

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DENISE CAROLINE LUIZ SOARES

**Estudo do perfil químico e das atividades citotóxica e antitrombótica de
extratos bruto e supercríticos de *Agaricus bisporus***

CAMPO GRANDE-MS

2022

DENISE CAROLINE LUIZ SOARES

Estudo do perfil químico e das atividades citotóxica e antitrombótica de extratos bruto e supercríticos de *Agaricus bisporus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Investigação de alvos terapêuticos, estudos epidemiológicos e pré-clínicos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

CAMPO GRANDE – MS

2022

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto, pela oportunidade, compreensão e paciência, orientação, e por ter sempre acreditado em mim. Muito obrigada!

À Profa Karina Bettega Felipe do Departamento de Análises Clínicas, da Universidade Federal do Paraná-UFPR minha gratidão pela colaboração no desenvolvimento desse estudo.

À Profa Ana Carolina Rabello de Moraes, Stephanie Viegas Gkionis e Tanara Arenhart do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC agradeço pelo auxílio e colaboração nessa pesquisa.

À Prof. Sandra Regina Salvador Ferreira e Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos-Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC agradeço pela colaboração no desenvolvimento desse estudo.

À Prof. Denise Brentan Silva do Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-UFMS agradeço por contribuir com esse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul- UFMS.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os cogumelos são conhecidos pelo seu valor medicinal e apresentam benefícios para a saúde associados à sua ingestão dietética, particularmente o cogumelo *Agaricus bisporus* devido aos seus diversos componentes bioativos. No entanto, há dificuldades para determinar os compostos bioativos, uma vez que os diferentes métodos de extração podem resultar em perfis químicos variáveis e frequentemente não são investigados, bem como a toxicidade dos solventes residuais não é considerada. A extração por fluido supercrítico (ESC) utiliza alta pressão de CO₂ para sua aplicação como solvente, a qual é considerada uma tecnologia limpa, uma vez que os extratos obtidos com esse processo apresentam elevada pureza e baixo teor de solventes residuais. Foram avaliados dois diferentes extratos de *Agaricus bisporus* utilizando extração com fluido supercrítico (ESC1 e ESC2) e extração por solvente orgânico clássico (extrato bruto), utilizando etanol como solvente, comparando seus rendimentos, perfis químicos, atividade citotóxica e antitrombótica (antiagregante plaquetária e anticoagulante). O perfil químico foi avaliado por cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrometria de massa. A análise química mostrou que (E, E) - 9,12- octadecadienoato de metila e (Z) -9-octadecenoato de metila foram os principais ésteres derivados de ácidos graxos nos extratos ESC. O ESC apresentou alto efeito citotóxico na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, quando comparado à MDA-MB-231, linhagem de câncer de mama resistente. A linhagem celular McCoy (não tumoral) não apresentou efeito citotóxico. Além disso, o efeito antiagregante dos extratos ESC foi superior ao efeito produzido pela extração por solvente orgânico clássico. No geral, os extratos ESC mostraram o melhor desempenho na triagem bioativa em comparação com o extrato etanólico convencional.

Palavras-chave: *Agaricus bisporus*, câncer de mama, plaquetas, espectrometria de massa.

ABSTRACT

Mushrooms are known for medicinal value and it has health benefits associated with its dietary intake, mainly *Agaricus bisporus* due to its various bioactive components. However, there are difficulties to determine bioactive compounds, since the different extraction methods can result in variate chemical profile and frequently they are not investigated, as well as the toxicity of residual solvents are not considered. The supercritical fluid extraction (SFE) uses high-pressure of CO₂ for its application as solvent; it has considered a clean technology, since the extracts obtained with this process have high purity with low residual solvents. We evaluated different extracts from *Agaricus bisporus* using supercritical fluid extraction (SFE) and classical organic solvent extraction (crude extract), with ethanol as solvent, comparing their yields, chemical profiles, cytotoxic, antiaggregant and anticoagulant activities. The chemical profile was evaluated by Gas or Liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The chemical analysis showed that methyl (E,E)-9,12- octadecadienoate and methyl (Z)-9-octadecenoate were the main esters derived from fatty acids in SEF extracts. The SFE had a high cytotoxic effect in the MCF-7 cell line, when compared to the MDA-MB-231 line. The McCoy cell line (non-tumor) showed no cytotoxic effect. Additionally, the anti-aggregate effect of SFE extracts was higher than the effect produced by classical organic solvent extraction. Overall, SFE extracts showed the best performance on bioactive screening compared to conventional ethanolic extract.

Keywords: *Agaricus bisporus*, breast cancer, platelets, mass spectrometry.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	12
2.1 PRODUTOS NATURAIS	12
2.2 <i>Agaricus bisporus</i>	14
2.3 CÂNCER	17
2.4 CÂNCER DE MAMA	19
2.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES ASSOCIADAS À TROMBOSE	22
2.6 ANTITROMBÓTICOS: ANTIAGREGANTES E ANTICOAGULANTES.	26
2.6 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO	30
3 OBJETIVO	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	34
4.2 EXTRAÇÃO POR SOLVENTE ORGÂNICO CLÁSSICO POR MACERAÇÃO (EXTRATO BRUTO).....	34
4.3 EXTRAÇÃO DE FLUIDO SUPERCRÍTICO (ESC).....	34
4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA – ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)	35
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA – ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)	35
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	36
4.7 COLETA DE SANGUE: OBTENÇÃO DE PLASMA E ISOLAMENTO DE PLAQUETAS.....	36
4.8 DETERMINAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	37

4.9 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO SANGUE.....	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4.11 GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO BRASILEIRO	38
5 RESULTADOS	39
5.1 RENDIMENTOS GLOBAIS	39
5.2 ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS.....	39
5.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i> DE EXTRATOS ESC	43
5.4 O EFEITO DOS EXTRATOS DE <i>A. bisporus</i> NA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS E COAGULAÇÃO DO SANGUE	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO.....	50
8 PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo de descoberta de produtos naturais.....	14
Figura 2. O cogumelo <i>Agaricus bisporus</i> conhecido popularmente como Champignon de Paris	15
Figura 3. A formação do câncer.	18
Figura 4. Etapas da formação da metástase	19
Figura 5. Fluxograma de tratamento de câncer de mama.....	21
Figura 6. As três vias da coagulação	24
Figura 7. As vias de coagulação que auxiliam na formação de trombo.....	25
Figura 8. Análise da hemostasia primária e secundária.....	27
Figura 9. Ativadores e inibidores da fibrinólise	29
Figura 10. Diagrama de fases, segundo a variação de pressão e temperatura.	30
Figura 11. Cromatograma de pico base do extrato bruto de <i>A. bisporus</i> obtido através da análise LC-DAD-MS no modo de íon positivo.....	40
Figura 12. Efeito de <i>A. bisporus</i> em McCoy, MCF-7 e MDA pelo método MTT em 72 h.	43
Figura 13. Resultados obtidos dos extratos de <i>A. bisporus</i> na agregação plaquetária humana.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco do câncer de mama	20
Tabela 2. Valores de rendimento global (X_o) dos extratos comestíveis de <i>A. bisporus</i> de cogumelo obtidos pelos métodos ESC e EB.....	39
Tabela 3. Compostos identificados nos extratos ESC de <i>A. bisporus</i> usando análise de GC-MS	40
Tabela 4. Compostos identificados no extrato bruto (EB) de <i>A. bisporus</i> usando análise de LC-DAD-MS	42
Tabela 5. Valores de IC_{50} e desvio padrão da amostra calculados para os extratos EB, ESC1 e ESC2 de <i>A. bisporus</i> em células McCoy, MCF-7 e MDA em 72h.	44
Tabela 6. Parâmetros de coagulação TP, RNI, TTPa e Razão medidos em plasma humano tratado com heparina e extratos de <i>A. bisporus</i>	45

1 INTRODUÇÃO

O número de pesquisas focadas na relação entre os alimentos e seus ingredientes e a saúde está crescendo notavelmente. Portanto, a busca por compostos naturais e bioativos está relacionada às suas propriedades farmacológicas e biológicas (GALLEGO et al., 2019). Nos últimos anos, muitos estudos demonstraram que os cogumelos comestíveis são fontes de substâncias bioativas. Entre outros, eles contêm polissacarídeos, fibras, terpenos, peptídeos, glicoproteínas, elementos minerais, ácidos graxos insaturados e antioxidantes (HOSEINIFAR et al., 2019). Dentre as diferentes culturas de cogumelos, o cogumelo-botão branco *Agaricus bisporus* é uma espécie importante devido ao valor econômico, demandas de mercado e cultura de difusão mundial (LIU et al. 2013).

A. bisporus é um cogumelo comestível muito comum que contém vários componentes medicinais (SRIRAMULU et al., 2020). Os efeitos farmacológicos exibidos pelos diferentes constituintes estão relacionados às funções antitumoral, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antiobesidade e hepatoprotetora (RAMOS et al., 2019; FENG et al., 2020). As propriedades terapêuticas das formulações à base de produtos naturais estão diretamente relacionadas aos componentes da matéria-prima, que são afetados por variáveis como tempo de armazenamento e condições de temperatura, entre outros (GRINEVICIUS et al., 2017).

A extração com fluido supercrítico ou extração supercrítica (ESC) é um método vantajoso para obtenção de compostos bioativos. As tecnologias de fluidos supercríticos oferecem um método inovador para a indústria de alimentos e a descoberta de medicamentos de fontes naturais (GRINEVICIUS et al., 2019). Essa técnica pode ser utilizada em baixas temperaturas, garantindo menor deterioração dos componentes termolábeis presentes na matéria-prima. Além disso, os extratos obtidos por esta técnica têm a vantagem de apresentar menor teor de solventes residuais, conferindo-lhes menor toxicidade (SWERN, 1982; PARISOTTO et al., 2012). Assim, a extração de matérias-primas por meio desse método tem sido amplamente utilizada, oferecendo uma excelente possibilidade de concentração e isolamento de compostos de interesse (MICHIELIN et al., 2009; GRINEVICIUS et al., 2019).

Considerando a importância deste cogumelo, bem como a ausência de estudos utilizando ESC e *A. bisporus*, o objetivo deste trabalho foi comparar o perfil químico e as atividades biológicas, citotóxica e antitrombótica, de diferentes extratos de *A. bisporus*, em modelos experimentais *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

A área de produtos naturais é uma das mais tradicionais na pesquisa no Brasil, devido à grande biodiversidade do país. A maioria dos trabalhos é voltada ao isolamento e à identificação de substâncias associadas a ensaios biológicos, *in vivo* e *in vitro*. Tais estudos contribuem para a formação de recursos humanos competentes na área de produtos naturais, além de auxiliarem no desenvolvimento de novos medicamentos com intuito de prevenir ou tratar diversas doenças (PUPO et al., 2007, SANTANA et. al, 2018).

A fitoterapia é definida como a ciência que busca a prevenção e cura de doenças através da utilização de produtos naturais, apresentando menor custo para a utilização e a continuação dessa cultura empírica pela população. A utilização da fitoterapia tornou-se comum entre a população com menor poder aquisitivo, tanto da área rural quanto urbana, devido ao fácil acesso à matéria-prima e ao baixo custo. O uso excessivo de produtos naturais oferece riscos à saúde humana, pois há evidências de plantas que podem ser potencialmente tóxicas e levar a disfunção de órgãos vitais (SANTANA et. al, 2018; DE MOURA et. al, 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

Os produtos naturais tornaram-se conhecidos através da cultura popular, passada de geração em geração, por pessoas conhecidas como curandeiros, que acumularam experiências e conhecimentos a respeito do uso de plantas medicinais. Há registros históricos sobre a utilização das plantas para o tratamento de doenças desde 4.000 a.C, sendo que o primeiro registro médico depositado no Museu da Pensilvânia é datado de 2.100 a.C., incluindo a coleção de fórmulas de trinta diferentes drogas de origem vegetal, animal ou mineral (DUARTE, 2006; DE LIMA, BARBADO, 2020).

As descobertas de produtos naturais para o tratamento de doenças e alívio de condições físicas/psíquicas são descritos desde o século XIX(Figura 1). A descoberta e a utilização do ópio ocorreram no início da civilização. Como evidência mais antiga do cultivo da papoula, os sumérios descreviam a papoula como a “planta da alegria” (COHEN,1969). A papoula, nome popular da planta *Papaver somniferum*, da qual se extrai o ópio, crescia nas terras em torno do Mediterrâneo (BOOTH,1998), e o uso do ópio é relatado em praticamente todas civilizações conhecidas, tais como egípcia, mesopotâmica, gregos e romanos (KRITIKOS, 1967).

O início da descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) foi realizado por Edmund Stone, quando se notou que a substância extraída do salgueiro poderia ser utilizada para o controle de febre em pacientes. O isolamento dessa substância em sua forma cristalina ocorreu em 1828 por Leroux, farmacêutico francês. Em 1897, o laboratório Bayer conjugou quimicamente o ácido salicílico com acetato, sintetizando o ácido acetilsalicílico (aspirina), o qual se mostrou menos tóxico. Em 1971, John Vane descobriu pela primeira vez o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico no corpo humano (KOROLKOVAS, 1988; BRAÑA et al. 2005).

A principal descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal é o da *Catharanthus roseus* (L.), conhecida como vinca. Através de testes para avaliar sua atividade hipoglicemiante, tais extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A partir da confirmação da atividade nesses modelos, ocorreu isolamento de dois alcaloides, a vimblastina e a vincristina. Esses dois alcaloides são utilizados para o tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010).

A descoberta da artemisinina ocorreu na China durante a Revolução Cultural com o objetivo de ajudar os militares no norte do Vietnã na guerra contra os Estados Unidos devido a sua eficácia para a cura da malária. Através dessa descoberta, derivados da artemisinina vêm sendo sintetizados até os dias de hoje (LIAO, 2009; MILLER, et al., 2011; UDAYKUMAR, 2014).

Figura 1. Linha do tempo de descoberta de produtos naturais.



Fonte: Adaptado de Simões e colaboradores, 2016.

2.2 *Agaricus bisporus*

Os cogumelos estão inseridos na alimentação de diversos povos desde a antiguidade, devido ao seu valor nutricional e propriedades terapêuticas. Antigamente, os chineses acreditavam que os cogumelos estabeleciam a saúde ao corpo humano, sendo capazes de preservar a juventude por longos períodos, utilizando-os como alimento e remédio (SAFWAT E AL KHOLI, 2006).

Na Grécia, os cogumelos eram reconhecidos como alimentos que davam força para os guerreiros em batalhas (DABA et al., 2008). O *Auricularia auricularia* foi o primeiro cogumelo cultivado artificialmente no mundo, porém o grande desenvolvimento em cultivo de cogumelos ocorreu na França, quando *Agaricus bisporus* foi cultivado pela primeira vez em 1.600 e *Pleurotus* spp. nos EUA em 1900 (CHANG, 2008). Atualmente, em torno de trinta e cinco espécies de cogumelos são cultivadas comercialmente, dentre essas vinte estão sendo cultivadas em escala industrial (MUHAMMAD E SULEIMAN, 2015).

Em razão de suas propriedades nutricionais e médicas, o interesse pelos benefícios dos cogumelos aumentou significativamente nos últimos anos. Os cogumelos comestíveis são classificados como um alimento saudável (PEREIRA et al., 2012; VITAL et. al, 2018), devido ao seu alto teor proteico e de polissacarídeos, associados ao baixo teor de gordura, garantindo maior

concentração de ácidos graxos monosaturados e poli-insaturados quando comparados aos ácidos graxos saturados. Além disso, são fontes de compostos fenólicos, micronutrientes e macronutrientes (RODRIGUES et al., 2015; BACH et. al, 2017; BACH et. al, 2019). Dentre os ácidos graxos identificados no *A. bisporus* é possível ressaltar os ácidos linoleico, palmítico, esteárico, oleico, eicosanóico e erúcido. O *A. bisporus*, por seu baixo teor de gordura e presença de ácido linoleico, é considerado essencial para a saúde humana, podendo reduzir a aterosclerose (SADIQ et al., 2008). O ácido linoleico de *A. bisporus* é responsável por 44,19% do ácido graxo total identificado, sendo cinco e vinte vezes mais do que no *Pleurotus ostreatus* e no *Ganoderma lucidum*, respectivamente (HOSSAIN et. al, 2007).

Os estudos sobre os extratos de *A. bisporus* (Figura 2) estão em constante desenvolvimento, podendo comprovar seus efeitos benéficos como antioxidantes, anticancerígenos e anti-inflamatórios, sugerindo um potencial futuro para o tratamento de diabetes mellitus, infecções bacterianas e fúngicas, distúrbios do sistema imunológico humano e cânceres (DHAMODHARAN E MIRUNALINI, 2010; ÖZTÜRK et al., 2011; MAO et al., 2013; GHahremani-Majd E Dashti, 2015; NDUNGUTSE et al., 2015; SAMI et al. 2021).

Figura 2. O cogumelo *Agaricus bisporus* conhecido popularmente como Champignon de Paris.



Fonte: Fungicultura, 2021.

O isolamento e a purificação de componentes ativos de cogumelos mostraram que os polissacarídeos, exibem atividades antitumorais em relação a várias linhagens de células cancerígenas, o *Basidiomycota* é conhecido por suas características medicinais atribuídas à sua glucana e a outro polissacarídeo. São identificados em *A. bisporus* compostos bioativos que demonstraram propriedades imunomoduladoras e anticâncer. Segundo Zhang et al. (2014), o polissacarídeo marrom de *A. bisporus* é responsável por sua atividade imunoestimulante e antitumoral *in vivo* e *in vitro*.

A ingestão dietética de *A. bisporus* acelera significativamente a secreção de imunoglobulina A secretora que é responsável pela defesa imune humoral nas superfícies das mucosas, demonstrando seus benefícios à saúde (KOZARSKI et al., 2011; JEONG et al., 2012). A arginina presente no *A. bisporus* garante o crescimento retardado do tumor e metástase, podendo ser adicionado à alimentação de pacientes com câncer. Além disso, relatam que a aromatase presente nesse cogumelo diminuiu o risco de câncer de mama (NOVAES et al. 2011; KANAYA et al. 2011). Segundo Yang et al. (2016), a lovastatina exerce efeito anticâncer na linhagem celular de câncer de mama triplo-negativa MDA-MB-231 e já foi identificado em *A. bisporus* (CHEN et al., 2012). Os compostos extraídos de *A. bisporus* suprimem a atividade da aromatase, inibem a proliferação de células do câncer de mama e diminuem a formação de tumor mamário *in vivo* (PALOMARES et al. 2011). Além disso, Chen et al. (2006) relataram que os principais compostos ativos em *A. bisporus* são ácidos graxos insaturados, como ácido linoleico e ácido linolênico, que exibem atividade inibitória da aromatase (ROUPAS et al. 2012).

A Sociedade Canadense do Câncer (*Canadian Cancer Society*) recomenda o consumo do cogumelo *A. bisporus* relacionando-o à sua eficácia contra doenças humanas, assim como sua diminuição no risco de câncer de mama devido ao consumo de cogumelos por mulheres na pré-menopausa (SHIN et al. 2010).

O cogumelo *A. bisporus* é reconhecido por ser utilizado contra a desnutrição em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, além de ser uma fonte de tratamento para diabetes, câncer, dislipidemias ou suplementos alimentares saudáveis. Tais estudos mostraram que a terapia nutracêutica é uma fonte de novas terapêuticas contra muitas doenças (ATILA et al., 2021).

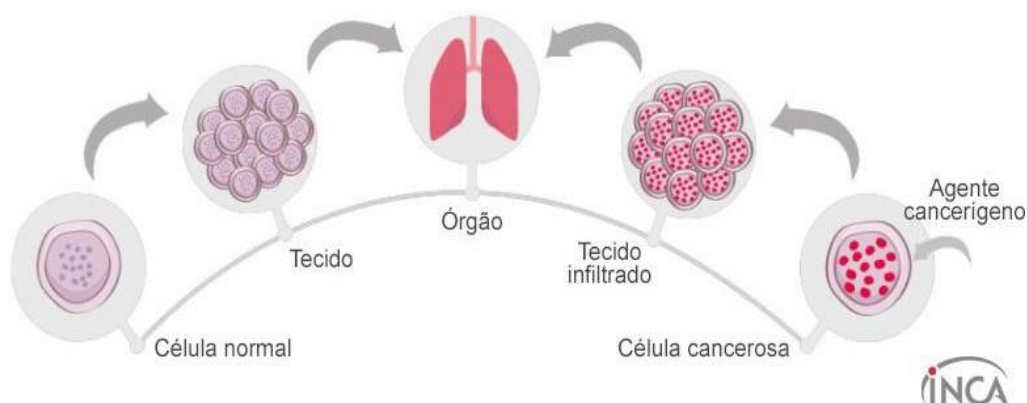
2.3 CÂNCER

A palavra câncer é advinda de origens antigas e derivada do termo em latim “caranguejo”, sendo justificado por agarrar-se de uma forma obstinada a qualquer parte do que se apodera, como um caranguejo (GUPTA et al., 2004). O câncer engloba em torno de 100 diferentes tipos de doenças com crescimento desordenado de células e capacidade de invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes. Através de uma mutação genética a célula passa a receber instruções erradas para as suas atividades, ocorrendo a formação de genes especiais, denominados proto-oncogenes (inativos em células normais). Os proto-oncogenes ativados tornam-se oncogenes, fazendo com que células normais se transformem em células cancerosas (RIBEIRO et al., 2021).

A carcinogênese é o processo de formação do câncer, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes (Figura 3), em uma dada frequência e em dado período de tempo, e pela interação entre eles. Devem ser consideradas, no entanto, as características individuais que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular (SILVA et al., 2004; DÜSMAN et al., 2012; RIBEIRO et al., 2020).

A definição bioquímica para o câncer é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (MOFFAT et al., 2000). Através da capacidade de invasão dos tumores, torna-se possível sua penetração em vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, ocorrendo uma disseminação. Quanto maior o nível de agressividade, seu rápido crescimento e tamanho, muito maior é possibilidade de desencadear metástases (GUPTA et al., 2004).

Figura 3. A formação do câncer.

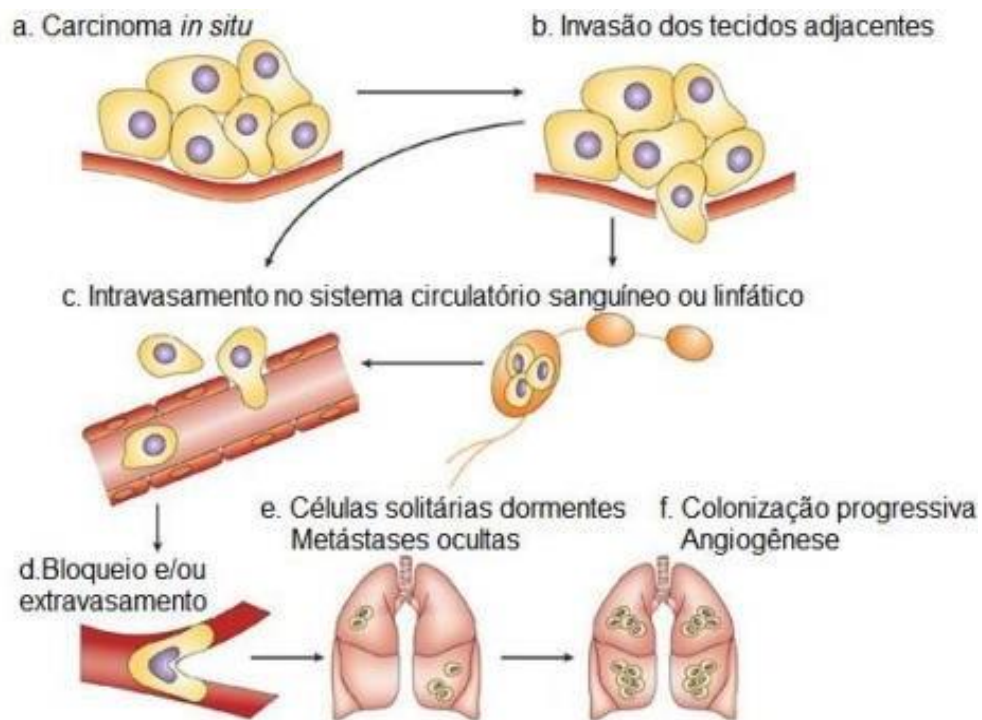


Fonte: INCA, 2021.

A origem do câncer se dá por alterações no DNA celular, o que causa mutações. Normalmente, as células possuem mecanismos de regulação, tendo o seu período de funcionamento e de sua morte. Quando ocorre algum erro nesses mecanismos, há possibilidade de surgir células alteradas, tornando-as cancerosas. As células cancerosas têm capacidade de divisão superior quando comparadas às células normais e o seu crescimento torna-se contínuo. Tais células em excesso invadem todo o organismo. O acúmulo dessas células de crescimento desordenado dá origem aos tumores (BACAC et al., 2008; INCA, 2021).

As células possuem a capacidade de se desprenderem do tumor e de se deslocarem, invadindo tecidos vizinhos, chegando ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático, se disseminando, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (Figura 4). Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos perdem suas funções. Sendo assim, as células cancerosas apresentam quatro características que as distinguem das células normais: proliferação descontrolada, indiferenciação e perda de função, poder de invasão e capacidade de sofrer metástases (BRUM et al., 2017; INCA, 2021).

Figura 4. Etapas da formação da metástase.



Fonte: adaptado de STEEG, 2003.

2.4 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é causado pela multiplicação desordenada de células da mama, gerando células anormais que se multiplicam e formando um tumor, com desenvolvimento rápido ou lento. Cerca de 66.280 novos casos foram descritos em 2021, com 18.295 mortes, sendo 18.068 mulheres e 227 homens. Os fatores de risco do câncer de mama não são isolados, podendo dividi-los em três fatores (Tabela 1): fatores ambientais e comportamentais, fatores da história reprodutiva e hormonal e fatores genéticos e hereditários. Além da faixa etária, sendo que cerca de quatro em cada cinco casos, ocorrem após os 50 anos (KASPER et al., 2016).

Tabela 1. Fatores de risco do câncer de mama.

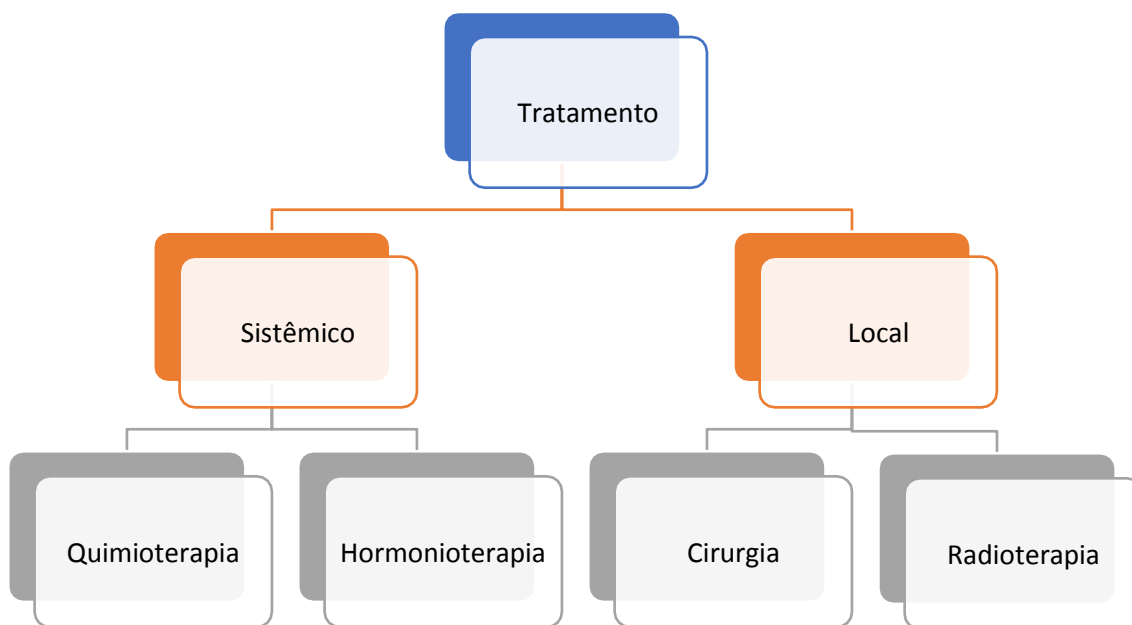
Fatores ambientais e Comportamentais	Fatores da história reprodutiva e hormonal	Fatores genéticos e hereditários*
Obesidade e sobrepeso após a menopausa;	Primeira menstruação antes de 12 anos;	História familiar de câncer de ovário;
Sedentarismo e inatividade física;	Não ter tido filhos;	Casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos;
Consumo de bebida alcoólica;	Primeira gravidez após os 30 anos;	História familiar de câncer de mama em homens;
Exposição frequente a radiações ionizantes (Raios-X).	Parar de menstruar (menopausa) após os 55 anos;	Alteração genética, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2.
	Uso de contraceptivos hormonais (estrogênio-progesterona);	
	Ter feito reposição hormonal pós-menopausa.	

Fonte: INCA, 2021.

Para prevenção do câncer de mama recomenda-se a inclusão de hábitos saudáveis na rotina, como praticar atividade física, ter alimentação balanceada, manter peso corporal ideal, evitar o consumo de bebidas alcoólicas, amamentar e evitar o uso de anticoncepcionais e reposição hormonal. O câncer de mama pode ser percebido em suas fases iniciais através de nódulos fixos e indolores na mama, pele da mama avermelhada, alterações no mamilo, nódulos nas axilas ou pescoço e/ou saída de líquidos pelos mamilos (CÂNDIDO et al. 2016; SILVA et al., 2020).

Existem dois fatores para definir o tratamento que será utilizado: a fase em que a doença se encontra e o tipo de tumor. Através do diagnóstico precoce há maior potencial curativo. Em casos com metástases o tratamento ideal será estabelecido considerando a melhora da qualidade de vida do paciente e buscando prolongar a sobrevida. O tratamento de câncer de mama é dividido em tratamento local e sistêmico (Figura 5), sendo o tratamento local: cirurgia e radioterapia e o tratamento sistêmico: quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (FERREIRA et al., 2017; INCA, 2021).

Figura 5. Fluxograma de tratamento de câncer de mama.



Fonte: adaptado de INCA, 2021.

Para as fases iniciais do câncer de mama, a conduta indicada é a cirurgia, conservadora (apenas retirada do tumor) ou mastectomia (retirada da mama). Após cirurgia, o tratamento complementar é a radioterapia. A mensuração dos receptores hormonais (receptor de estrôgeno e progesterona) do tumor através de exame de imunohistoquímica avalia se a hormonioterapia pode ser indicada. A presença do HER-2 (fator de crescimento epidérmico 2) é avaliada e através desse exame será analisada a necessidade de terapia biológica anti-HER-2, sendo que a superexpressão do HER-2 induz malignidade dos cânceres e pior prognóstico (SLAMON et al., 2011; MARTINS et al., 2017).

As linhagens celulares são uma grande contribuição para o desenvolvimento de alternativas para tratamento e diagnóstico molecular do câncer, pois através de sua utilização é possível reconhecer diversos compostos antitumorais. Dentre as inúmeras linhagens celulares de tumor de glândula mamária, encontra-se a MCF-7 e MDA-MB-231. A linhagem celular MCF-7 representa 70% dos casos de câncer de mama não invasivo e enquanto a linhagem celular MDA-MB-231 é mensurada em 15% dos casos de câncer de mama invasivo e metastático (COMÇA et al., 2015).

A linhagem MCF-7 apresenta receptores positivos para estrógeno e progesterona, com características de diferentes epitélios mamários, incluindo a síntese de estradiol. Essa linhagem é considerada pouco agressiva e não invasiva, possuindo um baixo potencial de metástase *in vitro*. Enquanto a linhagem celular MDA-MB-231 é derivada de um tecido epitelial de câncer de mama, sendo uma das linhagens mamárias mais utilizadas em pesquisas laboratoriais. É altamente agressiva, invasiva e pertence ao subtipo molecular triplo-negativo, não apresentando receptores para estrógeno, progesterona, bem como a ausência de receptores para a proteína HER2(CAILLEAU et al., 1978; CHAVEZ et al., 2010; COMÇA et al., 2015).

2.5 DOENÇAS CARDIOVASCULARES ASSOCIADAS À TROMBOSE

O aumento da expectativa de vida é responsável pelo número de indivíduos de idade avançada com doenças crônicas, tornando-se uma preocupação em saúde pública. A Organização Mundial de Saúde (OMS) alega a ocorrência de elevado número de indivíduos com doenças cardiovasculares em países de baixa e média renda. As doenças cardiovasculares são classificadas como a principal causa de morte nos países em desenvolvimento (MATHERS, 2008; MENDIS et al., 2011; WHO, 2014; ABUBAKAR et al. 2015).

Há uma variedade de doenças do sistema circulatório amplamente classificadas como doenças cardiovasculares, destas estão inclusas: isquemia cardíaca, o acidente vascular encefálico, o tromboembolismo venoso e a doença congênita cardíaca. As doenças cardiovasculares possuem fatores de risco que podem ser tratados e controlados. Como fatores de risco controlados pode-se definir a hipertensão sanguínea, hiperglicemia, hipercolesterolemia, obesidade, falta de atividade física, tabagismo e uso excessivo de álcool (WHO, 2017).

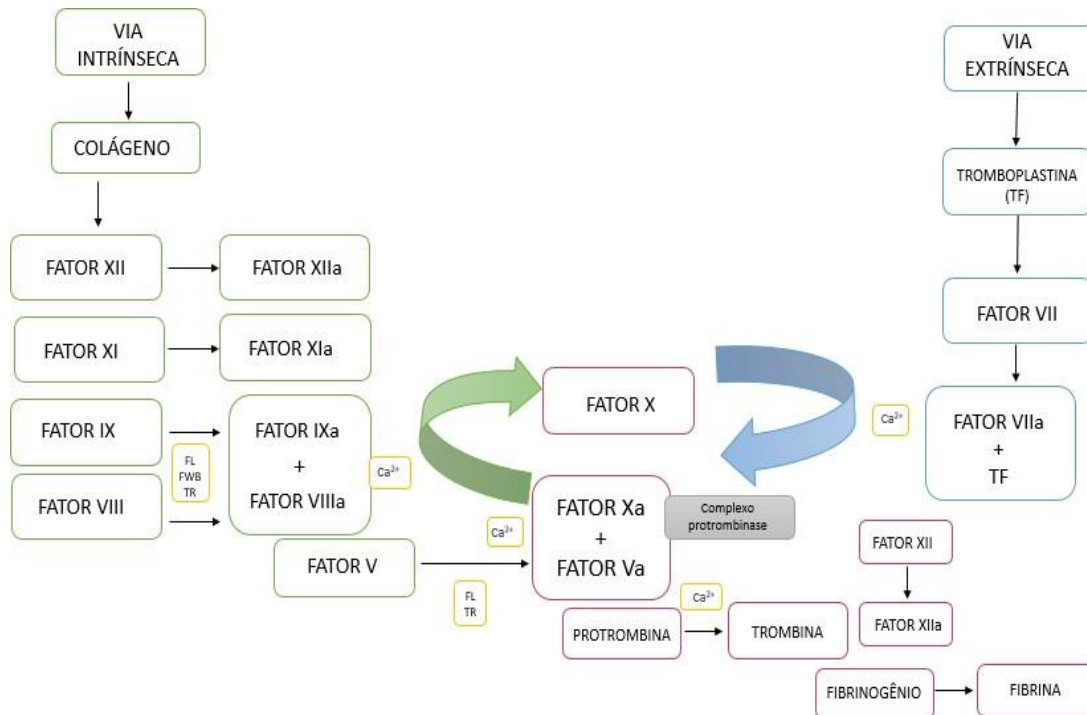
Considerando a importância mundial da trombose, diversos estudos têm como objetivo o desenvolvimento de fármacos para o tratamento e prevenção de eventos tromboembólicos. A farmacoterapia disponível para tratamento antitrombótico tem seus efeitos indesejáveis e como principal risco há elevada chance de ocorrência de hemorragias, além do alto custo dos medicamentos. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de desenvolver novos agentes antitrombóticos, pois as terapias disponíveis não garantem controle seguro

desses eventos tromboembólicos (ANDREWS et al. 2014; BICKMANN et al. 2017; GIMBEL et al. 2018; MCFADYEN et al. 2018). Para desenvolver novos possíveis fármacos para prevenção de eventos tromboembólicos é necessário entender a papel das plaquetas e as vias de coagulação que formam os trombos.

A cascata da coagulação é didaticamente dividida em 3 vias: via intrínseca, via extrínseca e via comum (Figura 6). A via extrínseca é ativada por tromboplastina (fator tecidual) quando ocorre lesão da parede vascular. A tromboplastina ativa o fator VII, formando um complexo do fator tecidual com VIIa, tal complexo por influência do cálcio ativa o fator X. A partir do fator X se inicia a via comum. O complexo protrombinase ativa o fator II (protrombina), tornando-se IIa (trombina) (SILVA & MELO, 2016; VAN DER MEIJDEN & HEEMSKERK, 2019).

A via intrínseca (via de ativação por contato) da coagulação é ativada pelo colágeno quando ocorre uma lesão vascular. O fator XII quando ativado pelo colágeno tornando-se XIIa, assim como o fator XI forma XIa. O fator IX ativado torna-se IXa e o fator VIII é ativado por fosfolipídios das plaquetas, fator de Willdebrand e trombina (provinda de grânulos presentes nas plaquetas e de retroalimentação). Os fatores IXa e VIIIa formam um complexo cálcio dependente ativado pelo fator X, tornando-o Xa. O fator V é ativado em Va através da influência de fosfolipídios e trombina, formando dessa forma o complexo protrombinase dependente de cálcio (Xa e Va). A trombina ativa fibrinogênio, que consequentemente ativa fibrina (SILVA & MELO, 2016; VAN DER MEIJDEN & HEEMSKERK, 2019). A trombina ativa o fator XIII, tornando XIIIa responsável pela polimerização das fibrinas (ligações cruzadas). A fibrina é uma proteína insolúvel responsável pela formação de uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em um tampão hemostático (SILVA & MELO, 2016; VAN DER MEIJDEN & HEEMSKERK, 2019).

Figura 6. As três vias da coagulação.



Nota:

FL: fosfolípidos de membrana das plaquetas

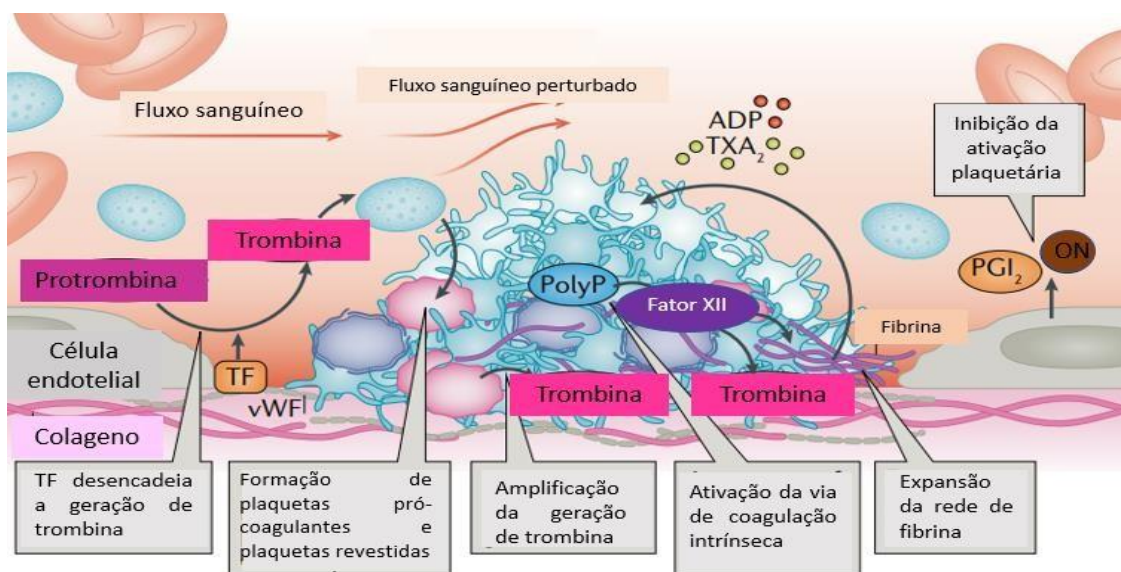
FWR: fator de Willdebrand

TR: trombina

Fonte: Adaptado de SILVA & MELO, 2016.

A ocorrência de dano ao endotélio pode resultar em dois tipos de mecanismos fisiológicos: a hemorragia e ativação do mecanismo hemostático. A hemostasia eficaz impede a perda abundante de sangue pelos vasos sanguíneos. Para a redução da perda sanguínea ocorrem três eventos importantes: o espasmo vascular, a formação do tampão plaquetário e a coagulação do sangue. A célula endotelial possui papel importante na inibição da resposta hemostática, principalmente pela síntese de prostaglandina e óxido nítrico (Figura 7), que tem propriedades vasodilatadoras e função de inibir a agregação plaquetária (HOFFBRAND, 2019).

Figura 7. As vias de coagulação que auxiliam na formação de trombo.



Fonte: Adaptado de VAN DER MEIJDEN & HEEMSKERK, 2019.

A formação de constituintes sanguíneos de forma desordenada dentro dos vasos com interação de fatores vasculares, celulares e humorais na corrente sanguínea circulante, com capacidade de se desenvolver em artérias (responsável por transportar o sangue oxigenado nos pulmões para os tecidos) ou veias (transporta o sangue após deixar oxigênio nos tecidos, de volta para os pulmões), denomina-se trombose (MOREIRA, et al., 2009; HEINER, 2018). A trombose pode ser classificada como trombose arterial e trombose venosa, dependendo do local onde se desenvolve. A Trombose Venosa (TV) se desencadeia através da formação de coágulos sanguíneos nas veias presentes em todo o organismo (HEINER, 2018). A partir da formação do coágulo sanguíneo na veia, ocorre o bloqueio do fluxo sanguíneo, gerando a formação de edemas e dores no local afetado. Por sua vez, a TV acomete os membros inferiores, na maior parte dos casos, porém não exclui a possibilidade de ocorrer em nos membros superiores (SIMÕES; DE OLIVEIRA, 2014; GOMES, et al. 2021).

A principal causa da Trombose Arterial (TA) é a lesão do endotélio vascular. Normalmente, ocorrem em regiões da circulação arterial parcialmente obstruídas devido ao crescimento de placas de aterosclerose. Como resultado ocorre a inflamação e acúmulo de colesterol na parede arterial (SIMÕES; DE OLIVEIRA, 2014). O infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular encefálico e a doença arterial obstrutiva crônica são as tromboses arteriais mais

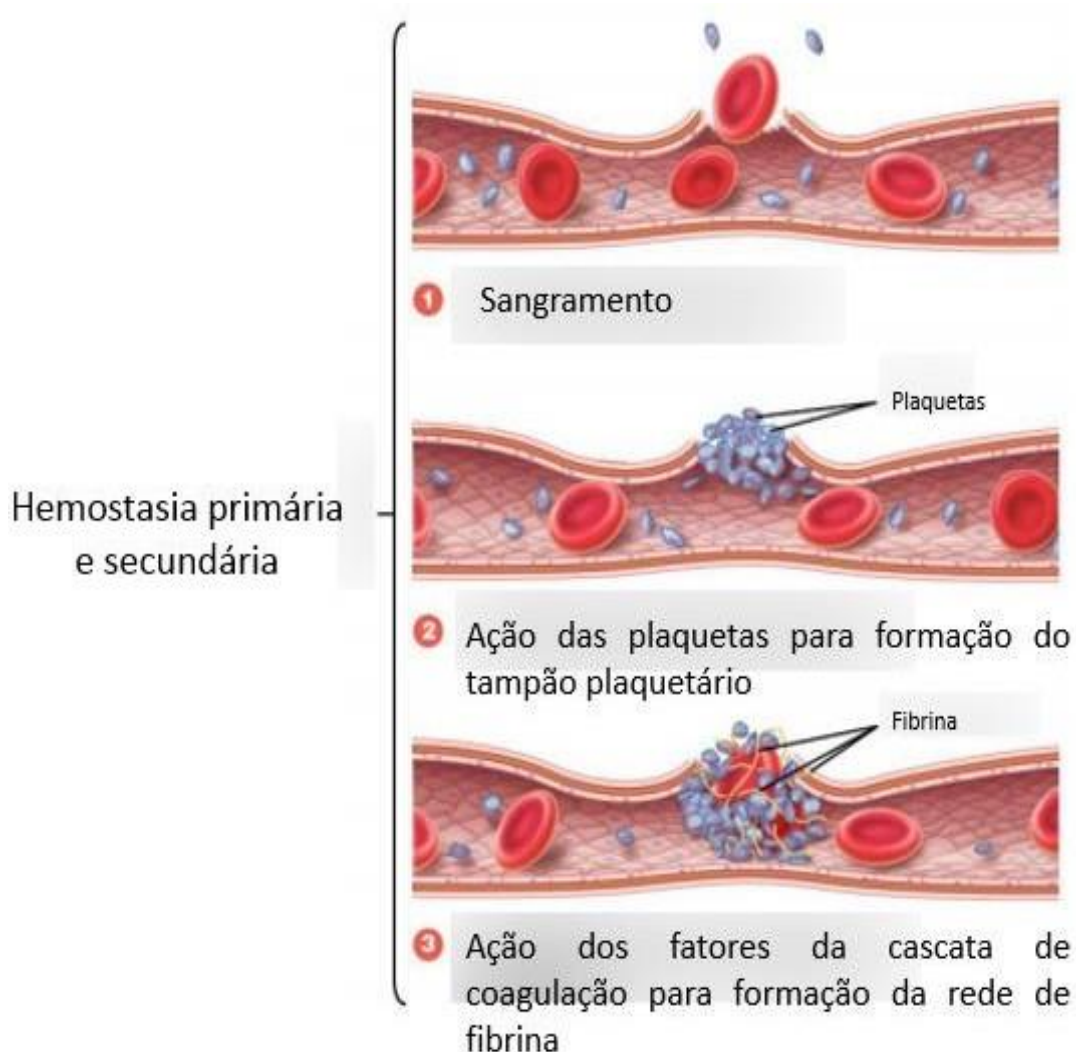
conhecidas. (MACCALLUM et al., 1999; MORAES et al., 2020). Quando ocorre a obstrução da circulação arterial, conseqüentemente há interrupção na chegada de oxigênio para os demais tecidos, o que desencadeia sofrimento agudo e morte em segundos a minutos dos tecidos (caso não seja restabelecido o fluxo sanguíneo). Na trombose arterial há um predomínio de agregados plaquetários devido à ocorrência de microlesões nos vasos sanguíneos, expondo o colágeno que ativa as plaquetas (MACCALLUM et al., 1999; DENTALI et al., 2009; MESQUITA, et al., 2016).

2.6 ANTITROMBÓTICOS: ANTIAGREGANTES E ANTICOAGULANTES

Um organismo em estado fisiológico normal apresenta o sangue em estado fluido, para que possa desempenhar sua principal função de transporte de células e outras substâncias. O sistema hemostático mantém a fluidez sanguínea e a integridade vascular, seus principais componentes envolvidos são as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas da coagulação e as da fibrinólise (BITTENCOURT, 2016; HOFFBRAND, 2019).

Na hemostasia primária, através da lesão vascular ocorre o desencadeamento da adesão e ativação das plaquetas induzindo a rearranjos na estrutura plaquetária (Figura 8), secreção dos grânulos plaquetários e agregação plaquetária. Como resultado, forma-se um tampão hemostático para obstruir o local lesionado, cessando a perda sanguínea e auxiliando na regeneração tecidual (MATUS et al., 2018). As plaquetas ativadas são capazes de recrutar outras plaquetas circulantes pela secreção de mediadores da ativação plaquetária, como a adenosina difosfato (ADP) e a adenosina trifosfato (ATP) ocorrendo o aumento do tamanho do tampão plaquetário (KOUPENOVA-ZAMOR et al., 2017).

Figura 8. Análise da hemostasia primária e secundária.



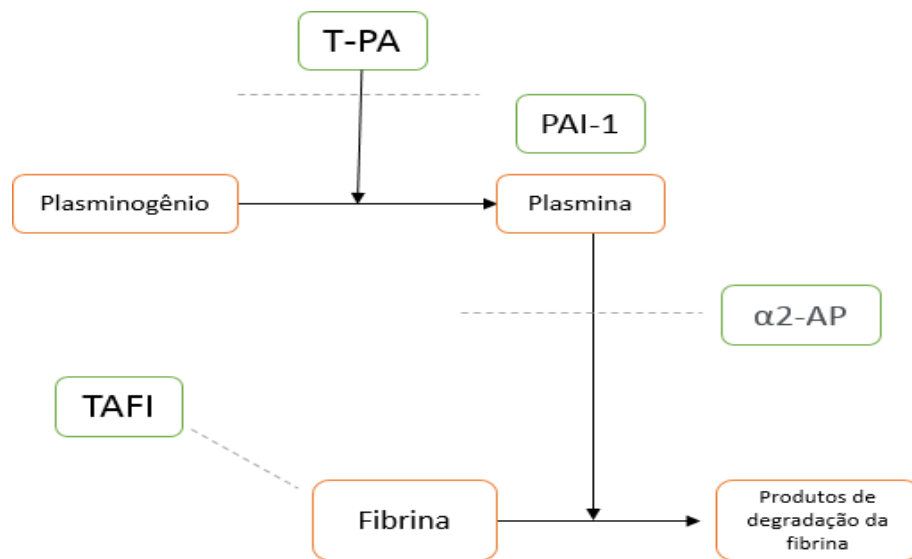
Fonte: Adaptado de Kasvi, 2019.

Na hemostasia secundária, o fibrinogênio do local da lesão sofre ação da trombina e é convertido em fibrina. A partir da formação da fibrina, uma proteína que faz ligações covalentes com outros monômeros de fibrina, forma uma estrutura firme que estabiliza o agregado plaquetário. (TOMAIUOLO, 2017). Didaticamente, a hemostasia secundária compreende a cascata de coagulação, constituída de fatores de coagulação que são proteínas sintetizadas pelo fígado (TEN CATE et al., 2017).

Posteriormente, ocorre a degradação do trombo, para que seja restabelecido o lúmen vascular e o fluxo sanguíneo. A fibrinólise é o processo de degradação da fibrina, mediada através da ação da plasmina (RODRIGUES et al., 2012). O sistema fibrinolítico é composto por várias proteínas responsáveis por regular a geração de plasmina (enzima ativa), produzida a partir do plasminogênio. As funções do sistema plasminogênio/plasmina incluem a degradação da fibrina, remodelagem da matriz extracelular, crescimento e disseminação tumoral, cicatrização e infecção (FRANCO, R.F., 2001; LANGER; WOLOSKE, 2006). Para que ocorra a fibrinólise, é necessário a ativação do plasminogênio. Os três ativadores do plasminogênio são: o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) e por meio da via intrínseca da coagulação (Figura 9). A síntese e secreção de t-PA ocorre pelas células endoteliais, é o principal ativador relacionado à dissolução de fibrina na circulação, já o u-PA é sintetizado por monócitos, macrófagos e o epitélio urinário. A via intrínseca da coagulação ativa diretamente plasminogênio, além disso, favorece a ativação de t-PA e u-PA. Assim como a fibrinólise possui ativadores também há os inibidores endógenos desse processo, dentre eles: a fibrinólise são o Inibidor de Fibrinólise Ativável por Trombina (TAFI), o Inibidor 1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1) e a alfa-2-antiplasmina (α 2-AP) (MARINHO, 2021).

A partir da falha dos mecanismos hemostáticos por anormalidades genéticas ou adquiridas ocorrem eventos hemorrágicos ou complicações tromboembólicas (KRIZ et al., 2009). As doenças cardiovasculares tornaram-se uma das causas de óbito recorrentes e implicam em altos gastos para sistema de saúde ou até mesmo familiares, devido a internações e tratamento dos pacientes, fazendo desses eventos um importante problema de saúde (CHAN et al., 2016). Os eventos trombóticos são prevenidos e tratados com medicamentos antiagregantes ou anticoagulantes, tais medicamentos possuem desvantagens como uma janela terapêutica estreita e interações medicamentosas. Os produtos naturais são candidatos a fontes de novos agentes terapêuticos devido a sua grande quantidade de compostos disponíveis e utilizados para diversas aplicações (KHALID et al., 2016).

Figura 9. Ativadores e inibidores da fibrinólise.



Nota:

t-PA: Ativador Tecidual do Plasminogênio

PAI-1: Inibidor 1 do Ativador do Plasminogênio

α2-AP: Alfa-2-antiplasmina

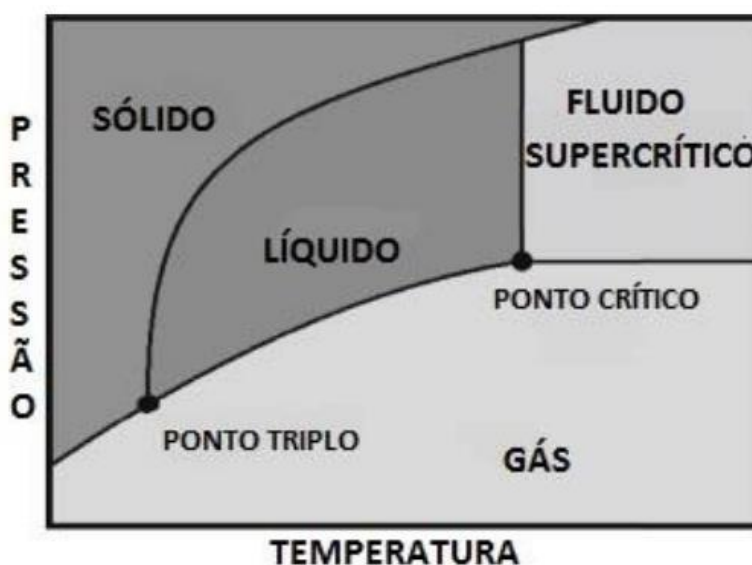
TAFI: Inibidor de Fibrinólise Ativável por Trombina

Fonte: Adaptado de Marinho, 2021.

2.6 EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Um solvente quando atinge a pressão e a temperatura acima do seu ponto crítico (Figura 10), torna-se um fluido supercrítico (KNEZ et al., 2014). Considera-se temperatura crítica a temperatura máxima em que um gás é capaz de se converter em líquido através do aumento da pressão, sendo que a pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido é convertido em gás pelo aumento da temperatura (RIZVI et al., 1986). Na extração supercrítica (ESC) ocorre a transferência de massa sob pressão e temperatura acima do ponto crítico do solvente (MANTELL et al., 2013). As vantagens desse método são inúmeras quando comparados aos métodos de extração convencionais, dentre elas, destaca-se o aumento da seletividade, qualidade superior dos extratos, diminuição da utilização de solvente orgânico, o que garante baixas quantidades residual desolvente no extrato (XYNOS et al., 2012).

Figura 10. Diagrama de fases, segundo a variação de pressão e temperatura.



Fonte: KNEZ et al., 2014.

A extração por fluido supercrítico garante maior eficiência da extração quando comparada aos métodos de extração convencionais, utilizando solventes líquidos, pois o fluido supercrítico apresenta baixa viscosidade e baixa tensão superficial, o que permite a rápida difusão do solvente (POULIOT et al., 2014). Na extração convencional, o volume de solvente orgânico é alto, sendo necessária uma etapa exaustiva para que ocorra a separação do extrato e do

solvente, nessa etapa pode ocorrer degradação de compostos termolábeis de interesse devido às altas temperaturas do solvente durante a extração (KIM et al., 1999; GIL-CHAVEZ et al., 2013).

O solvente mundialmente utilizado para a extração por fluido supercrítico é o dióxido de carbono (CO_2), pois apresenta diversas vantagens tais como não ser tóxico, não inflamável, baixo custo e seguro (MANTELL et al., 2013; POULIOT et al., 2014). O CO_2 é gasoso em temperatura ambiente e a recuperação do extrato livre de solvente se torna muito simples e a extração de compostos termolábeis pode ser realizada (HERRERO et al., 2010). Como o dióxido de carbono (CO_2) apresenta baixa polaridade, ele é menos efetivo para a extração de compostos com maior polaridade. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) é aplicada nas análises de misturas complexas e permite identificação de compostos voláteis e com baixa polaridade. Portanto, para identificação dos compostos presentes nos extratos supercríticos é preferencialmente a empregada a técnica de CG-MS (ANDREO, D et al, 2006; LANÇAS, 2009; DE ANDRADE NEVES et al., 2021).

A extração utilizando solvente orgânico (extrato bruto) permite que sejam identificados compostos com maior polaridade, empregando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) como método de identificação de compostos, um procedimento mais rápido e econômico comparado aos demais, com capacidade de identificar compostos com maior polaridade e menor volatilidade (LANÇAS, 2009; GRUTES et al. 2019; SVERSUT et al., 2019).

Resumidamente, a extração supercrítica pode ser definida como um método de separação e purificação com inúmeras vantagens dentre elas, o alto rendimento de extrato obtido, a facilidade de separação do solvente e a possibilidade de se trabalhar em baixas temperaturas (NASCIMENTO et al., 2016). Desde 1997, considerava-se a possibilidade desse processo como uma alternativa para substituir os métodos tradicionais como a extração por arraste a vapor e a extração por solvente a baixa pressão (REVERCHON et al., 1997). Sendo que entre os anos 2000 e 2013 mais de 300 plantas foram utilizadas para em processos de extração supercrítica (REN et al., 2014).

A intenção desse estudo é destacar que apesar de ser cultivado mundialmente o cogumelo *Agaricus bisporus* necessita de estudos que comprovem as vantagens da utilização de diferentes métodos de extração de compostos bioativos. Dessa maneira, enfatiza-se a diferença entre o perfil químico (influenciado pelo método de extração empregado) e as atividades biológicas de *A. bisporus*, através da avaliação do efeito citotóxico e ação antitrombótica de diferentes extratos desse cogumelo em modelos experimentais *in vitro*.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a capacidade antitumoral e antitrombótica de extratos bruto e supercríticos obtidos a partir de *Agaricus bisporus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar os extratos bruto e supercríticos de *A. bisporus*;
- Avaliar a capacidade citotóxica dos extratos bruto e supercríticos de *A. bisporus*, em linhagens celulares tumorais (MCF-7 e MDA) e linhagem celular não tumoral (McCoy);
- Avaliar o efeito sobre a agregação plaquetária dos extratos bruto e supercríticos de *A. bisporus*;
- Avaliar a atividade anticoagulante dos extratos bruto e supercríticos de *A. bisporus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O cogumelo comestível *A. bisporus*, popularmente conhecido como cogumelo Portobello, foi adquirido da empresa Zucca Mushrooms Company (Salto, SP, Brasil). Primeiramente, 1 kg de cogumelos inteiros foram desidratados em estufa a 45-60 °C durante 18 h. O material seco foi pulverizado para produzir partículas com tamanho classificado como malha 32 (amostra moída) e utilizado para realizar os diferentes métodos de extração para fins comparativos. A amostra moída foi armazenada a 10 °C até os procedimentos de extração.

4.2 EXTRAÇÃO POR SOLVENTE ORGÂNICO CLÁSSICO POR MACERAÇÃO (EXTRATO BRUTO)

A extração foi realizada pelo método de maceração, misturando-se 100 g de amostra seca e moída em 200 mL de etanol (99% puro, CAQ Ind. & Com., SP, Brasil), por 7 dias em temperatura ambiente e um dia de agitação manual. A amostra resultante foi evaporada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, e após liofilizada para obtenção do extrato bruto (EB) (PARISOTTO et al., 2012).

4.3 EXTRAÇÃO DE FLUIDO SUPERCRÍTICO (ESC)

O método de ESC utilizado foi realizado de acordo metodologia proposta por Mazzutti et al. (2017). Para isso, aproximadamente 15 g de material seco e em pó foram colocados dentro da coluna de extração (EV1, 20 mm de diâmetro interno e 440mm de altura, aço inoxidável AISI 316) e adicionadas esferas de vidro para formar um leito de partículas fixas dentro da coluna. As extrações foram realizadas a 40 °C e pressões de 20 Mpa (ESC1) e 30 Mpa (ESC2), vazão de solvente de $1,2 \pm 2 \text{ kg h}^{-1}$ e durante 2 h. As condições de extração foram selecionadas de acordo com a literatura bem como estudo piloto com a matéria-prima do cogumelo. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar, pesados e armazenados em freezer (-18 °C).

A coluna de extração foi revestida termicamente e controlada por banho de aquecimento (Microquímica, modelo MQBTZ 99-20, Palhoça/SC – Brasil). As pressões de extração foram controladas por manômetros analógicos (General Connections, Campinas / SP – Brasil). O gás CO₂ foi comprimido por uma bomba de alta pressão (Maximator, modelo M111, Alemanha), juntamente com um banho termostático (Microquímica, modelo MQBMP01, Palhoça/SC – Brasil). Um banho aquecedor de água (Fisatom, modelo 572, São Paulo/SP – Brasil) manteve a temperatura a 60 °C das válvulas reguladoras (HIP, modelo 10-11 NFA e modelo 10-11 NFA-REG, EUA) responsáveis pelo CO₂ controle de fluxo e taxa de fluxo.

4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA – ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Os extratos ESC1 e ESC2 foram analisados por GC-MS, aplicando-se cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu QP2010 acoplado a espectrômetro de massas, com fonte de ionização de elétrons (EI) e energia de ionização de 70 Ev. Foi usada uma coluna cromatográfica Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 mm de espessura) e hélio como gás de arraste a pressão de 100 kPa e taxa de fluxo da coluna de 1,61 mL/ min. A proporção de divisão foi de 1:10 e o programa de temperatura foi o seguinte: 60 °C por 3 min, 60 a 310 °C aumentando em 6 °C/min e 310 °C por 13 min. Para a identificação dos compostos, os dados foram comparados com os dados dos bancos de dados WILEY 7 e NIST 11 e seus índices de retenção foram comparados com os dados relatados por Adams et al.2007. Para os cálculos do índice de retenção, uma série de alcanos (C8 a C26) foi injetada.

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA – ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS)

O extrato bruto foi analisado por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massa (LC-DAD-MS). Foi utilizado um UFLC Prominence Shimadzu e um espectrômetro de massa MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Para as análises, foi aplicada uma coluna Kinetex C18 (2,6 µm, 150 ± 2,1 mm). A fase móvel era composta por água (A) e

acetonitrila (B), ambas adicionadas a 0,1% de ácido fórmico. O perfil de eluição foi o seguinte: 0 a 2 min – 3% de B, 2 a 25 min – 3-25% de B, 25 a 40 min – 80% de B. A coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C e a taxa de fluxo foi de 0,3 mL/min. O extrato bruto foi preparado a 1 mg/mL e 3 µL foram injetados.

Os compostos foram identificados com base na comparação com dados espectrais publicados (UV, MS e MS / MS) e com dados depositados no banco de dados *Global Natural Products Social Networking* (GNPS).

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O efeito citotóxico de *A. bisporus* contra células MCF-7, MDA-MB-231 (câncer de mama) e McCoy (não tumorais) foi medido usando o ensaio MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) segundo Mosmann (1983). As células foram plaqueadas a uma densidade de 10^4 células/poço em placas de 96 poços e deixadas crescer por 24 h. Em seguida, o meio foi obtido e as células foram tratadas com DMSO (1%) como controle ou em diferentes concentrações (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/mL) dos extratos por 24, 48 e 72 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (0,5 mg/mL) por 2 h. A solução do meio MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de DMSO (100 µL/poço) e a absorbância da solução foi avaliada a 550 nm. Três experimentos independentes foram realizados, e os resultados foram apresentados com seus respectivos valores de IC₅₀ (concentração inibitória 50%).

4.7 COLETA DE SANGUE: OBTENÇÃO DE PLASMA E ISOLAMENTO DE PLAQUETAS

Amostras de sangue humano foram obtidas de doadores saudáveis sem histórico de sangramento ou trombose, com faixa etária entre 18 a 40 anos, de forma voluntária. Todos os voluntários humanos receberam e assinaram um

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS, de acordo com as normas nacionais e internacionais de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução nº 1996 do Conselho Nacional de Saúde), que regulamenta experimentos envolvendo seres humanos (CAAE: 22858119.9.0000.0021).

A coleta de sangue foi realizada com citrato trissódico (nove partes de sangue e uma parte de citrato trissódico 3,8% - 9:1) como anticoagulante. Para a realização dos experimentos de agregação plaquetária, foi obtido um *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP) por centrifugação do sangue total por 10 min a 123 *g* em temperatura ambiente. O PRP foi ajustado para $2,5 \times 10^8$ células /mL em tampão fosfato-salino (PBS). Para os ensaios de coagulação, um pool de plasma pobre em plaquetas (PPP) foi usado. Para a obtenção do *pool* de PPP, as amostras de sangue foram centrifugadas 1.107 *g* por 15 min a 8 °C. Todos os experimentos foram realizados dentro de 3 h após a coleta da amostra.

4.8 DETERMINAÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A avaliação da agregação plaquetária foi realizada por turbidimetria, segundo Born e colaboradores (1963), utilizando agregômetro semiautomático (AgreGO, Qualitem). Alíquotas de 400 mL de PRP foram transferidas em curvetas e homogeneizadas sob agitação de 180 *g* a 37 °C. As plaquetas foram pré-incubadas com extratos a 400 mg/mL por 5 min antes da adição de difosfato de adenosina (ADP 10 Mm, Sigma-Aldrich® St. Louis, EUA) ou epinefrina (5 µg/mL; Hipolabor, Minas Gerais, BR). A agregação foi medida em porcentagem (%) e registrada continuamente por 5 min após a adição de agonistas. Para corrigir a linha de base da turbidez da amostra, foi utilizado o PRP obtido pela centrifugação das amostras. Foi usado como controle negativo DMSO 0,6% (v/v), enquanto 10 Mm de ticlopidina (Tcp) foi usado como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.9 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO DO SANGUE

Os ensaios de coagulação foram realizados em um coagulômetro semiautomático (CLOTimer, Quick Timer). Para realizar os testes, 100 µL do pool de PPP foram incubados a 37°C por 5 min com cada extrato de *A. bisporus* a 400 mg/ML. Em seguida, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram realizados de acordo com as orientações do fabricante (BIOS Diagnostics, São Paulo, BR). O veículo (DMSO 0,6%; v/v) foi usado como controle negativo, enquanto heparina (17 UI/mL de sangue) foi usada como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os rendimentos globais (X_o) foram obtidos considerando a relação entre a massa do material moído e a massa do extrato obtido (% g/g amostra). Para a análise estatística foi utilizado o software STATISTICA for Windows (versão 6.0 – Statsoft Inc., EUA). Para elaboração das figuras foi utilizada o Software GraphPad Prism 3.0. A análise de variância (ANOVA) unilateral foi conduzida para investigar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos testados e os controles.

4.11 GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO BRASILEIRO

A cepa de *A. bisporus* foi previamente cadastrada no Sistema Nacional de Patrimônio Genético (SisGen) com o número A3B7063.

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTOS GLOBAIS

Os rendimentos globais obtidos pelos diferentes métodos de extração foram de $0,94 \pm 0,13\%$ (m/m) e $1,30 \pm 0,26\%$ (m/m) para ESC1 e ESC2, respectivamente. Além disso, o procedimento de extração clássica com solvente orgânico (EB) apresentou um valor de X_o de $0,38 \pm 0,01\%$ (p/p) (Tabela 2). Dentre as técnicas de extração aplicadas, aquelas realizadas com ESC proporcionaram os maiores rendimentos em relação ao método clássico. No entanto, não foi observada diferença estatística nos rendimentos entre os dois extratos ESC, que foram produzidos em diferentes pressões.

Tabela 2. Valores de rendimento global (X_o) dos extratos de *A. Bisporus* obtidos pelos métodos ESC e extração bruto.

Extrato ¹	X_o (% g/g amostra) ²
EB	0.38 ± 0.01^a
ESC1	$0.94 \pm 0.13\%^b$
ESC2	1.30 ± 0.26^b

¹ Extratos da extração clássica com solvente orgânico (EB), extração com fluido supercrítico a 20 MPa, 40 ° C (ESC1) e a 30 MPa, 40 ° C (ESC2). ² Os valores de X_o estão expressos como valor médio $\pm$ desvio padrão. (^{a,b}) significância estatística ($p < 0,05$).

5.2 ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS

Os extratos ESC1 e ESC2, que foram analisados por GC-MS e os compostos identificados, estão apresentados na Tabela 3. Esses extratos apresentaram perfis semelhantes, demonstrando que a extração por pressão não afetou significativamente sua composição química ou rendimento. Os principais compostos identificados foram dois éster metílico de ácido graxo (EMAC), metil (E, E) -9,12-octadecadienoato (linoleato de metila) e metil (Z) -9-octadecenoato (oleato de metila) com uma porcentagem relativa superior a 40%. O hexadecanoato de metila e o octadecanoato de metila, ésteres derivados do ácido palmítico, também estiveram presentes nos extratos, mas em menor concentração em termos de % de área de pico.

Tabela 3. Compostos identificados nos extratos ESC1 e ESC2 de *A. bisporus* usando análise de GC-MS.

Pico	Compostos	IR ¹	%	
			ESC1 ²	ESC3 ³
1	Hexadecanoato de metila	1929	7,50	1,91
2	Metil (E, E) -9,12-Octadecadienoato	2100	41,97	46,92
3	Metil (Z) -9-octadecenoato	2105	46,97	47,84
4	Octadecenoato de metila	2130	3,57	3,34

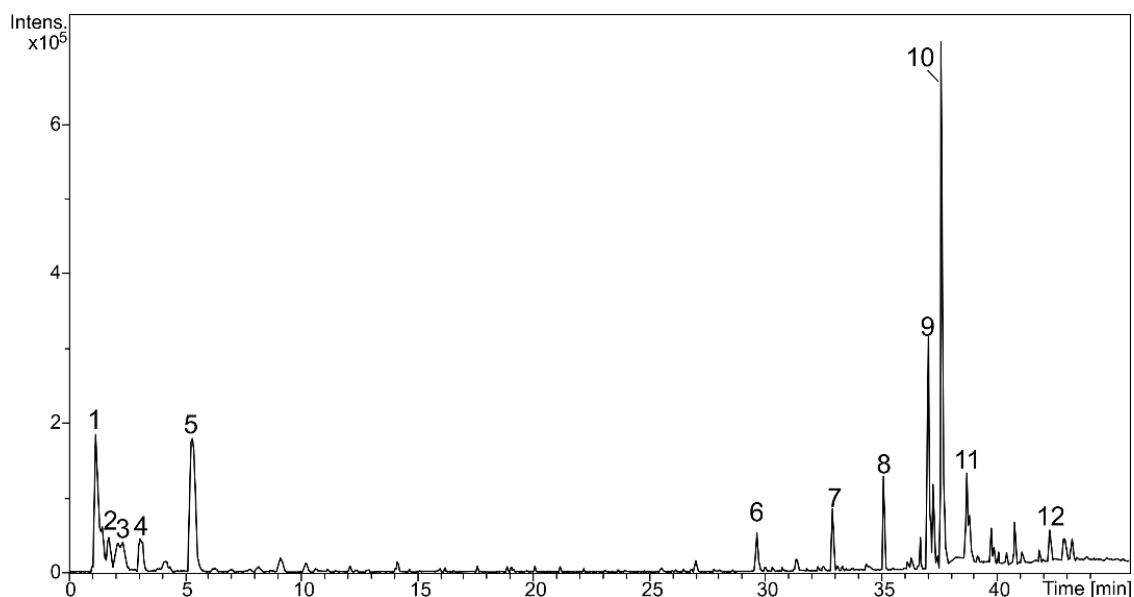
¹ Índice de retenção (IR) em RTx5MS

² Extratos da extração de fluido supercrítico a 20 MPa, 40 ° C (ESC1)

³ Extratos da extração de fluido supercrítico a 30 MPa, 40 ° C (ESC2)

O extrato bruto analisado por LC-DAD-MS revelou doze compostos (Figura 11e Tabela 4). Alguns aminoácidos foram identificados, como N-acetil lisina, tirosina, fenilalanina e triptofano, que são compostos descritos de *A. bisporus* (DEL MAR et al., 2016).

Figura 11. Cromatograma de pico base do extrato bruto de *A. bisporus* obtido através da análise LC-DAD-MS no modo de íon positivo.



Nota:

Os compostos dos picos 3, 6, 7, 9 e 11 não puderam ser identificados devido a baixa teor neste extrato.

O pico 8 mostrou um íon intenso em m/z 318,3001 $[M + H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{39}NO_3$. A partir desse íon protonado, os íons

produtos foram gerados por perdas de moléculas de água, semelhantes aos dados já publicados. Assim, esse componente foi anotado como fitosingosina (LI et al., 2020). Além disso, um ácido de cera e uma glicerofosfocolina também foram identificados.

Tabela 4. Compostos identificados no extrato bruto (EB) de *A. bisporus* usando análise de LC-DAD-MS.

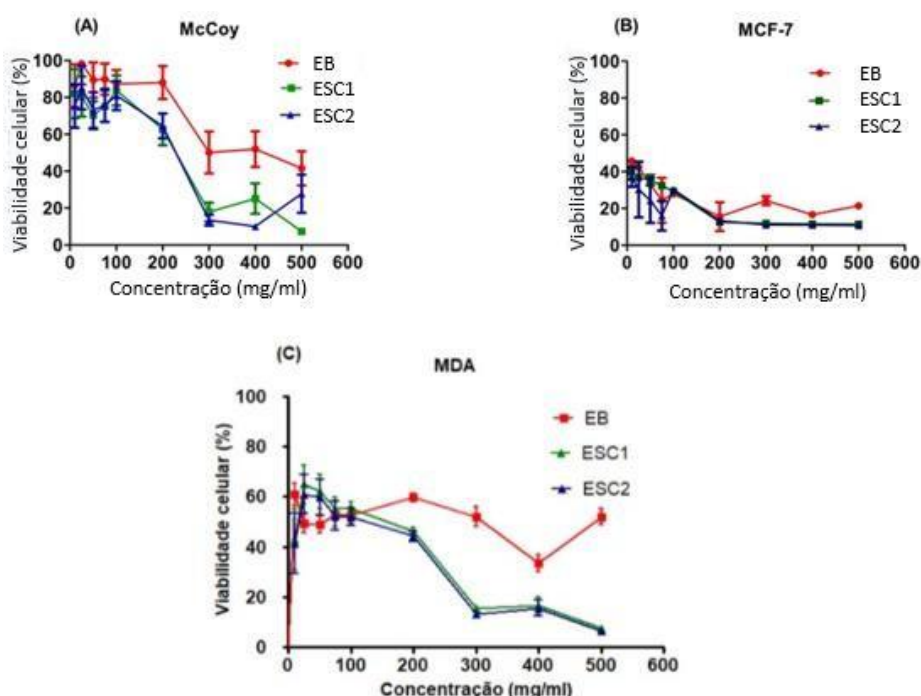
Pico	TR (min)	UV (nm)	Formula Molecular	Negativo (m/z)		Positivo(m/z)		Composto
				MS [M-H] ⁻	MS/MS	MS [M+H] ⁺	MS/MS	
1	1.1	-	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	-	-	189.1231	145, 99	N-acetil lisina
2	1.7	262	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-	-	182.0811	136	Tirosina
3	2.1	258, 300sh	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	-	-	268.1043	221, 214, 186, 176, 163	Desconhecido
4	3.1	258	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	164.0753	-	166.087	149	Fenilalanina
5	5.1	271, 279, 288	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.0830	186	205.0974	188, 170, 159, 143	Triptofano
6	29.6	-	C ₁₄ H ₇ NO ₃	-	-	238.0535	192, 164	Desconhecido
7	32.9	276	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	-	-	274.2743	256, 231, 212, 188, 159	Desconhecido
8	35.1	-	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	-	-	318.3001	300, 282, 264	Fitoesfingosina
9	37.1	-	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₆	476.2762	279, 196	478.2925	460, 418, 308, 274, 250, 221, 196, 182	Desconhecido
10	37.6	-	C ₂₆ H ₅₁ NO ₇ P	-	-	520.3388	184	Glicerofosfocolina
11	38.6	-	C ₂₄ H ₄₄ O ₇	443.3006	309, 280, 244, 209	445.3170	427, 409, 377, 353, 328, 228, 168	Desconhecido
12	42.3	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2320	-	281.2486	-	Ácido Octadecadienóico

Nota: Tempos de retenção (TR), comprimento de onda ultravioleta máximo (UV) e dados de MS para os compostos encontrados no extrato bruto de *A. bisporus* através de LC-DAD-MS.

5.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DE EXTRATOS EB e ESC

Neste estudo, a viabilidade celular foi comparada em três linhas celulares diferentes: McCoy, MCF-7 e MDA-MB-231. Todas as linhas celulares foram submetidas ao ensaio MTT, após os tratamentos com diferentes concentrações de extratos de *A. bisporus* (EB, ESC1 e ESC2) por 72 h, conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12. Efeito de *A. bisporus* em McCoy, MCF-7 e MDA-MB-231 pelo método MTT em 72h.



Nota: (A) McCoy: comparação entre EB, ESC1 e ESC2; (B) MCF-7: comparação entre EB, ESC1 e ESC2; e (C) MDA: comparação com EB e ESC1.

Os extratos investigados apresentaram efeito citotóxico nas células MCF-7 (Figura 12B), conforme mostrado na Tabela 5. Os ensaios utilizando a célula MDA-MB-231, aparentemente mostrou diminuição da viabilidade celular, particularmente ESC1 (Figura 12C), mas experimentos adicionais são necessários para confirmar. Não foram observados valores de citotoxicidade significativos para células não tumorais (Figura 12A). Nenhum resultado significativo de citotoxicidade foi observado em 24 e 48 h (dados não mostrados).

Tabela 5. Valores de IC₅₀ e desvio padrão calculados para os extratos EB,ESC1 e ESC de *A. bisporus* em células McCoy, MCF-7 e MDA em 72h.

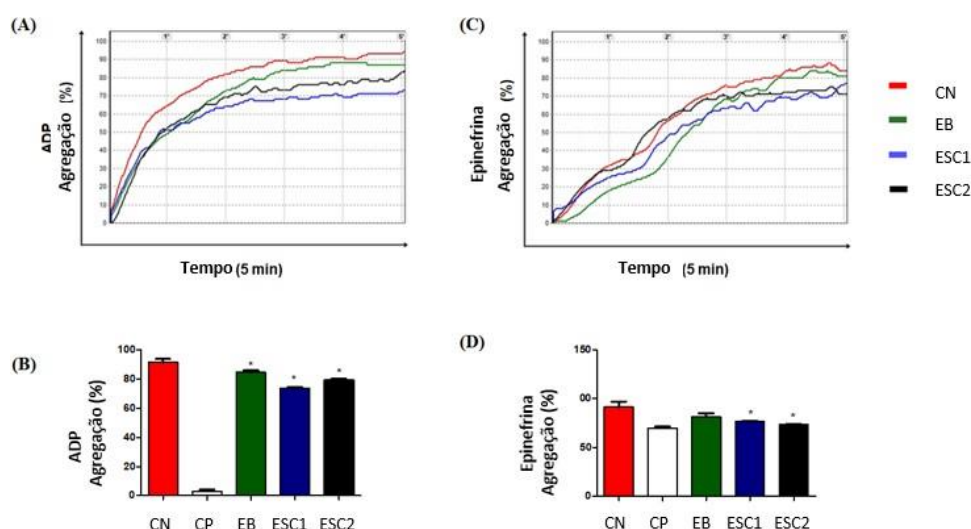
Célula	EB	ESC1	ESC2
McCoy	700,92 µg ±0,37 ^a	324,96 µg ±0,39 ^a	338,84 µg ±0,39 ^a
MCF7	444,07 µg ±0,10 ^a	292,66 µg ±0,12 ^b	285,43 µg ±0,13 ^b
MDA	1694,69 µg ±0,08 ^a	342,60 µg ±0,22 ^a	328,68 µg ± 0,21 ^a

Resultado de valores de IC₅₀ e desvio padrão calculados para os extratos EB, ESC1 e ESC de *A. bisporus* expresso em µg. Os valores de IC₅₀ estão expressos como valor médio ± desvio padrão. (^{a,b}) significância estatística (p <0,05).

5.4 O EFEITO DOS EXTRATOS DE *A. bisporus* NA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS HUMANAS E COAGULAÇÃO DO SANGUE

Os extratos investigados revelaram uma atividade antiplaquetária *in vitro* significativa ao inibir a agregação plaquetária induzida por ADP (Figura 13 A e B). Além disso, apenas os extratos ESC1 e ESC2 mostraram um efeito inibitório significativo na agregação plaquetária induzida pela epinefrina (Figura 13 C e D).

Figura 13. Resultados obtidos dos extratos de *A. bisporus* na agregação plaquetária humana.



Agregação de plaquetas de diferentes extratos a 400 mg/µL induzida por 6 µM de ADP(A e B) e adrenalina (C e D) por 5 min. CN: controle negativo; CP: controle positivo (Ticlopidina 10 µM); EB; ESC1: ESC 40C/20 MPa; ESC2: ESC 40C/30 MPa. Três experimentos independentes foram realizados. (*) indica diferença estatisticamente significativa com o controle negativo * p ≤ 0,05.

O tratamento do plasma humano com extratos de *A. bisporus* não prolongou significativamente os tempos de TP e TTPa (Tabela 6). Além disso, os extratos não alteraram a relação RNI e TTPa de maneira clinicamente significativa.

Tabela 6 - Parâmetros de coagulação TP, RNI, TTPa e Razão medidos em plasma humano tratado com heparina e extratos de *A. bisporus*.

Amostras ¹	Ensaio de coagulação sanguínea ²			
	TP		TTPa	
	Tempo (sec)	RNI ³	Tempo (sec)	Razão ⁴
Controle negativo	14.4 ± 0.8	1.0	26.5 ± 1.6	1.0
EB (400 mg/μL)	15.2 ± 0.9	1.1	26.1 ± 0.4	1.0
ESC1 (400 mg/μL)	15.3 ± 0.4	1.1	26.8 ± 0.4	1.0
ESC2 (400 mg/μL)	15.3 ± 0.2	1.1	24.8 ± 0.1	0.9
Heparina (17 IU/mL de sangue)	> 100	-	> 100	-

¹ Extrato bruto (EB); extração com fluido supercrítico a 20 MPa, 40°C (ESC1) e a 30 MPa, 40°C (ESC2); controle negativo (veículo, DMSO 0,6%) e heparina (controle positivo).

² Determinação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em segundos (seg) medido em plasma humano tratado com extratos de *A. bisporus* e expresso em média ± DP.

³ Razão normalizada internacional (RNI) calculada com base nos resultados do TP e usada para monitorar a eficácia do anticoagulante.

⁴ Relação entre os valores de tempo entre o(s) tempo(s) das extrações e o(s) tempo(s) do controle.

6 DISCUSSÃO

Fluidos supercríticos estão cada vez mais substituindo solventes orgânicos em métodos de extração (UWINEZA et al., 2020). Neste estudo, o método ESC mostrou-se vantajoso, uma vez que revelou a concentração de vários compostos com atividade biológica significativa de *A. bisporus*.

Os fungos têm se mostrado excelentes fontes potenciais de compostos bioativos (HYDE et al., 2019). Centenas de espécies de cogumelos demonstraram um amplo espectro de atividades farmacológicas, mas a maioria desses estudos está quase totalmente focada na triagem das atividades antimicrobianas de extratos de cogumelos. Portanto, ainda é necessário ampliar os estudos sobre a composição química relacionada às propriedades bioativas de diferentes espécies de cogumelos. Os cogumelos do gênero *Agaricus* são os mais consumidos no mundo, devido ao seu valor nutricional, principalmente sua elevada proporção de ácidos graxos. Os cogumelos também são fontes ricas de metabólitos secundários (CHEN et al., 2017). Nesse estudo, a composição de ácidos graxos em extratos ESC de *A. bisporus* foram determinados como os ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa. Nossos resultados identificaram dois ésteres derivados de ácido linoleico poli-insaturado (18: 2 ω 6, AL) e ácido oleico monoinsaturado (18: 1 ω 9). Níveis mais elevados de ácidos graxos insaturados em cogumelos, principalmente AL e ácido oleico, foram descritos em estudos anteriores (BORN et al., 1963; AMAKURA et al., 2006; YILMAZ et al., 2006; BARROS et al., 2007; PEDNEAULT et al., 2008; COELHO et al., 2009; ÖZTÜRK et al., 2011).

Um estudo realizado por Amakura e colaboradores (2006) relataram que em *A. bisporus*, o ácido oleico é o principal ácido graxo insaturado e também estão presentes ácidos graxos saturados de cadeia longa como AL e ácidos palmíticos. *Agaricus blazei*, estudado por Coelho e colaboradores (2009) revelou ácido palmítico e ácido oleico como os principais componentes em extratos ESC. Da mesma forma, Mazzutti e colaboradores (2017) reconheceram principalmente os ácidos hexadecanóico (ácido palmítico) e 9,12- octadecadienóico (ácido linoleico) na composição do extrato ESC de *A. brasiliensis*, que foram associados a atividades antimicrobianas.

O conjunto de resultados referente aos ensaios de citotoxicidade de *A. bisporus* sugerem que dentre os tipos de extração de compostos bioativos, a extração por fluido supercrítico mostrou-se mais vantajosa devido à alta seletividade deste método de extração. Os extratos ESC1 e ESC2 apresentaram maiores concentrações de compostos bioativos (MILOVANOVIC et al., 2021). No entanto, quando testado em uma linha de células de câncer de mama resistente (MDA-MB-231), *A. bisporus* não mostrou valores de IC₅₀ significativos quando comparados a linhagem celular não tumoral (McCoy).

Por outro lado, a linhagem celular MCF-7 apresentou resultados promissores quando comparado a linhagem celular McCoy, mostrando-se uma boa candidata para o tratamento futuro, porém ainda são necessários estudos *in vivo*. A ESC tem sido utilizada para a concentração de compostos bioativos de materiais vegetais e de fungos. Alguns estudos relataram efeito citotóxico de ESC em linhagem celular MCF-7 submetidos ao ensaio MTT, os quais identificaram a ocorrência de morte celular (PARISOTTO et al. 2012; GRINEVICIUS et al., 2017). Portanto, quando comparados, os extratos supercríticos (ESC1 e ESC2), observa-se um efeito citotóxico significativo na linha celular MCF-7, em comparação com EB (KVIECINSKI et al., 2011; PARISOTTO et al., 2012; GRINEVICIUS et al., 2017).

Nos estudos utilizando a linhagem celular MDA-mb-231, o ensaio MTT foi a triagem para avaliar a viabilidade celular, além de avaliar possível efeito dose-dependente (ARUNASREE, 2010; MOGHADERI et al., 2018). A linhagem celular MDA-mb-231 já foi utilizada em outros estudos para avaliação da citotoxicidade e mostrou resultados promissores, quando utilizados produtos naturais, como *Satureja montana* L. e óleo de semente de Kenaf (ELGNDI et al., 2017; YAZAN et al., 2011). Quando testados, os extratos supercríticos de *Satureja montana* L. apresentaram elevada atividade antiproliferativa no MDA-MB-453 (ELGNDI et al., 2017), assim como o óleo de semente Kenaf apresentou efeito citotóxico na linhagem celular MDA-MB-231 devido à sua composição rica em fitoesteróis e ácido linoleico. Esses produtos naturais mostraram-se promissores agentes contra o câncer de mama resistente (YAZAN et al., 2011). Embora os extratos supercríticos de *A. bisporus* apresentem bons resultados em relação ao efeito citotóxico da linha celular MCF-7, na linhagem celular MDA-MB-231 não sofreu interferência significativa dos mesmos extratos.

Os extratos do cogumelo *A. bisporus* (EB, ESC1 e ESC2) apresentaram diminuição significativa na agregação plaquetária, principalmente os extratos ESC (Figura 13). Por outro lado, esses extratos não apresentaram interferência significativa nos tempos de TP, TTPa e RNI (Tabela 6). Um estudo de Hyun e colaboradores (2006) mostrou atividade inibitória da agregação plaquetária (81,2%), utilizando o ADP como agonista. A atividade inibitória da agregação plaquetária máxima foi encontrada quando o micélio de *Inonotus obliquus* ASI 74006 foi extraído com etanol a 80 °C por 12 h. Porém, neste estudo, a atividade foi atribuída a um peptídeo caracterizado e isolado do fungo. Outro estudo avaliou o efeito de um cogumelo medicinal raro de Taiwan, o *Antrodia camphorate*. Nesse estudo, o tratamento com extratos de *Antrodia camphorate* foi realizado em concentrações na faixa de 56–224 µg/mL, o qual inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno. O mecanismo de ação relacionado é incerto, mas os resultados do trabalho sugerem que o cogumelo pode inibir a ativação plaquetária ao inibir a cascata de Ca²⁺ e PKC, bem como a via Akt (LU et al., 2014). Recentemente, um estudo em modelo experimental semelhante ao ao modelo utilizado por nosso grupo de pesquisa, utilizou o ADP e o ácido araquidônico como agonistas para avaliar os extratos de *Auricularia auricularia-judae* e *Pleurotus eryngii*. Curiosamente, a resposta dos extratos de cogumelos ao ADP foi superior ao ácido acetilsalicílico e, ao usar ácido araquidônico, eles mostraram efeitos semelhantes. Os resultados dessa pesquisa corroboram com os nossos dados, visto que neste estudo também não houve alteração nos parâmetros de coagulação (TP e TTPa e RNI) (PONIEDZIAŁEK et al. 2019).

A diminuição significativa na agregação plaquetária tanto do EB bem como dos extratos supercríticos (ESC1 e ESC2) do cogumelo *A. bisporus* concomitante com o fato da trombose arterial ter um predomínio de agregados plaquetários, sugere-se que os extratos desse cogumelo possam ser utilizados para futuros estudos de tratamento e/ou prevenção da trombose arterial (MACCALLUM et al, 1999; DENTALI et al. 2009; MESQUITA, et al. 2016).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas dentro das plaquetas ativadas e desempenham um papel importante na regulação das respostas plaquetárias e na formação de trombos (QIAO et al., 2017). Estudos utilizando extratos de ESC com outras espécies de cogumelos, como *A. brasiliensis* e *Pleurotus ostreatus*, demonstraram uma importante atividade

antioxidante, o que poderia explicar a melhora no efeito antitrombótico dos extratos de ESC, uma vez que os compostos antioxidantes poderiam modular a produção de EROs intra-plaquetários (MILOVANOVIC et al., 2021). Teoricamente, os ácidos graxos ômega-6 poderiam ser pró-inflamatórios, sendo os precursores dos eicosanóides. No entanto, estudos mostram que a ingestão de AL nem de ácido araquidônico tem mostrado associação com o aumento da inflamação (VISIOLI et al., 2020). Ao contrário, há evidências de ações anti-inflamatórias sinérgicas dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6. Esses ácidos graxos poderiam atuar indiretamente nas células endoteliais vasculares, reduzindo a inflamação e, por sua vez, o risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares (RICHARD et al., 2008). Além disso, o ômega 6 poderia diminuir a regulação de prostaglandinas e leucotrienos pró-inflamatórios, levando à diminuição da agregação plaquetária e inibição da aterogênese. Assim, isso poderia justificar os achados sobre a inibição da agregação plaquetária por extratos ESCs de *A. bisporus* em nosso estudo.

A. bisporus revelado como uma fonte de linoleato de metila e oleato de metila, juntamente como método ESC, pode ser útil para aplicações biotecnológicas. O oleato de metila é um componente importante na indústria, que tem sido aplicado na produção de detergentes, agentes umectantes e emulsificantes. Métodos tradicionais de síntese de oleato de metila são relatados por apresentar problemas secundários, como a produção de produtos indesejáveis, alto consumo de tempo, entre outros (ARANDA et al., 2008). Embora métodos alternativos para produzir oleato de metila já tenham sido publicados, novas fontes e métodos para obtê-lo são constantemente buscados (MARZUKI et al., 2015).

Portanto, os resultados obtidos nesse estudo nos mostraram a necessidade de mais estudos para avaliação do mecanismo de ação no efeito citotóxico e antitrombótico dos extratos EB, ESC1 e ESC2.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho nos permitem concluir que:

- Os extratos supercríticos apresentaram maior rendimento que o extrato bruto (EB);
- O extrato bruto (EB) e os extratos supercríticos (ESCs) possuem perfis químicos diferentes. Porém, não mostram diferença considerável entre o perfil químico dos extratos supercríticos (ESC 1 e ESC2);
- O extrato bruto (EB) e os extratos supercríticos (ESC1 e ESC2) de *Agaricus bisporus* apresentam atividade citotóxica significativa para células MCF-7. Os extratos supercríticos apresentaram maior citotoxicidade. Porém, não houve atividade citotóxica significativa nas células MDA-MB-231 (câncer de mama resistente);
- Os extratos de *A. bisporus* (EB, ESC1 e ESC2) promoveram diminuição significativa na agregação plaquetária. Sugere-se estudos para futura utilização em tratamento e/ou prevenção de trombose arterial. Sendo que os extratos supercríticos obtiveram melhores resultados independente do agonista utilizado;
- Nenhum dos extratos interferiram significativamente em parâmetros de coagulação (TP, RNI e TTPa).

8 PERSPECTIVAS

Através do desenvolvimento desse estudo, surgem novas propostas de estudos que possam servir de complemento, tais como:

- Avaliação de outras condições de extração supercrítica (utilização de co-solvente) para uma eventual melhora do efeito citotóxico dos extratos;
- Avaliar o efeito citotóxico sobre outras linhagens celulares de câncer de mama, para caracterizar o efeito e a seletividade dos compostos presentes nos extratos;
- Investigar os possíveis mecanismos da ação antiagregante e o efeito citotóxico (modelo 3D e tumor de Ehrlich – *in vivo*) de *A. bisporus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABUBAKAR, I. I.; TILLMANN, T.; BANERJEE, A. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117-171, 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.

AMAKURA, K. KONDO, H. AKIYAMA, H. ITO, T. HATANO, T. YOSHIDA T, T. Maitani. Characteristic long-chain fatty acid of *Pleurocybella porrigens*. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v.47, 2006.

ANDREO, D; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANDREWS, R. K.; ARTHUR, J. F.; GARDINER, E. E. Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. **Journal of blood medicine**, v. 5, p. 59, 2014.

ARANDA, D. A.; SANTOS, R. T.; TAPANES, N. C; RAMOS, A. L. D.; ANTUNES, O. A. C. Acid-catalyzed homogeneous esterification reaction for biodiesel production from palm fatty acids. **Catalysis letters**, v. 122, n. 1, p. 20-25, 2008.

ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231. **Phytomedicine**, v. 17, n. 8-9, p. 581-588, 2010.

ATILA, F.; OWAID, M. N.; SHARIATI, M. A. The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: a review. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 281-286, 2021

BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic cancer cell. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, p. 221-247, 2008.

BACH, F., HELM, C. V., BELLETTINI, M. B., MACIEL, G. M., HAMINIUK, C. W. I. I. Edible mushrooms: A potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 11, p. 2382-2392, 2017.

BACH, F., ZIELINSKI, A. A. F., HELM, C. V., MACIEL, G. M., PEDRO, A. C., STAFUSSA, A. P., HAMINIUK, C. W. I. Bio compounds of edible mushrooms: In vitro antioxidant and antimicrobial activities. **Lwt**, v. 107, p. 214-220, 2019.

BARROS, L.; BAPTISTA, P.; CORREIA, D. M.; CASAL, S., OLIVEIRA, B.; FERREIRA, I. C. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 140-145, 2007.

BICKMANN, J. K.; BAGLIN, T.; MEIJERS, J.; RENNÉ, T. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. **Current opinion in hematology**, v. 24, n. 5, p. 419-426, 2017.

BITTENCOURT, N. C.; SANTOS, P. N. P. Avaliação das provas da hemostasia primária em indivíduos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 2, p. 144-8, 2016.

BOOTH, M. **Opium: A history**. St. Martin's Griffin, 2013.

BORN, G. V. R.; CROSS, MoJ. The aggregation of blood platelets. **The Journal of physiology**, v. 168, n. 1, p. 178-195, 1963.

BRAÑA, M. F. La verdadera historia de la Aspirina. 2011.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A., & DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

- BRUM, I. V., GUERRA, M. R., CINTRA, J. R. D., & BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T. Câncer de mama metastático: aspectos clinicopatológicos e sobrevida segundo o sítio de metástase. **Medicina (Ribeirão Preto, Online.)**, v. 50, n. 3, p. 158-68, 2017.
- CAILLEAU, R.; OLIVÉ, M.; CRUCIGER, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In vitro**, v. 14, n. 11, p. 911-915, 1978.
- CÂNDIDO, C., LUZ, G., MACHADO, J., & CARGNIN, A. B. A carcinogênese e o câncer de mama. **Maiêutica-Ciências Biológicas**, v. 4, n. 1, 2016.
- CHAN, N. C., EIKELBOOM, J. W., & WEITZ, J. I. Evolving treatments for arterial and venous thrombosis: role of the direct oral anticoagulants. **Circulation research**, v. 118, n. 9, p. 1409-1424, 2016.
- CHANG, S. T. 2008. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. **Mushrooms as functional foods**, v. 260, 2008.
- CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast disease**, v. 32, n. 1-2, p. 35, 2010.
- CHEN, H. P., & LIU, J. K. Secondary metabolites from higher fungi. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products** 106, p. 1-201, 2017.
- CHEN, S. Y., HO, K. J., HSIEH, Y. J., WANG, L. T., & MAU, J. L. Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. **Lwt**, v. 47, n. 2, p. 274-278, 2012.
- CHEN, S., OH, S-R., PHUNG, S., HUR, G., YE, J.J., KWOK, S.L., SHRODE, G.E., BELURY, M., ADAMS, L.S.; WILLIAMS, D. Anti-aromatase activity of phytochemicals in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Cancer research**, v. 66, n. 24, p. 12026-12034, 2006.

COELHO, J. P., CASQUINHA, L., VELEZ, A.; KARMALI, A. Supercritical CO₂ extraction of secondary metabolites from *Agaricus blazei*: experiments and modelling. **Alicerces**, p. 7-15, 2009.

COHEN, M.M. The history of opium and opiates. **Tex Med**, v. 65, p.76-85, 1969.

COMŞA, Ş., CIMPEAN, A. M., & RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

DABA, A.S., KABEIL, S.S., WILLIAM, A.B. & EL-SAADANI, M.A. Production of mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a source of nutritional and medicinal food. **World J. Agric. Sci**, v. 4, n. 5, p. 630-634, 2008.

DE ANDRADE NEVES, N., STRINGHETA, P. C. Caracterização da fração volátil minoritária de bebida alcoólica fermentada de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) por CG/MS. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e41010414122-e41010414122, 2021.

DE LIMA, A. J.; BARBADO, N. Herbário de plantas medicinais como estratégia no ensino de Botânica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e73991110295-e73991110295, 2020.

DEL MAR DELGADO-POVEDANO, M., DE MEDINA, V. S., BAUTISTA, J., PRIEGO-CAPOTE, F.; DE 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**, v. 24, p. 403-419, 2016.

DE MOURA, D. F., MELO, M.A., MELO, D.B., ROCHA, T. A., SILVA, F. A., DA SILVA, G. M., DA FONTE, R. D. A. B. A Importância da Biossegurança na Produção e Utilização de Produtos Naturais e Fitoterápicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 7054-7062, 2020.

DENTALI, F.; SQUIZZATO, A.; AGENO, W. The metabolic syndrome as a risk factor for venous and arterial thrombosis. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, p. 451-457, 2009.

DHAMODHARAN, G.; MIRUNALINI, S. A novel Medicinal Characterization of *Agaricus bisporus* (white button mushroom). **Pharmacol Online**, v. 2, p. 456- 463, 2010.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

DÜSMAN, E., BERTI, A. P., SOARES, L. C., & VICENTINI, V. E. P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.

ELGNDI, M. A., FILIP, S., PAVLIĆ, B., VLADIĆ, J., STANOJKOVIĆ, T., ŽIŽAK, Ž., & ZEKOVIĆ, Z. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 128-137, 2017.

FENG, Y., ZHANG, J., WEN, C., DZAH, C. S., JULIET, I. C., DUAN, Y., ZHANG, H. Recent advances in *Agaricus bisporus* polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities. **Process Biochemistry**, v. 94, p.39-50,2020.

FERREIRA, R. G.; DE REZENDE FRANCO, L. F. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento quimioterápico no câncer de mama: revisão bibliográfica. **Revista da universidade vale do rio verde**, v. 15, n. 2, p. 633- 638, 2017.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, n. 3/4, p. 229-237, 2001.

FUNGICULTURA. *AGARICUS BISPORUS*. Disponível em
<<https://www.fungicultura.com.br/especie/agaricus-bisporus/>>

GALLEGO, R., BUENO, M.; HERRERO, M. Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae—An update. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 198- 213, 2019.

GHAHREMANI-MAJD, H.; DASHTI, F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 376-382, 2015.

GIMBEL, M. E., MINDERHOUD, S. C. S., & TEN BERG, J. M. A practical guide on how to handle patients with bleeding events while on oral antithrombotic treatment. **Netherlands Heart Journal**, v. 26, n. 6, p. 341-351, 2018.

GOMES, P. L.; DA SILVA, A. A.; JUNIOR, O. M. R. Uso de anticoagulantes em pacientes hospitalizados por trombose venosa profunda em membros inferiores. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e46101522699-e46101522699, 2021.

GRINEVICIUS, V. M., ANDRADE, K. S., MOTA, N. S., BRETANHA, L. C., FELIPE, K. B., FERREIRA, S. R., & PEDROSA, R. C. CDK2 and Bcl-xL inhibitory mechanisms by docking simulations and anti-tumor activity from piperine enriched supercritical extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110644, 2019.

GRINEVICIUS, V. M.; ANDRADE, K. S.; OURIQUE, F.; MICKE, G. A.; FERREIRA, S. R.; PEDROSA, R. C. Antitumor activity of conventional and supercritical extracts from *Piper nigrum* L. cultivar *Bragantina* through cell cycle arrest and apoptosis induction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 94-101, 2017.

GRUTES, J. V., FERREIRA, R. G., MONTEIRO, M. A., PEREIRA, M. U., SPISSO, B. F. Evaluation of Different Extraction Methods for Identification of Macrolides Residues in Meat-Based Canned Baby Food by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 214-220, 2019.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T., & VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 2, p. 177-184, 2004.

HEINEN, R. C. ASSOCIAÇÃO ENTRE O USO DE ANTICONCEPCIONAIS ORAIS E O SURGIMENTO DE EVENTOS TROMBÓTICOS. **Revista Saúde Física & Mental-ISSN 2317-1790**, v. 6, n. 1, p. 41-58, 2018.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography a**, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, 2010.

HOFFBRAND, A. V.; STEENSMA, D. P. **Hoffbrand's essential haematology**. John Wiley & Sons, 2019.

HOSEINIFAR, S. H., ZOU, H. K., PAKNEJAD, H., HAJIMORADLOO, A., VAN DOAN, H. Effects of dietary white-button mushroom powder on mucosal immunity, antioxidant defence, and growth of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 501, p. 448-454, 2019.

HOSSAIN, M.S., ALAM, N., AMIN, S.M.R., BASUNIA, M.A. & RAHMAN, A. Essential fatty acid contents of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Agaricus bisporus*. **Bangladesh J Mushroom**, v. 1, p. 1-7, 2007.

HYDE, K. D., XU, J., RAPIOR, S., JEEWON, R., LUMYONG, S., NIEGO, A. G. T. & STADLER, M. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019.

HYUN, K. W.; JEONG, S. C.; LEE, D. H.; PARK, J. S.; LEE, J. S. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1173-1178, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer de mama, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). O que é câncer?, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> .

JEONG, S.C., KOYYALAMUDI, S.R., PAN, G. Dietary intake of *Agaricus bisporus* white button mushroom accelerates salivary immunoglobulin A secretion in healthy volunteers. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 527-531, 2012.

KANAYA, N.; KUBO, M.; LIU, Z.; CHU, P.; WANG, C.; YUAN, Y.C.; CHEN, S. Protective effects of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) against Hepatic Steatosis in ovariectomized mice as a model of postmenopausal women. **Plos one**, v.6 (10), p 1-11, 2011.

KASPER, D. L. Harrison Medicina Interna. v. 2. 19ª. Edição. 2016.

KASVI. Análise da Hemostasia: Tempo de Atividade da Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa).Disponível em <<https://kasvi.com.br/analise-da-hemostasia/>>

KIM, H. J., LEE, S. B., PARK, K. A., & HONG, I. K. Characterization of extraction and separation of rice bran oil rich in EFA using SFE process. **Separation and Purification Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 1999.

KNEZ, Ž., MARKOČIČ, E., LEITGEB, M., PRIMOŽIČ, M., HRNČIČ, M. K., ŠKERGET, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. In: **Química farmacêutica**. 1988. p. 783-783.

KOUPENOVA, M.; KEHREL, B. E.; CORKREY, H. A.; FREEDMAN, J. E. Thrombosis and platelets: an update. **European heart journal**, v. 38, n. 11, p. 785-791, 2017.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; NIKSIC, M.; JAKOVLJEVIC, D.; HELSPER, J. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1667-1675, 2011.

KRITIKOS, P.G.; PAPADAKI, S.P. **The history of the poppy and of opium and their expansion in antiquity in the eastern Mediterranean area**. UN, 1967.

KRIZ, N.; RINDER, C. S.; RINDER, H. M. Physiology of hemostasis: with relevance to current and future laboratory testing. **Clinics in laboratory medicine**, v. 29, n. 2, p. 159-174, 2009.

KVIECINSKI, M. R.; BENELLI, P.; FELIPE, K. B.; CORREIA, J. F. G.; PICH, C. T.; FERREIRA, S. R. S.; PEDROSA, R. C. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 243-248, 2011.

LANGER, B.; WOLOSKEWICZ, M. Coagulação e fibrinólise: ideias atuais e suas aplicações clínicas. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 4, p. 157-164, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35- 61, 2009.

LI, C.; TIAN, Q. U.; RAHMAN, M. K.; WU, F. Effect of anti-fungal compound phytosphingosine in wheat root exudates on the rhizosphere soil microbial community of watermelon. **Plant and Soil**, v. 456, n. 1, p. 223-240, 2020.

LIAO, F. 2009. Discovery of Artemisinin (Qinghaosu). **Molecules**. 5363.

LIU, J.; JIA, L.; KAN, J.; JIN, C. H. In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Food and chemical toxicology**, v. 51, p. 310-316, 2013.

LU, W. J.; LIN, S. C.; LAN, C. C.; LEE, T. Y.; HSIA, C. H.; HUANG, Y. K.; SHEU, J. R. Effect of *Antrodia camphorata* on inflammatory arterial thrombosis-mediated platelet activation: the pivotal role of protein kinase C. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

MACCALLUM, P. K.; MEADE, T. W. Haemostatic function, arterial disease and the prevention of arterial thrombosis. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 12, n. 3, p. 577-599, 1999.

MANTELL, C.; CASAS, L.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA OSSA, E. M. Supercritical fluid extraction. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**, p. 79-100, 2013.

MAO, Y.; MAO, J.; MENG X. Extraction optimization and bioactivity of exopolysaccharides from *Agaricus bisporus*. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1602-1607, 2013.

MARTINS, L. C.; REZENDE, R. M. D.; CORDEIRO, J. A. B. L.; DE PAULA, H. D. S. C.; DE BASTOS, D. R.; SAM, C. A.; SILVA, A. M. T. C. Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. **Rev Bras Mastologia**, v. 27, n. 1, p. 8-14, 2017.

MARINHO, D. S. Hiperfibrinólise perioperatória fisiologia e fisiopatologia. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 71, n. 65, p. 65-75, 2021.

MARZUKI, N. H. C.; MAHAT, N. A.; HUYOP, F.; BUANG, N. A.; WAHAB, R. A. Candida rugosa lipase immobilized onto acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of methyl oleate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 177, n. 4, p. 967-984, 2015.

MATHERS, C. **The global burden of disease: 2004 update**. World Health Organization, 2008.

MATUS, M. F.; VILOS, C.; CISTERNA, B. A.; FUENTES, E.; PALOMO, I. Nanotechnology and primary hemostasis: Differential effects of nanoparticles on platelet responses. **Vascular pharmacology**, v. 101, p. 1-8, 2018.

MAZZUTTI, S.; FERREIRA, S. R. S.; HERRERO, M.; IBAÑEZ, E. Intensified aqueous-based processes to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 64-71, 2017.

MCFADYEN, J. D.; SCHAFF, M.; PETER, K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 3, p. 181-191, 2018.

MENDIS, S., PUSKA, P., NORRVING, B., & WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. World Health Organization, 2011.

MESQUITA, E. T., DEMARCHI, A. V., BITENCOURT, D. D. S., MACHADO, P. E. D. A., BADRAN, P. M., ALMEIDA, R. G. P. D., JORGE, A. J. L. Continuum Cardiovascular 25 anos. Evolução de um Modelo Etiofisiopatológico. **Int. j. cardiovasc. sci.(Impr.)**, p. 56-64, 2016.

MICHIELIN, E. M., SALVADOR, A. A., RIEHL, C. A., SMÂNIA JR, A., SMÂNIA, E. F., & FERREIRA, S. R. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6615-6623, 2009.

MILLER, L.; SU, X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 855-858, 2011.

MILOVANOVIC, I.; ZENGİN, G.; MAKSIMOVIC, S.; TADIC, V. Supercritical and ultrasound-assisted extracts from *Pleurotus pulmonarius* mushroom: chemical profiles, antioxidative, and enzyme-inhibitory properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 6, p. 2284-2293, 2021.

MOGHTADERI, H.; SEPEHRI, H.; DELPHI, L.; ATTARI, F. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. **BiolImpacts: BI**, v. 8, n. 3, p. 185, 2018.

MORAES, A. O., ZUBIOLO, T. F. M., BRITO, A. F. B., BELENTANI, J., SANTOS, J. F., SANTOS, G. N. D., SILVA, L. G. Trombose arterial recorrente em paciente com doença de Fabry: relato de caso. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, 2020.

MOREIRA, A. M., RABENHORST, S. H., HOLANDA, R. A., PITOMBEIRA, M. H. Fatores de risco associados a trombose em pacientes do estado do Ceará. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 132-136, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, B.L.; SULEIMAN, B. Global development of mushroom biotechnology. **Int J Emerg Trends Sci Technol**, v. 2, n. 06, p. 2660-2669, 2015.

NASCIMENTO, A. D. P.; SOARES, L. A. L.; STRAGEVITCH, L.; DANIELSKI, L. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 1-7, 2016.

NASCIMENTO, M. R. B.; DE MORAIS CARVALHO FILHO, R. S.; MAMEDE, R. V. S. Benefícios da utilização da babosa (*Aloe vera*) na fitoterapia. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e470101624244-e470101624244, 2021.

NDUNGUTSE, V.; MEREDDY, R.; SULTANBAWA, Y. Bioactive Properties of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Stipe Extracts. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2225-2233, 2015.

NOVAES, M.R.C.G.; VALADARES, M.C.R., GONÇALVES, D.R.; MENEZES, M.C. The effects of dietary supplementation with *Agaricales* mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: evidence-based medicine. **Clinics**, v. 66, p. 2133-2139, 2011.

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, Ş.; MERCAN-DOĞAN, N.; TÜRKÖGLÜ, A.; ÖZLER, M. A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1353-1360, 2011.

PALOMARES, M. R.; RODRIGUEZ, J.; PHUNG, S.; STANCZYK, F. Z.; LACEY, S.F.; SYNOLD T.W.; DENISON, S.; FRANKEL, P.H.; CHEN, S. A dose-finding clinical trial of mushroom powder in postmenopausal breast cancer survivors for secondary breast cancer prevention. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15_suppl, p. 1582-1582, 2011.

PARISOTTO, E. B.; MICHIELIN, E. M.; BISCARO, F.; FERREIRA, S. R.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PEDNEAULT, K.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; TWEDDELL, R. J. Fatty acid profiles of polar and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern Canada. **Mycological Research**, v. 112, n. 12, p. 1428-1434, 2008.

PEREIRA, E.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I.C.F.R. Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 394-403, 2012.

PONIEDZIAŁEK, B.; SIWULSKI, M.; WIATER, A.; KOMANIECKA, I.; KOMOSA, A.; GAŚECKA, M.; RZYMSKI, P. The effect of mushroom extracts on human platelet and blood coagulation: in vitro screening of eight edible species. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 3040, 2019.

POULIOT, Y.; CONWAY, V.; LECLERC, P. L. Separation and concentration technologies in food processing. **Food processing: principles and applications**, p. 33-60, 2014.

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

QIAO, J.; ARTHUR, J. F.; GARDINER, E. E.; ANDREWS, R. K.; ZENG, L.; XU, K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. **Redox biology**, v. 14, p. 126-130, 2018.

RAMOS, M.; BURGOS, N.; BARNARD, A.; EVANS, G.; PREECE, J.; GRAZ, M.; JIMÉNEZ, A. *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 292, p. 176-187, 2019.

REN, G.; SANDERS, A. W.; NGUYEN, Q. P. New method for the determination of surfactant solubility and partitioning between CO₂ and brine. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 91, p. 77-83, 2014.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1-37, 1997.

RIBEIRO, É. V.; MORENO, M.; DE AZEVEDO LIMA, M.; DA SILVA DIAS, C.; DA SILVA DIAS, K. Z.; DE SÁ, M. F. C. P.; SILVA, D. A. O papel de alguns micro-organismos na carcinogênese. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 67540-67553, 2020.

RIBEIRO, A. P., SANTANA, A., MARA, J., RODRIGUES, I., ALMEIDA, J. C. F. CÂNCER DE MAMA. **Revista Projetos Extensionistas**, v. 1, n. 2, p. 126-136, 2021.

RICHARD, D.; KEFI, K.; BARBE, U.; BAUSERO, P.; VISIOLI, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. **Pharmacological research**, v. 57, n. 6, p. 451-455, 2008.

RIZVI, S. S.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food technology (USA)**, 1986.

RODRIGUES, D.; FREITAS, A. C.; PEREIRA, L.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; VASCONCELOS, M. R.; RODRIGUEZ-ALCALA, L. M.; GOMES, A. M. P.; DUARTE, A.C. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food chemistry**, v. 183, p. 197-207, 2015.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FONTES, A. M. Novosconceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

ROUPAS, P.; KEOGH, J.; NOAKES, M.; MARGETTS, C.; TAYLOR, P. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 687-709, 2012.

SADIQ, S.; BHATTI, H. N.; HANIF, M. A. Studies on chemical composition and nutritive evaluation of wild edible mushrooms, v. 27(3), p.151-154, 2008.

SAFWAT, M. S. I. A.; AL KHOLI, M. A. J. Recent trends, reality and future in the production, manufacture and marketing of medicinal and aromatic plants. **Egyptian Association of Producers, Manufacturers and Exporters of Medical and Aromatic Plants Esmab, Giza, Egypt**, p. 76, 2006.

SAMI, R., ELHAKEM, A., ALHARBI, M., BENAJIBA, N., ALMATRAFI, M., ABDELAZEZ, A., HELAL, M. Evaluation of antioxidant activities, oxidation enzymes, and quality of nano-coated button mushrooms (*Agaricus bisporus*) during storage. **Coatings**, v. 11, n. 2, p. 149, 2021.

SANTANA, M. D. O.; DE SÁ, J. S.; NEVES, A. F.; FIGUEREDO, P. G. J.; VIANA, J. A. O Poder das Plantas Medicinais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de Idosas. **Multidebates**, v. 2, n. 2, p. 10-27, 2018

SHIN, A.; KIM, J.; LIM, S. Y.; KIM, G.; SUNG, M. K., LEE, E.S.; RO, J. Dietary mushroom intake and the risk of breast cancer based on hormone receptor status. **Nutrition and cancer**, v. 62, n. 4, p. 476-483, 2010.

SILVA, A. E. D.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.

SILVA, R. D.; MELO, E. M. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Saúde & ciência em ação**, v. 2, n. 1, p. 79-92, 2016.

SILVA, G. A.; CASTRO, N. S.; FIGUEIREDO, R. O. Mecanismos epigenéticos e a ação da expressão da proteína BRCA na carcinogênese mamária. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82596-82613, 2020.

SIMÕES, M. S. M. B.; DE OLIVEIRA, R. P. Principais fatores de risco para trombose venosa profunda. **Revista Atualiza Saúde**, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SLAMON, D.; EIERMANN, W.; ROBERT, N.; PIENKOWSKI, T.; MARTIN, M.; PRESS, M.; CROWN, J. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **New England journal of medicine**, v. 365, n. 14, p. 1273-1283, 2011.

SRIRAMULU, M.; SHANMUGAM, S.; PONNUSAMY, V. K. *Agaricus bisporus* mediated biosynthesis of copper nanoparticles and its biological effects: An in- vitro study. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 35, p. 100254, 2020.

STEEG, Patricia S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 2003.

SVERSUT, R. A., VIEIRA, J. C., KASSAB, N. M., SILVA, D. B., SALGADO, H. R. N. Forced degradation behavior of two-drug combinations: Isolation and characterization of major degradation products by LC-MS. *Microchemical Journal*, v. 150, p. 104074, 2019.

SWERN, D. Bailey's industrial oil and fat products. 1982.

TEN CATE, H.; HACKENG, T. M.; DE FRUTOS, P. G. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. **Thrombosis and haemostasis**, v. 117, n. 07, p. 1265-1271, 2017.

TOMAIUOLO, M.; BRASS, L. F.; STALKER, T. J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. **Interventional cardiology clinics**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

UDAYKUMAR, P. Discovery of artemisinin: The Chinese wonder drug. **Muller Journal of Medical Sciences and Research**, v. 5, n. 2, p. 191, 2014.

UWINEZA, P. A.; WAŚKIEWICZ, A. Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3847, 2020.

VAN DER MEIJDEN, P. E.; HEEMSKERK, J. W. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 166-179, 2019.

VISIOLI, F.; POLI, A. Fatty acids and cardiovascular risk. Evidence, lack of evidence, and diligence. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3782, 2020.

Vital, A. C. P., Saraiva, B. R., Maldonado, L. H., & da Silva, P. T. M. P. Ingredientes funcionais e seus benefícios a saúde humana. **PubSaúde**, 1, a005, 2018.

WHO, G. WHO methods for life expectancy and healthy life expectancy. 2014.

WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017.

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; ARGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 67, p. 89-93, 2012.

YANG, T.; YAO, H.; HE, G.; SONG, L.; LIU, N.; WANG, Y.; YANG Y.; KELLER, E.T.; DENG, X. Effects of lovastatin on MDA-MB-231 breast cancer cells: an antibody microarray analysis. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 2, p. 192, 2016.

YAZAN, L. S.; FOO, J. B.; CHAN, K. W.; TAHIR, P. M.; ISMAIL, M. Kenaf seed oil from supercritical carbon dioxide fluid extraction shows cytotoxic effects towards various cancer cell lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 27, p. 5381-5388, 2011.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TÜRKEKUL, İ.; ELMASTAŞ, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 168-174, 2006.

ZHANG, J. J.; MA, Z.; ZHENG, L.; ZHAI, G. Y.; WANG, L. Q.; JIA, M.; JIA, L. Purification and antioxidant activities of intracellular zinc polysaccharides from *Pleurotus cornucopiae* SS-03. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 947-954, 2014.