



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 Antioxidante.....	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