostaglandinas, diminuição do fluxo sanguíneo, degranulação das células, necrose celular e, portanto, a úlcera gástrica (CERQUEIRA *et al.*, 2012; JEONG *et al.*, 2019; ZAKARIA *et al.*, 2016). Como a fisiopatologia da úlcera gástrica induzida por etanol envolve múltiplos fatores, estima-se que o mecanismo de proteção gástrica EEAb envolve pelo menos três fatores distintos: redução do estresse oxidativo, redução da expressão de mediadores inflamatórios e aumento da osmolaridade luminal. Concomitantemente, há relatos no literatura que os β -glucanos também conseguiram reverter o quadro ulcerativo efeito induzido pelo etanol (CHEN *et al.*, 2019). Desta forma, os glucanos presentes no extrato podem ter atuado em sinergismo com o manitol potencializando seu efeito gastroprotetor.

Figura 12 - Efeito do EEAb sobre a mucosa gástrica dos camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol



Efeito do EEAb (5, 25 e 50 mg kg⁻¹) e NAC (300 mg kg⁻¹) sobre a mucosa gástrica de camundongos submetidos às lesões gástricas induzidas por etanol: a) mucosa gástrica tratada apenas com etanol absoluto; b) mucosa gástrica tratada com EEAb-5; c) mucosa gástrica tratada com EEAb-25; d) mucosa gástrica tratada com EEAb-50; e e) mucosa gástrica tratada com NAC-300.

Fonte: Próprio autor.

Os grupos pré-tratados com as doses de EEAb-25 e EEAb-50 foram capazes de inibir a lesão ulcerativa induzida por etanol à semelhança do NAC-300, fármaco de referência. A partir da análise da Figura 12, verifica-se a manutenção da integridade celular, ausência de

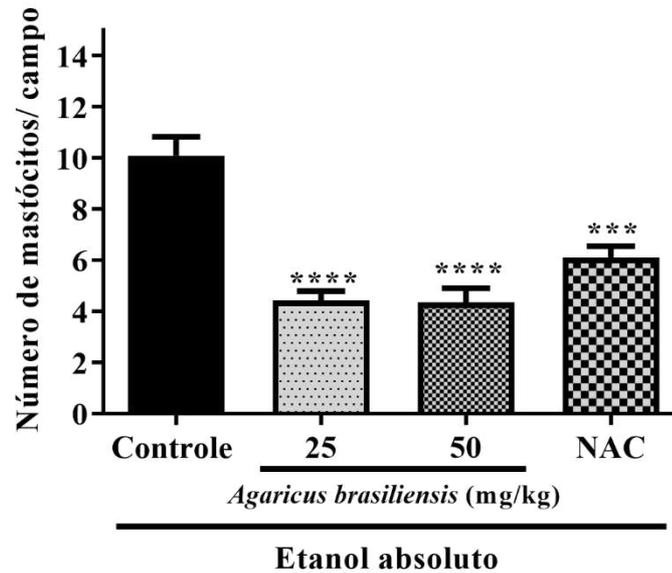
sinais inflamatórios e a preservação das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida *et al.* (2019) e Sagun (2017), que investigaram o potencial efeito gastroprotetor de extratos vegetais contra a úlcera gástrica induzida por etanol. Desse modo, estima-se que o EEAb apresentou um potencial efeito gastroprotetor de modo dose-independente relacionado aos metabólitos secundários putativamente identificados, ao manitol (composto majoritário) e a presença das glucanas (polissacarídeos) para espécie *A. brasiliensis*. Segundo Silva, Mantovanini e Zingaretti, (2015) a β -glucana promove a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β , além de estimular a função fagocitária, expressão de moléculas de adesão e a resposta imune celular.

Ademais, tem-se que a composição química do EEAb foi potencializada uma vez que estudos demonstram a estreita relação entre o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio e a ocorrência da lesão gástrica. Deste modo, a presença de metabólitos com ação antioxidante foi capaz de minimizar as alterações teciduais promovidas pelo etanol através da inibição do estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2016; MAHMOUD; EL-GHFFAR, 2019; SIDAHMED *et al.*, 2019).

5.10.3 EEAb reduz o número de mastócitos na submucosa de estômagos de camundongos

A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (água salina, v.o.), produziu um aumento significativo no número de mastócitos na mucosa gástrica (tecido conjuntivo) ($10,1 \pm 0,74$) quando comparados a todos os demais grupos testados. A quantidade de mastócitos foi significativamente diminuída com a administração prévia do EEAb-25 (v.o.) ($4,41 \pm 0,37$, $p < 0,0001$) e EEAb-50 (v.o.) ($4,36 \pm 0,54$, $p < 0,0001$). O NAC-300 ($6,11 \pm 0,45$, $p < 0,001$), utilizada como fármaco de referência, também reduziu significativamente a quantidade de mastócitos na mucosa gástrica (FIGURA 13). Não foi continuado o estudo com a dose de EEAb-5 uma vez que ela não apresentou atividade gastroprotetora.

Figura 13 - Efeito do tratamento com EEAb na mastocitose da mucosa gástrica



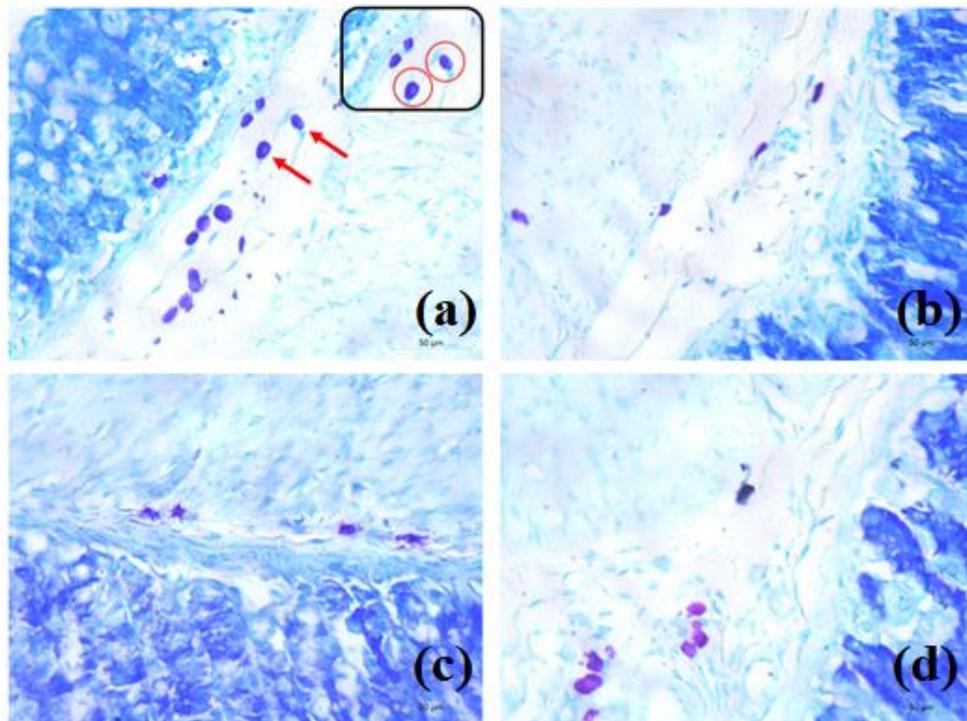
Os valores foram apresentados como média \pm EPM do número de mastócitos por 10 campos seguidos. Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey. Onde * $p < 0,05$ vs controle.

Fonte: Próprio autor.

Os mastócitos por serem células patognomônicas da úlcera péptica, apresentam em sua superfície receptores com especificidade para o anticorpo IgE, a qual implicaram em reações de hipersensibilidade imediata e bastante evidenciado no grupo controle tratado com o etanol (FRENZEL; HERMINE, 2013). A desgranulação mastocitária promove a liberação de mediadores pré-formados, como histamina e fator de agregação plaquetária (PAF), bem como mediadores neoformados, como prostaglandinas e leucotrienos, que promovem efeito direto na musculatura lisa dos vasos. Além disso, a histamina, promove o aumento da liberação de ácido clorídrico (HCl) de forma indireta, por agir em seus receptores do tipo H_2 , corroborando para o agravamento das lesões gástricas (HSIEH, 2018).

Diante disso, estima-se que a diminuição do número de mastócitos relaciona-se com o efeito gastroprotetor. O EEAb, nas duas doses, promoveu redução significativa dessas células nos tecidos gástricos avaliados, sendo sua ação de forma dose-independente, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as dosagens de 25 mg kg^{-1} e 50 mg kg^{-1} . A Figura 14 mostra a representação média de mastócitos por campo de cada grupo, sendo possível ver a conformação de tal célula (circular) e sua coloração (roxa) após fixação nas lâminas histológicas.

Figura 14 - EEAb reduz o número de mastócitos na mucosa gástrica induzida por etanol



Redução do número de mastócitos na mucosa gástrica dos camundongos no teste de úlcera gástrica induzida por etanol: a) mucosa gástrica tratada apenas com etanol absoluto; b) mucosa gástrica tratada com EEAb-25; c) mucosa gástrica tratada com EEAb-50; d) mucosa gástrica tratada com NAC 300 mg kg⁻¹. Os painéis foram obtidos na escala de 50 µm (40x).

Fonte: Próprio autor.

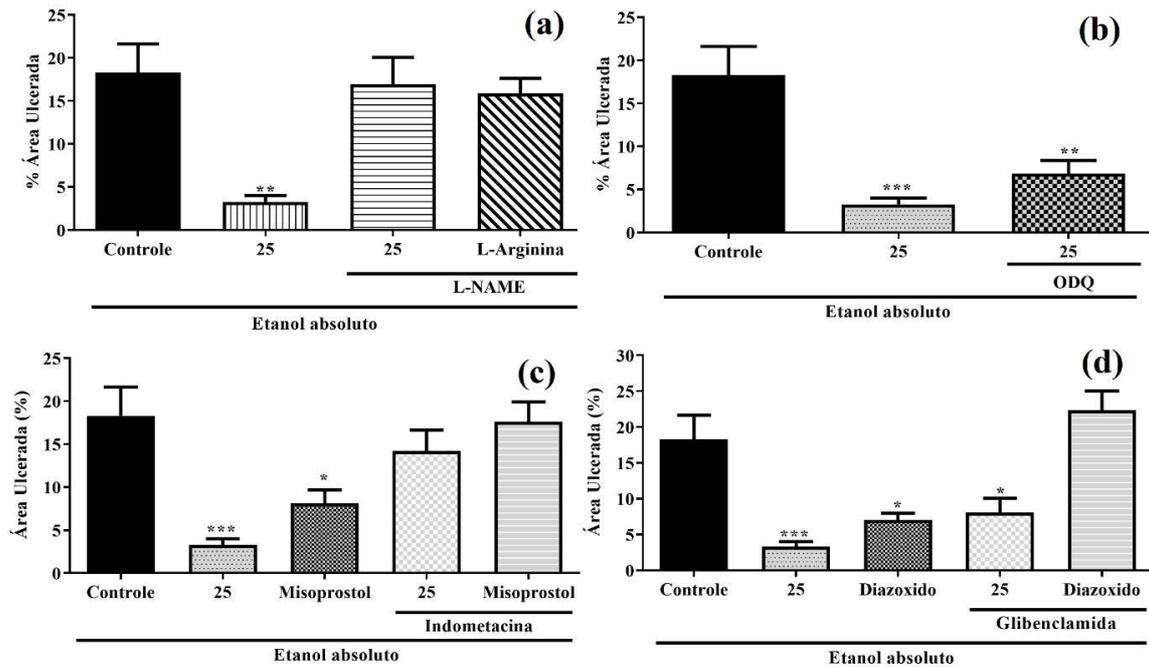
Sulaieva, Deliy e Zharikov, (2015) demonstraram a estreita relação entre a presença de leucócitos no local ulcerado e o risco de hemorragia, pois a passagem dessas células para o local de inflamação, principalmente mastócitos, relaciona-se com o pior prognóstico da lesão péptica, uma vez que a desgranulação mastocitária promove o aumento da permeabilidade vascular, liberação dos mediadores inflamatórios e vasodilatação, aumentando o risco de eventos hemorrágicos. Assim, o dano ocasionado na mucosa pelo etanol absoluto teve diminuição do número de mastócitos quando tratado com EEAb e NAC-300 (Figura 14) possivelmente interferindo na necrose e *feedback* de dano tecidual, resultante da degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina no tecido lesado (SILVA *et al.*, 2018b).

5.10.4 Efeito gastroprotetor do EEAb-25 e possíveis mecanismos de ação

A partir dos resultados obtidos ficou demonstrado a atividade gastroprotetora do EEAb, sendo escolhido a dose de 25 mg kg⁻¹ para um estudo mais aprofundado. Partindo dessa

prerrogativa, utilizou-se o EEAb-25 na avaliação das possíveis *vias* relacionadas à fisiopatologia da úlcera gástrica (óxido nítrico, GMPc, prostaglandinas e canais de K^+_{ATP}), na tentativa de elucidar os seus possíveis mecanismos de ação. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos após a averiguação dessas *vias* no efeito gastroprotetor do EEAb-25.

Figura 15 - Possíveis *vias* de atuação na gastroproteção do EEAb-25



Para a análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido de Teste de Tukey. Onde * $p < 0,05$ vs controle. As *vias* testadas foram: (a) óxido nítrico; (b) monofosfato cíclico de guanosina (GMPc); (c) prostaglandinas e (d) canais de K^+_{ATP} .

Fonte: Próprio autor.

Para análise da *via* relacionada ao óxido nítrico (NO), observou-se que a administração do etanol absoluto produziu grande porcentagem de área gástrica ulcerada ($18,31 \pm 3,31\%$) aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (água salina, v.o.). A área gástrica ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia do EEAb-25 (v.o.) ($3,28 \pm 0,72\%$, $p < 0,01$) quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. O efeito gastroprotetor do EEAb-25 foi revertido pela administração prévia de L-NAME (10 mg kg^{-1}), i.p, um inibidor da síntese de NO, ($16,93 \pm 3,14\%$). A administração de L-NAME reverteu o efeito gastroprotetor da L-arginina na dose de 600 mg kg^{-1} , i.p. ($15,89 \pm 1,75\%$) (FIGURA 15a), que é conhecido por ser um agonista desta *via*. Assim, estima-se que o efeito gastroprotetor do EEAb-25 envolve mecanismos moleculares relacionados à *via* do NO uma vez que a dose de extrato testada apresentou efeito similar ao agonista da *via* testada.

De acordo com a literatura, a atividade do óxido nítrico sintase é um importante marcador do processo inflamatório, haja vista que se relaciona intimamente com o processo de infiltração leucocitária, devido a sua ação vasodilatadora (RATH *et al.*, 2014). No trabalho de Batra, Sharma e Khajuria, (2013), a qual fizeram um levantamento bibliográfico a respeito da espécie *Ganoderma lucidum* (cogumelo do imperador), observou-se a ativação dos macrófagos por componentes auxiliares na liberação de citocinas, óxido nítrico (NO) e outros mediadores. Fatores esses que contribuíram para uma melhor resposta no efeito gastroprotetor.

No trabalho de Yi *et al.* (2015) foi observado que os polifenóis presentes no extrato aquoso de Dragon-pearl proporcionaram o aumento dos níveis de PGE2 e NO, a qual promoveram uma resposta gastroprotetora devido ocasionarem um aumento na microcirculação da mucosa gástrica, redução dos radicais livres de oxigênio assim como o fortalecimento da função da barreira mucosa. Com base nos resultados obtidos (FIGURA 15a), estima-se que a atuação do EEAb-25 na *via* do NO, envolvida assim como para a espécie citada acima, ocasiona uma diminuição da lesão gástrica na mucosa dos camundongos pelo aumento da vasodilatação quando utilizado o agente agressor etanol.

A partir da avaliação do papel da *via* do NO no efeito gastroprotetor do EEAb, investigou-se o papel do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Um dos mecanismos de atuação na *via* do NO na vasodilatação ocorre por estimular a enzima guanilato ciclase, que aumenta a concentração de GMPc intracelular. No intuito de demonstrar que a dependência do NO no efeito gastroprotetor (EEAb-25) ocorre devido ao efeito vasodilatador, decidimos investigar se ao bloquearmos o GMPc este efeito seria também bloqueado. Para isto utilizamos o ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- a]quinoxalin-1-one), a qual é um inibidor da guanilato ciclase que se liga irreversivelmente ao grupamento HEME da enzima, competindo assim com o NO por este sítio de ligação (DORIS; EVANTHIA; MICHAEL, 2016; GARTHWAITE, 2010).

O grupo tratado com EEAb-25 (v.o.) apresentou uma inibição significativa de área lesionada percentual de $3,28 \pm 0,72$ % ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle $18,31 \pm 3,33$ %, tratado apenas com etanol absoluto (FIGURA 15b). O grupo pré-tratado com ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase, não inibiu a ação protetora do EEAb-25 ($6,35 \pm 1,20$ %, $p < 0,01$) de forma significativa quando comparado como grupo controle (FIGURA 15b), demonstrando assim a não dependência da ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO para a manutenção do efeito gastroprotetor do extrato.

Na investigação do EEAb-25 na *via* das prostaglandinas foi realizado um pré-

tratamento com indometacina, além de se fazer um comparativo com um fármaco agonista da *via*, o misoprostol (FIGURA 15c). Conforme descrito antes, as úlceras induzidas por etanol foram significativamente reduzidas pelo tratamento prévio com o EEAb-25 ($3,28 \pm 0,72 \%$, $p < 0,01$), bem como pelo misoprostol, um análogo da PGE_1 ($8,14 \pm 1,55 \%$, $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($18,31 \pm 3,31 \%$). O efeito da dose de 25 mg kg^{-1} do EEAb foi significativamente aumentado pela administração de indometacina anterior ($14,23 \pm 2,40 \%$). Um resultado semelhante também foi demonstrado pela combinação de indometacina com o misoprostol ($17,63 \pm 2,28 \%$), em comparação com o grupo tratado apenas com misoprostol. Desta forma pode-se inferir que o EEAb-25 atua na *via* das prostaglandinas uma vez que ele se comportou de forma semelhante ao fármaco agonista da *via* (misoprostol).

A literatura relata que a diminuição dos níveis de prostaglandinas está relacionada a redução da produção de muco e bicarbonato pelas células caliciformes presentes na mucosa gástrica, o que culmina no aumento da secreção de ácido clorídrico e quimiotaxia de leucócitos, corroborando assim para o aumento do estresse oxidativo, um dos principais causadores do aumento de lesões gástricas (SIDAHMED *et al.*, 2019). Assim, o envolvimento no efeito gastroprotetor realizado pelo EEAb na mucosa gástrica está relacionado à regulação da síntese de prostaglandinas. Ademais, os componentes putativamente identificados no extrato, principalmente manitol, foram capazes de inibir a liberação de secreção gástrica, atuando na preservação de células epiteliais, bem como na proteção da mucosa gástrica.

Outros estudos que demonstram esses efeitos para tal *via* são os trabalhos de Minozzo *et al.* (2016) e Júnior *et al.* (2014), os quais trabalharam com extratos etanólicos (70% e 50%) de *Euphorbia umbellata* ($50\text{-}200 \text{ mg kg}^{-1}$) e *Croton campestris* ($50\text{-}750 \text{ mg kg}^{-1}$), respectivamente. Nestes estudos, foi observado o envolvimento das prostaglandinas no efeito gastroprotetor induzido por etanol e etanol acidificado para mesma ordem supracitada. As prostaciclina (PGI_2) e prostaglandinas E_2 (PGE_2) atuaram estimulando a secreção de muco e bicarbonato bem como o aumento do fluxo sanguíneo.

A *via* dos canais de K^+_{ATP} foram averiguados com o pré-tratamento de glibenclamida e diazóxido (FIGURA 15d). A administração de etanol absoluto aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (água salina, v.o.), produziu grande porcentagem de área ulcerada ($18,31 \pm 3,31 \%$). A área ulcerada pelo etanol foi significativamente diminuída com a administração prévia do EEAb-25 ($3,28 \pm 0,72 \%$, $p < 0,01$) e diazóxido (3 mg kg^{-1} , i.p.) ($6,98 \pm 1,01 \%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. A gastroproteção do EEAb-25 não foi revertida pela administração prévia de glibenclamida (10 mg kg^{-1}), i.p, droga bloqueadora de K^+_{ATP} ($8,07 \pm 1,98 \%$, $p < 0,05$). Quando comparada a

gastroproteção do diazóxido com administração prévia de glibenclamida foi possível ver que houve a reversão ($22,31 \pm 2,71\%$), podendo-se inferir assim que a atuação da gastroproteção do EEAb independe da *via* do Canal K^+_{ATP} , uma vez que o extrato não se comportou de forma semelhante ao fármaco agonista da *via* analisada.

Os canais de K^+_{ATP} estão envolvidos numa série de eventos fisiológicos, tais como: potencial da membrana celular, secreção de insulina, equilíbrio hemodinâmico, secreção gástrica, entre outros (SALES *et al.*, 2018). De acordo com a literatura, a ativação dos canais de K^+ sensíveis ao ATP promove efeito protetor frente a úlcera gástrica devido a inibição da ativação de neutrófilos, assim como depleção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROZZA *et al.*, 2014). Antonisamy *et al.* (2015) investigaram o efeito gastroprotetor do friedelin isolado do extrato hexânico das folhas de *Azima tetracantha* (35 mg kg^{-1}), e observaram que a *via* dos canais de K^+_{ATP} propiciaram a inibição da permeabilidade microvascular, ocasionando assim um efeito protetor a mucosa gástrica dos estômagos dos camundongos. Quanto aos resultados obtidos, pode-se observar que o EEAb-25 quando combinado com a glibenclamida conseguiu reter seu efeito, sugerindo que os princípios ativos do extrato não apresentavam mecanismos de ação protetora *via* canais de potássio dependentes de ATP, tendo em vista uma diferença significativa com o agonista da *via* (diazóxido).

Contudo, as prostaglandinas e o óxido nítrico desempenham um papel protetor vital na manutenção da integridade celular na mucosa através da estimulação da secreção de muco-bicarbonato, regulação da renovação e reparo das células da mucosa e inibição do recrutamento de leucócitos (ZAKARIA *et al.*, 2016). Nossos resultados convergem com resultados evidenciados em outros estudos com extratos ricos em açúcares e compostos fenólicos, como Sumbul *et al.* (2011), sugerindo que o extrato de *F. vulgaris* reduziu as lesões gástricas induzidas pelo etanol, devido às suas propriedades antioxidantes, e também por estimular a síntese de PGE2. Outros estudos propõem que as propriedades citoprotetoras de compostos naturais na resolução de úlceras gástricas estão associadas ao aumento da liberação de PGs e também mostraram que o extrato hidroetanólico de *A. brachypoda* (FARIA *et al.*, 2012), contendo flavonóides diméricos glicosilados, promove citoproteção e manutenção da homeostase gástrica devido à restauração dos níveis de PG e, conseqüentemente, produção de muco gástrico (ROCHA *et al.*, 2017).

Abdelwahab (2013) afirmou que o principal mecanismo de ação do ácido gálico, por exemplo, como agente antiulceroso se deve à promoção da proteção da mucosa por fatores endógenos (NO, PGE2 e fator de necrose tumoral- α), inibição da apoptose induzida pelo estresse oxidativo e liberação de histamina por mastócitos. Devido à gênese multifacetada da úlcera gástrica, com diversos agentes promotores e responsáveis pelo estabelecimento do estresse oxidativo e do processo inflamatório, torna-se difícil estabelecer apenas um mecanismo de ação responsável pela resolução deste problema. Assim, sugeri-se que o efeito gastroprotetor do HEAb está diretamente relacionado às vias do NO e das prostaglandinas e, portanto, diminuição da mastocitose, estresse oxidativo e inflamação no tecido lesado.

6. CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas para o preparo dos extratos do cogumelo *Agaricus brasiliensis* se mostraram bastante eficientes, uma vez que foram obtidos altos rendimentos para o EEAb (53,53%), EAAb (54,08%) e EASP (51,50%). Mediante a prospecção fitoquímica para identificação das principais classes de metabólitos secundários, bem como por meio do uso das técnicas de análise elementar (CHNS-O), UPLC-QTOF-MS^E, RMN (¹H, ¹³C e ¹³⁵DEPT), CCD e CLAE foram possíveis a identificação (qualitativamente, putativamente e estruturalmente) do ácido málico, ácido piroglutâmico, *L*-agaritina, *L*-valina e manitol nos extratos estudados. O manitol foi o composto majoritário encontrado nos extratos, sendo este quantificado, apresentando os teores de 40,81 ± 0,74%, 31,25 ± 1,25% e 73,10 ± 0,24% para os EEAb, EAAb e EASP, respectivamente. Os teores de fenóis (mg EAG/g) e flavonoides (mg EQ/g) totais corroboraram (89,23 ± 2,56 e 14,33 ± 0,07 para o EEAb, 60,17 ± 3,92 e 9,37 ± 0,18 para o EAAb e 55,04 ± 1,48 e 8,11 ± 0,18 para o EASP, respectivamente) com as boas atividades antioxidantes (117,04 ± 0,76 µg mL⁻¹, 156,95 ± 4,80 µg mL⁻¹ e 290,98 ± 6,77 µg mL⁻¹ para os EEAb, EAAb e EASP, respectivamente) e de quelação do íon ferroso (619,25 ± 1,59 para o EEAb, 675,14 ± 1,82 para o EAAb e 2206,45 ± 14,07 para o EASP, respectivamente) para os extratos em estudo.

Mediante os resultados mais promissores, o EEAb foi escolhido para o teste de úlcera gástrica nas doses de 5, 25 e 50 mg kg⁻¹, assim como avaliar as possíveis *vias* de atuação. O EEAb nas doses de 25 e 50 mg kg⁻¹ apresentaram boa resposta gastroprotetora no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto, de forma similar a N-acetilcisteína (300 mg kg⁻¹). A dose de 25 mg kg⁻¹ do EEAb foi escolhida para o estudo das *vias* apresentando modulação/atuação nas *vias* do óxido nítrico (NO) e das prostaglandinas. Desta forma, conclui-se diante de todos os resultados obtidos neste trabalho que o EEAb apresentou atividade gastroprotetora devido a redução do estresse oxidativo, redução dos parâmetros histopatológicos e diminuição da mastocitose, por meio dos seus metabólitos secundários atuarem nas *vias* do óxido nítrico (ocasionando vasodilatação) e das prostaglandinas (favorecendo a produção de muco e bicarbonato).

Ademais, são necessários estudos sobre o possível envolvimento dos polissacarídeos do *Agaricus blazei* Murill, uma vez que esses biopolímeros podem ter contribuído para a gastroproteção. Além disso, o EEAb torna-se uma possibilidade de incorporação em diversas formulações farmacêuticas (comprimidos, emulsões, suspensões, etc.) para atuação como tratamento preventivo de úlceras gástricas.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S. I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. **International Immunopharmacology**, Jazan, v. 16, n. 2, p. 296-305, 2013. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.04.005
- ADEBAYO, E. A.; OLOKE, J. K.; AYANDELE, A. A.; ADEGUNLOLA, C. O. Phytochemical, antioxidante and antimicrobial assay of mushroom metabolite from *Pleurotus pulmonarius*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Ogbomoso, v.2, n. 2, p. 366-374, 2012.
- AHAD, S.; TANVEER, S.; MALIK, T. A. Bioactive potential of wild edible mushrooms and need for their conservation. **Journal of Yeast and Fungal Research**, Srinagar, v. 5, n. 9, p. 110-118, 2014. DOI: 10.5897/JYFR2014.0138
- AHANGARPOUR, A.; SAYAHI, M.; SAYAHI, M. The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, Ahvaz, v. 13, p. 854-857, 2019. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.11.051
- AHMAD, A. A.; KASIM, K. F.; MARADZI, A. H.; GOPINATH, S. C. B. Peptic ulcer: Current prospects of diagnostic and nanobiotechnological trends on pathogenicity. **Process Biochemistry**, Perlis, v. 85, p. 51-59, 2019a. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.06.024
- AHMAD, N.; SAHRIN, N.; TALIB, N.; GHANI, F. S. A. Characterization of energy content in food waste by using thermogravimetric analyser (TGA) and elemental analyser (CHNS-O). **Journal of Physics: Conference Series**, Penang, v. 1349, p. 012140, 2019b. DOI: 10.1088/1742-6596/1349/1/012140
- AHMED, E.; ARSHAD, M.; KHAN, M. Z.; AMJAD, M. S.; SADAF, H. M.; RIAZ, I.; SABIR, S.; AHMAD, N.; SABAOON. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Rawalpindi, v. 6, n. 2, p. 205-214, 2017.
- AHNERT, S.; DICKHOEFER, U.; SCHULZ, F.; SUSENBETH, A. Influence of ruminal Quebracho tannin extract infusion on apparent nutrient digestibility, nitrogen balance, and urinary purine derivatives excretion in heifers. **Livestock Science**, Kiel, v. 177, p. 63-70, 2015. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.04.004
- AKIYAMA, H.; ENDO, M.; MATSUI, T.; KATSUDAI; EMI, N.; KAWAMOTO, Y.; KOIKE, T.; BEPPU, H.; Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. **Biochimica et Biophysica Acta**, Toyooka, v. 1810, n. 5, p. 519-525, 2011. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.02.010
- ALAMGIR, A. N. M. Cultivation of Herbal Drugs, Biotechnology, and *In Vitro* Production of Secondary Metabolites, High-Value Medicinal Plants, Herbal Wealth, and Herbal Trade. **Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts**, Chittagong, v. 1, p. 379-452, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-63862-1_9
- AL-DBASS, A. M.; AL-DAIHAN, S. K.; BHAT, R. S. *Agaricus blazei* Murrill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 19, n. 3, p. 303–309, 2012. DOI: 10.1016/j.sjbs.2012.03.004

- ALMEIDA, G. V. B.; ARUNACHALAM, K.; BALOGUN, S. O.; PAVAN, E.; ASCÊNCIO, S. D.; SOARES, I. M.; ZANATTA, A. C.; VILEGAS, W.; MACHO, A.; MARTINS, D. T. O. Chemical characterization and evaluation of gastric antiulcer properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Virola elongata* (Benth.) Warb. **Journal of Ethnopharmacology**, Cuiabá, v. 231, p. 113-124, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2018.11.011
- AMMAR, S.; CONTRERAS, M. M.; GARGOURI, B.; SEGURA-CARRETERO, A.; BOUAZIZ, M. RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. **Phytochemical Analysis**, Granada, v. 28, n. 3, p. 217–229, 2017. DOI: 10.1002/pca.2664
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; ARAVINTHAN, A.; AL-DHABI, N. A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, K. C.; KIM, J. H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, Jeonju, v. 750, p. 167-175, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.015
- ARAL, H.; ÇELİK, K. S.; ALTINDAĞ, R.; ARAL, T. Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography. **Talanta**, Batman, v. 174, p. 703-714, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.07.014
- ARMAH, F. A.; AMPONSAH, I. K.; MENSAH, A. Y.; DICKSON, R. A.; STEENKAMP, P. A.; MADALA, N. E.; ADOKOH, C. K. Leishmanicidal activity of the root bark of *Erythrophleum Ivorense* (Fabaceae) and identification of some of its compounds by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). **Journal of Ethnopharmacology**, Cape Coast, v. 211, p. 207-216, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017.09.030
- ASHOK, A.; SHABUDEEN, P. S. S. Phytochemical Qualitative Analysis and Immunomodulator Activity of *Agaricus bisporous* Ethanol Extract by Carbon Clearance Technique. **Biochemistry & Pharmacology**, Coimbatore, v. 4, n. 2, p. 1-2, 2015. DOI: 10.4172/2167-0501.1000168
- AZEEM, M.; ZAMAN, T.; TAHIR, M.; HARIS, A.; IQBAL, Z.; BINYAMEEN, M.; NAZIR, A.; SHAD, S. A.; MAJEED, S.; MOZÛRAITIS, R. Chemical composition and repellent activity of native plants essential oils against dengue mosquito, *Aedes aegypti*. **Industrial Crops & Products**, Abbottabad, v. 140, p. 111609, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111609
- AZEVÊDO, J. C. S.; FUJITA, A.; OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**, São Paulo, v. 62, p. 934-940, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.018
- BABENKO, M.; PERON, J. M. R.; KAIALY, W.; CALABRESE, G.; ALANY, R. G.; ELSHAER, A. ¹H NMR quantification of spray dried and spray freeze-dried saccharide carriers in dry powder inhaler formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Surrey, v. 564, p. 318-328, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.030
- BANASIK, A.; KANELLOPOULOS, A.; BLOEMHOF-RUWAARD, J. M.; CLAASSEN, G. D. H. Accounting for uncertainty in eco-efficient agri-food supply chains: A case study for mushroom production planning. **Journal of Cleaner Production**, Wageningen, v. 216, p. 249-256, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.01.153

- BANDMANN, O.; WEISS, K. H.; KALER, S. G. Wilson's disease and other neurological copper disorders. **The Lancet Neurology**, Sheffield, v. 14, n. 1, p. 103-113, 2015. DOI: 10.1016/s1474-4422(14)70190-5
- BARRECH, D.; ALI, I.; TAREEN, M. A Review on Mycoremediation - The fungal bioremediation. **Pure and Applied Biology**, Quetta, v. 7, n. 1, p. 343-348, 2018. DOI: 10.19045/bspab.2018.70042
- BASCHIERI, A.; AMORATI, R.; BENELLI, T.; MAZZOCCHETTI, L.; D'ANGELO, E.; VALGIMIGLI, L. Enhanced Antioxidant Activity under Biomimetic Settings of Ascorbic Acid Included in Halloysite Nanotubes. **Antioxidants**, Bologna, v. 8, n. 2, p. 1-17, 2019. DOI: 10.3390/antiox8020030
- BATISTA, E. S.; BRANDÃO, F. R.; MAJOLO, C.; INOUE, L. A. K. A.; MACIEL, P. O.; OLIVEIRA, M. R.; CHAVES, F. C. M.; CHAGAS, E. C. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, Manaus, v. 495, p. 545-549, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.040
- BATRA, P.; SHARMA, A. K.; KHAJURIA, R. Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haryana, v. 15, n. 2, p. 127-143, 2013. DOI: 10.1615/intjmedmushr.v15.i2.20
- BENEDET, J. A.; SHIBAMOTO, T. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, Davis, v. 107, n. 1, p. 165-168, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.076
- BERVEN, L.; KARPPINEN, P.; HETLAND, G.; SAMUELSEN, A. B. C. The polar high molecular weight fraction of the *Agaricus blazei* Murill extract, AndoSan™, reduces the activity of the tumor-associated protease, legumain, in RAW 264.7 cells. **Journal of Medicinal Food**, Oslo, v. 18, n. 4, p. 429-438, 2015. DOI: 10.1089/jmf.2014.0018
- BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Trends In Analytical Chemistry**, Lucknow, v. 35, p. 5-26, 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2012.02.007
- BILIA, A. R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M. C. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Sesto Fiorentino, v. 2014, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1155/2014/651593
- BLUMBERG, J. B.; CAMESANO, T. A.; CASSID, A.; KRIS-ETHERTON, P.; HOWELL, A.; MANACH, C.; OSTERTAG, L. M.; SIES, H.; SKULAS-RAY, A.; VITA, J. A. Cranberries and their bioactive constituents in human health. **Advances in Nutrition**, Boston, v. 4, n. 6, p. 618-632, 2013. DOI: 10.3945/an.113.004473
- BLUNT, J. W.; CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Brisbane, v. 35, p. 8-53, 2018. DOI: 10.1039/C7NP00052A
- BORHEGYI, C.; BORHEGYI-FORREST, S. Chapter 33 - Mushroom Intoxication in Mesoamerica. **Toxicology in Antiquity**, Michigan, p. 461-472, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-815339-0.00033-0

- BOROVÍČKA, J.; MIHALJEVIČ, M.; GRYNDLER, M.; KUBROVÁ, J.; ŽIGOVÁ, A.; HRŠELOVÁ, H.; ŘANDA, Z. Lead isotopic signatures of saprotrophic macrofungi of various origins: Tracing for lead sources and possible applications in geomycology. **Applied Geochemistry**, Prague, v. 43, p. 144-120, 2014. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2014.02.012
- BOUSLIMANI, A. E. A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**, San Diego, v. 31, n. 6, p. 718–729, 2014. DOI: 10.1039/c4np00044g
- BOUTEMINE, I. M.; AMRI, M.; AMIR, Z. C.; FITTING, C.; IDJERI, S. M.; LAYAIDA, K.; SENNOUN, N.; BERKANE, S.; CAVAILLON, J. M.; BOUKOFFA, C. T. Gastro-protective, therapeutic and anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, Algiers, v. 224, p. 273-282, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.05.040
- BOYCE, G. R.; GLUCK-THALER, E.; SLOT, J. C.; STAJICH, J. E.; DAVIS, W. J.; JAMES, T. Y.; COOLEY, J. R.; PANACCIONE, D. G.; EILENBERG, J.; LICHT, H. H. D. F.; MACIAS, A. M.; BERGER, M. C.; WICKERT, K. L.; STAUDER, C. M.; SPAHR, E. J.; MAUST, M. D.; METHENY, A. M.; SIMON, C.; KRITSKY, G.; HODGE, K. T.; HUMBER, R. A.; GULLION, T.; SHORT, D. P. G.; KIJIMOTO, T.; MOZGAI, D.; ARGUEDAS, N.; KASSON, M. T. Psychoactive plant- and mushroom-associated alkaloids from two behavior modifying cicada pathogens. **Fungal Ecology**, Morgantown, v. 41, p. 147-164. 2019. DOI: 10.1016/j.funeco.2019.06.002
- BRANCO, A.; SANTOS, J. D. G.; PIMENTEL, M. M. A. M.; OSUNA, J. T. A.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, Salvador, v. 32, n. 3, p. 507-510, 2010. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.06.025
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, Massy, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- BRAUN, E. I.; PANTANO, P. The importance of an extensive elemental analysis of single-walled carbon nanotube soot. **Carbon**, Dallas, v. 77, p. 912-919, 2014. DOI: 10.1016/j.carbon.2014.06.005
- BURULEANU, L. C.; RADULESCU, C.; GEORGESCU, A. A.; DANET, F. A.; OLTEANU, R. L.; NICOLESCU, C. M.; DULAMA, I. D. Statistical characterization of the phytochemical characteristics of edible mushroom extracts. **Analytical Letters**, Targoviste, v. 51, n. 7, p. 1039-1059, 2018. DOI: 10.1080/00032719.2017.1366499
- CARDOSO, R. V. C.; FERNANDES, A.; BARREIRA, J. C. M.; VERDE, S. C.; ANTONIO, A. L.; GONZALEZ-PARAMÁS, A. M.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Effectiveness of gamma and electron beam irradiation as preserving technologies of fresh *Agaricus bisporus* Portobello: a comparative study. **Food Chemistry**, Bragança, v. 278, p. 760–766, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.116
- CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; CORDEIRO, M. N. S.; MASCARELLO, A.; MALAGOLI, B. G.; LARSEN, I. V.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BRAGA, F. C.; BRANDT, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Florianópolis, v. 57, p. 265-272, 2013. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.026

- CARRIE, J.; SANEI, H.; STERN, G. Standardisation of Rock–Eval pyrolysis for the analysis of recent sediments and soils. **Organic Geochemistry**, Winnipeg, v. 46, p. 38-53, 2012. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2012.01.011
- CARVAJAL, A. E. S. S.; KOEHNLEIN, E. A.; SOARES, A. A.; ELER, G. J.; NAKASHIMA, A. T. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, Maringá, v. 46, n. 2, p. 493-499, 2012. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.11.018
- CAVANAGH, J. J. SMITH, T. Y. Psychedelic Drug (LSD, PCP, Hallucinogenic Mushrooms) Intoxication. **Quick Guide to Psychiatric Emergencies**, Brooklyn, p. 199-203, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-58260-3_36
- ÇAKAR, S.; GÜY, N.; ÖZACAR, M.; FINDIK, F. Investigation of Vegetable Tannins and Their Iron Complex Dyes for Dye Sensitized Solar Cell Applications. **Electrochimica Acta**, Sakarya, v. 209, p. 407-422, 2016. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.05.024
- CERQUEIRA, G. S.; SILVA, G. S.; VASCONCELOS, E. R.; FREITAS, A. P. F.; MOURA, B. A.; MACEDO, D. S.; SOUTO, A. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; LUZIA LEAL, K. A.; BRITO, G. A. C.; SOUCCAR, C.; BARROS, G. S. V. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. **European Journal of Pharmacology**, Fortaleza, v. 683, p. 260-269, 2012. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.02.043
- CHAKRABORTY, P. Herbal genomics as tools for dissecting new metabolic pathways of unexplored medicinal plants and drug discovery. **Biochimie Open**, Kolkata, v. 6, p. 9-16, 2018. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.12.003
- CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol and indomethacin- induced gastric lesions in the rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, United Arab Emirates, v. 29, n. 3, p. 173–180, 2002. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03626.x
- CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 14, n. 2, p. 95-134, 2012. DOI: 10.1615/intjmedmushr.v14.i2.10
- CHAO, Y. T.; TSAI, S. J.; LIU, Y. L.; YANG, A. C.; KUO, P. H. SU34 - Distinct genetic profiles of peptic ulcer in individuals with depression. **European Neuropsychopharmacology**, Taipé, v. 29, p. 905-906, 2019. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2017.08.223
- CHELELA, B. L.; CHACHA, M.; MATEMU, A. Larvicidal potential of wild mushroom extracts against *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedesa egypti* and *Anopheles gambiae* Giles S.S. **American Journal of Research Communication**, Arusha, v. 2, n. 8, p. 105-1014, 2014.
- CHEN, H.; NIE, Q.; XIE, M.; YAO, H.; ZHANG, K.; YIN, J.; NIE, S. Protective effects of β -glucan isolated from highland barley on ethanol-induced gastric damage in rats and its benefits to mice gut conditions. **Food Research International**, Nanchang, v. 122, p. 157–166, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.011
- CHEN, P.; SHEN, Y.; SHI, H.; MA, X.; LIN, B.; XIAO, T.; WU, F.; ZHU, J.; LI, Z.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, H.; GENG, F. Gastroprotective effects of Kangfuxin-against ethanol-induced

gastriculcer via attenuating oxidative stress and ER stress in mice. **Chemico-Biological Interactions**, Wenzhou, v. 260, p. 75-83, 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.10.021

CHEN, Z.; ZHENG, S.; LI, L.; JIANG, H. Metabolism of Flavonoids in Human: A Comprehensive Review. **Current Drug Metabolism**, Hangzhou, v. 15, n. 1, p. 48-61, 2014. DOI: 10.2174/138920021501140218125020

CHENG, Q.; SHOU, L.; CHEN, C.; SHI, S.; ZHOU, M. Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry for identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated weight-loss drugs in plant dietary supplements. **Journal of Chromatography B**, Zhejiang, v. 1064, p. 92-99, 2017. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.09.009

CHIGURUPATI, H.; AUDDY, B.; BIYANI, M.; STOHS, S. J. Hepatoprotective effects of a proprietary glycyrrhizin product during alcohol consumption: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Phytotherapy Research**, Frisco, v. 30, n. 12, p. 1943-1953, 2016. DOI: 10.1002/ptr.5699

CHIM ACTIVE. Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH^o assay. Disponível em: <chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>. Acessado em 18/11/2018 às 21:00.

CHINA BUSINESS RESEARCH INSTITUTE (15 de dezembro de 2017). **Relatório de Pesquisa de Mercado da Indústria de Fungos Comestíveis na China (versão curta) 2017**. Disponível em: <<http://www.askci.com/news/chanye/20171215/175617114071.shtml>>. Acessado em 18/07/2019.

CHOWAŃSKI, S.; ADAMSKI, Z.; MARCINIAK, P.; ROSIŃSKI, G.; BÜYÜKGÜZEL, E.; BÜYÜKGÜZEL, K.; FALABELLA, P.; SCRANO, L.; VENTRELLA, E.; LELARIO, F.; BUFO, S. A. A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. **Toxins**, Poznań, v. 8, n. 3, p. 60, 2016. DOI: 10.3390/toxins8030060

COLLADO, E.; BONET, J. A.; CAMARERO, J. J.; EGLI, S.; PETER, M.; SALO, K.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; OHENOJA, E.; MARTÍN-PINTO, P.; PRIMICIA, I.; BÜNTGEN, U.; KURTTILA, M.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; MARTÍNEZ-DE-ARAGÓN, J.; MIINA, J.; MIGUEL, S. Mushroom productivity trends in relation to tree growth and climate across different European forest biomes. **Science of the Total Environment**, Lleida, v. 689, p. 602-615, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.471

CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; FERNANDES, A.; SOKOVIC, M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. A natural food ingredient based on ergosterol: optimization of the extraction from *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. **Food & Function**, Bragança, v. 9, n. 3, p. 1465-1474, 2018. DOI: 10.1039/c7fo02007d

COSTA, T. M.; TAVARES, L. B. B.; OLIVEIRA, D. Fungi as a source of natural coumarins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Florianópolis, v. 100, n. 15, p. 6571-6584, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7660-z

CRESTINI, C.; LANGE, H. A novel and efficient immobilised tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. **Microchemical Journal**, Rome, v. 123, p. 139-147, 2015. DOI: 10.1016/j.microc.2015.05.025

DELGADO-POVEDANO, M. M.; MEDINA, V. S.; BAUTISTA, J.; PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, M. D. L. Tentative identification of the composition of *Agaricus bisporus* aqueous enzymatic extracts with antiviral activity against HCV: a study by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. **Journal of Functional Foods**, Córdoba, v. 24, p. 403-419, 2016. DOI: 10.1016/j.jff.2016.04.020

DÍAZ-TRISTE, N.E.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.P.; JIMÉNEZ-ANDRADE, J.M.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; CHÁVEZ-PIÑA, A.E. Pharmacological evidence for the participation of NO–cGMP–KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. **European Journal of Pharmacology**, Ticomán, v. 730, p. 102-106, 2014. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.02.030

DING, Y.; QU, D.; ZHANG, K. M.; CANG, X. X.; KOU, Z. N.; XIAO, W.; ZHU, J. B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. **Journal of Asian Natural Products Research**, Dalian, v. 19, p. 53-100, 2017. DOI: 10.1080/10286020.2016.1198332

DORIS, K.; EVANTHIA, M.; MICHAEL, R. Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms. **Current Medicinal Chemistry**, Bochum, v. 23, n. 24, p. 2653-2665, 2016. DOI: 10.2174/0929867323666160812145050

DU, W. J.; YANG, X. L.; SONG, Z. J.; WANG, J. Y.; ZHANG, W. J.; HE, X.; ZHANG, R. Q.; ZHANG, C. F.; LI, F.; YU, C. H.; WANG, C. Z.; YUAN, C. S. Antitumor Activity of Total Flavonoids from *Daphne genkwa* in Colorectal Cancer. **Phytotherapy Research**, Jiangsu, v. 30, n. 2, p. 323-330, 2016. DOI: 10.1002/ptr.5540

DUAN, Y. C.; FENG, J.; BAI, N.; LI, G. H.; ZHANG, K. Q.; ZHAO, P. J. Four novel antibacterial sesquiterpene- α -amino acid quaternary ammonium hybrids from the mycelium of mushroom *Stereum hirsutum*. **Fitoterapia**, Kunming, v. 128, p. 213-217, 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.05.026

DULERMO, T.; RASCLE, C.; BILLON-GRAND, G.; GOUT, E.; BLIGNY, R.; Cotton, P. Novel insights into mannitol metabolism in the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Biochemical Journal**, Villeurbanne, v. 427, n. 2, p. 323-332, 2010. DOI: 10.1042/bj20091813

DUSEK, P.; ROOS, P. M.; LITWIN, T.; SCHNEIDER, S. A.; FLATEN, T. P.; SETH, A. A. J. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Prague, v. 31, p. 193-203, 2015. DOI: 10.1016/j.jtemb.2014.05.007

DUTTA, S.; DEY, P.; CHAKRABORTY, A. K.; KAR, P. Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill. **PLoS ONE**, Assam, v. 13, n. 4, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0196411

EL'TEKOV, A. Y.; EL'TEKOVA, N. A.; EL'TEKOV, Y. A. Thin-Layer Chromatography in the Investigation of Polystyrene Macromolecule Interaction with Nanoporous Silica. **Potection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, Moscow, v. 50, n. 1, p. 45-48, 2014. DOI: 10.1134/S2070205114010031

FANG, F.; QI, Y.; LU, F.; YANG, L. Highly sensitive on-site detection of drugs adulterated in botanical dietary supplements using thin layer chromatography combined with dynamic surface enhanced Raman spectroscopy. **Talanta**, Hefei, v. 146, p. 351-357, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.08.067

- FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C.; LUIZ, F. A.; TAKAYAMA, C.; DUNDER, R. J.; SILVA, M. A.; SALVADOR, M. J.; ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, M. N.; VILEGAS, W.; TOMA, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. **Scientific World Journal**, Campinas, v. 2012, p. 1-9, 2012. DOI: 10.1100/2012/327071
- FEENEY, M. J; MILLER, A. M.; ROUPAS, P. Mushrooms-Biologically Distinct and Nutritionally Unique: Exploring a "Third Food Kingdom". **Nutrition Today**, Los Altos, v. 49, n. 6, p. 301–307, 2014a. DOI: 10.1097/nt.0000000000000063
- FEENEY, M. J.; DWYER, J.; HASLER-LEWIS, C. M.; MILNER, J. A.; NOAKES, M.; ROWE, S.; WACH, M.; BEELMAN, R. B.; CALDWELL, J.; CANTORNA, M. T.; CASTLEBURY, L. A.; CHANG, S. T.; CHESKIN, L. J.; CLEMENS, R.; DRESCHER, G.; FULGONI, V. L.; HAYTOWITZ, D. B.; HUBBARD, V. S.; LAW, D.; MILLER, A. M.; MINOR, B.; PERCIVAL, S. S.; RISCUTA, G.; SCHNEEMAN, B.; THORNSBURY, S.; TONER, C. D.; WOTEKI, C. E.; WU, D. Mushrooms and Health Summit Proceedings. **Journal of Nutrition**, Los Altos, v. 144, n. 7, p. 1128-1136, 2014b. DOI: 10.3945/jn.114.190728
- FERREIRA, A. **Curso Cultivo de Cogumelo Medicinal - *Agaricus blazei* (Murrill)**. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/cursos-agroindustria-cogumelos-comestiveis/cultivo-de-cogumelo-medicinal-agaricus-blazei-murrill>>. Acessado em 18/07/2019.
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Empoli, v. 5, n.1, p. 3–15, 2008. DOI: 10.1093/ecam/nem007
- FRENZEL, L.; HERMINE, O. Mastocytes et inflammation. **Revue Du Rhumatisme**, Paris, v. 80, n. 2, p. 111-115, 2013. DOI: 10.1016/j.rhum.2012.07.016
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Propolis analysis. **Food Science and Technology**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000100028
- GALURA, G. M.; CHAVEZ, L. O.; ROBLES, A.; MCCALLUM, R. Gastroduodenal Injury: Role of Protective Factors. **Current Gastroenterology Reports**, El Paso, v. 21, n. 34, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1007/s11894-019-0701-x
- GAO, M. R.; XU, Q. D.; HE, Q.; SUN, Q.; ZENG, W. C. A theoretical and experimental study: the influence of different standards on the determination of total phenol content in the Folin–Ciocalteu assay. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Chengdu, v. 13, p. 1349-1356, 2019. DOI: 10.1007/s11694-019-00050-6
- GARRAB, M.; EDZIRI, H.; MOKNI, R. E.; MASTOURI, M.; MABROUK, H.; DOUKI, W. Phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase properties of the three mushrooms *Agaricus silvaticus* Schaeff., *Hydnum rufescens* Pers. and *Meripilus giganteus* (Pers.) Karst. in Tunisia. **South African Journal of Botany**, Tunis, v. 124, p. 359-363, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.05.033
- GASECKA, M.; MAGDZIAK, Z.; SIWULSKI, M.; MLECZEK, M. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. **European Food Research and Technology**, Poznan, v. 244, p. 259-268, 2018. DOI: 10.1007/s00217-017-2952-9

- GAN, C. H.; NURUL, A. B.; ASMAH, R. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*). **International Food Research Journal**, Selangor, v. 20, n. 3, p. 1095-1102, 2013.
- GARTHWAITE, J. New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. **Molecular and Cellular Biochemistry**, London, v. 334, p. 221–232, 2010. DOI: 10.1007/s11010-009-0318-8
- GAWEŁ-BĘBEN, K.; BUJAK, T.; NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z.; ANTOSIEWICZ, B.; JAKUBCZYK, A.; KARAŚ, M.; RYBCZYŃSKA, K. Stevia *Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. **Molecules**, Tyczyn, v. 20, n. 4, p. 5468-5486, 2015, 2015. DOI: 10.3390/molecules20045468
- GHARZOULI, K.; BALINT, G. A.; GALFI, M.; RIMANOCZY, A.; JUHASZ, A. The effect of osmolality changes on gastric mucosal endogenous prostacyclin levels in drug-induced experimental ulcer model of rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Szeged, v. 53, n. 5, p. 409-411, 2001. DOI: 10.1078/0940-2993-00208
- GIRARD, A. L.; BEAN, S. R.; TILLEY, M.; ADRIANOS, S. L.; AWIKA, J. M. Interaction mechanisms of condensed tannins (proanthocyanidins) with wheat gluten proteins. **Food Chemistry**, College Station, v. 245, p. 1154-1162, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.054
- GIRAUDEAU, P. Quantitative 2D liquid-state NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Nantes, v. 52, n. 6, p. 259-272, 2014. DOI: 10.1002/mrc.4068
- GLAMOCLIIJA, J.; STOJKOVIC, D.; NIKOLIĆ, M.; CIRÍĆ, A.; REIS, F. S.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; SOKOVIC, M. A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods. **Food & Function**, Belgrade, v. 6, p. 1900–1910, 2015. DOI: 10.1039/C4FO01135J
- GOLDSMITH, C. D.; Q. VUONG, V.; STATHOPOULOS, C. E.; ROACH, P. D.; SCARLETT, C. J. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. **Antioxidants (Basel)**, Ourimbah, v. 3, n. 4, p. 700-712, 2014. DOI: 10.3390/antiox3040700
- GONZAGA, M. L. C.; MENEZES, T. M. F.; SOUZA, J. R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; SOARES, S. D. A. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Fortaleza, v. 2, n. 2, p. 152 – 156, 2013. DOI: 10.1016/j.bcdf.2013.10.005
- GHOSH, S. Biosynthesis of Structurally Diverse Triterpenes in Plants: the Role of Oxidosqualene Cyclases. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, Lucknow, v. 82, n. 4, p. 1189-1210, 2016. DOI: 10.16943/ptinsa/2016/48578
- GRIENKE, U.; ZÖLL, M.; PEINTNER, U.; ROLLINGER, J. M. European medicinal polypores - A modern view on traditional uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Innsbruck, v. 154, p. 564-583, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.030
- GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, Bragança, v. 32, n. 2, p. 152-156, 2010. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.04.011

- GÜLÇİN, I.; BERASHVILI, D.; GEPIREMEN, A. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Erzurum, v. 56, n. 7, p. 491–499, 2005. DOI: 10.1080/09637480500450248
- GUO, Y. J.; DENG, G. F.; XU, X. R.; WU, S.; LI, S.; XIA, E. Q.; LI, F.; CHEN, F.; LING, W. H.; LI, H. B. Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. **Food & Function**, Guangzhou, v. 3, n. 11, p. 1195-1205, 2012. DOI: 10.1039/C2FO30110E
- GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Noida, v. 6, n. 2, p. 546-566, 2015. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66
- GÜRBÜZ, V.; ALICAN, I.; BERRAK; YEGEN, C.; BOZKURT, A.; OKTAR, B.; HAKLAR, G.; YÜKSEL, M.; KURTEL, H. Role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric mucosal dysfunction in the rat. **Experimental Physiology**, Istanbul, v. 84, n. 2, p. 319–332, 1999. DOI: 10.1111/j.1469-445X.1999.01800.x
- HABIBZADEH, M.; TOURANI, M.; SHOKRI-SHIRVANI, J.; MOSTAFAZADEH, A.; KHAFRI, S.; NOURI, H. R. TLR2 Arg677Trp but not TLR2 -196 to -174 ins/del and Arg753Gln polymorphism alter the risk of peptic ulcer in north of Iran. **Journal Of The Chinese Medical Association**, Babol, v. 81, n. 1, p. 25-30, 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.05.009
- HAKIME-SILVA, R. A.; VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; KHALIL, O. A. K.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Chemical, enzymatic and cellular antioxidant activity studies of *Agaricus blazei* Murrill. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Araraquara, v. 85, n. 3, p. 1073–1081, 2013. DOI: 10.1590/s0001-37652013005000044
- HAZRA, B.; SARKAR, R.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Emblica officinalis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Kolkata, n. 10, n. 20, 2010. DOI: 10.1186/1472-6882-10-20
- HOEFGEN, S.; LINA, J.; FRICKE, J.; STROE, M. C.; MATTERN, D. J.; KUFS, J. E.; HORTSCHANSKY, P.; BRAKHAGE, A. A.; HOFFMEISTER, D.; VALIANTE, V. Facile assembly and fluorescence-based screening method for heterologous expression of biosynthetic pathways in fungi. **Metabolic Engineering**, Jena, v. 48, p. 44-51, 2018. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.014
- HETLAND, G.; EIDE, D. M.; TANGEN, J. M.; HAUGEN, M. H.; MIRLASHARI, M. R.; PAULSEN, J. E. The *Agaricus blazei*-Based Mushroom Extract, Andosan™, Protects against Intestinal Tumorigenesis in the A/J Min/+ Mouse. **PLoS ONE**, Oslo, v. 11, n. 12, p. 1-15, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0167754
- HOLT, R. R.; HEISS, C.; KELM, M.; KEEN, C. L. The potential of flavanol and procyanidin intake to influence age-related vascular disease. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, Davis, v. 31, p. 290-323, 2012. DOI: 10.1080/21551197.2012.702541
- HSIEH, F. H. Gastrointestinal Involvement in Mast Cell Activation Disorders. **Immunology And Allergy Clinics of North America**, Cleveland, v. 38, n. 3, p. 429-441, 2018. DOI: 10.1016/j.iac.2018.04.008

- HUANG, Q.; QIAN, X.; JIANG, T.; ZHENG, X. Effect of chitosan and guar gum based composite edible coating on quality of mushroom (*Lentinus edodes*) during postharvest storage. **Scientia Horticulturae**, Hangzhou, v. 253, p. 382-389, 2019. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.04.062
- HUANG, S. J.; MAU, J. L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of λ -irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, Taichung, v. 39, n. 7, p. 707-716, 2006. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.06.001
- HUERTAS-PÉREZ, J. F.; ARROYO-MANZANARES, N.; HITZLER, D.; CASTRO-GUERRERO, F. G.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Simple determination of aflatoxins in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to chemical post-column derivatization and fluorescence detection. **Food Chemistry**, Granada, v. 245, p. 189-195, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.041
- INOUE, K.; AIKAWA, S.; MASARU, S.; FUKUSHIMA, Y. Colorimetric chemosensor for Fe^{2+} and Fe^{3+} based on a ternary mixture of an anionic dye, a cationic polyelectrolyte, and a metal chelator in aqueous solution. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Saitama, v. 91, p. 171-177, 2018. DOI: 10.1007/s10847-018-0812-2
- ITOH, H.; ITO, H.; HIBASAMI, H. Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. **Oncology Reports**, Tsu, v. 20, n. 6, p. 1359-1361, 2008. DOI: 10.3892/or_00000152
- JEDIDI, I. K.; AYOUB, I. K.; PHILIPPE, T.; BOUZOUITA, N. Chemical composition and non-volatile components of three wild edible mushrooms collected from northwest Tunisia. **Mediterranean Journal of Chemistry**, Tunis, v. 5, n. 3, p. 434-441, 2016. DOI: 10.13171/mjc53/01604121130/bouzouita
- JEONG, H.; KIM, D.; SONG, H. J.; LEE, S.; KIM, M.; KIM, K. J.; HAN, G. D. β -Glucan-enriched fermented barley bran (*Sigumjang meju*) extracts attenuates gastric mucosal injury induced by acute alcohol intake *in vivo*. **Food Bioscience**, Gyeongsan, v. 28, p. 20-26, 2019. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.01.007
- JESUS, L. I.; SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; VILAPLANA, F.; DAL'LIN, F. T.; FERREIRA, D. M.; WERNER, M. F.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; IACOMINI, M. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom *Piptoporus betulinus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Curitiba, v. 117, p. 1361-1366, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.107
- JIA, S.; LI, F.; LIU, Y.; REN, H.; GONG, G.; WANG, Y.; WU, S. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. **International Journal of Biological Macromolecules**, Tianjin, v. 62, p. 66-69, 2013. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.08.031
- JIANG, P.; YUAN, L.; CAI, D.; JIAO, L.; ZHANG, L. Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from mycelium of *Phellinus pini*, and culture médium. **Carbohydrate Polymers**, Changchun, v. 117, p. 600-604, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.013
- JIMÉNEZ, N.; ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHEÑO, J. M.; LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Tannin Degradation by a Novel Tannase Enzyme Present in Some *Lactobacillus plantarum*

Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Madrid, v. 80, n. 10, p. 2991-2997, 2014a. DOI: 10.1128/AEM.00324-14

JIMÉNEZ, Y. C.; M. GARCÍA-MORENO, V.; IGARTUBURU, J. M.; BARROSO, C. G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chemistry**, Cádiz, v. 165, p. 198-204, 2014b. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.106

JOHNSON, A. C.; MEERVELD, B. G. V. Critical Evaluation of Animal Models of Gastrointestinal Disorders. **Gastrointestinal Pharmacology**, Oklahoma, v. 239, p. 289-317, 2017. DOI: 10.1007/164_2016_120

JOOSTEN, L.; VAN-VEEN, J. A. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. **Phytochemistry Reviews**, Heteren, v. 10, p. 127-136, 2011. DOI: 10.1007/s11101-010-9204-y

JÚNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; SILVA, G. F.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, São Gabriel, v. 153, p. 469-477, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.03.005

KANG, G. G.; FRANCIS, N.; RODNEY, H.; WATERS, D.; BLANCHARD, C.; SANTHAKUMAR, A. B. Dietary Polyphenols and Gene Expression in Molecular Pathways Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, Wagga Wagga, v. 21, n. 1, p. 140, 2019. DOI: 10.3390/ijms21010140

KASPRZAK, M. M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, Łódź, v. 5, p. 45853-45877, 2015. DOI: 10.1039/C5RA05069C

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1

KEMPENICH, J. W.; SIRINEK, K. R. Acid Peptic Disease. **Surgical Clinics of North America**, San Antonio, v. 98, n. 5, p. 933-944, 2018. DOI: 10.1016/j.suc.2018.06.003

KHALIL, M. S. Utilization of Biomaterials as Soil Amendments and Crop Protection Agents in Integrated Nematode Management. **Plant, Soil and Microbes**, Alexandria, v. 1, p. 203-224, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-27455-3_11

KHAN, I.; HUANG, G.; LI, X.; LIAO, W.; LEONG, W. K.; XIA, W.; BIAN, X.; WU, J.; HSIAO, W. W. L. Mushroom polysaccharides and jiaogulan saponins exert cancer preventive effects by shaping the gut microbiota and microenvironment in *Apc^{Min/+}* mice. **Pharmacological Research**, Macau, v. 148, 104448, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104448

KIM, H. K.; CHOI, Y. A.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, Leiden, v. 5, p. 536-549, 2010. DOI: 10.1038/nprot.2009.237

KIM, M. Y.; CHUNG, M.; LEE, S. J.; AHN, J. K.; KIM, E. H.; KIM, M. J.; KIM, S. LIM.; MOON, H. I.; RO, H. M.; KANG, E. Y.; SEO, S. H.; SONG, H. K. Comparison of free amino

- acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. **Food Chemistry**, Seoul, v. 113, n. 2, p. 386-393, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.045
- KIM, M. Y.; SEGUIN, P.; AHN, J. K.; KIM, J. J.; CHUN, S. C.; KIM, E. H.; SEO, S. H.; KANG, E. Y.; KIM, S. L.; PARK, Y. J.; RO, H. M.; CHUNG, I. M. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Seoul, v. 56, n. 16, p. 7265–7270, 2008. DOI: 10.1021/jf8008553
- KLEWICKI, R.; BELINA, I.; WOJCIECHOWSKA, A.; KLEWICKA, E.; SOJKA, M. Synthesis of galactosyl mannitol derivative using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Łódź, v. 67, n. 1, p. 33–39, 2017. DOI: 10.1515/pjfn-2016-0002
- KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; JAKOVLJEVIC, D.; TODOROVIC, N.; NIKSIC, M.; VRVIC, M. M.; VAN-GRIENSVEN, L. J. L. D. Dietary polysaccharide extracts of *Agaricus brasiliensis* fruiting bodies: chemical characterization and bioactivities at different levels of purification. **Food Research International**, Wageningen, v. 64, p. 53–64, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.075
- KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKSI, M.; JAKOVLJEVIC, D.; HELSPER, J. P. F. G.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. **Food Chemistry**, Wageningen, v. 129, n. 4, p. 1667-1675, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.06.029
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, Kota Kinabalu, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
- KUMAR, K. Role of edible mushrooms as functional foods-a review. **South Asian Journal of Food Technology and Environment**, Sirmour, v. 1, n. 3, p. 211-218, 2015.
- KUNA, L.; JAKAB, J.; SMOLIC, R.; RAGUZ-LUCIC, N.; VCEV, A.; SMOLIC, M. Peptic ulcer disease: a brief review of conventional therapy and herbal treatment options. **Journal of Clinical Medicine**, Osijek, v. 8, n. 2, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3390/jcm8020179
- KUROZAWA, L. E.; AZOUBEL, P. M.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Drying kinetic of fresh and osmotically dehydrated mushroom (*Agaricus blazei*). **Journal of Food Process Engineering**, Campinas, v. 35, n. 2, p. 295–313, 2011. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2010.00590.x
- LAGO, J. H. G.; TOLEDO-ARRUDA, A. C.; MERNAK, M.; BARROSA, K. H.; MARTINS, M. A.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; PRADO, C. M. Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. **Molecules**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 3570-3595, 2014. DOI: 10.3390/molecules19033570
- LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, Los Angeles, v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 1988. DOI: 10.1016/0016-5085(88)90661-0
- LOMAE, A.; NANTAPHOL, S.; KONDO, T.; CHAILAPAKUL, O.; SIANGPROH, W.; PANCHOMPOO, J. Simultaneous determination of β -agonists by UHPLC coupled with

- electrochemical detection based on palladium nanoparticles modified BDD electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Bangkok, v. 840, p. 439-448, 2019. DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.04.003
- LAMY, E.; PINHEIRO, C.; RODRIGUES, L.; CAPELA-SILVA, F.; LOPES, O. S.; TAVARES, S.; GASPAR, R. Determinants of Tannin-Rich Food and Beverage Consumption: Oral Perception vs. Psychosocial Aspects. **Food Sources and Nutritional Properties**, Évora, p. 29-58, 2016.
- LANAS, A.; CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, Zaragoza, v. 390, n. 10094, p. 613-624, 2017. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)32404-7
- LANG, M.; FERRON, P. J.; BURSZYKA, J.; MONTJARRET, A.; DUTEIL, E.; BAZIRE, A.; BEDOUX, G. Evaluation of immunomodulatory activities of essential oils by high content analysis. **Journal of Biotechnology**, Lorient, v. 303, p. 65-71, 2019. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.07.010
- LEWOYEHU, M.; AMARE, M.; YILDIZ, F. Comparative evaluation of analytical methods for determining the antioxidant activities of honey: A review. **Cogent Food & Agriculture**, Bahir Dar, v. 5, n. 1, 2019. DOI: 10.1080/23311932.2019.1685059
- LI, Y.; LI, Z.; HOU, H.; ZHUANG, Y.; SUN, L. Metal Chelating, Inhibitory DNA Damage, and Anti-Inflammatory Activities of Phenolics from Rambutan (*Nephelium lappaceum*) Peel and the Quantifications of Geraniin and Corilagin. **Molecules**, Kunming, v. 23, n. 9, p. 2263, 2018. DOI: 10.3390/molecules23092263
- LI, W.; GU, Z.; YANG, Y.; ZHOU, S.; LIU, Y.; ZHANG, J. Non-volatile taste components of several cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, Shanghai, v. 143, p. 427-431, 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.006
- LIANG, J.; DOU, Y.; WU, X.; LI, H.; WU, J.; HUANG, Q.; LUO, D.; YI, T.; LIU, Y.; SU, Z.; CHEN, J. Prophylactic efficacy of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Chemico-biological Interactions**, Shenzhen, v. 283, p. 30-37, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.01.014
- LIMA, C. U. J. O.; GRIS, E. F.; KARNIKOWSKI, M. G. O. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* - integrative review, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Ceilândia, v. 26, p. 780-786, 2016. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.05.013
- LIN, W. V.; TURIN, C. G.; MCCORMICK, D. W.; HAAS, C.; CONSTANTINE, G. Ascorbic acid-induced oxalate nephropathy: a case report and discussion of pathologic mechanisms. **CEN Case Reports**, Houston, v. 8, p. 67-70, 2019. DOI: 10.1007/s13730-018-0366-6
- LINGAPPAN, K. NF- κ B in oxidative stress. **Current Opinion In Toxicology**, Houston, v. 7, p. 81-86, 2018. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.11.002
- LO, Y. C.; CHIEN, S. C.; MISHCHUK, D. O.; SLUPSKY, C. M.; MAU, J. L. Quantification of water-soluble metabolites in medicinal mushrooms using proton NMR spectroscopy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Taichung, v. 18, n. 5, p. 413-424, 2016. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v18.i5.50
- LOEF, M.; WALACH, H. Copper and iron in Alzheimer's Disease: A systematic review and its dietary implications. **British Journal of Nutrition**, Frankfurt, v. 107, n. 1, p. 7-19, 2012. DOI: 10.1017/s000711451100376x

LOVCHINSKY, I.; SUSHKOV, A. O.; URBACH, E.; LEON, N. P.; CHOI, S.; GREVE, K. D.; EVANS, R.; GERTNER, R.; BERSIN, E.; MÜLLER, C.; MCGUINNESS, L.; JELEZKO, F.; WALSWORTH, R. L.; PARK, H.; LUKIN, M. D. Nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. **Science**, Cambridge, v. 351, n. 6275, 2016. DOI: 10.1126/science.aad8022

LUNA-GUEVARA, M. L.; LUNA-GUEVARA, J. J.; HERNÁNDEZ-CARRANZA, P.; RUÍZ-ESPINOSA, H.; OCHOA-VELASCO, C. E. Chapter 3 - Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. **Studies in Natural Products Chemistry**, Puebla, v. 59, p. 79-108, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7

MACADAM, J. W.; VILLALBA, J. J. Beneficial Effects of Temperate Forage Legumes that Contain Condensed Tannins. **Agriculture**, Logan, v. 5, n. 3, p. 475-491, 2015. DOI: 10.3390/agriculture5030475

MAHADEVAN, V. Anatomy of the stomach. **Surgery (oxford)**, London, v. 35, n. 11, p. 608-611, 2017. DOI: 10.1016/j.mpsur.2017.08.004

MAHAKUNAKORN, P.; TOHDA, M.; MURAKAMI, Y.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Toyama, v. 27, n. 1, p. 38-46, 2004. DOI: 10.1248/bpb.27.38

MAHMOOD, F.; HETLAND, G.; NENTWICH, I.; MIRLASHARI, M. R.; GHIASVAND, R.; NISSEN-MEYER, L. S. H. *Agaricus blazei*-based mushroom extract supplementation to birch allergic blood donors: a randomized clinical trial. **Nutrients**, Oslo, v. 11, n. 10, p. 1-15, 2019. DOI: 10.3390/nu11102339

MAHMOUD, Y.; EL-GHFFAR, E. A. A. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Cairo, v. 109, p.314-321, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.118

MAHMOUD, M. A. A.; CHEDEA, V. S.; DETSI, A.; KEFALAS, P. Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism. **Food Research International**, Crete, v. 51, p. 907-913, 2013. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.023

MAI, N. T.; CUC, N. T.; ANH, H. L. T.; NHIEM, N. X.; TAI, B. H.; MINH, C. V.; QUANG, T. H.; KIM, K. W.; KIM, Y. C.; OH, H.; KIEM, P. V. Steroidal saponins from *Datura metel*. **Steroids**, Hanoi, v. 121, p. 1-9, 2017. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.02.002

MAKTOOF, S. A.; ALRUBAYAE, I. M. N.; ALMANSORII, N. A. Evaluation of in vitro antidiabetic effect and phytochemical screening of some wild mushroom extracts isolated in Basrah, Iraq. **Drug Invention Today**, Basrah, v. 11, n. 11, 2019.

MANEESH, A.; CHAKRABORTY, K.; MAKKAR, F. Pharmacological activities of brown seaweed *Sargassum wightii* (Family Sargassaceae) using different *in vitro* models. **International Journal of Food Properties**, Kerala, v. 20, n. 4, p. 931-945, 2017. DOI: 10.1080/10942912.2016.1189434

MARIENHAGEN, J.; BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**, Jülich, v. 163, p. 166-178, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.001

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **Journal of Chromatography A**, Bloemfontein, v. 1218, p. 2676-2683, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068

MASCI, V. L.; BERNARDINI, S.; MODESTI, L.; OVIDI, E.; TIEZZI, A. Medicinal Plants as a Source of Alkaloids. **Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites**, Viterbo, v. 15, p. 85-113, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-9566-6_5

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. Ed./ Francisco José de Abreu Matos. - Fortaleza: Edições UFC, 2009.

METSÄMUURONEN, S.; SIRÉN, H. Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. **Phytochemistry Reviews**, Helsinki, v. 18, p. 623-664, 2019. DOI: 10.1007/s11101-019-09630-2

MICHALANY, J. **Técnica histológico em anatomia patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3ª ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda. p. 153- 5, 1998.

MIKI, K.; BUTLER, R.; MOORE, D.; DAVIDSON, G. Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol, and lactulose in urine by HPLC for estimating intestinal permeability in pediatric practice. **Clinical Chemistry**, Adelaide, v. 42, n. 1, p. 71-75, 1996. DOI: 10.1093/clinchem/42.1.71

MISGIATI.; SUKARDIMAN.; WIDYAWARUYANTI, A. Anti-Breast Cancer Potency of Multistage Extraction from Jamur Dewa (*Agaricus blazei* Murill) Solvents on MCF-7 Cells. **Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention**, Surabaya, v. 8, n. 2, p. 67-71, 2017. DOI: 10.14499/indonesianjcanchemoprev8iss2pp68-73

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “himematsutake,” the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889–2896, 1990. DOI: 10.1080/00021369.1990.10870406

MINOZZO, B. R.; LEMES, B. M.; JUSTO, A. S.; LARA, J. E.; PETRY, V. E. K.; FERNANDES, D.; BELLÓ, C.; VELLOSA, J. C. R.; CAMPAGNOLI, E. B.; NUNES, O. C.; KITAGAWA, R. R.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; BELTRAME, F. L. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Paraná, v. 191, p. 29-40, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2016.06.032

MOKOCHINSKI, J. B.; LÓPEZ, B. G. C.; SOVRANI, V.; SANTA, H. S. D.; GONZÁLEZ-BORRERO, P. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; TORRES, Y. R. Production of *Agaricus brasiliensis* mycelium from food industry residues as a source of antioxidants and essential fatty acids. **International Journal of Food Science and Technology**, Guarapuava, v. 50, p. 2052–2058, 2015. DOI: 10.1111/ijfs.12861

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, Bangor, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOREAU, R. A.; NYSTRÖM, L.; WHITAKER, B. D.; WINKLER-MOSER, J. K.; BAER, D. J.; GEBAUER, S. K.; HICKS, K. B. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity,

distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, Wyndmoor, v. 70, p. 35-61, 2018. DOI: 10.1016/j.plipres.2018.04.001

MORESCO, H. H.; COLLA, G.; OLIVEIRA, A. S.; BRIGHENTE, I. M. C. **Atividade antioxidante de Myrcia splendens por três diferentes métodos**. 51º Congresso Brasileiro de Química: Meio Ambiente e Energia, 2011.

MOSES, T.; PAPADOPOULOU, K. K.; OSBOURN, A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Norwich, v. 49, n. 6, p. 439-462, 2014. DOI: 10.3109/10409238.2014.953628

MURIPITI, V.; BRIJESH, L.; RACHAMALLA, H. K.; MAREPALLY, S. K.; BANERJEE, R.; PATRI, S. V. α -Tocopherol-ascorbic acid hybrid antioxidant based cation amphiphile for gene delivery: Design, synthesis and transfection. **Bioorganic Chemistry**, Telangana, v. 82, p. 178-191, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.02.025

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, T.; MAZDA, O.; TAKEUCHI, M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, Kyoto, v. 2, n. 8, p. 1205–1211, 2002. DOI: 10.1016/S1567-5769(02)00056-5

NASO, F. C. D.; MELLO, R. N.; BONA, S.; DIAS, A. S.; PORAWSKI, M.; FERRAZ, A. B. F.; RICHTER, M. F.; MARRONI, N. P. Effect of *Agaricus blazei* Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes. **Experimental Diabetes Research**, Porto Alegre, v. 10, p. 1-8, 2010. DOI: 10.1155/2010/543926

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, Seoul, v. 30, n. 2, p. 134-144, 2014. DOI: 10.1016/j.nut.2013.04.007

NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O. The importance of mass spectrometric dereplication in fungal secondary metabolite analysis. **Frontiers In Microbiology**, Kongens Lyngby, v. 6, n. 71, p. 1-15, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00071

NUÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; MONEDERO-SAIZ, T.; GARCÍA-TALAVERA, N. V.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M. B.; SÁNCHEZ-ÁLVAREZ, C.; GARCÍA-ALBERT, A. M.; RODRÍGUEZ-GIL, F. J.; RUIZ-MARÍN, M.; PASTOR-QUIRANTE, F. A.; MARTÍNEZ-DÍAZ, F.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. **Molecular Nutrition & Food Research**, Murcia, v. 58, n. 6, p. 1199-1211, 2014. DOI: 10.1002/mnfr.201300931

OGBOMIDA, E. T.; OMOFONMWAN, K.; AGANMWONYI, I.; FASIPE, I. P.; ENUNEKU, A.; EZEMONYE, L. I. N. Bioactive profiling and therapeutic potential of mushroom (*Pleurotus tuberregium*) extract on Wistar albino rats (*Ratus norvegicus*) exposed to arsenic and chromium toxicity. **Toxicology Reports**, Benin City, v. 5, p. 401-410, 2018. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.03.004

OHTSUKI, T.; TADA, A.; TAHARA, M.; SUEMATSU, T.; SUGIMOTO, N. Applications of Quantitative ¹H NMR in Food- Related Analysis. **Applications of NMR Spectroscopy**, Tokyo, v. 4, n. 41, p. 222-262, 2016. DOI: 10.2174/9781681081434116040007

- OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**, Lublin, v. 144, p. 135-143, 2019. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.09.039
- OPPONG, P.; MAJUMDAR, D.; ATHERTON, J.; BEBB, J. *Helicobacter pylori* infection and pepticulcers. **Medicine**, Boston, v. 43, n. 4, p. 215-222, 2015. DOI: 10.1016/j.mpmed.2015.01.008
- OTTE, D. A.; BORCHMANN, D. E.; LIN, C.; WECK, M.; WOERPEL, K. A. ¹³C NMR spectroscopy for the quantitative determination of compound ratios and polymer end groups. **Organic Letters**, New York, v. 16, n. 6, p. 1566-1569, 2014. DOI: 10.1021/ol403776k
- OU, K.; GU, L. Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **Journal of Functional Foods**, Gainesville, v. 7, p. 43-53, 2014. DOI: 10.1016/j.jff.2013.08.004
- PADILHA, M. M.; AVILA, A. A. L.; SOUSA, P. J. C.; CARDOSO, L. G. V.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). **Journal of Medicinal Food**, Macapá, v. 12, n. 2, p. 359-364, 2009. DOI: 10.1089/jmf.2008.0177
- PANG, K. L.; OVERY, D. P.; JONES, E. B. G.; CALADO, M. L.; BURGAUD, G.; WALKER, A. K.; JOHNSON, J. A.; KERR, R. G.; CHA, H. J.; BILLS, G. F. 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. **Fungal Biology Reviews**, Keelung, v. 30, n. 4, p. 163-175, 2016. DOI: 10.1016/j.fbr.2016.08.001
- PASSOS, M. L. C.; SARAIVA, M. L. M. F. S. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement**, Porto, v. 135, p. 896-904, 2019. DOI: 10.1016/j.measurement.2018.12.045
- PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; PILO-VELOSE, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* Swartz (bombacaceae). **Eclética Química**, Belo Horizonte, v. 23, p. 45-57, 1998. DOI: 10.1590/S0100-46701998000100004
- PÉREZ-CHÁVEZ, A. M.; MAYER, L.; ALBERTÓ, E. Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources. **Energy For Sustainable Development**, Buenos Aires, v. 50, p. 50-60, 2019. DOI: 10.1016/j.esd.2019.03.002
- PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Madrid, v. 646, p. 107-112, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.03.022
- PINYA, S.; FERRIOL, P.; TEJADA, S.; SUREDA, A. Chapter 5.3 - Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*), maitake (*Grifola frondosa*). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, Balearic Islands, p. 517-526, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00068-0
- PISKLAK, D. M.; ZIELINSKA-PISKLAK, M. A.; SZELESZCZUK, Ł.; WAWER, I. ¹³C solid-state NMR analysis of the most common pharmaceutical excipients used in solid drug formulations, Part I: Chemical shifts assignment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Warsaw, v. 122, p. 81-89, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.032

- POPESCU, M. L.; COSTEA, T.; GÎRD, C. E.; FIERĂSCU, I.; BALACI, T. D.; FIERĂSCU, R. C. Antioxidant Activity of Romanian *Agaricus blazei* Murrill and *Agaricus bisporus* J.E. Lange Mushrooms. **Farmacía**, Bucureste, v. 65, n. 3, p. 329-335, 2017.
- PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Surgery (oxford)**, Edinburgh, v. 32, n. 11, p. 599-607, 2014. DOI: 10.1016/j.mpsur.2014.09.005
- PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, San Diego, v.114, n. 22, p. 5601, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1614680114
- RADULESCU, C.; BURULEANU, L. C.; GEORGESCU, A. A.; DULAMA, I. D. Correlation between Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants in Several Edible Mushrooms Species. **Food Engineering**, Targoviste, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.82578
- RAFIGHI, P.; BOLLELLA, P.; PANKRATOVA, G.; PETERBAUER, C. K.; CONGHAILE, P. O.; LEECH, D.; HAGHIGHI, B.; GORTON, L. Substrate preference pattern of *Agaricus meleagris* pyranose dehydrogenase evaluated through bioelectrochemical flow injection amperometry. **Chemelectrochem**, Lund, v. 6, n. 3, p. 801–809, 2019. DOI: 10.1002/celec.201801194
- RAMOUTSAKI, I. A.; RAMOUTSAKIS, I. A.; PAPADAKIS, C. E.; HELIDONIS, E. S. Therapeutic methods used for otolaryngological problems during the byzantine period. **Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology**, Crete, v. 111, n. 6, p. 553–557, 2002. DOI: 10.1177/000348940211100612
- RATH, M.; MÜLLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; Munder, M. Metabolism *via* Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Frontiers In Immunology**, Mainz, v. 5, p. 1-10, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532
- RATHORE, H.; PRASAD, S.; KAPRI, M.; TIWARI, A.; SHARMA, S. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. **Journal of Functional Foods**, New Delhi, v. 56, p. 182-193, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2019.03.016
- RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **Pharma Nutrition**, Hauz Khas, v. 5, n. 2, p. 35-46, 2017. DOI: 10.1016/j.phanu.2017.02.001
- RAUF, A.; IMRAN, M.; ABU-IZNEID, T.; UL-HAQ, I.; PATEL, S.; PAN, X.; NAZ, S.; SILVA, A. S.; SAEED, F.; SULERIA, H. A. R. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Beijing, v. 116, p. 108999, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108999
- REIS, F. S.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, M. H.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, Bragança, v. 66, p. 48-62, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.05.010
- RESHETNIKOV, S. V.; WASSER, S. P.; TAN, K. K. Higher Basidiomycota as source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 3, p. 361-394, 2001. DOI: 10.1615/INTJMEDMUSHR.V3.I4.80

- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, Michigan, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979. DOI: 10.1016/0016-5085(79)90002-7
- ROCHA, C. Q.; FARIA, F. M.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; KITANO, B. T.; GHILARDI, A. F.; FERREIRA, A. L.; ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, R. J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HAMBURGER, M.; VILEGAS, W.; QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, São Vicente, v. 135, p. 93-105, 2017. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.12.002
- RODRIGUES, F.; LIMA, J.; OLIVEIRA, M. C.; VASCONCELOS, J.; SANTIAGO, G.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; ARRIAGA, A. Diterpene and other constituents from **Stemodia maritima** (scrophulariaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Fortaleza, v. 21, n. 8, p. 1581-1586, 2010. DOI: 10.1590/S0103-50532010000800025
- ROSA, L. A.; MORENO-ESCAMILLA, J. O.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Chapter 12 - Phenolic Compounds. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, Ciudad Juárez, p. 253-271, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9
- ROVINA, K.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. D. Toxicology, extraction and analytical methods for determination of Amaranth in food and beverage products. **Trends in Food Science & Technology**, Sabah, v. 65, p. 68-79, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.05.008
- ROZZA, A. L.; FARIA, F. M.; BRITO, A. R. S.; PELLIZZON, C. H. The Gastroprotective Effect of Menthol: Involvement of Anti-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. **PLoS One**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. e86686, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086686
- RUBEL, R.; SANTA, H. S. D.; DOS SANTOS, L. F.; FERNANDES, L. C.; FIGUEIREDO, B. C.; SOCCOL, C. R. Immunomodulatory and antitumoral properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (agaricomycetes) medicinal mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Guarapuava, v. 20, n. 4, 393-403, 2018. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025979
- SAGUN, K.; ROY, V. K.; KUMAR, R. S.; IBRAHIM, K. S.; PARIMELAZHAGAN, T.; KUMAR, N. S.; GURUSUBRAMANIAN, G. Antioxidant potential, anti-inflammatory activity and gastroprotective mechanisms of *Mallotus roxburghianus* (Muell) against ethanol-induced gastric ulcers in Wistar albino rats. **Journal Of Functional Foods**, Coimbatore, v. 36, p. 448-458, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.07.005
- SAHU, P. K.; RAMISETTI, N. R.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C. S.; PANDA, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Telangana, v. 147, p. 590-611, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006
- SALEEM, H.; PAL, P.; HAIJA, M. A.; BANAT, F. Regeneration and reuse of bio-surfactant to produce colloidal gas aphrons for heavy metal ions removal using single and multistage cascade flotation. **Journal of Cleaner Production**, Abu Dhabi, v. 217, p. 493-502, 2019. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.01.216

SALES, I. R. P.; FORMIGA, R. O.; MACHADO, F. D. F.; NASCIMENTO, R. F.; PESSOA, M. M. B.; BARROS, M. E. F. X.; VIEIRA, G. C.; GADELHA, F. A. A. F.; MARINHO, A. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; JÚNIOR, R. F. A.; ANTUNES, A. A.; BATISTA, L. M.

Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. **Journal Of Ethnopharmacology**, João Pessoa, v. 222, p. 190-200, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.04.019

SALVADÓ, M. J.; CASANOVA, E.; FERNÁNDEZ-IGLESIAS, A.; AROLA, L.; BLADÉ C. Roles of proanthocyanidin rich extracts in obesity. **Food & Function**, Tarragona, v. 6, n. 4, p. 1053-1071, 2015. DOI: 10.1039/c4fo01035c

SÁ-NAKANISHI.; SOARES, A. A.; NATALI, M. R.; COMAR, J. F.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. Effects of the continuous administration of an *Agaricus blazei* extract to rats on oxidative parameters of the brain and liver during aging. **Molecules**, Maringá, v. 19, n. 11, p. 18590-185603, 2014. DOI: 10.3390/molecules191118590

SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and Systems Biotechnology**, Tlaxcala, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2017. DOI: 10.1016/j.synbio.2016.12.001

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radical Biology and Medicine**, Pittsburgh, v. 62, p. 111-120, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003

SANTOS, R. C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; ZANATTA, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; LIMA, C. A. H. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Botucatu, v. 111, p. 1112-1123, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.132

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Patiala, v. 10, n. 1, p. 120-132, 2008. DOI: 10.1208/s12248-008-9012-0

SCHWAB, W.; FISCHER, T.; WÜST, M. Terpene glucoside production: Improved biocatalytic processes using glycosyltransferases. **Engineering In Life Sciences**, Freising, v. 15, n. 4, p. 376-386, 2015. DOI: 10.1002/elsc.201400156

SELLAL, A.; MELLOUL, D.; BENGHEDFA, N.; BELATTAR, R.; BOUZIDI, A. Iron, Zinc and Copper Chelation Activity of *Phragmites australis* leaves extracts. **Adevances in Environmental Biology**, Sfax, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2016.

SEZER, Y. Ç.; SÜFER, Ö.; SEZER, G. Extraction of Phenolic Compounds from Oven and Microwave Dried Mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*) by Using Methanol, Ethanol and Aceton as Solvents. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, Osmaniye, v. 51, n. 3, p. 393-397, 2017. DOI: 10.5530/ijper.51.3s.55

SHAIK, J. Study on preliminary phytochemical screening and anti ulcer activity of *Agaricus bisporus*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Mulugu, v. 7, n. 5, 2018.

- SHEN, Y.; SUN, J.; NIU, C.; YU, D.; CHEN, Z.; CONG, W.; GENG, F. Mechanistic evaluation of gastroprotective effects of Kangfuxin on ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Chemico-biological interactions**, Chengdu, v. 273, p. 115-124, 2017. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.007
- SIDAHMED, H. M. A.; VADIVELU, J.; LOKE, M. F.; ARBAB, I. A.; ABDUL, B.; SUKARI, M. A.; ABDELWAHAB, S. I. Anti-ulcerogenic activity of dentatin from *Clausena excavata* Burm. f. against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Possible role of mucus and anti-oxidant effect. **Phytomedicine**, Kuala Lumpur, v. 55, p. 31-39, 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.06.036
- SIDANA, J.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, Himachal Pradesh, v. 130, p. 22-46, 2016. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.06.010
- SIENIAWSKA, E. Activities of Tannins-From In Vitro Studies to Clinical Trials. **Natural Product Communications**, Lublin, v. 10, n. 11, p. 1877-1884, 2015. DOI: 10.1177/1934578X1501001118
- SILVA, F. A.; BIZERRA, A. M. C.; FERNANDES, P. R. D. Testes fítoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa Orellana* L. (Urucum). **HOLOS**, Pau dos Ferros, v. 2, 2018a. DOI: 10.15628/holos.2018.6929
- SILVA, B. A. F.; COSTA, R. H. S.; FERNANDES, C. N.; LEITE, L. H. I.; RIBEIRO-FILHO, J.; GARCIA, T. R.; COUTINHO, H. D. M.; WANDERLEY, A. G.; MENEZES, I. R. A. HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, Crato, v. 119, p. 199-205, 2018b. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.041
- SILVA, S. A. C.; CORREA, V. G.; GONCALVES, G. A.; SOARES, A. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. *Agaricus blazei* Bioactive Compounds and their Effects on Human Health: Benefits and Controversies. **Current Pharmaceutical Design**, Maringá, v. 23, n. 19, p. 2807-2834, 2017. DOI: 10.2174/1381612823666170119093719
- SILVA, R. G.; MANTOVANINI, L.; ZINGARETTI, S. M. Cogumelo *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae): adjuvante imunológico no tratamento do câncer. **Revista Uningá Review**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 6-12, 2015.
- SINGH, B.; SINGH, J. P.; SINGH, N.; KAUR, A. Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. **Food Chemistry**, Punjab, v. 233, p. 540-549, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.161
- SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, Messina, v. 174, n. 11, p. 1244-1262, 2017. DOI: 10.1111/bph.13630
- SOARES, A. A.; SOUZA, C. G. M.; DANIEL, F. M.; FERRARI, G. P.; COSTA, S. M. G.; PERALTA, R. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. **Food Chemistry**, Maringá, v. 112, p. 775-781, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.117
- SOININEN, P.; KANGAS, A. J.; WÜRTZ, P.; SUNA, T.; ALA-KORPELA, M. Quantitative Serum Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics in Cardiovascular Epidemiology and

Genetics. **Circulation Cardiovascular Genetics**, Bristol, v. 8, n. 1, p. 192-206, 2015. DOI: 10.1161/circgenetics.114.000216

SOKOVIC, M.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; NIKOLIC, M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. *Agaricus blazei* hot water extract shows anti quorum sensing activity in the nosocomial human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, Wageningen, v. 19, n. 4, p. 4189–4199, 2014. DOI: 10.3390/molecules19044189

SONG, S. H.; KIM, J. E.; SUNG, J. E.; LEE, H. A.; YUN, W. B.; LEE, Y. H.; SONG, H. K.; HWANG, D. Y. Anti-ulcer effect of Gallarhois extract with anti-oxidant activity in an ICR model of ethanol/hydrochloride acid-induced gastric injury. **Journal Of Traditional And Complementary Medicine**, Miryang, v. 9, n. 4, p. 372-382, 2018. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.07.001

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, Teresina, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200021

SOUZA, A. C. S.; GONÇALVES, G. A.; SOARES, A. A.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; SANTI-RAMPAZZO, A. P.; NATALI, M. R. M.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A. Antioxidant Action of an Aqueous Extract of Royal Sun Medicinal Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes), in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Maringá, v. 20, n. 2, p. 101–117, 2018. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.2018025309

STOJKOVIC, D.; SMILJKOVIC, M.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; VAN GRIENSVEN, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; SOKOVIC, M. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, Belgrade, v. 120, p. 100-103, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.01.007

STOJKOVIC, D.; REIS, F. S.; GLAMOČLIJA, J.; CIRIC, U. M.; BARROS, L.; VAN GRIENSVEN, L. J.; FERREIRA, I. C.; SOKOVIĆ, M. Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product-natural preservatives in yoghurt. **Food & Function**, Belgrade, v. 5, n. 7, p. 1602-1612, 2014. DOI: 10.1039/c4fo00054d

STOKNES, K.; SCHOLWIN, F.; JASINSKA, A.; WOJCIECHOWSKA, E.; MLECZEK, M.; HANC, A.; NIEDZIELSKI, P. Cadmium mobility in a circular food-to-waste-to-food system and the use of a cultivated mushroom (*Agaricus subrufescens*) as a remediation agent. **Journal of Environmental Management**, Drammen, v. 245, p. 48-54, 2019. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.03.134

SUI, Z. F.; YANG, R. Y.; LIU, B.; GUA, T. M.; ZHAO, Z. L.; SHI, D. F.; CHANG, D. Q. Chemical analysis of *Agaricus blazei* polysaccharides and effect of the polysaccharides on IL-1 mRNA expression in skin of burn wound-treated rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, Beijing, v. 47, n. 2, p. 155–157, 2010. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.05.006

SULAIEVA, O.; DELIY, V.; ZHARIKOV, S. Relationship between leukocytes recruitment and risk of rebleeding in patients with peptic ulcers. **Pathophysiology**, Zaporizhzhia, v. 22, n. 4, p. 175-182, 2015. DOI: 10.1016/j.pathophys.2015.07.002

SUMBUL, S.; AHMAD, M. A.; MOHD, A.; MOHD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: an overview. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 3, n. 3, p. 361-367, 2011. DOI: 10.4103/0975-7406.84437

SUN, A.; XU, X.; LIN, J.; CUI, X.; XU, R. Neuroprotection by Saponins. **Phytotherapy Research**, Quanzhou, v. 29, n. 2, p. 187-200, 2015. DOI: 10.1002/ptr.5246

TAKSHAY, P.; WILLIAMSON, J. D. Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. **Trends in Plant Science**, Raleigh, v. 21, n. 6, p. 486-497, 2016. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.01.006

TAOFIQ, O.; RODRIGUES, F.; BARROS, L.; PERALTA, R. M.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P. *Agaricus blazei* Murrill from Brazil: an ingredient for nutraceutical and cosmeceutical applications. **Food & Function**, Bragança, v. 10, n. 2, p. 565–572, 2019. DOI: 10.1039/C8FO02461H

TAYLER, M. C. D.; THEIS, T.; SJOLANDER, T. F.; BLANCHARD, J. W.; KENTNER, A.; PUSTELNY, S.; PINES, A.; BUDKER, D. Invited Review Article: Instrumentation for nuclear magnetic resonance in zero and ultralow magnetic field. **Review of Scientific Instruments**, Berkeley, v. 88, p. 091101, 2017. DOI: 10.1063/1.5003347

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, Hyderabad, v. 249, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1007/s00425-018-3056-x

THAKUR, M. Mushrooms as a Biological Tool in Mycoremediation of Polluted Soils. **Emerging Issues in Ecology and Environmental Science**, Noida, p. 27-42, 2019a. DOI: 10.1007/978-3-319-99398-0_3

THAKUR, M.; BHATTACHARYA, S.; KHOSLA, P. K.; PURI, S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research On Medicinal and Aromatic Plants**, Solan, v. 12, p. 1-12, 2019b. DOI: 10.1016/j.jarmap.2018.11.004

THERKELSEN, S. P.; HETLAND, G.; LYBERG, T.; LYGREN, I.; JOHNSON, E. Cytokine levels after consumption of a Medicinal *Agaricus blazei* Murrill-based Mushroom Extract, AndoSan™, in Patients with Crohn's disease and Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo Controlled Study. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 84, n. 6, p. 323–331, 2016a. DOI: 10.1111/sji.12476

THERKELSEN, S. P.; HETLAND, G.; LYBERG, T.; LYGREN, I.; JOHNSON, E. Effect of a Medicinal *Agaricus blazei* Murrill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, on Symptoms, Fatigue and Quality of Life in Patients with Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo Controlled Study. **Plos One**, Oslo, v. 2, n. 11, 2016b. DOI: 10.1371/journal.pone.0150191

TOMSIK, A.; PAVLIC, B.; VLADIC, J.; RAMIC, M.; BRINDZA, J.; VIDOVIC, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, Novi Sad, v. 29, p. 502-511, 2016. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.11.005

TOURANI, M.; HABIBZADEH, M.; KARKHAH, A.; SHOKRI-SHIRVANI, J.; BARARI, L.; NOURI, H. R. Association of TNF- α but not IL-1 β levels with the presence of *Helicobacter pylori* infection increased the risk of peptic ulcer development. **Cytokine**, Babol, v. 110, p. 232-236, 2018. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.01.003

- TSAI, S. Y.; TSAI, H. L.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. **Food Chemistry**, Taichung, v. 107, p. 977-983, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.080
- TSAI, S. Y.; TSAI, H. L.; MAU, J. L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. **LWT - Food Science and Technology**, Taichung, v. 40, n. 8, p. 1392-1402, 2007. DOI: 10.1016/j.lwt.2006.10.001
- TSIMOGLIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Chapter 16 - Classification of Phenolic Compounds in Plants. **Polyphenols in Plants**, Athens, p. 263-284, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8
- TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, Tsukuba, v. 5, n. 3, p. 93, 2018. DOI: 10.3390/medicines5030093
- VAIRAMUTHU, G. M.; PETER, J. J. R.; JERLEY, A.; DHANDAPANI, S. Effect of Chitosan in Radical Scavenging and Bactericidal Activity Isolated from *Agaricus bisporus* Mushroom. **International Journal of Life Sciences Scientific Research**, Tiruchirappalli, v. 4, n. 4, p. 1952-1959, 2018. DOI: 10.21276/ijlssr.2018.4.4.14
- VAN DRIEL, I. R.; TU, E.; GLEESON, P. A. Autoimmune Gastritis and Pernicious Anemia. **The Autoimmune Diseases**, Parkville, p. 619-631, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-384929-8.00044-7
- VAN GRIENSVEN, L. J. Culinary-medicinal mushrooms: Must action be taken?. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Wageningen, v. 11, n. 3, p. 281-286, 2009. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v11.i3.70
- VÁZQUEZ, C. V.; ROJAS, M. G. V.; RAMÍREZ, C. A.; CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; GARCÍA-GASCA, T.; MARTÍNEZ, R. A. F.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; LÓPEZ-SABATER, C. M.; CASTELLOTE, A. I.; MONTEMAYOR, H. M. A.; CARBOT, K. T. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, Querétaro, v. 176, p. 480-486, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.050
- VEERAPPAN, V. G.; RAJASANKAR, S.; RAMKUMAR, M.; DHANALAKSHMI, C.; MANIVASAGAM, T.; THENMOZHI, A. J.; ESSA, M. M.; CHIDAMBARAM, R.; KALANDAR, A. *Agaricus blazei* extract abrogates rotenone-induced dopamine depletion and motor deficits by its anti-oxidative and anti-inflammatory properties in Parkinsonic mice. **Nutritional Neuroscience**, Annamalai Nagar, v. 21, n. 9, p. 657-666, 2018. DOI: 10.1080/1028415x.2017.1337290
- VELDE, F. V.; GRACE, M. H.; ESPOSITO, D.; PIROVANI, M. É.; LILA, M. A. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. **Journal of Food Composition and Analysis**, Santa Fe, v. 47, p. 82-91, 2016. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.01.008
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; PALAFOX-CARLOS, H.; WALL-MEDRANO, A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; CHEN, C. Y.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARAN-GARCÍA, H.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic compounds: their

journey after intake. **Food & Function**, Sonora, v. 5, n. 2, p. 189-197, 2014. DOI: 10.1039/c3fo60361j

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUJAJILA, J.; SOUCHARD, J. P.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, Toulouse, v. 83, p. 44-54, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.05.004

VENERITO, M.; LINK, A.; ROKKAS, T.; MALFERTHEINER, P. Review: Gastric cancer-Clinical aspects. **Helicobacter**, Magdeburg, v. 24, e12643, 2019. DOI: 10.1111/hel.12643

VITAL, A. C. P.; CROGE, C.; COSTA, S. M. G.; PINTRO, P. T. M. Effect of addition of *Agaricus blazei* mushroom residue to milk enriched with Omega-3 on the prevention of lipid oxidation and bioavailability of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, Maringá, v. 52, p. 1483-1490, 2017. DOI: 10.1111/ijfs.13413

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA-JUNIOR, M. R. Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. **Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications**, Campinas, p. 33-50, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5

WANG, H.; FU, Z.; HAN, C. The Medicinal Values of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Jinan, v. 2013, p. 1-6, 2013a. DOI: 10.1155/2013/842619

WANG, C. H.; WU, S. B.; WU, Y. T.; WEI, Y. H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. **Experimental Biology and Medicine**, New Taipei, v. 238, n. 5, p. 450-460, 2013b. DOI: 10.1177/1535370213493069

WANSI, J. D.; DEVKOTA, K. P.; TSHIKALANGE, E.; KUETE, V. 14 - Alkaloids from the Medicinal Plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa**, Dschang, p. 557-605, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-405927-6.00014-X

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill?. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 4, n. 4, p. 267-290, 2002. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v4.i4.10

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 1, p. 31-62, 1999. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v1.i1.30

WASSON, R. G. **Soma Divine mushroom of immortality**. NY, USA: Harcourt Brace Jovanovich, Inc., 1968.

WEI, Q.; ZHAN, Y. S.; CHEN, B. Z.; JIANG, Y. J. Optimization of polyphenol extraction from *Agaricus blazei* Murrill and determination of its antioxidant activities. **Current Topics In Nutraceutical Research**, Beijing, v. 18, n. 2, p. 158-165, 2019. DOI: 10.37290/ctnr2641-452X.18:158-165

WEN, Y.; WAN, Y. Z.; QIAO, C. X.; XU, X. F.; WANG, J.; SHEN, Y. Immunoregenerative effects of the bionically cultured Sanghuang mushrooms (*Inonotus sanghuagn*) on the

immunodeficient mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Zhenjiang, v. 245, p. 112047, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112047

WINK, M. Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?. **Frontiers in Physiology**, Heidelberg, v. 9, n. 364, p. 1-9, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00364

WU, X.; HUANG, Q.; XU, N.; CAI, J.; LUO, D.; ZHANG, Q.; SU, Z.; GAO, C.; LIU, Y. Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of Water Extract of *Acrostichum aureum* Linn. against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Guangzhou, v. 2018, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1155/2018/3585394

XIN, X.; QU, J.; VEERARAGHAVAN, V. P.; MOHAN, S. K.; GU, K. Assessment of the gastroprotective effect of the chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (agaricomycetes), against the gastric mucosal ulceration induced by ethanol in experimental rats. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Jinan, v. 21, n. 8, p. 805-816, 2019. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019031154

YAMANAKA, D.; MOTOI, M.; ISHIBASHI, K. I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; OHNO, N. Effect of *Agaricus brasiliensis*-derived cold water extract on Toll-like receptor 2-dependent cytokine production in vitro. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, Hachioji, v. 34, n. 4, p. 561-570, 2012. DOI: 10.3109/08923973.2011.633526

YAO, J. N.; CHEN, L.; CHEN, H. P.; ZHAO, Z. Z.; ZHANG, S. B.; HUANG, Y.; TANG, Y.; ISAKA, M.; LI, Z. H.; FENG, T.; LIU, J. K. *Miscellaneous lanostane* triterpenoids with cytotoxicities from fruiting bodies of the basidiomycete *Stereum* sp. **Fitoterapia**, Wuhan, v. 125, p. 227-234, 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.11.020

YI, F.; SUN, J.; BAO, X.; MA, B.; SUN, M. Influence of molecular distillation on antioxidant and antimicrobial activities of rose essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, Shanghai, v. 102, p. 310-316, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.12.051

YI, R.; WANG, R.; SUN, P.; ZHAO, X. Antioxidant-mediated preventative effect of *Dragon-pearl* tea crude polyphenol extract on reserpine-induced gastric ulcers. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Chongqing, v. 10, n. 1, p. 338-344, 2015. DOI: 10.3892/etm.2015.2473

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G.; The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, Yanji, v. 21, n. 5, p. 1-18, 2016. DOI: 10.3390/molecules21050559

YULIANA, N. D.; JAHANGIR, M.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, Bogor, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013. DOI: 10.1007/s11101-013-9297-1

YURKIV, B.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; SYBIRNA, N. O. Antioxidant Effects of Medicinal Mushrooms *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): Evidence from Animal Studies. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Haifa, v. 17, n. 10, p. 943-955, 2015. DOI: 10.1615/intjmedmushrooms.v17.i10.40

ZAIDMAN, B. Z.; YASSIN, M.; MAHAJNA, J.; WASSER, S. P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Kiryat Shmona, v. 67, n. 4, p. 453-468, 2005. DOI: 10.1007/s00253-004-1787-z

ZAKARIA, Z. A.; BALAN, T.; AZEMI, A. K.; OMAR, M. H.; MOHTARRUDIN, N.; AHMAD, Z.; ABDULLAH, M. N. H.; DESA, M. N. M.; TEH, L. K.; SALLEH, M. Z. Mechanism(s) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Serdang, v. 16, n. 78, p. 1–17, 2016. DOI: 10.1186/s12906-016-1041-0

ZÁLEŠÁK, F.; BON, D. J. Y. D.; POSPÍŠIL, J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, Olomouc, v. 146, n. 104284, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104284

ZHAI, F. H.; WANG, Q.; HAN, J. R. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. **Journal of Cereal Science**, Taiyuan, v. 65, p. 202-208, 2015. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.010

ZHANG, Z.; WANG, J.; LIU, L.; SHUN, Q.; SHI, W.; LIU, X.; WANG, F. The optimum conditions and mechanism for increasing exo-polysaccharide production of *Truffles melanosporum* by Dioscorea saponins. **LWT - Food Science and Technology**, Zhenjiang, v. 107, p. 331-339, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.011

ZHANG, A.; DENG, J.; LIU, X.; HE, P.; HE, L.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; SUN, P. Structure and conformation of α -glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill by high-speed shearing homogenization. **International Journal of Biological Macromolecules**, Zhenjiang, v. 113, p. 558–564, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.151

ZHANG, L.; WANG, Y.; LI, D.; HO, C. T.; LI, J.; WAN, X. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. **Food & Function**, Hefei, v. 7, n. 3, p. 1273-1281, 2016. DOI: 10.1039/c5fo01244a

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, Harbin, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2012a. DOI: 10.1039/C1AN15605E

ZHANG, Z.; LV, G.; PAN, H.; FAN, L. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for six phenolic compounds in *Agaricus blazei* Murrill. **International Journal of Food Science & Technology**, Zhejiang, v. 47, n. 1, p. 24-31, 2012b. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02802.x

ZHENG, H.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; WANG, L.; JIN, Z.; HUANG, H.; MAN, S.; GAO, W. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. **Chemico-Biological Interactions**, Tianjin, v. 250, p. 68-77, 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.003

ZIVOVINOVIC, S.; ALDER, R.; ALLENSPACH, M. D.; STEUER, C. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. **Journal of Analytical Science and Technology**, Zürich, v. 9, n. 27, p. 1-10, 2018. DOI: 10.1186/s40543-018-0159-8

ZSIGMOND, A. R.; VARGA, K.; KÁNTOR, I.; URÁK, I.; MAY, Z.; HÉBERGER, K. Elemental composition of wild growing *Agaricus campestris* mushroom in urban and peri-urban regions of Transylvania (Romania). **Journal of Food Composition and Analysis**, Budapest, v. 72, p. 15-21, 2018. DOI: 10.1016/j.jfca.2018.05.006