



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

GIULIANE MOURA ANDRADE

**POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO COGUMELO *Pleurotus*
djamor (RUMPH. EX FR.) BOEDIJN SOBRE A MICROBIOTA COLÔNICA
HUMANA**

JOÃO PESSOA

2024

GIULIANE MOURA ANDRADE

POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DO COGUMELO *Pleurotus djamor* (RUMPH. EX FR.) SOBRE A MICROBIOTA COLÔNICA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

ORIENTADOR: Prof.^o Dr.^o Fillipe de Oliveira Pereira

COORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque

JOÃO PESSOA

2024

POTENCIAL PREBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DE COGUMELO
***Pleurotus djamor* (RUMPH. EX FR.) SOBRE A MICROBIOTA COLÔNICA HUMANA**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **19 / 08 / 2024**

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **FILLIPE DE OLIVEIRA PEREIRA**
Data: 20/09/2024 08:55:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Orientador (DN/CES/UFCG)

Documento assinado digitalmente
 **THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUE**
Data: 23/09/2024 14:38:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque
Coorientadora (DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **EVANDRO LEITE DE SOUZA**
Data: 27/09/2024 19:59:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Examinador interno (DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente
 **BRUNA BRAGA DANTAS**
Data: 26/09/2024 10:53:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Bruna Braga Dantas
Examinadora externa (CES/UFCG)

A553p Andrade, Giuliane Moura.

Potencial prebiótico e antioxidante do cogumelo pleurotus djamor (RUMPH. EX FR.) boedijn sobre a microbiota colônica humana / Giuliane Moura Andrade. - João Pessoa, 2024.

91 f. : il.

Orientação: Fillipe de Oliveira Pereira.

Coorientação: Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Cogumelos comestíveis. 2. Pleurotus spp. 3. Microbiota intestinal humana. 4. Compostos fenólicos. 5. Propriedades prebióticas. I. Pereira, Fillipe de Oliveira. II. Albuquerque, Thatyane Mariano Rodrigues de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 635.89(043)

Dedico esse trabalho ao Criador Inefável, fonte verdadeira da luz e da ciência, autor e consumidor de todas as coisas visíveis e invisíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois confiei meu caminho ao Senhor e Ele tudo fez. Deus me capacitou para concluir esta obra, dando-me todos os meios necessários para avançar cada passo nessa jornada, conectando-me com pessoas que foram imprescindíveis para a conclusão dessa dissertação. Este trabalho é primeiramente de Deus, em segundo lugar, de todas as mãos que me ajudaram, e por fim, cabe a mim apenas uma parcela de mérito.

Agradeço imensamente à minha família, especialmente ao meu esposo, Fernando. Ele sabe que esse título é nosso, pois, sem seu apoio, incentivo, amor e compreensão, eu não o teria alcançado. Às minhas filhas, que foram e são minha motivação para me tornar a cada dia uma pessoa melhor. À minha mãe e à minha sogra, que me ajudaram para que eu pudesse me dedicar mais ao estudo e à conclusão desta dissertação.

À Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pela assistência prestada ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira, e coorientadora Profa. Dra. Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque, por todas as orientações que possibilitaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores da Banca, que me auxiliaram com seus apontamentos, discernimentos e orientações na correção desse trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (UFPB) que viabilizou a execução da maior parte dessa pesquisa, assim como ao Laboratório de Bioquímica (UFCG), Laboratório de Caracterização e Análise Multiusuário (UFPB) e Laboratório de Águas e bebidas (IFSertão).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante o mestrado.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* têm ganhado destaque global por suas características sensoriais, nutricionais e funcionais. *Pleurotus djamor* possui elevado teor de compostos bioativos, como beta-glucanas, inulina e fenólicos, os quais podem exercer atividade prebiótica e antioxidante no trato gastrointestinal humano. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades prebióticas e antioxidantes de *P. djamor* sobre a microbiota bacteriana colônica durante fermentação *in vitro*. Para tanto, foram caracterizados e quantificados os compostos fenólicos de *P. djamor* seco (PDS) usando cromatografia líquida de alta eficiência e avaliada sua atividade antioxidante por meio dos métodos de ABTS, DPPH e FRAP. PDS foi submetido a uma digestão gastrointestinal *in vitro* (MUS) e submetido a um processo de fermentação, sendo adicionado 20% a um ensaio com inóculo fecal humano (40%) e meio de fermentação (40%) sob condições anaeróbias por 48 h. Meio com frutooligossacarídeos (FOS, 20%) e meio sem substrato fermentável (NC) foram utilizados como controles. Durante a fermentação foi quantificada a abundância relativa (%AR) de grupos bacterianos indicadores de modulação da microbiota colônica humana através da fluorescência de hibridização *in situ* com citometria de fluxo multiparamétrica, avaliada a atividade metabólica (pH, quantificação de açúcares e ácidos orgânicos) e antioxidante nos tempos 0, 24 e 48 h, enquanto a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H RMN) foi utilizada para detectar o perfil metabólico global nos tempos 0 e 48 h de fermentação. Foram realizados três ensaios independentes, expressos como média $\pm$ desvio padrão. Dez compostos fenólicos (três ácidos fenólicos e sete flavonoides) foram identificados, com maiores concentrações epicatequina ($3,03 \pm 1,54$ mg/L), ácido gálico ($2,71 \pm 1,54$ mg/L) e quercetina-3-glicosídeo ($2,40 \pm 1,54$ mg/L). Meio com MUS apresentou maior %AR de *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. ($1,12 \pm 0,15$ - $4,83 \pm 0,32$), *Bifidobacterium* spp. ($0,59 \pm 0,14$ - $1,85 \pm 0,37$) e *Ruminococcus albus* - *R. flavefaciens* ($0,37 \pm 0,16$ - $1,88 \pm 0,17$) após 48 h de fermentação. Não houve alterações significativas ($p \geq 0,05$) na %AR de *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. no meio com MUS, enquanto ocorreu a redução da %AR ($p < 0,05$) de *Clostridium histolyticum* após 48 h ($2,89 \pm 0,17$ - $1,22 \pm 0,38$). O índice prebiótico para MUS foi positivo em 24 e 48 h, diferindo significativamente ($p < 0,05$) de NC, indicando um potencial prebiótico. MUS causou diminuição do pH, consumo de açúcares, e aumento da produção de ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético, butírico e propiônico) do meio, correlacionando-se positivamente com os grupos bacterianos cujos %AR aumentaram durante a fermentação. *P. djamor* apresentou elevada atividade antioxidante (ABTS $86,94 \pm 0,95$ %; DPPH $36,19 \pm 6,71$ %; FRAP $239,08 \pm 33,14$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$). Essa atividade persistiu durante a fermentação, porém em decréscimo ao longo do tempo. A análise ^1H RMN revelou um perfil distinto de aminoácidos essenciais no meio com MUS, não presente nos meios controles. Dessa forma, *P. djamor* poderia contribuir para alterações benéficas na microbiota colônica humana, além de possuir atividade antioxidante capaz de diminuir o estresse oxidativo e promover a saúde intestinal.

Palavras-chave: cogumelos comestíveis; *Pleurotus* spp.; alimentos funcionais; microbiota intestinal humana; compostos fenólicos; propriedades prebióticas.

ABSTRACT

Edible mushrooms of the genus *Pleurotus* have gained global prominence for their sensory, nutritional, and functional characteristics. *Pleurotus djamor* has a high content of bioactive compounds, such as beta-glucans, inulin, and phenolics, which can exert prebiotic and antioxidant activity in the human gastrointestinal tract. The aim of this study was to evaluate the prebiotic and antioxidant properties of *P. djamor* on the colonic bacterial microbiota during *in vitro* fermentation. For this purpose, the phenolic compounds of dried *P. djamor* (PDS) were characterized and quantified using high-performance liquid chromatography, and their antioxidant activity was evaluated using the ABTS, DPPH, and FRAP methods. PDS was subjected to an *in vitro* gastrointestinal digestion (MUS) and a fermentation process, with 20% added to an assay with human fecal inoculum (40%) and fermentation medium (40%) under anaerobic conditions for 48 hours. Medium with fructooligosaccharides (FOS, 20%) and medium without fermentable substrate (NC) were used as controls. During fermentation, the relative abundance (%RA) of bacterial groups indicative of modulation of the human colonic microbiota was quantified through fluorescence in situ hybridization with multiparametric flow cytometry, and metabolic (pH, quantification of sugars and organic acids) and antioxidant activity were evaluated at 0, 24, and 48 hours, while ¹H Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) was used to detect the global metabolic profile at 0 and 48 hours of fermentation. Three independent assays were conducted, expressed as mean $\pm$ standard deviation. Ten phenolic compounds (three phenolic acids and seven flavonoids) were identified, with the highest concentrations being epicatechin (3.03 ± 1.54 mg/L), gallic acid (2.71 ± 1.54 mg/L), and quercetin-3-glucoside (2.40 ± 1.54 mg/L). The medium with MUS showed a higher %RA of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. (1.12 ± 0.15 - 4.83 ± 0.32), *Bifidobacterium* spp. (0.59 ± 0.14 - 1.85 ± 0.37), and *Ruminococcus albus* - *R. flavefaciens* (0.37 ± 0.16 - 1.88 ± 0.17) after 48 hours of fermentation. There were no significant changes ($p \geq 0.05$) in the %RA of *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. in the medium with MUS, while there was a reduction in the %RA ($p < 0.05$) of *Clostridium histolyticum* after 48 hours (2.89 ± 0.17 - 1.22 ± 0.38). The prebiotic index for MUS was positive at 24 and 48 hours, differing significantly ($p < 0.05$) from NC, indicating prebiotic potential. MUS caused a decrease in pH, sugar consumption, and an increase in the production of organic acids (lactic, acetic, butyric, and propionic acids) in the medium, correlating positively with the bacterial groups whose %RA increased during fermentation. *P. djamor* showed high antioxidant activity (ABTS $86.94 \pm 0.95\%$; DPPH $36.19 \pm 6.71\%$; FRAP 239.08 ± 33.14 μ mol FeSO₄/g). This activity persisted during fermentation, but decreased over time. The ¹H NMR analysis revealed a distinct profile of essential amino acids in the medium with MUS, not present in the control media. Thus, *P. djamor* could contribute to beneficial changes in the human colonic microbiota, in addition to having antioxidant activity capable of reducing oxidative stress and promoting intestinal health.

Keywords: Edible mushrooms; *Pleurotus* spp.; functional foods; human gut microbiota; phenolic compounds; prebiotic properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1:	Estrutura básica de um cogumelo (A) e formas variadas dos corpos de frutificação (B).....	15
Figura 2:	Classificação científica das espécies <i>Pleurotus</i> spp.....	18
Figura 3:	Imagem de <i>P. djamor</i>	20
Figura 4:	Desenho do estudo.....	35
Figura 5:	Cogumelo <i>P. djamor</i> em unidade produtiva.....	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure abstract		58
Figure 1:	Pearson correlation matrix for data from variables measured in media with <i>Pleurotus djamor</i> (MUS) during colonic fermentation.	81
Figure 2:	Analysis of the antioxidant activity of <i>Pleurotus djamor</i> powder and digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS) during colonic fermentation.....	82
Figure 3:	Representative ^1H NMR spectra of the media with digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS) at 0 (A) and 48 h (B) of <i>in vitro</i> colonic fermentation analyzed by ^1H NMR.....	83

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1:	Ranking dos 10 países que mais produziram cogumelos e trufas* no mundo em 2022.....	15
Tabela 2:	Composição nutricional de <i>P. djamor</i> e <i>P. Ostreatus</i>	22
Tabela 3:	Características físico-químicas e de composição nutricional de <i>P. djamor</i> seco (substrato folha de bananeira 100%)	37

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1:	Phenolic compounds (mean $\pm$ standard deviation, n = 3) of <i>Pleurotus djamor</i> powder.....	84
Table 2:	Relative abundance (% mean $\pm$ standard deviation; n = 3) of different bacterial groups in media with digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation.....	84
Table 3:	Prebiotic index (mean $\pm$ standard deviation; n = 3) calculated for media with digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 24 and 48 h of colonic fermentation.....	85
Table 4:	pH values and contents of sugars, lactic acid, and short-chain fatty acids in media with digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation.....	85
Table 5:	Metabolites in media with digested mushroom <i>Pleurotus djamor</i> (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation analyzed by $^1\text{H-NMR}$	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 COGUMELOS.....	15
2.1.1 Cogumelos comestíveis.....	18
2.2 <i>PLEUROTUS DJAMOR</i>	22
2.2.1 Características nutricionais de <i>P. djamor</i>	25
2.2.2 Moléculas bioativas de importância prebiótica em <i>P. djamor</i>	27
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL	31
2.3.1 Influência dos prebióticos na microbiota intestinal	35
2.3.2 Atividade antioxidante e microbiota intestinal.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 TIPO DE ESTUDO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2 LOCAL DA PESQUISA.....	38
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
3.4 PREPARO DA AMOSTRA E ANÁLISES INICIAIS.....	39
3.4.1 Obtenção de cogumelos <i>P. djamor</i> e preparo inicial da amostra	39
3.4.2 Determinação e quantificação de compostos fenólicos	40
3.4.3 Determinação de atividade antioxidante.....	41
3.5 AVALIAÇÃO PREBIÓTICA POR SISTEMA DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA <i>IN VITRO</i>	42
3.5.1 Simulação de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	42
3.5.2 Procedimentos éticos.....	43
3.5.3 Coleta das amostras fecais.....	44
3.5.4 Preparação do inóculo fecal humano	45
3.5.5 Preparação do meio de fermentação	45
3.5.6 Enumeração bacteriana por fluorescência de hibridização <i>in situ</i> acoplada com citometria de fluxo multiparamétrica	45
3.5.7 Determinação do índice prebiótico	47
3.5.8 Monitoramento de pH, teores de ácidos orgânicos e açúcares durante a fermentação.....	48
3.5.9 Determinação de perfil metabólico global	48
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49

4 RESULTADOS	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL	59
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	88
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	91

1 INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos comestíveis está em ascensão no cenário mundial por serem considerados alimentos altamente palatáveis, com excelente composição nutricional e de compostos bioativos, além de baixo valor calórico, de modo que essa tendência vem se estendendo gradativamente ao consumo brasileiro (Bellettini *et al.*, 2019; Waktola; Temesgen, 2018).

Dentre as espécies de cogumelos comestíveis, o gênero *Pleurotus*, composto por mais de 200 espécies, é um dos mais cultivados no mundo. Neste gênero, as espécies mais comumente conhecidas, consumidas, cultivadas e com reconhecida segurança para o consumo humano são *P. ostreatus* (cogumelo ostra), *P. djamor* (ostra rosa), *P. citrinopileatus* (ostra dourada) e *P. eryngii* (ostra rei), entre outros (Carvalho *et al.*, 2024; Carrasco-Gonzalez; Serna-Saldívar; Gutiérrez-Urbe, 2017; Li *et al.*, 2020).

P. djamor é um importante cogumelo comestível que tem atraído muita atenção devido ao seu alto valor nutricional e suas diversas propriedades terapêuticas. No entanto, os padrões de qualidade específicos desta espécie permanecem pouco explorados até o momento. Essa espécie apresenta frutificação precoce e alto rendimento quando comparada com outras espécies de *Pleurotus* spp. (Acharya, Khatua, Raio, 2017). *P. djamor* é um fungo pantropical da ordem Agaricales que apresenta características favoráveis para o cultivo em substratos à base de resíduos lignocelulósicos como palha de trigo e algodão, folha de bananeira, entre outros resíduos agroindustriais (İnci; Kirbağ; Akyüz, 2024).

O substrato de cultivo impacta o crescimento, rendimento, conteúdo de metabólitos secundários e propriedades físico-químicas, nutricionais e antioxidantes de *P. djamor* (Belletini *et al.*, 2019; Raman *et al.*, 2020; Vega *et al.*, 2022). Nesse sentido, a folha da bananeira, um resíduo agroindustrial derivado da produção comercial da fruta pelo setor hortícola em diversas regiões, que, se manejado de forma ineficiente, pode gerar prejuízos ao meio ambiente (Zárate-Salazar *et al.*, 2020), demonstrou, contudo, ser um substrato excelente para a produção de cogumelo comestível da espécie *P. djamor*. Medeiros *et al.* (2024) ao realizarem análise de cogumelos secos dessa espécie, derivados de cultivo no substrato folha de bananeira, encontraram conteúdo elevado de proteína, fibras, cinzas, polissacarídeos, compostos fenólicos totais, além de atividade antioxidante e baixo teor de lipídios. A combinação desses componentes com outros já relatados em sua composição, como quitina e inulina (Bach *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018), torna-o um alimento com grande potencial prebiótico, sendo uma

valiosa alternativa a dietas voltadas para a promoção da saúde intestinal e do bem-estar geral (Pham *et al.*, 2021).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, encontrados em alimentos, plantas e fungos. Sua diversidade estrutural permite que apresentem diferentes efeitos biológicos para além da atividade antioxidante (Haminiuk *et al.*, 2012). Essas moléculas são resistentes ao ácido gástrico e têm baixa absorção no estômago. No entanto, porções significativas de alguns compostos fenólicos ingeridos chegam ao intestino grosso, onde interagem com a microbiota local e podem também exercer atividade prebiótica (BIÉ *et al.*, 2023).

A respeito desse efeito, a definição de prebióticos é a de “substratos seletivamente utilizados por microrganismos que formam a microbiota do hospedeiro, conferindo ampla gama de benefícios à saúde”. Esse conceito ampliado não se refere apenas a microbiota do trato intestinal, como também, a de outras partes do corpo (Gibson *et al.*, 2017). Entretanto, é ainda no intestino grosso o principal sítio de atuação dos componentes prebióticos dietéticos por meio do estímulo a proliferação e consequente atividade da microbiota intestinal benéfica (Sanders *et al.*, 2019).

Sob tais considerações, é crucial explorar o potencial de alimentos naturais, a exemplo de *P. djamor* cultivado em substrato de folha de bananeira, e os seus efeitos sobre a microbiota intestinal humana. Apesar da literatura mostrar estudos prévios que se debruçam sobre os constituintes químicos e algumas das propriedades nutricionais e medicinais (Bach *et al.*, 2017; Inci; Akyüz; Kirbag, 2023; Medeiros *et al.*, 2024) de *P. djamor*, há escassez (ou até mesmo inexistência até o momento) de estudos que avaliem seu potencial prebiótico sobre a microbiota intestinal humana.

A metodologia de fermentação utilizando inóculo fecal humano é a abordagem mais relatada recentemente para avaliar um potencial efeito prebiótico, indicando impactos nas barreiras biológicas, mecânicas, químicas e imunológicas intestinais (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024). Estudos sobre a potencial atividade antioxidante durante a fermentação colônica humana de *P. djamor* também são escassos ou inexistentes, criando uma demanda de investigação sobre os possíveis efeitos de cogumelos comestíveis no ambiente intestinal.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial prebiótico e antioxidante de cogumelos comestíveis da espécie *P. djamor* sobre a microbiota colônica humana. Para isso, foram caracterizados e quantificados compostos fenólicos presentes em *P. djamor*, bem como sua atividade antioxidante. Além disso, foram investigados os efeitos desse cogumelo em

grupos bacterianos formadores da microbiota colônica, além da atividade metabólica e antioxidante encontradas no meio durante fermentação colônica *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COGUMELOS

Cogumelos são o corpo de frutificação ou esporocarpo, de uma classe de fungos conhecida como macrofungos. Dessa classe de fungos, fazem parte os filos ascomicetos e em sua maioria os basidiomicetos, os quais produzem corpos de frutificação distintos, visíveis (maiores que 5mm), que podem ser formados acima (epígeo) ou abaixo (hipógeo) do solo, dependendo da espécie, bem como assumir diversas formas, como cogumelos, trufas, *puffballs* e fungos de suporte, cuja função é a dispersão de esporos fúngicos no ambiente. Embora essa estrutura seja a parte de mais fácil visualização desse tipo de fungo, constitui apenas uma pequena porção de sua biomassa, sendo a maior porção o micélio, que se estende pelo substrato (Kavanagh, p. 333, 2018).

A parte do organismo fúngico responsável pela fixação, digestão e nutrição se chama micélio vegetativo, que são grupamentos celulares que formam filamentos tubulares chamados hifas. As hifas se estendem pelo substrato em busca de nutrientes, produzindo e liberando enzimas digestivas e depois absorvendo os nutrientes resultantes da digestão (Kendrick, p. 78, 2017).

Pertencendo ao Reino Fungi, os fungos são evolutivamente mais próximos dos animais do que dos vegetais. Os fungos podem ser uni ou multicelulares e empregam quitina na sua parede celular, a mesma substância que compõe o exoesqueleto de insetos e crustáceos, enquanto plantas empregam lignina e celulose em sua parede celular. Os fungos não realizam fotossíntese, mas são capazes de realizar a digestão fora do corpo, através da liberação de enzimas no substrato, e utilizam como reserva energética carboidratos na forma de glicogênio (Timm, p.27, 2018).

Enquanto o micélio vegetativo é responsável pela nutrição, o micélio reprodutivo, ou o corpo de frutificação é a parte responsável pela reprodução e também é formado por hifas, a partir do micélio vegetativo. A estrutura de um corpo de frutificação pode apresentar características diversas a depender da espécie, do filo, do ambiente, podendo ter formatos típicos, cores marcantes, superfícies características e manter alguns adereços como escamas, véus, volvas e anéis que são resquícios de véu parcial ou véu universal, presente nos corpos de frutificação jovens (Deacon, p. 49, 2013).

Além destes “adereços” o crescimento e características dos corpos de frutificação poderá trazer particularidades como superfícies lisas, viscosas, fibrilosas, pilosas, cobertura de escamas ou placas auréoladas. As texturas também serão muito variadas sendo comum as

gelatininosas, cartilaginosas, carnosas, coriáceas e lenhosas (Timm, p. 36, 2018). Abaixo apresentamos a figura 1, com exemplos da (A) estrutura básica de um cogumelo e (B) formas variadas dos corpos de frutificação.

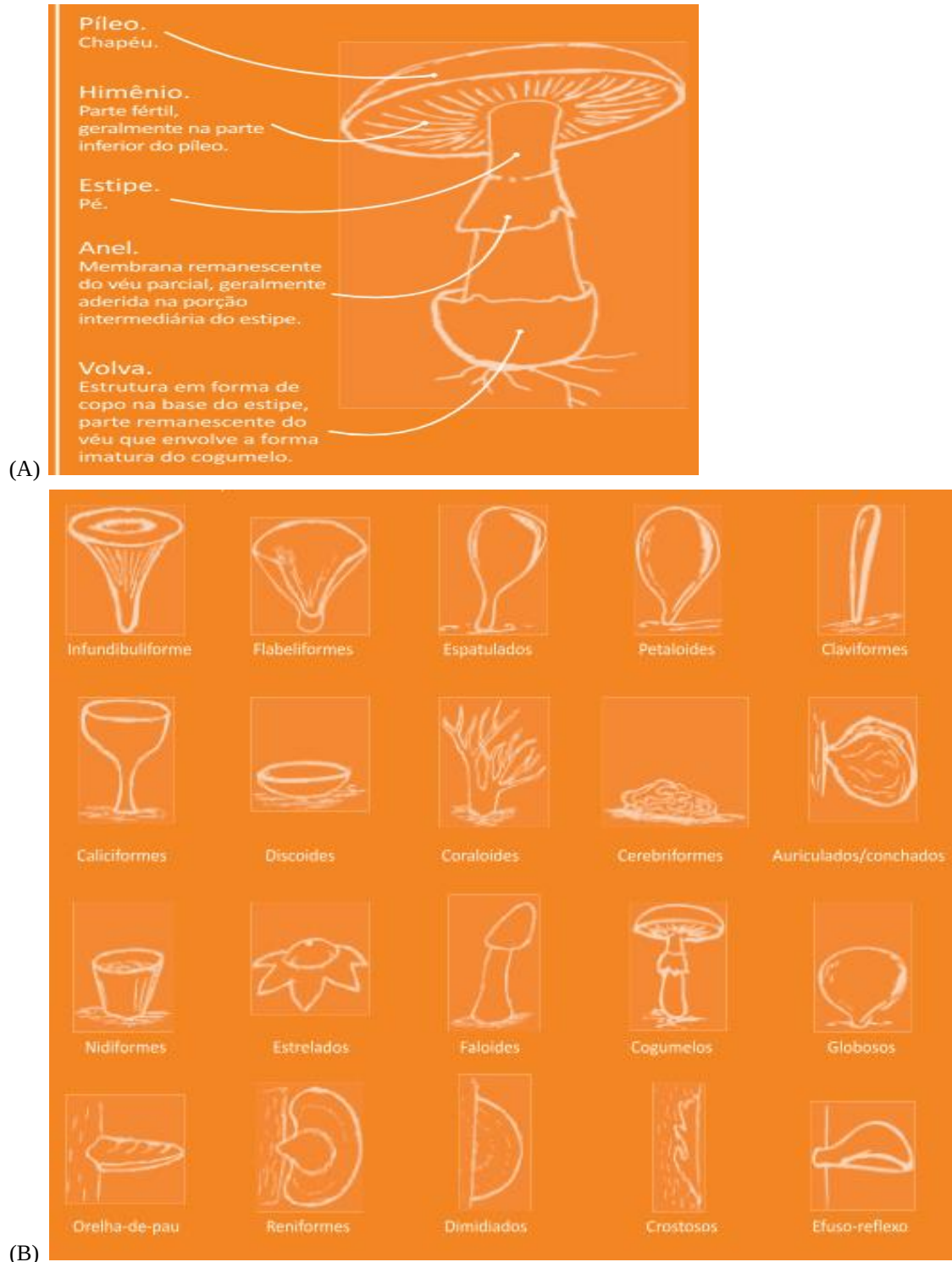


Figura 1: Estrutura básica de um cogumelo (A) e formas variadas dos corpos de frutificação (B).

Fonte: Timm, p. 56-57, 2018.

Quanto a forma de interação com o meio ambiente e com outros seres vivos, os fungos podem ser: 1. simbióticos, mantendo relação próxima com outro organismo, sem causar-lhe dano; 2. saprófitos, ou decompositores de matéria orgânica; 3. parasitas, que infectam e prejudicam outros organismos vivos. Espécies comestíveis cultiváveis de cogumelos pertencem ao grupo dos saprófitos, ou macrofungos que possuem características de reciclagem de nutrientes em ambientes terrestres e aquáticos, o que os tornam importantes para alguns serviços ecossistêmicos, como em teias alimentares, visto que o micélio fúngico dessas espécies liberam enzimas extracelulares no substrato, as quais decompõe restos de plantas e animais, e que por sua vez, liberam esses nutrientes de volta ao solo para reutilização por outros organismos quando a biomassa fúngica se decompõe (Kavanagh, p. 334, 2018).

As espécies saprófitas silvestres ocorrem naturalmente em matéria orgânica, comuns em interior de matas, sobre troncos de árvores caídos, árvores mortas ainda de pé, galhos e folhas caídas, no solo, nos campos, sobre esterco e etc (Timm, p. 60, 2018).

Ambientalmente, o cogumelo tem um impacto positivo centrado em dois eixos: 1) aumentar a fertilidade do solo através da sua capacidade de quebrar e dissolver compostos complexos (seja vegetal ou animal) em elementos simples e fáceis de usar, ou seja, bioconversão de biomassa orgânica em alimentos e produtos úteis; e 2) sua capacidade de reduzir ou eliminar os poluentes ambientais, seja por decomposição ou adsorção. Neste sentido, os cogumelos apresentam outro papel influente no ecossistema, que é a biorremediação, utilizando micélios de cogumelos para analisar e remover contaminantes e eventualmente absorver os poluentes, por um processo de bioadsorção (El Sheikha; Hu, 2018). Sem as contribuições dos fungos para os processos ecossistêmicos, a manutenção da vida como a conhecemos ficaria gravemente comprometida.

O potencial para aproveitar o arsenal metabólico especializado dos fungos saprófitos é um importante fator impulsionador na pesquisa em biotecnologia fúngica. Na indústria alimentícia esse potencial é muito promissor, pois pode servir para decompor resíduos industriais (bagaço de frutas, etc), convertendo-os (ao invés do descarte ambiental) em alimento nutricionalmente completo (cogumelo) e substrato rico em nutrientes aptos a serem devolvidos ao solo (Melanouri; Dedousi, 2022).

Além dos impactos significativos dos cogumelos na agricultura e no meio ambiente, possuem também potencial para gerar valor socioeconômico e melhorar o bem-estar humano em escala global. A disponibilidade de resíduos de lignocelulose em todo o mundo pode ser aproveitada para produzir alimentos funcionais por meio da produção em larga escala de cogumelos comestíveis (Chang; Wasser, 2017). Isso não apenas diversifica os mercados

agrícolas, mas também reduz o desperdício e promove o crescimento econômico na indústria de cogumelos, potencialmente influenciando a dinâmica do comércio global e oferecendo novos produtos e práticas sustentáveis para mercados internacionais. (Vega *et al.*, 2022).

Quanto ao uso dos cogumelos, esses podem ser classificados em: (a) comestíveis (exemplo *Pleurotus djamor*); (b) medicinais (exemplo do *Ganoderma lucidum*); (c) venenosos (*Amanita phalloides* ou “tampa mortal”) e (d) outros cogumelos, que incluem grande número de espécies cujas propriedades não foram definidas (El Sheikha; Hu, 2018).

Existem aproximadamente 14.000 espécies conhecidas de cogumelos, das quais 2.006 são seguras para consumo humano como os principais cogumelos comestíveis. Tendo por base essa classificação, os benefícios dos cogumelos cobrem diversos aspectos, como saúde, economia, produção alimentar sustentável, meio ambiente e indústria, sendo considerado um produto estrategicamente promissor, contribuindo eficazmente para o desenvolvimento econômico sustentável (Li *et al.*, 2020).

2.1.1 Cogumelos comestíveis

Cogumelos têm sido usados pelos seres humanos desde o período Neolítico para alimentação, propósitos medicinais, como agentes alucinógenos em rituais ou como meio para produzir fogo (*fomitopsis pinicola*). O uso mais conhecido de cogumelos no mundo ocidental é como alimento, em que podemos encontrar a menção explícita para esse propósito em antigos escritos romanos e gregos (El Sheikha; Hu, 2018).

A maioria dos cogumelos é coletada na natureza e há quase uma centena de espécies de fungos para as quais é conhecida algum tipo de sistema de cultivo. O primeiro registro escrito sobre o cultivo e produção de cogumelos vem da China. Wang Zeng (1313 dC) descreveu no livro “A agricultura” a cultura do shiitake (*Lentinula edodes*). O cultivo de cogumelo botão (*Agaricus bisporus*) foi descrito pela primeira vez na França por Tournefort em 1707 (Kavanagh, p. 342, 2018).

Por um longo período de tempo os cogumelos silvestres comestíveis aliviaram significativamente a desnutrição proteica e as deficiências de micronutrientes em famílias rurais e populações indígenas em todo o mundo, quando em situações de escassez, eles representaram um recurso altamente nutritivo, cujo acesso só era possível em algumas estações do ano (Pérez-Moreno *et al.*, 2020).

Normalmente, os cogumelos silvestres comestíveis podem ser consumidos após a colheita no seu ambiente natural, adquiridos nos mercados locais, ou mesmo através do

comércio internacional. A coleta de cogumelos é o método mais básico e antigo de consumo de cogumelos selvagens comestíveis. Vários grupos étnicos coletam e consomem centenas de espécies de cogumelos comestíveis anualmente durante suas respectivas estações chuvosas, constituindo uma parte essencial de suas dietas (Carvalho *et al.*, 2024).

Cogumelos comestíveis têm se tornado um dos recursos alimentares mais populares em todo o mundo e muito apreciados pelos consumidores (El Sheikha, Hu, 2018). O seu consumo, seja por meio de seu cultivo ou coleta de espécies silvestres estão interligados à própria história da dieta humana devido aos seus atributos sensoriais, valor nutricional e qualidades promotoras da saúde (Jacob *et al.*, 2023). Dados da FAOstat revelam que em 2012 a produção mundial de cogumelos e trufas foi de 31.780,371 toneladas e em 2022 essa produção cresceu, com registro de 4.833.599,608 toneladas.

Cogumelos comestíveis têm se tornado parte da dieta de diversas populações ao redor do mundo, embora dados das quantidades e espécies consumidas possam variar significativamente. Li *et al.* (2020) em revisão da literatura, encontraram 2.786 espécies de cogumelos de 99 países, de mais de 1.100 fontes, catalogando 2.189 espécies comestíveis, das quais 2.006 podem ser consumidas com segurança, e mais 183 espécies que necessitam de alguma forma de pré-tratamento antes do consumo seguro ou que foram associados a reações alérgicas por alguns indivíduos que o consumiram.

Um levantamento feito por Carvalho *et al.* (2024), trouxe dados significativos e atualizados sobre a lista de cogumelos comestíveis encontrados no Brasil, que compreende 133 cogumelos (93,23% do filo basidiomicetos; 6,02% filo ascomicetos e 0,75% Myxomycota) seguros para consumo humano e estando distribuídos por todos os estados brasileiros, com presença significativa em São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Bahia e Santa Catarina. A grande maioria são cogumelos saprófitos (81,20%), com menor quantidade de cogumelos micorrízicos (15,04%) e parasitas (3,76%). A distribuição de espécies de cogumelos silvestres comestíveis no Brasil concentra-se nas seguintes famílias: Polyporaceae, Agaricaceae, Russulaceae, Hydnangiaceae e Pleurotaceae. Os gêneros primários relatados neste estudo incluem *Agaricus*, *Auricularia*, *Lentinus*, *Polyporus*, *Pleurotus* e *Pluteus*. Alguns desses cogumelos são amplamente reconhecidos e representativos da biodiversidade brasileira, pois são encontrados em diversos biomas.

Se tratando de produção, há uma série de condições adequadas para o seu crescimento e rendimento ideais, visto que existem várias condições ambientais necessárias ao cultivo de diversas espécies de cogumelos. Na indústria, várias espécies de cogumelos estão sendo cultivadas para fins comerciais (Mahari *et al.*, 2020). Dados da FAOstat (Tabela 1) mostram

que em 2022 os principais países produtores de cogumelos foram China, Japão, Estados Unidos, Índia, Polônia, Holanda, Espanha, Canadá, Rússia e França. Entre estes países, a China é de longe o maior produtor, fornecendo aproximadamente 94% da produção mundial.

Tabela 1. Ranking dos 10 países que mais produziram cogumelos e trufas* no mundo em 2022.

RANKING	PAÍS	PRODUÇÃO DE COGUMELOS E TRUFAS* (t)
1	China	45.428,82
2	Japão	469,49
3	Estados Unidos das Américas	0,32
4	Índia	0,28
5	Polônia	0,257
6	Holanda	0,235
7	Espanha	0,167
8	Canadá	0,139
9	Rússia	0,128
10	França	0,102

Fonte: FAOstat, 2024. *As trufas representam apenas uma pequena porção das quantidades de cogumelos listadas nesta tabela.

Apenas um número muito limitado entre várias espécies é cultivado em escala industrial: As principais espécies de cogumelos cultivadas na China são o cogumelo ostra (espécie *Pleurotus*), shiitake (Xianggu pelo nome chinês ou *Lentinula edodes*), enokitake (*Flammulina edodes*), cogumelo palha (*Volvariella volvacea*), cogumelo orelha-de-pau (espécie *Auricularia*) e cogumelo botão (*Agaricus bisporus*). Os cogumelos comestíveis mais cultivados ao redor do mundo são as espécies *A. bisporus*, *Flammulina velutipes* (cogumelo enoki), *L. edodes*, e *Pleurotus* spp., em particular cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) (Niego *et al.*, 2021).

Os dados da consulta a FAOstat apresentados anteriormente (Tabela 1) sobre a produção mundial de cogumelos não trazem (ou não consideram) a produção ou consumo de cogumelos comestíveis da América do Sul ou do Brasil, até 2022. No Brasil, entretanto, o último Censo Agropecuário realizado pelo IBGE, trouxe dados sobre a produção de cogumelos em 2017, com registros de 773 estabelecimentos horticultores classificados como produtores de cogumelos, com produção total de 12,730 toneladas. Nesses dados não há registro de tipos de cogumelos comestíveis produzidos, se são espécies importadas ou nativas, silvestres que foram domesticadas. O Estado de São Paulo, de acordo com o mesmo Censo, representa quase 87% dessa produção (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2017).

No Brasil, os cogumelos silvestres representam patrimônio cultural, principalmente entre as culturas indígenas e oferecem rica área de exploração e potencial para enriquecer a biodiversidade alimentar, preservando não só esse patrimônio, como também contribuindo para a manutenção dos ecossistemas naturais do Brasil. Os indígenas Yanomami desenvolveram práticas de cultivo de cogumelos como *Panus neostrigosus*, *Panus strigellus*, *Panus velutinus*, *Lentinus bertieri* e *P. djamor*, os quais crescem em troncos de árvores dentro da área de produção de mandioca e alimentam toda a comunidade. Esse sistema de produção associado a mandioca está intimamente ligado à diversidade e quantidade de cogumelos colhidos ao longo do ano, pois podem ser encontradas durante todo o ano outras espécies, mesmo quando decidem abandonar a área de cultivo (Sanuma *et al.*, 2016, p. 66).

As comunidades locais e indígenas no Brasil desenvolveram práticas de cultivo de cogumelos ao longo dos anos para atender à necessidade de uso sustentável dos recursos naturais, preservando a cultura e contribuindo para a segurança alimentar e nutricional (Ulian *et al.*, 2020). Além disso, esses conhecimentos e práticas favorecem a domesticação mais eficaz dos cogumelos silvestres do Brasil, aumentando o número de variedades de cogumelos comestíveis disponíveis para a população brasileira (Albertó, 2017).

Há escassez de estudos sobre características de consumo de cogumelos comestíveis no Brasil, em que nenhum estudo de frequência/histórico dietético relata o consumo em nível de espécie. Sendo difícil inferir também quais fatores, sejam sensoriais, econômicos ou outros, estão associados ao consumo de cogumelos comestíveis. Carvalho *et al.*, 2024, em recente revisão de literatura sobre estudos etnomicológicos no Brasil, encontrou registros de consumo de cogumelos que datam do século XVII, fornecendo relatos desses, incluindo espécies do gênero *Fistulina* spp. na dieta dos índios "Tucano" e *Polyporus sapurema* na dieta de diversas tribos indígenas brasileiras, onde eram conhecidos como "pão do índio".

Hoje em dia, inúmeras espécies de cogumelos, seus grupos de macromoléculas ou compostos específicos isolados e purificados também podem ser utilizados para formular alimentos funcionais, nutracêuticos e farmacêuticos (Niego *et al.*, 2021). De acordo com a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Por outro lado, "nutracêuticos" correspondem a um composto natural específico ou nutriente, bem como um extrato alimentar, geralmente como um suplemento no formato farmacêutico.

Alimentos funcionais e nutracêuticos possuem benefícios biológicos e funcionais comprovados ou efeitos protetivos contra doenças (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024).

Consequentemente, cogumelos são preferíveis e adaptáveis em formulações alimentares devido ao seu sabor distinto e gosto específico, podendo ser usados na forma de alimentos, condimentos, ingredientes de preparações ou formulações de produtos alimentares ou como suplementos alimentares. Uma dieta equilibrada que inclua o consumo de cogumelos tem uma grande vantagem em termos dos benefícios nutricionais e propriedades funcionais que os mesmos oferecem (Deveci *et al.*, 2021).

Outrossim, devido a sua perecibilidade, cogumelos frescos necessitam de métodos de conservação para prolongar a sua vida útil. Nesse caso, esses alimentos são comumente comercializados na forma seca tendo em vista garantir um maior tempo de prateleira (Guo *et al.*, 2023). Em sua maioria, cogumelos comestíveis passam por algum processo de cozimento antes do consumo. O processamento de cogumelos por meio de secagem, fervura, micro-ondas, cozimento sob pressão, grelhar, cozinhar no vapor e a fritura induz mudanças significativas na textura, valor nutricional e propriedades bioativas (Niazi; Ghafoor, 2021).

2.2 *Pleurotus djamor*

Cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* atraem atenção especial devido ao seu teor de nutrientes, sendo um dos mais populares e cultivados em todo o mundo. As espécies que pertencem ao gênero *Pleurotus* spp. podem crescer em uma ampla faixa de temperaturas, com umidade relativamente alta e tolerar altos níveis de CO₂, não requerem, portanto, condições ambientais controladas sofisticadas e específicas. Espécies *Pleurotus* são praticamente onipresentes, encontradas tanto em partes temperadas quanto tropicais e são uma iguaria bem conhecida em diferentes partes do mundo (Raman *et al.*, 2021).

Segundo Bellettini *et al.* (2019) o gênero de fungos *Pleurotus* spp. é um dos mais extensivamente estudados pelas suas excepcionais propriedades ligninolíticas, ou seja, este gênero cliva celulose, hemicelulose e lignina da madeira. Em seu cultivo, apresenta alto rendimento por maior utilização do substrato, ausência de esporos, ampla tolerância térmica e química, bem como biotransformação de substrato para o meio ambiente. As espécies de *Pleurotus* podem ser cultivadas facilmente devido à sua natureza de rápida colonização em substratos agrícolas diversificados e à sua eficiência biológica de 100%.

Cogumelos comestíveis são produzidos em todo o território mundial e somente a produção de espécies *Pleurotus* spp. representam cerca de 27% do total de cogumelos

cultivados a nível mundial (Raman *et al.*, 2021). A China é atualmente o principal produtor de *Pleurotus* com cerca de 80% da produção global (Carrasco-gonzalez; Serna-Saldívar; Gutiérrez-Urbe, 2017).

Na natureza, cogumelos desse gênero geralmente crescem colonizando resíduos e materiais orgânicos mortos como restos de árvores, folhas, entre outros materiais, funcionando como decompositores primários (Mahari *et al.*, 2020). Conforme observado na Figura 2, as espécies *Pleurotus* pertencem a ordem Agaricales e à família Pleurotaceae (cogumelo ostra com esporos brancos) e distinguem-se pela sua cor e habitat. As características morfológicas das espécies *Pleurotus* são instáveis devido às variações das condições agroclimáticas e aos diferentes substratos utilizados para cultivo (Raman *et al.*, 2021).

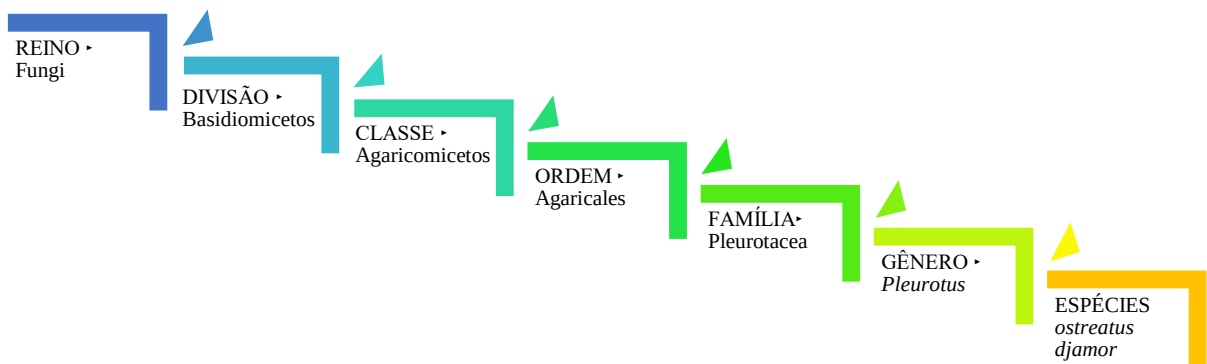


Figura 2: Classificação científica das espécies *Pleurotus* spp.

Fonte: adaptado de Mahari *et al.* (2020).

Esse gênero chama atenção pela ampla variedade de substratos que podem ser utilizados para sua produção, pois crescem na maioria das madeiras nobres, subprodutos da madeira (serragem, papel, borra de celulose), todas as palhas de cereais (milho e espigas de milho), borra de café, cascas, talos e folhas, folha de bananeira, resíduos de algodão, palha e vagens de feijão, resíduos do cultivo de Brassicas (colza e mostarda), cactos, agave e mandioca, na polpa de cardamomo, casca de coco, casca de amendoim e aguapé, folhagens de batata, plantas de quinoa, talos de gergelim, cascas de girassol e muito mais (Kavanagh, p. 345, 2018).

Globalmente, são produzidos anualmente cerca de 998 milhões de toneladas de resíduos agroindustriais, que incluem palhas de arroz, trigo e cereais, o que pode ser utilizado por cogumelos do gênero *Pleurotus* spp. como substrato para o seu crescimento e, assim, o seu

cultivo ajuda na reciclagem de resíduos agrícolas e pode aliviar a lacuna nutricional predominante, principalmente entre as populações de países em desenvolvimento. Além disso, os substratos gastos, podem ser aproveitados como fertilizante, ração animal e para produção de biogás (Raman *et al.*, 2021).

O gênero *Pleurotus* inclui espécies que não são cultivadas comercialmente em larga escala, mas são muito importantes por suas propriedades nutricionais e medicinais. Um exemplo é *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, ou cogumelo ostra rosa, uma espécie tropical e subtropical amplamente distribuída. Na América Latina, foram encontrados exemplares silvestres na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Guadalupe, Guatemala, Martinica, México, Panamá, Porto Rico e Venezuela, embora provavelmente tenha uma distribuição mais ampla (Vega *et al.*, 2022). Podemos observar um exemplar dessa espécie na figura 3 abaixo:



Figura 3: Imagem de *P. djamor*

Fonte: Trierweiler-Pereira; Sulzbacher; Baltazar (2018).

No site de catalogação Flora e Funga Brasil (2024), está catalogado como *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn e tem como sinônimo heterotípico o *Pleurotus ostreatusroseus*. É um fungo sapróbio, tendo como substrato natural os troncos em decomposição, sendo cogumelo nativo, com distribuição geográfica nas regiões Norte (Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia), Nordeste (Paraíba e Pernambuco), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e no Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) do Brasil, com domínios fitogeográficos na Amazônia e Mata Atlântica.

P. djamor é uma espécie tropical de cogumelo ostra nativo do Sudeste Asiático e da América Central. Nas regiões tropicais, cogumelos dessa espécie são comumente coletados na

natureza e estão facilmente disponíveis nos mercados rurais, onde são muito apreciados e comprados pelos clientes como substitutos de soja ou ovo, pelo seu elevado teor de aminoácidos essenciais. Embora esta espécie seja menos importante economicamente do que *P. ostreatus*, está se tornando mais popular devido à sua cor rosa incomum e textura específica. Além disso, é mais resistente a doenças do que *P. ostreatus* e pode ser cultivado em temperaturas mais altas, chegando a ultrapassar os 35 ° C. O principal desafio do cultivo e comércio de *P. djamor* é a vida útil curta (Zieba *et al.*, 2021).

Descrito na enciclopédia Yanomami sobre cogumelos comestíveis (Sanuma *et al.* 2016) como “Hiwala amo”, que significa Porco espinho, *P. djamor*, normalmente é encontrado em troncos de embaúba, na parte central da roça (onde os índios cultivam a mandioca). Ele também pode ser coletado, com menor frequência, na floresta. São preparados para consumo embrulhado em folhas e assado na brasa. Depois de cozido, o embrulho é rasgado e o cogumelo é temperado com pimenta seca em pó e consumidos acompanhando beiju e banana verde assada.

Pesquisas têm confirmado os benefícios a saúde e as propriedades medicinais potenciais de basidiocarpos e micélio obtido a partir de culturas *in vitro* de *P. djamor*. Glucanas isolados deste cogumelo apresentaram efeito citotóxico contra células de carcinoma ovariano em modelos *in vitro* (Maity *et al.*, 2019). Além de efeitos citotóxicos contra células cancerígenas, as glucanas de cogumelos têm potencial prebiótico pouco explorados. Um estudo realizado por Sawangwan *et al.* (2018), para avaliar as propriedades prebióticas *in vitro* de 7 cogumelos comestíveis, mostrou que notavelmente, *Lactobacillus acidophilus* cultivadas com extrato de *P. djamor* tiveram a maior porcentagem de sobrevivência em HCl (ácido clorídrico) após 2 horas de incubação.

Bach *et al.* (2017) ao realizarem estudo com 9 espécies de cogumelos comestíveis, encontrou quantidades significativas de α -glucanas e β -glucanas totais na espécie *P. djamor* (14,96mg/g em matéria seca⁻¹) maiores que 7 (*Agaricus bisporus* champignon e *A. bisporus* Portobello; *A. brasiliensis*; *Flamulina velutipes*; *Lentinula edodes* ou shitake; *P. ostreatus* ostra branca e *P. ostreatus* ostra preta) das 9 espécies ($p \leq 0,05$) avaliadas. O único avaliado a apresentar maiores quantidades de glucanas que *P. djamor* foi *P. eringy*.

2.2.1 Características nutricionais de *P. djamor*

Cogumelos *Pleurotus* spp. são ricos em proteínas, fibras alimentares, aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas solúveis em água e minerais. Estes cogumelos são

abundantes em moléculas bioativas funcionais, que exercem influências na saúde humana. Nessas espécies encontramos aplicações únicas como aromatizante, saborizante e excelente qualidade de preservação (Torres-Martínez *et al.*, 2022). Na tabela 2 é apresentado um compilado sobre composição nutricional de *P. djamor* e uma comparação com os teores de composição da espécie mais conhecida desse gênero, *P. ostreatus*.

Tabela 2: Composição nutricional de *P. djamor* e *P. Ostreatus*.

Nutrientes p/ 100g														
Espécie	Ref.	Kcal	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	K (mg)	P mg	Fe mg	Zn mg	Cu mg	Ca mg	Mn mg	Mg mg
<i>P. djamor</i> (seco)	Medeiros <i>et al.</i> , 2024	251	18,3	0,25	44	18,5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. djamor</i> (liofilizado)	Vega <i>et al.</i> , 2022	303	24,4	2,3	46,1	17,2	179	96,6	6,8	37,5	0,26	5594	-	153
<i>P. djamor</i> (seco)	Bach <i>et al.</i> , 2017	191	22,5	1,4	22	35,3	2790	617	15,4	16	1,8	15	2	175
<i>P. Ostreatus</i> (seco)	Bach <i>et al.</i> , 2017	179	22,5	1,4	19	46,6	3060	699	17,4	10	2,45	8,75	1	149

Fonte: Autor, 2024.

Nos estudos de composição compilados na tabela acima, temos um teor proteína para *P. djamor* seco/liofilizado entre 18,3 a 24,4 g/100g, carboidratos entre 22 e 46,1 g/100g, lipídeos entre 0,25 e 2,3 g/100g e fibras entre 17,2 e 35,3g/100g (Bach *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2024; Vega *et al.*, 2022). Dados de composição Nutricional para *P. djamor* (seco) em revisão de Carrasco-González *et al.* (2017) incluem teores de proteína entre 11.3 32.3 g/100g, carboidratos totais de 35,5–42,4g/100g, gordura de 0,1–4,6 g/100g, fibra de 7,3–12,2% e cinzas de 6,2–8,3 g/100g. Esse cogumelo comestível também é fonte de vitaminas, principalmente complexo B (B1, B2) e D, junto com os minerais K, P, Mg, Ca, Na, Zn e Fe, entre os mais comuns (Salmones, 2017). Variações na composição nutricional são resultado dos diferentes substratos utilizados para cultivo de cogumelos, entre outros fatores (Ritota; Manzi, 2019).

As espécies *Pleurotus* são consideradas uma boa fonte de aminoácidos, como o ácido γ -aminobutírico (GABA), um aminoácido não essencial necessário para o funcionamento do cérebro e atividade mental. Aminoácidos como triptofano, cisteína, alanina e glicina também presentes exibem um efeito sinérgico com a vitamina C e E em relação à sua atividade antioxidante. Por apresentarem fontes de nitrogênio na forma de aminoácidos, quitina e ácidos nucléicos, deve-se utilizar valores de coeficiente de conversão (Fator de correção de Nitrogênio / proteína) de 3,45 a 4,38. A assimilabilidade da proteína de cogumelos depende principalmente

da espécie, variando de 9,29 a 37,4 g/100 g de corpos frutíferos, que pode variar com base em fatores inerentes e agroclimáticos (Raman *et al.*, 2021).

Os cogumelos *Pleurotus* contêm grandes quantidades de carboidratos, sendo em sua maior composição de fibras como os polissacarídeos e a quitina. Os polissacarídeos encontrados são constituintes da parede celular, que contêm uma mistura de componentes fibrilares que incluem quitina e polissacarídeos b-D-glucana e manana (Bach *et al.*, 2017).

2.2.2 Moléculas bioativas de importância prebiótica em *P. djamor*

É fato que o gênero *Pleurotus* spp. vem ganhando cada vez mais importância como promotor/protetor da saúde, além do status de aliado ambiental em comparação com outros cogumelos medicinais e/ou comestíveis, resultando num aumento nas suas atividades de pesquisa e desenvolvimento durante as últimas duas décadas (Tolera; Abera, 2017). Graças a natureza química de compostos bioativos presentes neste cogumelo, os quais são naturalmente encontrados nos corpos de frutificação, suas concentrações sofrem alterações pelas diferentes composições dos substratos, tipo de cultura e condições pós-colheita (Carrasco-Gonzalez; Serna-Saldívar; Gutiérrez-Urbe, 2017).

Uma das espécies de cogumelos comestíveis mais estudadas devido a suas características medicinais e composição bioativa e seus benefícios a saúde é *P. ostreatus* (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024). No entanto, são poucos os estudos sobre *P. djamor*, outra importante espécie desse gênero, que apresenta grande potencial, visto suas características de cultivo e de composição já mencionados, em que muitas se sobressaem frente a *P. ostreatus*.

Fenóis e flavonoides são os metabólitos secundários de maior relevância farmacológica presentes nos corpos frutíferos de *P. djamor*. Existe uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de extratos de cogumelos comestíveis. Extratos fúngicos de *Pleurotus* spp. são potenciais candidatos para obtenção de compostos de interesse para a saúde humana e para desenvolvimento de produtos valiosos para tratar doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Cruz-Moreno, *et al.*, 2023).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pela atividade da vida vegetal, e são compostos por uma combinação de anéis aromáticos únicos ou múltiplos ligados a um grupo hidroxila. Existem aproximadamente 8.000 compostos fenólicos que foram identificados e estão subcategorizados em ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e outros fenóis complexos (Panche; Diwan; Chandra, 2016).

A biossíntese de compostos fenólicos ocorre em resposta às demandas internas e ambientais dos seres vivos que o produzem. Fatores externos como seca, excesso de salinidade ou de temperatura, poluentes atmosféricos metais pesados, radiação ultravioleta e patógenos são exemplos de fatores ambientais (ou externos) que fazem com que aumente formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido às quais o meio redox intracelular é modificado, afetando as vias de sinalização e o destino celular de algumas reações bioquímicas. Em resposta, esses organismos apresentam uma maior biossíntese de compostos fenólicos para lidar com essas restrições (Kaur *et al.*, 2023).

No entanto, não só o estresse ambiental, como também, as demandas inerentes dos organismos vivos estimulam os fluxos de carbono das vias metabólicas primárias para as secundárias, em resposta a essas alterações ou necessidades, visto que, esses metabólitos são especializados primariamente em funções celulares essenciais, como desenvolvimento, divisão celular, atividade fotossintética, regulação hormonal e eliminação de EROs prejudiciais e ativas. A capacidade de sintetizar compostos fenólicos foi selecionada ao longo da evolução em diferentes linhagens de plantas, permitindo assim que elas enfrentem os desafios ambientais em constante mudança ao longo do tempo evolutivo (Lattanzio, 2013).

Embora os cogumelos possam sintetizar seus próprios compostos fenólicos, também podem beneficiar-se dos que se encontram presentes no substrato em que crescem, demonstrando a sua versatilidade na utilização de diferentes fontes para a sua composição química. Essa produção e/ou utilização está associada à biotransformação do substrato rico em lignina, celulose e hemicelulose por enzimas secretadas pelo micélio fúngico e a bioengenharia fúngica, que utiliza o material resultante da quebra enzimática para produção de metabólitos secundários em resposta a fatores ambientais ou necessidades inerentes dos fungos (Díaz; Díaz-Godínez, 2022; Keller, 2019).

Os polifenóis constituem uma classe de compostos que também podem atender aos critérios dos prebióticos, embora sejam necessários muito mais estudos nos hospedeiros-alvos, ou seja, nos seres humanos (Gibson *et al.*, 2017). Estima-se que 90-95% dos polifenóis dietéticos não são absorvidos no intestino delgado e, portanto, atingem o cólon, onde sofrem extensa biotransformação pela microbiota colônica. Evidências crescentes indicam que os benefícios para a saúde associados ao consumo de polifenóis dependem da utilização microbiana e dos metabólitos produzidos, e não dos compostos originais (Makarewicz *et al.*, 2021).

Outros componentes bioativos presentes nos cogumelos *P. djamor* (Bach *et al.*, 2017) e que tem atraído a atenção em pesquisas são os polissacarídeos fúngicos. Cogumelos

comestíveis contêm polissacarídeos altamente bioativos, o que os tornam interessantes como alimento funcional, além de serem seguros para consumo, especialmente por serem boas fontes de substâncias prebióticas (Sawangwan *et al.*, 2018).

Polissacarídeos biologicamente ativos são compostos de moléculas de grande peso molecular ligadas por ligações glicosídicas de pelo menos dez monossacarídeos, que normalmente apresentam em comum uma estrutura de glicose β -ligada. Entretanto, polissacarídeos com estrutura de galactose ou manose também foram relatadas em macrofungos (Niego *et al.*, 2022).

Os polissacarídeos podem ser classificados como homoglicanos ou homopolissacarídeos (compostos por apenas um tipo de monossacarídeos) e heteroglicanos ou heteropolissacarídeos (contendo pelo menos dois tipos diferentes de monossacarídeos). Estes podem ser combinados com peptídeos e proteínas, formando complexos peptídeo/proteína polissacarídeos (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024). Esses complexos são denominados proteoglicanos, glicoproteínas e glicopeptídeos (Gong *et al.*, 2020).

Podemos encontrar polissacarídeos como glucanos, quitina e galactomananas entre os principais componentes das paredes celulares dos fungos filamentosos. Estes polissacarídeos podem conter diferentes ligações glicosídicas numa configuração α ou β e em várias posições, tais como (1-3,1-4, 1-6), bem como apresentar vários tamanhos moleculares. Isto leva a uma diversidade quase ilimitada na sua estrutura e na atividade biológica (antioxidantes, antiinflamatórias, imunomoduladoras, antinociceptivas, antitumorais e hipoglicêmicas) que essas moléculas podem exercer (Junior *et al.*, 2020).

A biossíntese desses polissacarídeos, como os β -glucanos, envolve enzimas chave como a β -(1,3)-glucano sintase (GLS) e a (1,3)- β -D-glucano sintase (GS), que são cruciais para sua produção e integridade estrutural. Exopolissacarídeos fúngicos (EPSs) e polissacarídeos intracelulares (IPSs) também são produtos significativos do metabolismo fúngico (Sharma; Sharma; Tripathi, 2021).

Além dos β -glucanos, as paredes celulares dos cogumelos também são ricas em quitina que é normalmente conectada covalentemente ao β -glucano e consiste em um polímero de N-acetilglucosamina com ligações (1 $\rightarrow$ 4)- β ((1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucano, um componente de uma rede complexa de biopolímero (proteína-glucano-quitina). Essa macromolécula pode ser convertida em quitosana através de uma reação de desacetilação (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024).

As ligações β -glicosídicas dos polissacarídeos de cogumelos não são digeríveis pelas enzimas gastrointestinais humanas (Niego *et al.*, 2021), geralmente resistindo à acidez gástrica,

à hidrólise por enzimas digestivas e à absorção gastrointestinal. Dependendo da estrutura e composição de polissacarídeos de cogumelos e possíveis interações com outros compostos, podem atingir o cólon sem qualquer efeito gástrico e digestão do trato intestinal superior (Gong *et al.*, 2020).

No entanto, no cólon, a microbiota intestinal pode metabolizar esses polissacarídeos, aumentando a proliferação de bactérias probióticas, potencializando modificações positivas na dinâmica gastrointestinal, com consequente produção de ácidos graxos de cadeia curta e outros metabólitos essenciais (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024).

As moléculas de beta-glucanas são moderadamente resistentes ao estresse ácido no estômago. Após administração oral, elas atingem gradualmente o duodeno, seguido de aprisionamento nos receptores de macrófagos da parede intestinal. Esses receptores estão presentes nas membranas dos macrófagos e são produtos proteináceos da medula óssea. Quando uma molécula de glucana encontra um grupo de seus receptores, ele é ativado e produz substâncias como lisozimas, N-óxidos e espécies reativas de oxigênio. Subsequentemente, as células começam a produzir citocinas que, por sua vez, levam a ativação de fagócitos e leucócitos vizinhos, assim modulando a imunidade (Moumita; Das, 2022).

Investigações fitoquímicas descobriram que a maioria dos polissacarídeos ativos extraídos de cogumelos possuem atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo, pela diminuição nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio - EROs e ERNs (Arunachalam; Sreeja; Yang, 2022; Petraglia, 2023). Acredita-se também que glucanas de cogumelos podem contribuir para a diminuição da absorção de produtos químicos tóxicos e nocivos, levando a uma menor incidência de câncer (Bach *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos do *P. djamor* desempenham um papel crucial na atividade prebiótica que este cogumelo pode exercer na microbiota intestinal, apoiando o crescimento de bactérias intestinais benéficas e mantendo um microbioma intestinal saudável (Törös *et al.*, 2023). Esses compostos incluem quitina, glucanos, alguns compostos fenólicos e outros metabólitos secundários, além de nutrientes que, ao passarem pelo processo digestivo, podem interagir com a microbiota local de modo a favorecê-la. Esta, por sua vez, interage com o microbioma de forma a produzir compostos que trarão benefícios ao hospedeiro (Pineda-alegría *et al.*, 2024, Törös *et al.*, 2023).

2.3 MICROBIOTA INTESTINAL

Como estratégia em evolução e constantes esclarecimentos por meio de pesquisas, há a busca da melhoria da saúde humana através da modulação da microbiota intestinal. A capacidade de mudar a composição e metabolismo dessas populações microbianas é possível, através de intervenções dietéticas ou não dietéticas (Gibson *et al.*, 2017). As intervenções dietéticas estão relacionadas ao consumo de alimentos, produtos alimentares enriquecidos ou suplementos que sejam fontes de substâncias reconhecidas como prebióticos.

A microbiota intestinal humana é uma grande, complexa e diversificada comunidade de microrganismos que habitam todo o trato intestinal, cujo repertório metabólico igualmente extenso, complementa a atividade das enzimas do fígado e da mucosa intestinal. No total, foram identificadas mais de 1.000 espécies bacterianas, com cerca de 160 espécies sendo comuns ao intestino de qualquer indivíduo. O conjunto de genes da microbiota intestinal (microbioma) é estimado em cerca de 3 milhões de genes –150 vezes maior que o do genoma humano (Rowland, *et al.*, 2018).

O microbioma intestinal pode ser considerado como um órgão, visto que produz milhares de metabólitos ativos, que podem afetar a saúde e doenças humanas dentro e fora do intestino (Jenkins; Mason, 2022). Os microrganismos vivem num ecossistema funcional complexo. Dentro desses ecossistemas, as bactérias têm uma infinidade de funções, incluindo a conversão de alimentos dietéticos como carboidratos, proteínas e algumas gorduras em metabólitos que podem ter efeitos positivos ou negativos na saúde do hospedeiro (Sanders *et al.*, 2019).

Uma microbiota saudável no corpo humano desempenha papel fundamental em vários aspectos da saúde e do bem-estar. Mecanismos de regulação do sistema imunológico, enzimas que auxiliam na digestão dos alimentos, síntese de vitaminas essenciais como B12 e K, metabolização de substâncias xenobióticas entre outras funções vitais, são resultado de uma microbiota intestinal equilibrada (Das *et al.*, 2020). Já distúrbios na microbiota podem levar a problemas físicos e psicológicos, afetando a saúde geral e potencialmente causando várias doenças. A microbiota intestinal, em particular, é essencial para manter a integridade estrutural do intestino, proteger contra patógenos e promover o bem-estar geral (Wilson, 2018).

É fato que a microbiota intestinal afeta a regulação de muitos aspectos da saúde e da doença. Essa regulação depende da composição da microbiota e da produção de metabólitos como resultado da fermentação bacteriana de componentes dietéticos. Os principais metabólitos resultados dessa fermentação incluem os ácidos graxos de cadeia curta – AGCC (propionato,

butirato e acetato), cuja abundância está relacionada a composição da microbiota intestinal, a qual, pode ser alterada pela dieta e por outros fatores ambientais. Os AGCC regulam muitas vias metabólicas dentro do intestino e além do intestino - no fígado, no tecido adiposo, nos músculos e no cérebro (Louis; Flint, 2017).

Quanto a diversidade de microrganismos gastrointestinais entre indivíduos, é fator impressionante, como cada indivíduo abriga seu próprio padrão distinto de composição microbiana. Essa diversidade individual é determinada pelo genótipo, colonização inicial no nascimento e por hábitos dietéticos. A composição microbiana também parece diferir de acordo com idade, sexo, raça e diferentes localizações geográficas. Em adultos saudáveis, a composição microbiana fecal é estável ao longo do tempo (Jenkins; Mason, 2022). A modulação do sistema imunológico, bem como dos processos hormonais são os mecanismos mais plausíveis para ajudar a explicar os benefícios de um balanço adequado na microbiota intestinal, não apenas na saúde intestinal, mas também na saúde geral (Wilson, 2018).

No intestino humano predominam os filos bacterianos Bacteroidetes e Firmicutes, que respondem por mais de 90% dos microrganismos ali presentes. Esses anaeróbios obrigatórios desempenham o papel importante de impedir a expansão de bactérias aeróbias facultativas e membros potencialmente patogênicos da família *Enterobacteriaceae*, pertencentes ao filo Proteobacteria (Sonnenburg; Sonnenburg, 2019). O filo Bacteroidetes são de bactérias gram-negativas e inclui os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Alistipes*, enquanto os Firmicutes são gram-positivos e incluem espécies como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* e *Eubacterium hallii*, bem como muitas outras espécies de baixa abundância (Raine, *et al.*, 2015).

As populações de microrganismos colonizadores diferem entre indivíduos saudáveis e com doenças ou problemas de saúde, apesar de não haver um consenso entre os pesquisadores sobre a definição de uma composição de microbiota humana saudável (Jenkins; Mason, 2022). Bifidobactérias e lactobacilos são considerados os gêneros mais benéficos dentro do intestino e, portanto, as principais bactérias reconhecidas como probióticos; e por sua vez, têm sido usados como marcadores para o efeito de análise de suplementação prebiótica (Peredo-Lovillo *et al.*, 2020).

Espécies probióticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem produzir ácidos láctico e acético como produtos primários do metabolismo dos carboidratos. Esses ácidos orgânicos quando produzidos *in situ* pode diminuir o pH luminal e desencorajar o crescimento de patógenos. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não produzem butirato, mas através da alimentação cruzada com outra microbiota comensal (por exemplo, *Faecalibacterium*), os

níveis de butirato e outros AGCC no intestino podem aumentar, potencialmente influenciando muitos aspectos da fisiologia (Sanders *et al.*, 2019).

O gênero *Lactobacillus* compreende um grupo diversificado de bactérias Gram-positivas, catalase-negativas que são anaeróbicas ou aerotolerantes, com morfologia em forma de bastonete e uma faixa de tamanho de $0,6\text{--}0,9 \times 1,5\text{--}6 \mu\text{m}$ (Zheng *et al.*, 2020). Os lactobacilos são componentes essenciais de uma microbiota humana saudável, com algumas cepas sendo utilizadas na fermentação de alimentos e como probióticos devido às suas propriedades benéficas, como resistência à bile, manutenção do equilíbrio microecológico por diferentes mecanismos, atuar na melhora da integridade e função imunológica da barreira mucosa, induzindo a expressão de mucina para reduzir a adesão do patógenos, estimulando a produção de peptídeos antibacterianos e bacteriocinas por células epiteliais intestinais, entre outros mecanismos (Qin *et al.*, 2019; Vinderola *et al.*, 2019).

Já o gênero *Bifidobacterium* representam parte de uma comunidade intestinal anaeróbica que se alimentam de carboidratos não digeríveis através de uma via metabólica fermentativa especializada, e que por sua vez produz substratos de crescimento para outros membros da comunidade intestinal. Sua presença tem sido associada a muitos efeitos benéficos ao hospedeiro. Como as bifidobactérias são colonizadoras do intestino grosso, elas têm que ser capazes de lidar com várias fontes de estresse: osmótico, oxidativo, biliar e ácido durante seu trânsito através da barreira gástrica e do intestino delgado. Os genomas dessas bactérias codificam vários mecanismos de sobrevivência, para superar tais desafios. Elas exibem estruturas proteicas como pili e camadas superficiais de células exopolissacarídicas auxiliando na colonização e persistência no intestino grosso (O'callaghan; Van Sinderen, 2016).

No geral, as espécies de *Ruminococcus* exibem funções especializadas na degradação de carboidratos (celulolíticas), interações de alimentação cruzada e potenciais implicações em doenças inflamatórias, enfatizando sua importância na formação da microbiota humana e na influência na saúde do hospedeiro (Rangarajan *et al.*, 2022). As espécies de *Ruminococcus*, incluindo cepas não celulolíticas, desempenham papéis vitais na degradação de polissacarídeos complexos, impactando a saúde do hospedeiro através da produção de nutrientes (La Reau; Suen, 2018).

O gênero *Bacteroides* predominantemente são os que digerem os polissacarídeos e liberam açúcares simples úteis para o metabolismo da glicólise. Além da formação de adenosina trifosfato (ATP), a hidrólise adicional destas biomoléculas leva à geração de mais ATP, de moléculas simples de carbono e de AGCCs, derivados do metabolismo bacteriano do cólon. Essas moléculas possuem um papel integral no fornecimento de energia para os colonócitos,

uma vez que essas células usam mais butirato como fonte de energia do que nutrientes mais disponíveis, como glicose ou glutamina (Peredo-Lovillo *et al.*, 2020).

O gênero *Prevotella* possui alta diversidade genética, representando um dos importantes grupos encontrados na cavidade oral e intestino grosso do homem. Essas bactérias comensais intestinais contribuem para a degradação dos polissacarídeos, sendo colonizadoras dominantes das sociedades agrárias. No entanto, há um papel potencial das espécies de *Prevotella* como patobiontes (Precup; Vodnar, 2019). Quando comparada com bactérias comensais estritas, *Prevotella* exibe propriedades inflamatórias aumentadas, pela liberação aumentada de mediadores inflamatórios de células do sistema imunológico e de várias células do estroma, indicando que algumas estirpes de *Prevotella* podem ser patobiontes clinicamente importantes que podem participar em doenças humanas, promovendo inflamação crônica (Larsen, 2017).

Clostridium spp. é um grande gênero de bactérias anaeróbios obrigatórios, extremamente heterogêneo do filo firmicutes, Gram-positivos formadores de esporos que impactam significativamente o metabolismo e o funcionamento do trato gastrointestinal humano. Esse gênero abriga tanto bactérias comensais quanto potencialmente patogênicas. Os Clostrídios comensais estão envolvidos na regulação e manutenção de todas as funções intestinais (Grenda *et al.*, 2022). Enquanto espécies potencialmente patogênicas estão associadas a processos patogênicos inflamatórios intestinais, como colite entre outros (Bhattacharjee *et al.*, 2023)

Diante do exposto, pode-se considerar que mudanças na microbiota intestinal em resposta à ingestão de prebióticos são centradas primariamente em alterações em *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, dois gêneros comuns que podem aumentar com o uso de prebióticos e estão associados aos seus efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro. Bem como, na possibilidade de alterações na população de bactérias que são consideradas potencialmente patogênicas, a depender de aumento ou diminuição, o que pode ser considerado um efeito positivo ou negativo ante a matriz alimentar que está sendo investigada. Contudo, deve haver o entendimento de que a estrutura da comunidade e a diversidade microbiana são importantes para a saúde intestinal e do hospedeiro, é necessário examinar mudanças microbianas mais amplas que ocorrem em resposta aos prebióticos ou a alimentos com potencial prebiótico (Nicolucci *et al.*, 2017).

2.3.1 Influência dos prebióticos na microbiota intestinal

Os prebióticos são a abordagem dietética mais popular para a modificação da microbiota intestinal, com intuito de melhorar a saúde do hospedeiro, por serem acessíveis, eficazes e seguros (Sanders *et al.*, 2019). Esses componentes alimentares são os principais substratos para o crescimento dos microrganismos nos intestinos. Quando não digeridos no intestino delgado, ao atingir o intestino grosso, são metabolizados seletivamente por algumas bactérias denominadas benéficas, auxiliando-as em seu crescimento e metabolismo gerando um microbioma intestinal saudável (Kareb *et al.*, 2019; Gibson *et al.*, 2017).

Componentes dietéticos prebióticos interagem com a microbiota intestinal principalmente nutrindo as bactérias anaeróbicas benéficas no cólon, especialmente as bifidobactérias e lactobacilos, e aumentando o seu número, enquanto reduzem a população dos principais microrganismos patogênicos. A estrutura do composto prebiótico indicará que microrganismos poderá utilizá-lo. O maior repertório conhecido de prebiótico alimentar é de algum tipo de fibra dietética. No entanto, nem todos os tipos de fibras alimentares são prebióticas, bem como, nem todos os prebióticos são fibras alimentares (Jenkins; Mason, 2022).

Estruturalmente, os prebióticos são algum tipo de polissacarídeo, associado a oligossacarídeos (Jenkins; Mason, 2022). Alguns dos prebióticos conhecidos são os frutooligossacarídeos – FOS (encontrados em alcachofra, alho, aspargos, banana, beterraba, cebola, chicória, tomate, trigo e yacon), a inulina (encontrada em aspargos, chicória, alcachofra de Jerusalém e alho-poró), beta-glucanos, galactooligossacarídeos – GOS (encontrados em leguminosas, hummus, castanha de caju e pistache, leite de soja e leite de aveia), polidextrose (carboidrato não natural), oligossacarídeos de soja - SBOS, isomaltoligossacarídeos - IMOS) e lactulose (dissacarídeo não natural) (Moumita; Das, 2022). O amido resistente é um carboidrato natural (encontrado em bananas, feijões, ervilhas e lentilhas, grãos inteiros, incluindo cevada, aveia cozidos e depois resfriados, batatas e arroz) resistente a digestão no intestino delgado com ação prebiótica (Jenkins; Mason, 2022).

Os AGCCs são os principais metabólitos resultantes da fermentação dos prebióticos pela microbiota intestinal, os quais desempenham diversas funções importantes no hospedeiro. Entre essas funções incluem: a manutenção da função da barreira intestinal (Jenkins; Mason, 2022) através do estímulo à síntese de muco pelas células do intestino; redução dos níveis de marcadores inflamatórios pela estimulação de citocinas imunossupressoras, como interleucina 10 – IL-10, e redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios inflamatórios (Gibson *et al.*, 2017); e influência dos hormônios metabólicos, incluindo estimulação do peptídeo 1

semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídeo Y-Y que pode reduzir o apetite, melhorar a sensibilidade à insulina e proteger contra ganho de peso e síndrome metabólica (Jenkins; Mason, 2022).

Além disso, o aumento dos AGCCs parece resultar no crescimento preferencial de bactérias protetoras sobre cepas patogênicas (Zhang, 2018). Os AGCCs podem fornecer, em humanos, cerca de 60 a 70% da necessidade de energia dos colonócitos, que são as células do epitélio colônico. Os AGCCs também são transportados do lúmen intestinal para o sangue e são levados aos órgãos onde atuam como substratos ou moléculas de sinalização (Moumita; Das, 2022), exercendo diversos efeitos metabólicos benéficos.

Entre os AGCCs, o butirato é uma fonte de energia preferida para os colonócitos e promove ainda mais a função de barreira intestinal, reduzindo a inflamação. O propionato é metabolizado no fígado e diminui a lipogênese hepática, reduz o colesterol sérico, e é potente no desencadeamento das células L-enteroendócrinas para sinalizar uma resposta de saciedade (Chambers *et al.*, 2015). O acetato é usado principalmente como fonte de energia, mas foi demonstrado que tem um efeito periférico circulante no núcleo arqueado do hipotálamo para reduzir o apetite (Frost *et al.*, 2014). Essas moléculas são biologicamente importantes em quantidade e proporção (Chen *et al.*, 2017).

Portanto, o consumo de alguns componentes alimentares, como os prebióticos podem atuar estimulando a formação de produtos gerados a partir do metabolismo bacteriano, a exemplo de ácidos orgânicos, impactando de forma positiva na saúde do hospedeiro (Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2020; Peredo-Lovillo *et al.*, 2020). A dieta atua modulando a composição e funcionalidade da microbiota intestinal, a qual, posteriormente, influencia os processos bioquímicos do hospedeiro, estabelecendo um sistema de interação mútua (Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2019).

Alguns estudos têm relatado o uso de substâncias prebióticas extraídas de cogumelos como ingredientes alimentares não digeríveis para demonstrar estimulação do crescimento probiótico e inibição microbiana patogênica. Extratos de alguns cogumelos comestíveis, como *L. edodes* e *P. eryngii* demonstraram alto potencial antimicrobiano contra alguns patógenos, por exemplo *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Typhimurium (Sawangwan *et al.*, 2018).

Devido ao alto teor de fibras, as espécies de *Pleurotus* têm ganhado atenção como fonte de prebióticos, como citado anteriormente, pois são fontes primárias de inulina e beta-glucanas (Carrasco-Gonzalez; Serna-Saldívar; Gutiérrez-Urbe, 2017).

2.3.2 Atividade antioxidante e microbiota intestinal

Inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos induzem a produção de moléculas chamadas de radicais livres, em especial as EROs no corpo humano. Para manter a homeostase e evitar danos oxidativos, o corpo humano possui diversos mecanismos de defesa naturais contra essas moléculas. Contudo, desequilíbrios entre produção e capacidade de resposta desses mecanismos promovem estresse oxidativo, o que está associado a diversas desordens e doenças (Sies, 2017).

Uma produção de EROs acima da capacidade de resposta dos mecanismos normais do corpo humano, levam a danos nos ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e outras estruturas celulares. Algumas macromoléculas antioxidantes agem evitando danos induzidos pelo estresse oxidativo no câncer, doenças crônicas e no envelhecimento (Gong *et al.*, 2020). Essas macromoléculas estão presentes em diversas fontes, como em frutas, vegetais, ervas e nos macrofungos, e possuem a habilidade de neutralizar e eliminar os radicais livres (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024). Uma dieta rica em compostos antioxidantes traz os benefícios de redução no estresse oxidativo (Cruz-Moreno *et al.*, 2023).

A atividade antioxidante de compostos bioativos presentes nos alimentos exerce um papel crucial na saúde intestinal humana através de diversos mecanismos. Esses compostos modulam a microbiota intestinal, favorecendo os micro-organismos benéficos, protegendo-os contra estresse oxidativo e aumentando sua população (Kc; Sumner; Lippmann, 2020).

Antioxidantes, em particular os polifenóis, têm uma relação bidirecional com a microbiota intestinal, influenciando o metabolismo microbiano e a composição das bactérias intestinais. Outrossim, antioxidantes, como polifenóis, ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos acessíveis à microbiota, contribuem para manter a homeostase redox, prevenindo o desenvolvimento de diversas condições patológicas (Jenkins; Mason, 2022).

Além disso, descobriu-se que os antioxidantes permitem que os microrganismos anaeróbicos prosperem num ambiente oxidativo, promovendo a produção de metabólitos benéficos, como o butirato, contribuindo, assim, para a resiliência do microbioma intestinal contra a agressão oxidativa, apoiando, em última análise, a saúde intestinal (Million *et al.*, 2019).

A metodologia dos estudos avaliados até então utiliza microorganismos isolados e cultivados *in vitro* com os extratos de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp. entre outros gêneros ou espécies) para avaliar o potencial prebiótico dos extratos desses cogumelos sobre os microorganismos em questão. Porém a metodologia de fermentação fecal humana é a

abordagem mais relatada recentemente para avaliar o potencial efeito prebiótico de um componente ou alimento, indicando impactos nas barreiras biológicas, mecânicas, químicas e imunológicas intestinais (Araújo-Rodrigues *et al.*, 2024). Quando se trata de *P. djamor*, não há na literatura estudo sobre seu potencial prebiótico utilizando essa metodologia, nem como esse potencial pode ser afetado pela composição micoquímica e a relação de sua atividade antioxidante com o potencial prebiótico. Portanto investigar as alterações na abundância relativa dos grupos bacterianos colônicos, utilizando *P. djamor* cultivado em folha de bananeira é um tema que carece de investigação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados, em sua maioria, no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (LMBA), Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Campus I, João Pessoa – PB. Algumas etapas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, campus Cuité-PB; no Laboratório de Caracterização e Análise Multiusuário (LMCA) da UFPB; e no Laboratório de Águas e Bebidas, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal do Sertão Pernambucano - IFSertão, Campus Petrolina-PE.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, cogumelos da espécie *P. djamor* foram adquiridos, transportados até o Laboratório e submetidos ao processamento de secagem em estufa, posteriormente triturados e identificado como *P. djamor* seco (PDS) e armazenados em sacos de polipropileno, selados hermeticamente e mantidos sob refrigeração. Em seguida, foi realizado o preparo de amostra PDS para análise de atividade antioxidante e perfil de composição e quantificação de compostos fenólicos. Após essa etapa, PDS foi submetida a um processo *in vitro* simulando a digestão gastrointestinal. PDS após ser digerida, liofilizada, triturada e congelada passa a ser designada como o material (MUS) utilizado no ensaio de fermentação com inóculo fecal humano sob anaerobiose por 48 h. Durante a fermentação, alíquotas foram extraídas nos tempos 0h, 24h e 48h para identificação da abundância relativa de diferentes populações bacterianas específicas que compõem a microbiota intestinal humana; monitorar indicadores de atividade metabólica

bacteriana (pH, açúcares, ácidos orgânicos) e avaliar atividade antioxidante. Por sua vez, a análise metabólica global foi realizada no tempo 0h e 48h da fermentação. Ao fim, pôde-se calcular o índice prebiótico. O desenho do estudo é apresentado na Figura 4, abaixo:

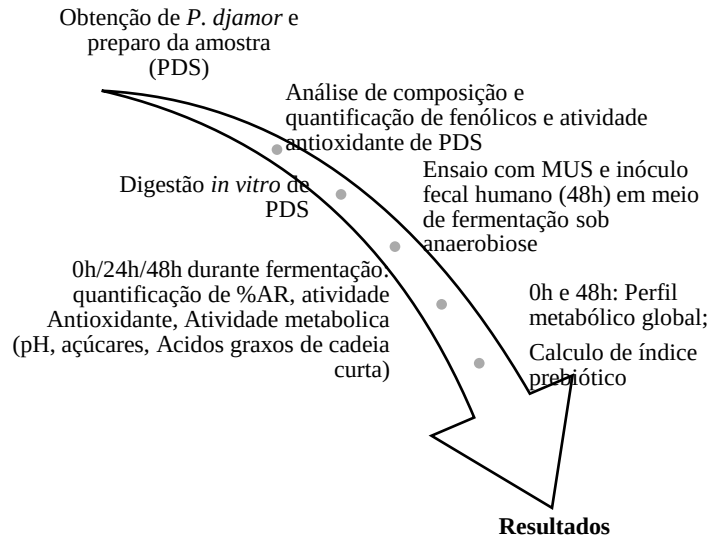


Figura 4: Desenho do estudo

Fonte: Autor, 2024. Legenda: PDS = *P. djamor* seco e triturado; MUS = PDS após ser digerido *in vitro*, liofilizado e triturado; %AR = percentual de abundância relativa de grupos bacterianos.

3.3 PREPARO DA AMOSTRA E ANÁLISES INICIAIS

3.3.1 Obtenção de cogumelos *P. djamor* e preparo inicial da amostra

Os cogumelos da espécie *P. djamor* utilizados na pesquisa foram obtidos do Grupo de Pesquisa e Produção de Cogumelos Comestíveis da UFPB (GPEC, UFPB, Campus Areia-PB). *P. djamor* foi cultivado em substrato composto de folhas de bananeira (*Musa* spp.) sob $28 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $92 \pm 1\%$ e intensidade luminosa de 200 lux (8,5 volts) por 120 dias, conforme descrito por Medeiros *et al.* (2024). A colheita dos cogumelos foi realizada no 1º fluxo (ou 1ª coleta) de forma manual, com prévia higienização das mãos, sendo coletados de três (3) unidades produtivas (Figura 5). Em seguida, foram transportadas ao Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, campus Cuité-PB, onde foram dispostos em bandejas de aço inox e levados à estufa de ar com circulação forçada (Medi-clave - Modelo 4) à 50°C por 72 h para secagem até atingir peso constante (AOAC, 2016). Após esse processo, a amostra seca foi moída em moinho de facas com peneira de malha 16 (PDS). O material foi armazenado em saco hermeticamente fechado de polipropileno sob refrigeração

($4 \pm 0,5$ °C) e levado ao laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos – LMBA da UFPB (Campus João Pessoa) onde seguiram-se as análises subseqüentes.



Figura 5: Cogumelo *P. djamor* em unidade produtiva

Fonte: GPEC, Grupo de Pesquisa e Produção de Cogumelos Comestíveis da UFPB, Campus Areia-PB, 2022.

Os parâmetros físico-químicos da amostra foram determinados em estudo anterior (MEDEIROS *et al.*, 2024). Suas principais características físico-químicas e de composição nutricional são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características físico-químicas e de composição nutricional (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) de *P. djamor* seco:

Parâmetros físico-químicos e composição nutricional	Resultados
Umidade (%)	$16,09 \pm 1,25$
Cinzas (%)	$4,71 \pm 0,86$
Atividade de água	$0,67 \pm 0,05$
Carboidratos (g/100 g)	$42,13 \pm 1,85$
Proteínas (g/100 g)	$18,77 \pm 0,24$
Lipídeos (g/100 g)	$0,28 \pm 0,08$
Fibra total (g/100g)	$18,02 \pm 0,05$

Fonte: Medeiros *et al.*, 2024.

3.3.2 Determinação e quantificação de compostos fenólicos

Para determinar e quantificar compostos fenólicos foram preparados extratos metanólicos, onde 2g de PDS foram acidificados com HCl 0,1 M (Neon, São Paulo, Brasil) até

atingir pH 2, e misturados com 10 ml de metanol:água (70:30 v/v) utilizando a Incubadora Refrigerada com Agitação (TE 424, Tecnal, São Paulo, Brasil) por 60 min, a 25 °C e mantido no escuro. As misturas foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 24°C) e os sobrenadantes foram filtrados (celulose regenerada, tamanho de poro de 0,45 μm) (Lima *et al.*, 2019).

Os teores de compostos fenólicos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um cromatógrafo líquido (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, St. Clara, CA, EUA) equipado com bomba de solvente quaternário (modelo G1311C), degaseificador, compartimento de coluna termostática (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) (modelo G1315D) e detector de índice de refração (RID) (modelo G1362A). Os dados foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies, St. Clara, EUA). Os picos amostrais observados em HPLC foram identificados comparando seus tempos de retenção com os respectivos padrões (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de compostos fenólicos.

3.3.3 Determinação de atividade antioxidante

A atividade antioxidante do produto PDS e de MUS nos tempos 0h, 24h e 48h durante a fermentação colônica foram avaliados por meio dos métodos de ABTS•+, DPPH, ABTS e FRAP. Para obtenção do extrato utilizou-se 1 g de PDS diluídos em 5 mL da solução de metanol a 70% (70:30, v/v) com ajuste de pH a 2 utilizando HCl 1M e cobertos em papel alumínio, sob abrigo da luz, posteriormente armazenados sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) por 24 horas. Após esse processo a amostra foi levada para centrifuga ($1696 \times g$, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

Alíquotas de 3ml do meio de fermentação com MUS em cada tempo indicado foram retiradas para preparar os extratos metanólicos, que foram acidificados com HCl 0,1 M (Neon, São Paulo, Brasil) até atingir pH 2, e misturados com 10 ml de metanol:água (70:30 v/v) utilizando a Incubadora Refrigerada com Agitação (TE 424, Tecnal, São Paulo, Brasil) por 60 min, a 25 °C e mantido no escuro. As misturas foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 24°C) e os sobrenadantes foram filtrados (celulose regenerada, tamanho de poro de 0,45 μm) e utilizados para as análises.

A atividade de eliminação de radicais ABTS foi medida de acordo com Re *et al.* (1999). O ABTS•+ foi preparado 16 horas antes da análise adicionando persulfato de potássio e solução estoque de ABTS•+. No dia da análise o radical foi estabilizado em 720nm e diluído em etanol.

Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL de cada concentração do extrato foi transferida para uma microplaca, acrescentando-se em seguida 300 µL do radical ABTS•+ ((2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)). Os resultados foram expressos como uma porcentagem de redução da atividade (%) com base na equação:

$$\text{Eq. 1 - \% de atividade: } \{[\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}] / \text{ABS controle}\} \times 100\}$$

Onde: “Amostra ABS” e “ABS controle” são, respectivamente, as absorbâncias observadas na amostra e no sistema (sem antioxidante).

A atividade de eliminação de radicais DPPH• foi analisada de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações para microplacas. Alíquotas de 50 µL do extrato foram retiradas e diluídas em 150 µL de solução 400 mM de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) diluídas em metanol. Após 30 minutos de repouso, verificou-se a redução do radical em 515 nm em espectrofotômetro. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de controle (sem antioxidante). A diminuição dos valores de densidade óptica das amostras foi correlacionada com a do controle e o percentual de atividade redutora foi estabelecido, com base na equação:

$$\text{Eq. 1 - \% de atividade: } \{[\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}] / \text{ABS controle}\} \times 100\}$$

Onde: “Amostra ABS” e “ABS controle” são, respectivamente, as absorbâncias observadas na amostra e no sistema (sem antioxidante).

O ensaio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizado conforme (Oyaizu, 1986), com algumas modificações para microplacas. Em ambiente escuro, foram retiradas alíquotas de 9 µL do extrato, adicionados 27 µL de água destilada e 270 µL de reagente FRAP (solução de acetato 0,3 M, TPTZ e cloreto férrico). A microplaca foi mantida em estufa (37°C por 30 minutos). Em seguida, as leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Todas as leituras foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em µM equivalentes de equivalentes trolox, utilizando a curva trolox ($y = 0,0009x + 0,1422$; $R^2=0,993$).

3.4 AVALIAÇÃO PREBIÓTICA POR SISTEMA DE FERMENTAÇÃO COLÔNICA *in vitro*

3.4.1 Simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*

PDS foi submetido a um processo que simulou os diferentes compartimentos do trato gastrointestinal humano, utilizando um protocolo de digestão gastrointestinal *in vitro* para ser transformado em material com características similares às aquelas quando atingem o cólon

humano (Massa *et al.*, 2022). Inicialmente, 10g de PDS foi misturado com 100 mL de água destilada esterilizada e homogeneizadas por 5 minutos. Uma mistura de α -amilase (1,04mL) foi adicionada à solução, tendo sido ajustado o pH para 7 utilizando o NaHCO_3 a 1M e mantida a 37 °C por 30 minutos sob agitação (130 rpm) simulando o trajeto boca – mastigação e esôfago até estômago. Após esta etapa, para simular o processo estomacal foi adicionada a pepsina (4,16 mL) e o pH da mistura ajustado para 2-2,5 com HCl 1M e mantido a 37 °C durante 2 h sob agitação (130 rpm). Em seguida, sais de bile (0,58g) e pancreatina (0,93 mg) anteriormente diluídos em 20,8 mL de NaHCO_3 a 1M foram adicionados a mistura, sendo o pH ajustado para 6,5 - 7 com NaHCO_3 a 1M, a qual foi mantida a 37 ± 1 °C por 2 horas sob agitação (45 rpm), simulando a chegada ao duodeno e intestino delgado. Todas as enzimas e reagentes utilizados para realização da digestão gastrointestinal *in vitro* foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Por fim, o material resultante do processo digestivo foi submetido à diálise em membrana de celulose regenerada de 1 kDa de peso molecular (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Holanda), previamente hidratada por 30 minutos em água destilada aquecida (60 ± 2 °C). As membranas contendo o material pré-digerido foram imergidas em NaCl 0,01 M (previamente esterilizada) e incubadas a 5 ± 0.5 °C, para remover produtos da digestão de baixo peso molecular. Após 18 horas de dialise as amostras pré-digeridas e dialisadas foram congeladas a -80 °C por 24 horas, em seguida liofilizadas a uma temperatura de -55 ± 2 °C, 60 mmHG de pressão por aproximadamente 18-20 horas, utilizando um liofilizador de bancada (modelo L-101, marca LIOTOP, São Carlos, SP, Brasil). Após a liofilização, o material desidratado foi mantido em recipiente de vidro esterilizado hermeticamente fechado e armazenado sob congelamento até o uso no ensaio da fermentação colônica.

3.4.2 Procedimentos éticos

Considerando as exigências do Conselho Nacional de Saúde, essa pesquisa foi cadastrada na Plataforma Brasil e enviada para apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS. Este procedimento está baseado na Resolução 466/12 (CNS-MS, 2012), que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e estabelece que "toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa".

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Paraíba, protocolo número 6.033.148 (ANEXO A), iniciamos o recrutamento de doadores voluntários.

3.4.3 Coleta das amostras fecais

Foi realizado um recrutamento de voluntários doadores de amostras fecais. Esse recrutamento foi realizado em praça pública, na praça da Paz, no Bairro dos Bancários, cidade de João Pessoa. Os voluntários foram convidados a participar da pesquisa após esclarecimentos acerca dela, bem como da possibilidade de participação mediante critérios de inclusão.

Em momento oportuno (agendado com os voluntários) e de forma individual, todos foram esclarecidos sobre os critérios da pesquisa, realizadas leitura e explicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B). Os voluntários que aceitarem participar assinaram o termo e receberam um kit para coleta, disponibilizado para cada doador, contendo frascos coletores esterilizados, luvas, papel toalha, prato e espátula descartáveis, além de álcool 70%, sendo instruídos quanto ao manuseio asséptico das amostras. Foi agendado o dia da coleta no período da manhã para todos os voluntários.

As amostras fecais frescas foram doadas por quatro voluntários adultos saudáveis, sendo dois homens e duas mulheres, compreendendo faixa etária entre 20 e 39 anos, com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 20,5-29,9 kg/m². Como critérios de inclusão, os doadores seguiam dieta onívora, sem antecedentes de doença no intestino grosso, não uso de alimentos probióticos ou prebióticos concentrados, não-fumantes, sem histórico de Doenças Crônicas Não-transmissíveis em uso de medicação, além de não terem feito uso de antibióticos ou qualquer outro medicamento de uso controlado por pelo menos três meses antes da coleta (Guergoletto *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2020).

As amostras foram coletadas no domicílio do participante ou em local apropriado, em até 30 minutos após a excreção, sendo transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos em jarra de vidro hermética, contendo gerador de gás anaeróbico (solução de CaCO₃ + água destilada + HCl a 0,1 M) e utilizadas imediatamente para o preparo do inóculo fecal. Parte das amostras fecais coletadas de cada doador foram direcionadas para laboratórios privados para realização dos exames de parasitológico de fezes e avaliação de sangue oculto nas fezes, atestando a normalidade do material fecal dos doadores (Massa *et al.*, 2022).

3.4.4 Preparação do inóculo fecal humano

As amostras fecais frescas, aptas para utilização (as que conseguiram se obter quantidade coletada ≥ 20 g de cada doador), quatro no total, foram misturadas em igual quantidade (1:1:1:1), diluídas (1:10) em tampão fosfato salino esterilizado (PBS 0,1 M; pH 7,3) e homogeneizadas até dissolução dos constituintes. O inóculo fecal diluído e homogeneizado então foi filtrado com o uso de uma camada tripla de gazes esterilizadas para remoção de partículas grandes, após filtradas foram armazenadas em frascos de 50ml (contendo 5mL de glicerol, na proporção de 10% do volume total do frasco) esterilizados (Andrade *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2022) sob condições de congelamento (-20 °C). Os ingredientes usados para preparar a solução de tampão fosfato salino – PBS (10g de cloreto de sódio – NaCl, 0,25g de cloreto de potássio-KCl, 1,8g de fosfato dissódico – Na₂HPO₄ e 0,306g de fosfato monopotássico – KH₂PO₄ para 1 litro de solução) foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.4.5 Preparação do meio de fermentação

Para o processo de fermentação foi utilizado 500mL de meio de crescimento esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm, 15 min), com a seguinte composição: 2,25 g de NaCl, 2,25 g de KCl, 0,75 g de NaHCO₃, 0,345 g de MgSO₄, 0,4 g de L-cisteína HCl, 0,25 g de KH₂PO₄, 0,25 g K₂HPO₄, 0,2 g de sal biliar, 0,04 g CaCl₂, 0,0025 g de FeSO₄, 0,5 mL de Tween 80 e 2 mL de solução de resazurina (0,025%, como um indicador anaeróbico) e água destilada. MUS foi submetido à fermentação com Inóculo fecal humano. O volume final da fermentação foi de 40% do meio de fermentação, 40% do inóculo fecal e 20% de MUS. A mistura foi incubada anaerobicamente a 37 °C por 48 horas (Hu *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2020). Um meio de fermentação contendo Frutooligosacarídeos - FOS (20%) e outro sem substrato adicionado foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, sendo submetidos aos mesmos procedimentos citados acima. Os ingredientes usados para preparar o meio de fermentação foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.4.6 Enumeração bacteriana por fluorescência de hibridização *in situ* acoplada com citometria de fluxo multiparamétrica

A técnica de Fluorescência de Hibridização *in situ* (FISH) usando sondas de oligonucleotídeos designadas para regiões alvo específicas do gene 16S rRNA de distintos

grupos bacterianos em combinação com Citometria de Fluxo multiparamétrica (CFM) foram utilizadas para avaliar a capacidade de MUS de induzir mudanças na composição da população bacteriana colônica. Seis diferentes sondas (Lab 158 específica para *Lactobacillus - Enterococcus*, Bif 164 específica para *Bifidobacterium*, Rfla 729 específica para *Ruminococcus albus - R. Flavefaciens*, Bac 303 específica para *Bacteroides- Prevotella*, Chis 150 específica para *Clostridium histolyticum* e Erec 482 específica para *Eubacterium rectale - Clostridium coccoides*) sintetizadas comercialmente e marcadas com o fluoróforo Cy3 (Sigma-Aldrich) foram utilizadas. O marcador SYBR Green (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi usado para enumerar a população total de bactérias por meio da marcação da fita dupla de DNA (Conterno *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2016).

No tempo zero (logo após a homogeneização dos componentes do meio de fermentação) e após 24 e 48 horas de fermentação, alíquotas de 375 µL das culturas foram fixadas *overnight* a 4 °C com 1125 µL de solução de paraformaldeído filtrada (4%, p/v) para estabilizar a estrutura celular. Após esse período, as alíquotas foram centrifugadas ($10000 \times g$, 5 min, 4 °C), lavadas duas vezes ($10000 \times g$, 5 min, 4 °C) com PBS 1 M esterilizado, ressuspensas em 300 µL de PBS:etanol 99% (1:1 v/v), filtradas com filtro de membrana tamanho de poro 0,45 µm (Whatman®) e armazenadas a -20 °C.

Para a realização da hibridização *in situ*, 10 µL das células fixadas foram ressuspensas em 190 µL de PBS 1X (Gibco®, Gaithersburg, EUA; pH 7.2), centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C), descartado o sobrenadante, ressuspensas em 200 µL de tampão Tris-EDTA (100 mM Tris-HCl and 50 mM EDTA; pH 8) e centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C). As amostras foram tratadas com 200 µL de Tris-EDTA contendo lisozima (1 mg/mL) e incubadas por 10 min no escuro a temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) para permeabilizar as células que receberam as sondas Lab 158, Bif 164 e Rfla 729 seguindo por centrifugação ($4000 \times g$, 15 min, 4 °C). As amostras foram ressuspensas em 45 µL de tampão de hibridização [0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (DSS)] e com 5 µL de sonda oligonucleotídica fluorescente (50 ng/µL) e mantidas sob temperatura de hibridização apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 4 horas.

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C), ressuspensas em 200 µL de tampão de hibridização sem DSS e mantidas sob temperatura de lavagem apropriada para cada sonda (45 ou 50 °C) no escuro por 30 min para retirar sondas não ligadas. As amostras foram centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C), ressuspensas em 200 µL de PBS 1X e 20 µL de SYBR Green (1:1000 solução estoque diluída em dimetil sulfoxido

$\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), incubadas por 10 min no escuro sob temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), centrifugadas ($4000 \times g$, 15 min, 25 °C) e ressuspensas com 200 μ L de PBS 1X.

Uma amostra em branco (sem a sonda oligonucleotídica e sem SYBR Green), e uma amostra marcada somente com SYBR Green, foram preparadas para todas as amostras, seguindo os mesmos passos das amostras hibridizadas, como um controle para definir o limiar das comportas do citômetro de fluxo (BD Accuri C6, New Jersey, EUA), o que permite revelar a potencial autofluorescência das amostras, excluindo os falsos positivos. Na análise de CFM, os sinais fluorescentes das células individuais passam através de uma zona de laser, sendo coletados como sinais logarítmicos. Os sinais fluorescentes (mensuramento da área de pulso) foram coletados pelos canais FL1 (SYBR Green) e FL2 (Lab 158, Bif 164, Rfla 729, Bac 303, Chis 150 e Erec 482). A aquisição das amostras foi configurada para passar em um baixo fluxo, com nível limite para dispersão direta (FSC) ajustado para 30000 e com total de 10000 eventos coletados para cada amostra. Os citogramas de emissão de fluorescência foram registrados com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company). Os resultados foram expressos como abundância (porcentagem relativa) de células hibridizadas com cada sonda Cy3 específica de grupo bacteriano (registrados como eventos fluorescentes) em relação ao total de bactérias enumeradas com coloração SYBR Green (Conterno *et al.*, 2019).

3.4.7 Determinação do índice prebiótico

Para obter uma medida comparativa quantitativa geral do equilíbrio entre diferentes populações bacterianas nas amostras de fermentação colônica, bem como para comparar a influência de MUS na modulação microbiana seletiva durante o processo, um índice prebiótico foi calculado com dados obtidos na análise de FISH-CFM. O índice prebiótico foi determinado após o cálculo da abundância relativa (porcentagem) de cada grupo bacteriano medido com base nos resultados de FISH-CFM (Albuquerque *et al.*, 2021), usando a seguinte equação:

$$\text{Índice prebiótico} = \% \text{ Lab} + \% \text{ Bif} + \% \text{ Rfla} - \% \text{ Bac} + \% \text{ Chis} + \% \text{ Erec}$$

Onde: %Lab = (abundância encontrada para Lab após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Lab no tempo zero); %Bif = (abundância encontrada para Bif após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Bif no tempo zero); %Rfla = (abundância encontrada para Rfla após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Rfla no tempo zero); %Bac = (abundância encontrada para Bac após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Bac no tempo zero); %Chis = (abundância encontrada para Chis após 24 ou 48 horas) – (abundância

encontrada para Chis no tempo zero); e %Erec = (abundância encontrada para Erec após 24 ou 48 horas) – (abundância encontrada para Erec no tempo zero).

A equação assume que um aumento na população de *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. (hibridizado pela sonda Lab 158), de *Bifidobacterium* spp. (hibridizado pela sonda Bif 164) e/ou de *Ruminococcus albus* - *R. Flavefaciens* (hibridizada pela sonda Rfla 729) é um efeito positivo, enquanto um aumento na população de *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. (hibridizado pela sonda Bac 303), *C. histolyticum* (hibridizado pela sonda Chis 150) e *E. rectale* - *C. coccoides* (hibridizado pela sonda Erec 482) é um efeito negativo. Mudanças na abundância destes grupos foram inseridas na equação em relação aos seus níveis iniciais (abundância). Se um grupo bacteriano mostra diferenças negativas entre o tempo de fermentação e o tempo zero, o sinal (positivo ou negativo) imediatamente anterior a essa sonda é alterado na equação. Isso permite normalizar o uso da equação para um número variado de sondas. A obtenção de um valor de índice prebiótico positivo indica um equilíbrio benéfico dos grupos bacterianos identificados na fermentação colônica induzida pelo substrato examinado e, conseqüentemente, potencial atividade prebiótica. Por sua vez, a obtenção de um valor de índice prebiótico negativo indica uma modulação indesejável da microbiota pelo substrato examinado (Albuquerque *et al.*, 2021).

3.4.8 Monitoramento de pH, teores de ácidos orgânicos e açúcares durante a fermentação

Alíquotas foram coletadas no tempo zero e após 24 e 48 horas de cada fermentação para determinação dos conteúdos de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido lático, ácido butírico e ácido propiônico) e açúcares, utilizando técnica de CLAE conforme descrito nas seções 3.4.2. Os valores de pH foram mensurados nos tempos zero, 24 e 48 horas de fermentação, utilizando pHmetro digital de bancada (Q400AS, Quimis, São Paulo, Brasil), seguindo o procedimento padrão (AOAC, 2016).

3.4.9 Determinação de perfil metabólico global

A análise de metabólitos foi realizada no Laboratório de Caracterização e Análise Multiusuários (LMCA) da UFPB. A quantificação e identificação dos metabólitos foram realizadas pelo método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. As análises foram realizadas em equipamento Bruker, modelo Avance Neo, operando em 500 MHz para RMN de ¹H e 125 MHz para ¹³C (Bruker, Billerica, MA, EUA). Para obtenção da sequência do espectro foram utilizados os seguintes parâmetros: Ic1pngpf2; temperatura

26°C; número de varreduras: 64; digitalização do dígito: 16; ganho do receptor: 32; tempo de aquisição: 3,27 segundos.

Para realizar esta análise, 2 mL de cada amostra foram diluídos (1:1) em solução com metanol grau HPLC (CH₃OH) e água deuterada (D₂O) (9:1, v/v), centrifugados (MPW®, 1696 × g, 10 minutos, 4° C) e filtrada com filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore®). A análise dos dados amostrais consistiu em picos que variam de acordo com a intensidade do sinal nas diferentes regiões avaliadas. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o software MestReNova® (MNova) versão 5.2.3.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em três ensaios independentes. Os resultados são expressos como média ± DP (desvio padrão). Inicialmente, foi utilizado como pressupostos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade de variância de Levene. Em seguida, realizada uma ANOVA mista com correção de Bonferroni para analisar a abundância relativa de grupos bacterianos, parâmetros bioquímicos e índice prebiótico durante a fermentação colônica. O teste de correlação de Pearson avaliou a relação entre a abundância relativa de grupos bacterianos e parâmetros bioquímicos (pH e ácidos graxos de cadeia curta). Finalmente, realizada ANOVA unidirecional com o teste post hoc de Tukey para determinar diferenças significativas entre a atividade antioxidante do pó de cogumelo e MUS durante a fermentação colônica. A comparação da atividade antioxidante do MUS durante a fermentação colônica foi realizada com medidas repetidas ANOVA com correção de Bonferroni. Consideramos que houve diferença estatística quando $p < 0,05$. O intervalo de confiança foi de 95%. Todas as análises foram realizadas no software R versão 4.1.0 na interface RStudio.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados no Artigo original no Apêndice A. Os resultados do estudo apontam que *P. djamor* digerido foi capaz de aumentar a abundância relativa das populações de *Lactobacillus* - *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus albus* - *R. flavefaciens*, enquanto diminuíram a abundância relativa de *Clostridium histolyticum* e manteve inalterada abundância relativa de *Bacteroides* - *Prevotella* durante a fermentação colônica. *P. djamor* apresentou índices prebióticos positivos após 24 e 48 h de fermentação colônica. O aumento da atividade metabólica microbiana foi evidenciado por meio da diminuição do pH, consumo de açúcares (maltose e rhamnose) e produção de ácido láctico e AGCCs (acético, butírico e propiônico) durante 48 h de fermentação colônica. *P. djamor* apresentou intensa atividade antioxidante, o que foi observado também durante a fermentação. Porém, com redução dessa atividade antioxidante ao longo dos tempos avaliados durante a fermentação. Os resultados encontrados estão associados ao perfil de micoquímicos dessa espécie, em especial a presença de compostos fenólicos, cujo perfil é apresentado nos resultados, bem como a composição de polissacarídeos e outros compostos comuns a espécie. No perfil metabólico global sobressaiu-se uma composição de aminoácidos essenciais, disponíveis apenas na fermentação com *P. djamor* digerido durante a fermentação. Esses resultados indicam a capacidade de *P. djamor* cultivado modular de forma benéfica a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal humana, o que deve estar relacionado às suas propriedades prebióticas. Dessa forma, *P. djamor* apresenta potenciais propriedades antioxidantes e prebióticas para consumo, associado a benefícios a saúde e bem-estar geral, bem como podem ser usados na formulação de suplementos dietéticos ou alimentos funcionais com alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K.; KHATUA, S.; RAI, S. Avaliação da qualidade e estudo antioxidante de *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 6, p. 105-110, 2017.
- ALBERTÓ, E. Naturally Occurring Strains of Edible Mushrooms: A Source to Improve the Mushroom Industry. Em: **Edible and Medicinal Mushrooms**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 415–425.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* Effects of digested flours from four different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) root varieties on the composition and metabolic activity of human colonic microbiota *in vitro*. **Journal of Food Science**, v. 86, p. 3707-3719, 2021.
- ANDRADE, R. M. S. *et al.* Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109354, 2020.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>> Acessado em: 12 jul. 2024.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 20th Edition, Washington, DC – USA, 2016.
- ARAÚJO-RODRIGUES, H. *et al.* An overview on mushroom polysaccharides: Health-promoting properties, prebiotic and gut microbiota modulation effects and structure-function correlation. **Carbohydrate Polymers**, p. 121978, 2024.
- ARUNACHALAM, K.; SREEJA, P. S.; YANG, X. The antioxidant properties of mushroom polysaccharides can potentially mitigate oxidative stress, beta-cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 874474, 2022.
- BACH, F. *et al.* 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.
- BELLETTINI, M. B. *et al.* Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. 26, p. 633–646, 2019.
- BIÉ, J. *et al.* Polyphenols in health and disease: gut microbiota, bioaccessibility, and bioavailability. **Compounds**, v. 3, n. 1, p. 40-72, 2023.
- BHATTACHARJEE, D. *et al.* Diversity and prevalence of *Clostridium innocuum* in the human gut microbiota. **Mosphere**, v. 8, n. 1, p. e00569-22, 2023.
- CARRASCO-GONZALEZ, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies:

Potential use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, 58, 69–81, 2017.

CARVALHO, A. J. S. *et al.* The role of edible mushrooms in the Brazilian diet: a comprehensive analysis. **Nutrition & Food Science**, 2024.

CHAMBERS, E. S. *et al.* Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1744-1754, 2015.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The cultivation and environmental impact of mushrooms. In: **Oxford research encyclopedia of environmental science**. 2017.

CHEN, T. *et al.* Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*-versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2594, 2017.

CONTERNO, L. *et al.* Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 58, p. 63 - 81, 2019.

CRUZ-MORENO, B. A. *et al.* Identification of secondary metabolites of interest in *Pleurotus djamor* using Agave tequilana Bagasse. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 557, 2023.

DANNESKIOLD-SAMSØE, N. B. *et al.* Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food research international**, v. 115, p. 23-31, 2019.

DAS, S. *et al.* Impact of human microbiome on health. **Microbial Diversity, Interventions and Scope**, p. 349-373, 2020.

DEACON, J. W. **Fungal biology**. John Wiley & Sons, 2013.

DEVECI, E. *et al.* Inhibitory activities of medicinal mushrooms on α -amylase and α -glucosidase-enzymes related to type 2 diabetes. **South African Journal of Botany**. v. 137, 19-23, 2021.

DÍAZ, R.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Substrates for mushroom, enzyme and metabolites production: A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 43, n. 3, p. 350-359, 2022.

EL SHEIKHA, A. F.; HU, D. How to trace the geographic origin of mushrooms? **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 292-303, 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO DATABASE. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso realizado em 03 de maio de 2024.

FROST, G. *et al.* The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 5, 3611 (2014).

GRENDÁ, T. *et al.* Probiotic potential of *Clostridium* spp.—Advantages and doubts. **Current issues in molecular biology**, v. 44, n. 7, p. 3118-3130, 2022.

GUERGOLETTTO, K. B. *et al.* *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v.196, p. 251 - 258, 2016.

GIBSON, G. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 14, 491-502, 2017.

GONG, X. *et al.* The interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional Chinese medicines: A review. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104824, 2020.

HAMINIUK, C. W. *et al.* Phenolic compounds in fruits—an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, 47(10), 2023-2044, 2012.

INCI, Ş.; AKYÜZ, M.; KIRBAG, S. Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxicity and DNA Protective Properties of the Pink Oyster Mushroom, *Pleurotus djamor* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 25, n. 2, 2023.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE. 2017.

JACOB, M. *et al.* Food biodiversity as an opportunity to address the challenge of improving human diets and food security. **Ethnobiology and Conservation**, v. 12, 2023.

JENKINS, G.; MASON, P. The role of prebiotics and probiotics in human health: A systematic review with a focus on gut and immune health. **Food Nutr. J**, v. 6, p. 245, 2022.

KAREB, O., AİDER, M. Whey and its derivatives for probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foods: a critical review. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 2, p. 348-369, 2019.

KAVANAGH, K. **Fungi biology and applications**. 3^o edition, 2017.

KAUR, M. *et al.* Phenolics biosynthesis, targets, and signaling pathways in ameliorating oxidative stress in plants. In: **Plant phenolics in abiotic stress management**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 149-171.

KC, D.; SUMNER, R.; LIPPMANN, S. Gut microbiota and health. **Postgraduate medicine**, v. 132, n. 3, p. 274-274, 2020.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167-180, 2019.

KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. Hackett Publishing, 2017.

LAKATOS, E.; MARCONI, M. A. M. **Fundamentos de metodologia científica**, 2003.

LA REAU, A. J.; SUEN, G. The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. **Journal of microbiology**, v. 56, p. 199-208, 2018.

LARSEN, J. M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**, v. 151, n. 4, p. 363-374, 2017.

LATTANZIO, V. Phenolic compounds: introduction 50. **Nat. Prod**, p. 1543-1580, 2013.

LI, H. *et al.* Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1982-2014, 2021.

LIMA, M. S. *et al.* Determining 1-kestose, nystose and raffinose oligosaccharides in grape juices and wines using HPLC: method validation and characterization of products from Northeast Brazil. **Journal of food science and technology**, v. 56, p. 4575-4584, 2019.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 1, p. 29-41, 2017.

MAHARI, W. A. W. *et al.* A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. **Journal of hazardous materials**, v. 400, p. 123156, 2020.

MAITY, G. N. *et al.* Structural studies of a water insoluble-glucan from *Pleurotus djamor* and its cytotoxic effect against PA1, ovarian carcinoma cells. **Carbohydr. Polym.** 2019, 222, 114990.

MAKAREWICZ, M. *et al.* The Interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 188, 2021.

MASSA, N. M. L. *et al.* *In vitro* colonic fermentation and potential prebiotic properties of pre-digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-products. **Food chemistry**. vol. 388, 2022: 133003.

MEDEIROS, R. L. *et al.* Nutritional and antioxidant potential of *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn produced on agronomic wastes banana leaves and sugarcane bagasse substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-13, 2024.

MELANOURI, E.; DEDOUSI, M.; DIAMANTOPOULOU, P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. **Carbon Resources Conversion**, v. 5, n. 1, p. 61-70, 2022.

MENEZES, F. N. D. D. *et al.* Acerola (*Malpighia glabra* L.) and guava (*Psidium guayaba* L.) industrial processing by-products stimulate probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth and induce beneficial changes in colonic microbiota. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 4, p. 1323 - 1336, 2020.

MILLION, M. *et al.* Antioxidants maintain Butyrate production by Human Gut *Clostridia* in the presence of Oxygen. **bioRxiv**, p. 652958, 2019.

MOUMITA, S.; DAS, B. Assessment of the Prebiotic Potential and Bioactive Components of Common Edible Mushrooms in India and Formulation of Synbiotic Microcapsules. **LWT**, 156, 113050, 2022.

NIAZI, A. R.; GHAFOR, A. Different ways to exploit mushrooms: A review. **All Life**, v. 14, n. 1, p. 450–460, 1 jan. 2021.

NICOLUCCI, A. C. *et al.* Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. **Gastroenterology**, v. 153, n. 3, p. 711-722, 2017.

NIEGO, A. G. *et al.* Macrofungi as a Nutraceutical Source: Promising Bioactive Compounds and Market Value. **Journal of Fungi Basel**. v.7, ed.5, p. 397, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2309-608X/7/5/397>>. Acesso em: 25 de agosto de 2022.

O'CALLAGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 925, 2016.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, 5, e47, 2016.

PHAM, V. T. *et al.* Antioxidant vitamins and prebiotic FOS and XOS differentially shift microbiota composition and function and improve intestinal epithelial barrier *in vitro*. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1125, 2021.

PEREDO-LOVILLO, A. *et al.* Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. **Food Research International**, v. 136, p. 109473, 2020.

PÉREZ-MORENO, J. *et al.* Climate change, biotechnology, and Mexican Neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. **Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences**, p. 61-99, 2020.

PETRAGLIA, T. *et al.* Antioxidant activity of polysaccharides from the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2176, 2023.

PINEDA-ALEGRÍA, J. A. *et al.* 1H-NMR Metabolomic Study of the Mushroom *Pleurotus djamor* for the Identification of Nematocidal Compounds. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 5, p. 580, 2024.

Pleurotus in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB95136>>. Acesso em: 03 jun. 2024.

PRECUP, G.; VODNAR, D. Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 2, p. 131-140, 2019.

QIN, D. *et al.* Contribution of *Lactobacilli* on intestinal mucosal barrier and diseases: perspectives and challenges of *Lactobacillus casei*. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1910, 2022.

RAMAN, J. *et al.* Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: an overview. **Mycobiology**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 2021.

RANGARAJAN, A. A. *et al.* *Ruminococcus bromii* enables the growth of proximal *bacteroides thetaiotaomicron* by releasing glucose during starch degradation. **Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 001180, 2022.

ROWLAND, I. *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **European Journal of Nutrition**, v. 57, p. 1-24, 2018.

RITOTA, M.; MANZI, P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application. **Sustainability**, v. 11, n. 18, p. 5049, 2019.

SANDERS, M. E. *et al.* Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605-616, 2019.

SALMONES, D. *Pleurotus djamor*, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. **Revista Mexicana de Micología**, v. 46, pág. 73-85, 2017.

SAWANGWAN, T. *et al.* Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 6, p. 519-524, 2018.

SIES, H. Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. Academic Press, 2017.

SONNENBURG, E. D.; SONNENBURG, J. L. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 383-390, 2019.

TIMM, J.M. **Primavera fungi, Guia de fungos para o Sul do Brasil**. 1ª edição, Editora Via Sapiens, Porto Alegre, 2018.

TOLERA, K. D.; ABERA, S. Nutritional quality of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. **Food science & nutrition**, v. 5, n. 5, p. 989-996, 2017.

TORRES-MARTÍNEZ, B. M. *et al.* *Pleurotus* genus as a potential ingredient for meat products. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 779, 2022.

TÖRÖS, G. *et al.* Modulation of the gut microbiota with prebiotics and antimicrobial agents from *Pleurotus ostreatus* mushroom. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2010, 2023.

TRIERVEILER-PEREIRA, L.; SULZBACHER, M. A.; BALTAZAR, J. M. Diversidade de fungos brasileiros e alimentação: o que podemos consumir? *In: III Fórum Ambiental de Angatuba*, 2018, Angatuba-SP. Resumo Expandido nos **Anais [...]**. Angatuba, 2018.

VEGA, A. *et al.* Agro-industrial waste improves the nutritional and antioxidant profile of *Pleurotus djamor*. **Cleaner Waste Systems**, v. 2, p. 100018, 2022.

VINDEROLA, G. *et al.* (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. Crc Press, 2019.

WAKTOLA, G.; TEMESGEN, T. Application of mushroom as food and medicine. **Adv. Biotechnol. Microbiol.**, v. 11, n. 3, p. 10-19080, 2018.

WILSON, M. **The Human Microbiota in Health and Disease: An Ecological and Community-Based Approach**. Garland Science, 2018.

ZHANG, S. *et al.* Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. **Food Chemistry**, v. 244, p. 232-237, 2018.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782-2858, 2020.

ZIEBA, P. *et al.* Supplementation with magnesium salts - a strategy to increase nutraceutical value of *Pleurotus djamor* fruiting bodies. **Molecules**, v. 26, n. 3273, p. 1-19, 2021.

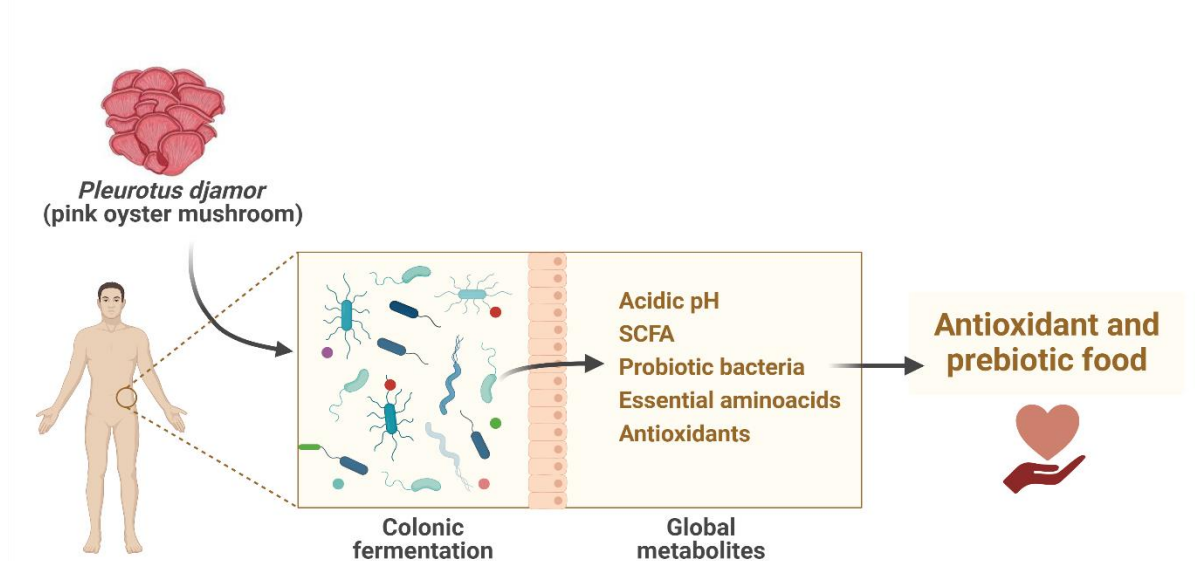
APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL

Unveiling the antioxidant and prebiotic properties of edible mushroom *Pleurotus djamor* during *in vitro* colonic fermentation

Giuliane Moura Andrade¹, Evandro Leite de Souza², Jhonatan Rafael Zárate-Salazar³, Jordana Nunes de Oliveira⁴, Josean Fachine Tavares⁵, Marcos dos Santos Lima⁶, Rossana Lucena de Medeiros⁷, Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque⁸, Fillipe de Oliveira Pereira^{9*}.

Figure abstract



1. Postgraduate Program in Nutrition Sciences, Health Sciences, Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. giuliane.giu@gmail.com
2. Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil. els@academico.ufpb.br
3. Postgraduate Program in Ecology and Conservation, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil. rzaratesalazar@gmail.com
4. Postgraduate Program in Nutrition Sciences, Health Sciences, Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. Jordananunes93@outlook.com
5. Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. josean@ltf.ufpb.br
6. Department of Food Technology, Federal Institute of Sertão Pernambucano, Petrolina, Brazil. marcos.santos@ifsertao-pe.edu.br
7. Fungi Research Group, Academic Unit of Health, Education, and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité, Brazil. rossanalucena@gmail.com
8. Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. thatyane.albuquerque3@academico.ufpb.br
9. Fungi Research Group, Academic Unit of Health, Education, and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité, Brazil. fillipe.oliveira@professor.ufcg.edu.br

Abstract

This study proves that digested *P. djamor* powder (MUS) exhibits antioxidant and prebiotic potential *in vitro* colonic fermentation. High levels of phenolic compounds, including epicatechin ($3,03 \pm 1,54$ mg/L), gallic acid ($2,71 \pm 1,54$ mg/L), and quercetin 3-glucoside ($2,40 \pm 1,54$ mg/L), were identified in *P. djamor*. During 48-hour fermentation, MUS significantly increased the relative abundance of beneficial bacteria such as *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Ruminococcus albus* - *R. flavefaciens*, and reduced *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. and *Clostridium histolyticum*. Furthermore, MUS enhanced short-chain fatty acid (SCFA) production and decreased pH levels, indicating positive prebiotic activity. The antioxidant activity of *P. djamor* remained high even after *in vitro* digestion and colonic fermentation. Finally, *P. djamor* altered the metabolic profile of the colonic microbiota by producing essential amino acids and other compounds with beneficial properties for human health. These findings suggest that *P. djamor* has strong potential as a functional food-modulating human gut microbiota.

Keywords: edible mushroom, phenolic compounds, short-chain fatty acids, microbiota, functional food

1. Introduction

Edible mushrooms have been used for thousands of years due to their benefits to human health and nutrition. People consume edible mushrooms worldwide, although the quantities and species consumed can vary significantly. Globally, at least 2,006 species of mushrooms are considered safe for human consumption and beneficial to human health.^{1,2} Edible mushrooms promote access to healthy and affordable food, aligning with sustainable development goals (SDG) such as SDG 2, 3, and 12^{3,4}

The production and consumption of edible mushrooms are rising, making them a promising option for a diverse and nutritious diet. The most consumed species worldwide include *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, and *Pleurotus* spp.⁵ Global mushroom consumption is projected to increase to 20.84 million tons by 2026. According to FAOSTAT, global mushroom production in 2021 was approximately 4 billion tons, double that in 2010⁶. The cultivation of edible mushrooms generates more than 34 billion tons annually. The sector invests around 30 billion dollars among the five mushroom genera that make up 85% of the world production: *Lentinula* (22%), *Pleurotus* (19%), *Auricularia* (17%), *Agaricus* (15%), and *Flammulina* (11%).⁷

Cultivating *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) boedijn (pink oyster) is appealing due to its low production costs. Its lignocellulolytic exoenzymes break down tough compounds, enabling it to grow on various agricultural residues. Mushroom farming is critical for converting waste into high-nutritional-value foods. Integrated into a zero-waste circular economy, it

promotes sustainable development in both energy and productivity.⁸ Some notable residues used in *P. djamor* cultivation include banana leaves, sugarcane bagasse, coffee pulp, rice straw, and corncobs.^{9,10} Besides being a species cultivated for commercial purposes, *P. djamor* is widely distributed worldwide and is naturally found in the Amazon and Atlantic Forest biomes of Brazil. Reports from traditional communities in Brazil and scientific literature confirm its edibility.^{1,3,11}

P. djamor is highly valued for its nutritional and medicinal properties. *P. djamor* is rich in proteins, fiber¹⁰, vitamins, and minerals and contains low fat and calories.⁹ This species also have bioactive compounds such as phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids), terpenoids, steroids (ergosterol), polyunsaturated fatty acids ω -3, and β -glucans, that can have health-promoting effects, improving well-being and reducing disease risk.^{12–14} Some studies demonstrated the functional potential of *P. djamor*. *P. djamor* showed nematocidal activity against *Haemonchus contortus*.¹⁵ Wild and cultivated *P. djamor* showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.¹⁶ Furthermore, extracellular polysaccharides produced by *P. djamor* have shown promising antitumor activity against Sarcoma 180 in animal models, with a tumor inhibition rate of 94%.¹⁷

In this context, *P. djamor* is believed to hold potential prebiotic effects because other species have shown compounds with prebiotic effects. Currently, the definition of prebiotics is a substrate that is selectively utilized by host microorganisms, conferring health benefits.¹⁸ For instance, the β -glucan extract from *P. ostreatus* demonstrated prebiotic potential comparable to established prebiotics like FOS and inulin.¹⁹ Using a culture medium, *Lentinus edodes*, and *Pleurotus pulmonarius* showed prebiotic properties based on probiotic growth stimulation.¹⁴ However, the crucial interaction between *P. djamor* and the human gut microbiota remains poorly understood.

Dietary prebiotic components in mushrooms can positively regulate the proliferation and activity of beneficial gut microbiota. Moreover, antioxidants like phenolic compounds, polyunsaturated fatty acids, and microbiota-accessible carbohydrates help maintain redox balance and contribute to intestinal microbiome resilience against oxidative stress, ultimately supporting gut health.^{20,21} The intestinal microbiota is crucial for maintaining intestinal homeostasis and overall health, as its dysregulation can lead to pathological conditions such as inflammatory bowel disease, diabetes, and hypertension.²² *In vitro* studies have been widely used to simulate human intestinal conditions and assess the prebiotic efficacy of various foods and nutraceuticals, making them helpful in developing nutritional strategies.^{23,24}

This study aims to investigate the prebiotic and antioxidant activities of *P. djamor* in an *in vitro* colonic fermentation system. Simulating human intestinal conditions, this study assessed the effects of *P. djamor* on gut microbiota composition, antioxidant potential, and metabolic changes post-fermentation, contributing to understanding its health benefits.

MATERIALS AND METHODS

Collection and characterization of *P. djamor*

P. djamor PDJR2 strain was obtained from the *Grupo de Pesquisa e Produção de Cogumelos Comestíveis* at the Federal University of Paraíba. The mushrooms were cultivated in substrates composed of banana leaves (*Musa* spp.) at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of $92 \pm 1\%$, and a light intensity of 200 lux (8.5 volts) for 120 days. The harvested mushrooms were dried in a circulating air oven at 45°C for three days. A knife mill with a 16-mesh sieve was used to grind the dried mushrooms. The resulting *P. djamor* powder was packed in polypropylene bags and stored under refrigeration ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$) for subsequent analyses. The physicochemical parameters of *P. djamor* powder were determined in a previous study¹⁰, and the main physicochemical characteristics were carbohydrates $42,13 \pm 1,85$ g/100 g, proteins $18,77 \pm 0,24$ g/100 g, lipids $0,28 \pm 0,08$ g/100 g, dietary fiber $18,02 \pm 0,05$ g/100 g. We registered this study with the Genetic Heritage Management Council (SisGen) under number A85791E to comply with the Brazilian law requirements.

In this study, we analyzed the content of phenolic compounds in *P. djamor* powder before exposure to simulated gastrointestinal digestion. Two grams of *P. djamor* powder were acidified with 0.1 M HCl (Neon, São Paulo, Brazil) until reaching pH 2 and mixed with 10 ml of methanol: water (70:30 v/v) for 60 min at 25°C in the dark. The mixtures were centrifuged ($4000 \times g$, 15 min, 24°C), and the supernatants were filtered (regenerated cellulose, $0.45 \mu\text{m}$ pore size)²⁵. The separation and quantification of the phenolic compounds (gallic acid, syringic acid, p-coumaric acid, catechin, procyanidin B2, epigallocatechin gallate, epicatechin, epicatechin gallate, procyanidin A2, and quercetin 3-glucoside) were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a liquid chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, USA) equipped with a quaternary solvent pump (G1311C model), degasser, thermostatic column compartment (G1316A model) and automatic autosampler (G1329B model), coupled with a diode array detector (G1315D model) and refractive index detector (G1362A model). Data were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies, St. Clara, USA). We identified the

sample peaks by comparing their retention times with the respective standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Antioxidant activity of *P. djamor*

The antioxidant activity of *P. djamor* powder was evaluated with ABTS•+ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) ^{26–28}. The extract of *P. djamor* was obtained using the methodology described in section 2.1. The extract was stored under light protection at 4 ± 0.5 °C for 24 h, centrifuged (at 1696 x g, 10 min, 4 °C, and the supernatant was used for further analyses. Absorbance measurements were analyzed on a microplate spectrophotometer (BioTek Eon, Winooski, VT, USA) at 734 nm (ABTS•+), 517 nm (DPPH•), and 585 nm (FRAP). The scavenging activity estimated by the DPPH• and ABTS•+ methods was expressed as a percentage (%) compared to the results obtained from the control without antioxidants. The antioxidant activity estimated by the FRAP method was expressed as $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$.

Simulated gastrointestinal digestion of *P. djamor*

P. djamor powder was subjected to a process simulating the different compartments of the human gastrointestinal tract under a controlled temperature ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) ²⁹. Initially, 10g of *P. djamor* powder was mixed with 100 mL of sterilized distilled water and homogenized for 5 minutes. An aliquot of 1.04 mL of α -amylase was added to the solution, and the pH was adjusted to 7 using NaHCO_3 (1M). The solution was maintained for 30 min under stirring (130 rpm). After this stage, pepsin (4.16 mL) was added, the pH was adjusted to 2-2.5 with HCl (1M), and the solution was maintained for 2h under stirring (130 rpm) to simulate the stomach process. Subsequently, bile salts (0.58g) and pancreatin (0.93 mg) diluted in 20.8 mL of NaHCO_3 (1M) were added to the mixture. The pH was adjusted to 6.5-7 with NaHCO_3 (1M), and the solution was maintained for 2h under stirring (45 rpm), simulating the small intestine. The digestion fluids were dialyzed using a 1 kDa regenerated cellulose membrane (Spectra/Por® 6, Spectrum Europe BV, Breda, Netherlands) pre-hydrated for 30 minutes in $60 \pm 2^\circ\text{C}$ distilled water. The membranes containing pre-digested *P. djamor* powder were immersed in 0.01 M NaCl and incubated at $5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ to remove low molecular weight digestion products. After 18 hours of dialysis, the samples were frozen at -80°C for 24 hours and lyophilized at $-55 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 mmHg for 18-20 hours using a bench-top lyophilizer (model L-101, Brazil). The digested mushroom *P. djamor* (MUS) was then stored in a sterile, hermetically sealed glass container.

***In vitro* colonic fermentation**

After approval by the Ethics Committee for Research on Human Beings at the Federal University of Paraíba (protocol number 6.033.148), fecal samples from 4 healthy adult volunteers (2 men and 2 women, aged 20-39 years, with a body mass index of 20,5-29,9 kg/m²) were obtained. Donors were omnivores, non-smokers, free of colonic illness, and had not taken antibiotics or other medications affecting the intestinal microbiota for at least three months. They also did not regularly consume concentrated prebiotics or probiotics^{30,31}. The samples were transported in hermetically glass jar, containing an anaerobic gas generator (CaCO₃ solution + distilled water + 0.1 M HCl), were used immediately to prepare the fecal inoculum. Fresh fecal samples were mixed in equal proportions (1:1:1:1, w/w) and diluted (1:10 w/v) in sterilized phosphate-buffered saline (PBS 0.1 M; pH 7.5). The fecal inoculum was filtered through a triple layer of sterilized gauze and stored in sterilized vials containing 5 mL of glycerol (Sigma-Aldrich; 20 mL/100 mL) (10% of the total volume of the bottle) at -20°C until fermentation³¹. We used 500 mL of sterilized fermentation medium with the following composition: 4.5 g NaCl, 4.5 g KCl, 1.5 g NaHCO₃, 0.69 g MgSO₄, 0.8 g L-cysteine HCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.4 g bile salt, 0.08 g CaCl₂, 0.005 g FeSO₄, 1 mL Tween 80, and 4 mL resazurin solution (0.025%) in distilled water. The fermentation system comprised 40% fermentation medium (v/v), 40% fecal inoculum (v/v), and 20% MUS (w/v) under anaerobic conditions for 48 hours at 37°C ± 1°C³². Controls included the fermentation medium with FOS (20%, w/v, positive control) and another without FOS or MUS (negative control).

Relative abundance of the bacterial population during *in vitro* colonic fermentation

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique coupled with multiparameter flow cytometry (MFC) was used to analyze the abundance of the bacterial population at time zero and 48 hours of *in vitro* colonic fermentation. For this purpose, SYBR Green markers (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and synthesized probes labeled with the fluorophore Cy3 (Lab 158 specific for *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., Bif 164 specific for *Bifidobacterium*, Rfla 729 specific for *Ruminococcus albus* - *R. Flavefaciens*, Bac 303 specific for *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp, Chis 150 specific for *Clostridium histolyticum* and Erec 482 specific for *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoides*) were used. At each fermentation time, 375 µL aliquots obtained from fermentation media were fixed overnight in paraformaldehyde and hybridized with the specific fluorescent probes as described previously³³. A flow cytometer (BD Accuri C6, USA) with 488 nm excitation from a blue solid-state laser

detected the bacterial individual cells according to the fluorescence signals on channels FL1 (SYBR Green) and FL2 (Lab 158, Bif 164, Rfla 729, Bac 303, Chis 150, and Erec 482) by the BD Accuri C6 Software. The results were expressed as the relative abundance (percentage) of different bacterial cells hybridized with each probe relative to the total bacterial population.

Prebiotic index

The prebiotic index in the fermentation medium with MUS, FOS, and NC was determined by calculating the relative abundance (percentage) of each bacterial group measured on FISH-MFC, using the following Eq 1: ³³

$$\text{Prebiotic index: } \% \text{ Lab} + \% \text{ Bif} + \% \text{ Rfla} - \% \text{ Bac} + \% \text{ Chis} + \% \text{ Erec}$$

%Lab refers to the abundance of the bacterial population at time zero, and Lab after 48 hours refers to the abundance at those respective times. The same approach was used for the other bacterial groups. Positive results for the prebiotic index indicate a beneficial overall alteration of the gut-intestinal microbiota, while negative results indicate an undesirable overall alteration.

Microbial metabolic activity during *in vitro* colonic fermentation

The analysis of metabolic activity was based on the determination of pH, sugars, lactic acid and short-chain fatty acids (SCFA), and global metabolic profile at zero, 24, and 48 h of *in vitro* colonic fermentation. The pH analysis was performed using a potentiometric pH meter (Q400AS, Quimis, São Paulo, Brazil) until a constant reading was obtained. ³⁴ The analyses of sugars (glucose, fructose, maltose, and rhamnose), lactic acid, and SCFA (acetic acid, propionic acid, and butyric acid) were performed using the HPLC technique described in Section 2.1. The sample peaks were identified by comparing their retention times with the respective standards (Sigma-Aldrich, USA) for sugars and organic acids, and the results were expressed in g/L. ³⁵

The global metabolic profile was analyzed at zero and 48 h using ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry (¹HNMR). Initially, 2 mL of each sample (MUS, FOS, and NC) was diluted (1:1 v/v) in methanol and deuterated water (D₂O) (9:1, v/v). The final solutions were centrifuged (MPW®, 1696 × g, 10 min, 4° C) and filtered with a 0.45 µm membrane filter (Millipore®) for ¹HNMR analysis. The ¹HNMR spectra were obtained on Bruker equipment, model Avance Neo, operating at 500 MHz for ¹HNMR and 125 MHz for ¹³C (Bruker, Billerica, USA). The following parameters were used to obtain the spectrum sequence: Ic1pngpf2; temperature 26 °C; the number of scans: 64; scan dumer: 16; receiver gain: 32; acquisition time:

3.27 seconds. Spectra were processed using the MestReNova® (MNova) software version 5.2.3.³⁶

Antioxidant activity during *in vitro* colonic fermentation

Aliquots of 3 mL from the fermentation medium with MUS at zero, 24, and 48 h of colonic fermentation were acidified with 0.1 M HCl to pH 2, mixed with methanol (70:30 v/v) for 60 minutes at 25°C in the dark, centrifuged, and filtered. The supernatants were then used for the assays to analyze the antioxidant activity of MUS at zero, 24, and 48 h of colonic fermentation. They were evaluated with ABTS^{•+}, DPPH, and FRAP methods using the procedures described in section 2.2.

Statistical analysis

The experiments were performed in three independent trials. The results are expressed as mean $\pm$ SD (standard deviation). Initially, we used the Shapiro-Wilk normality test and Levene's homogeneity of variance test as assumptions. Then, we conducted a mixed ANOVA with Bonferroni correction to analyze the relative abundance of bacterial groups, microbial metabolic activity, and prebiotic index during colonic fermentation. Pearson's correlation test assessed the relationship between the relative abundance of bacterial groups and microbial metabolic activity (pH and short-chain fatty acid). Finally, we performed one-way ANOVA with the Tukey post hoc test to determine significant differences between the antioxidant activity of *P. djamor* powder and MUS during colonic fermentation. A comparison of the antioxidant activity of MUS during colonic fermentation was performed using repeated measures ANOVA with Bonferroni correction. We considered that there was a statistical difference when $p < 0.05$. The confidence interval was 95%. All analyses were performed using R software Version 4.1.0 in the RStudio interface.

RESULTS

Table 1 presents the content of phenolic compounds in *P. djamor* powder. Ten compounds belonging to the classes of phenolic acids and flavonoids were identified. The phenolic compounds with the highest contents were epicatechin (3.03 ± 1.54 mg/L), followed by gallic acid (2.71 ± 1.54 mg/L) and quercetin 3-glucoside (2.40 ± 1.54 mg/L). The relative abundance of bacterial groups in the fermentation medium with MUS, FOS (positive control), and NC (negative control) during 48 h *in vitro* colonic fermentation is shown in Table 2.

The relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. increased ($p < 0.05$) in the medium with MUS ($1.12 \pm 0.15\%$ - $4.83 \pm 0.32\%$) and FOS ($2.20 \pm 0.24\%$ - $3.78 \pm 0.49\%$). The relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. increased by four-fold in the media with MUS and FOS at 48 h of fermentation compared to time zero. At 48 h, the relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. in the medium with MUS was significantly higher than in the medium with FOS and NC ($p < 0.05$). There was an increase in the relative abundance of *Bifidobacterium* spp. in the medium with MUS ($0.59 \pm 0.14\%$ - $1.85 \pm 0.37\%$) and FOS ($1.19 \pm 0.27\%$ - $4.13 \pm 0.59\%$) between zero and 48 h of fermentation ($p < 0.05$), with values being higher in medium with FOS than with MUS. At 48 h, the relative abundance of *Bifidobacterium* spp. in the media with MUS and FOS was significantly higher than in NC ($1.24 \pm 0.22\%$ - $0.92 \pm 0.14\%$) ($p < 0.05$). The relative abundance of *R. albus* - *R. flavefaciens* increased five-fold in the medium with MUS ($0.37 \pm 0.16\%$ - $1.88 \pm 0.17\%$) from time zero to 48 h of fermentation ($p < 0.05$). While the relative abundance of *R. albus* - *R. flavefaciens* in the media with MUS and FOS ($1.58 \pm 0.21\%$ - $3.23 \pm 0.26\%$) increased at 48 h of fermentation ($p < 0.05$). NC ($1.15 \pm 0.16\%$ - $0.31 \pm 0.08\%$) showed a decreased ($1.15 \pm 0.16\%$ - $0.31 \pm 0.08\%$), in this group.

During the 48 h of fermentation, there was no change ($p \geq 0.05$) in the relative abundance of *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. regardless the fermentation medium. Compared to time zero, the relative abundance of *C. histolyticum* decreased in the media with MUS ($2.89 \pm 0.17\%$ - $1.22 \pm 0.38\%$) and FOS ($4.26 \pm 0.45\%$ - $2.49 \pm 0.34\%$) at 48 h of fermentation ($p < 0.05$). However, only the values presented in the medium with MUS at 48 h of fermentation were significantly lower than in NC ($2.86 \pm 0.29\%$) ($p < 0.05$). There was an increase in the relative abundance of *E. rectale* - *C. coccoides* in the medium with MUS ($1.50 \pm 0.35\%$ - $3.78 \pm 0.17\%$) at 48 h of fermentation ($p < 0.05$). The medium with FOS ($3.93 \pm 0.42\%$ - $2.18 \pm 0.24\%$) decreased the relative abundance of *E. rectale* - *C. coccoides* at 48 h of fermentation and these values differed from the medium with MUS and NC ($3.12 \pm 0.71\%$ - $2.95 \pm 0.36\%$) ($p < 0.05$).

Table 3 presents the prebiotic indices of the different fermentation media at 24 and 48 h of fermentation. The media with MUS and FOS showed a positive prebiotic index at both 24 and 48 h, while NC showed a negative prebiotic index, which differed significantly from media with MUS and FOS ($p < 0.05$). The differences were considerably higher at 48 h of fermentation compared to 24 h of fermentation ($p < 0.05$).

Table 4 shows the pH values and contents of sugars (glucose, fructose, maltose, and rhamnose), lactic acid, and SCFA in the different media during the colonic fermentation. The

pH value decreased in the medium with MUS at 48 h ($p < 0.05$) ($6.68 \pm 0.74 - 4.02 \pm 0.28$). Medium with FOS decreased the pH at 24 h ($p < 0.05$), but it remained constant at 48 h ($p \geq 0.05$). The pH decreased in the media with FOS and MUS compared to the control at 48h ($p < 0.05$).

Regarding the sugar contents, maltose and rhamnose were detected at low levels in the medium with MUS at 24 h of fermentation. The content of maltose and rhamnose in the medium with differed from FOS and NC ($p < 0.05$). Different from FOS and NC, the medium with MUS had glucose and fructose at levels below the limit of detection throughout the measured fermentation time. Lactic, acetic, propionic, and butyric acid contents increased in the medium with MUS during the 48 h of fermentation ($p < 0.05$). The medium with MUS had higher propionic and butyric acid contents throughout the fermentation ($p < 0.05$). At 48 h of fermentation, while the propionic acid content increased by 6.5-fold, and butyric acid increased by 3.7-fold at 48 h. Lactic acid was below detection limits in NC during fermentation. Acetic, propionic, and butyric acid contents were lower in NC than in the medium with MUS and FOS ($p < 0.05$).

The relationships between the relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Ruminococcus albus* - *R. flavefaciens*, *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp., *C. histolyticum*, and *E. rectale* - *C. coccoides* with pH variations and SCFA contents were evaluated using Pearson correlation (Figure 1). The pH values correlated negatively with the relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. ($r: -0.89$), *Bifidobacterium* spp. ($r: -0.75$), *R. albus* - *R. flavefaciens* ($r: -0.85$), and *E. Rectale* - *C. coccoides* ($r: -0.80$). Additionally, there was a strong negative correlation between the relative abundance of these bacterial groups and the contents of lactic ($r: -0.80$), acetic ($r: -0.79$), propionic ($r: -0.81$), and butyric acid ($r: -0.84$). The relative abundance of *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. ($r: 0.33$) and *C. histolyticum* ($r: 0.70$) correlated positively with pH values. The relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *R. albus* - *R. flavefaciens*, and *Bacteroides* spp. showed a strong correlation with the contents of lactic acid and SCFA ($R: 0.79 - 0.97$). The strongest correlations were found between *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp. and butyric acid ($r: 0.97$), acetic acid ($r: 0.97$), and lactic acid ($r: 0.95$); and between *R. albus* - *R. flavefaciens* and acetic ($r: 0.97$) and butyric acid ($r: 0.96$). *C. histolyticum* had a negative correlation with propionic ($r: -0.88$), lactic ($r: -0.85$), butyric ($r: -0.80$), and acetic acid ($r: -0.75$). The relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *R. albus* - *R. flavefaciens* correlated negatively with the relative abundance of *Bacteroides* spp. - *Prevotella* spp. and *C. histolyticum*, while correlated positively with *E. rectale* - *C. coccoides*.

Considering the contents of phenolic compounds and flavonoids found for *P. djamor* (Table 1), the antioxidant activity of *P. djamor* powder (before digestion) and MUS was evaluated during colonic fermentation using three different methods (ABTS, DPPH, and FRAP) and the results are shown in Figure 2. *P. djamor* powder and MUS exhibited high antioxidant activity when measured with ABTS, DPPH, and FRAP methods. *P. djamor* powder showed higher antioxidant activity than the medium with MUS during colonic fermentation ($p < 0.05$). The antioxidant activity of the medium with MUS decreased at 24 h of fermentation compared to time zero ($p < 0.05$) but remained constant at 48 hours ($p \geq 0.05$).

The comparison of the spectral profile of the media with MUS, FOS, and NC at zero and 48 h of colonic fermentation identified 60 distinct chemical constituents (Table 5, Figure 3). Initially, some compounds were detected in the media with MUS and FOS, but at 48 h of fermentation, these compounds were detected only in the medium with MUS. Important detected compounds included proline, glutamate, aminopentanoate, methionine, citric acid, aspartate, p-cresol, tyrosine, aminosalicylate, phenylalanine, uracil, N-acetyl-5-aminosalicylate, phenylacetate, formic acid, and isocaproate. Some compounds were detected only in the medium with MUS, such as threonine, 3-hydroxyphenylacetate, and 3-hydroxyisovalerate. Other compounds were detected exclusively in the medium with MUS at 48 h of fermentation, such as acetone, 5-aminopentanoate, α -xylose, β -xylose, β -galactose, and tryptophan.

DISCUSSION

In this study, edible mushrooms *P. djamor* cultivated on banana leaves were analyzed considering potential prebiotic and antioxidant activity. *P. djamor* exhibited a diversity of phenolic compounds of interest to these activities, in addition to a high content of proteins and dietary fibers¹⁰. These chemical aspects underpinned the elucidation of the antioxidant and prebiotic potential of *P. djamor* during the *in vitro* colonic fermentation using feces from healthy individuals. Ingesting a diet with natural foods, enriched foods, or dietary supplements containing prebiotic components can positively influence the intestinal microbiota and confer health benefits.³⁷

Among the diversity of chemical components in mushrooms, phenolic compounds are among the most relevant groups. These compounds comprise phenolic acids, flavonoids, lignans, and tannins and exert a wide range of therapeutic effects, acting as immunomodulatory, anticarcinogenic, antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory agents.¹² Nayak et al. (2021)³⁸

found tannins, flavonoids, terpenoids, cardiac glycosides, and saponins in *P. djamor*. The chemical profile of edible mushrooms can vary according to substrate compositions, culture types, and post-harvest conditions.³⁹ A recent study showed that using agro-industrial wastes (coffee pulp, rice straw, and corncobs) for *P. djamor* cultivation impacted their biological efficiency, nutritional composition, and antioxidant activity.⁹ Researchers found gallic acid, syringic acid, and p-coumaric acid to be the most abundant phenolic compounds in wild *P. djamor* collected from dead tree trunks in a forest in India.⁴⁰ Therefore, the mushrooms used in this study were cultivated in banana leaves and presented an interesting profile of phenolic compounds, yielding high contents of epicatechin, gallic acid, and quercetin 3-glucoside (Table 1).

Wild or cultivated edible mushrooms with high phenolic compound content generally exhibit a strong ability to scavenge free radicals.⁴¹ Phenolic compounds have well-documented anti-free radicals, peroxide-decomposing, metal-activating, and oxygen-scavenging effects. This property arises from aromatic rings linked to hydroxyl groups, which allow them to neutralize free radicals by forming resonance-stabilized phenoxyl radicals.⁴²

Previous studies demonstrated that *P. djamor* cultivated on substrates made from banana leaves and sugarcane bagasse exhibited high contents of homopolysaccharides, phenolic compounds, and antioxidant activity, as measured by DPPH and ABTS methods.¹⁰ Preliminary chemical analyses of methanol extracts of *P. djamor* identified major bioactive components, including phenol, ascorbic acid, flavonoids, β -carotene, and lycopene, all contributing to significant antioxidant activity.⁴³

The antioxidant activity observed in *P. djamor* may be attributed not only to phenolic compounds but also to polysaccharides and other nutrients.^{13,44} Maity *et al.* (2020)⁴⁵ isolated a novel galactoglucan from *P. djamor* with strong antioxidant activity *in vitro* as measured with DPPH and ABTS methods. This activity might also be related to other antioxidant constituents, such as vitamins C and E, thiamine, and amino acids like L-tryptophan and branched-chain amino acids (BCAA). The interaction of these components within a food matrix can enhance the expected antioxidant effect compared to isolated constituents.⁴⁶

Additionally, phenolic compounds are recognized as modulators of gut microbiota composition. A recent systematic review provided strong evidence from preclinical studies that dietary phenolics can stimulate the growth of microorganisms identified as probiotics (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Akkermansia* spp., *Roseburia* spp., *Faecalibacterium* spp.) and promote the production of SCFA.⁴⁷ In the study by Liu *et al.* (2024)⁴⁸, catechin was shown to decrease the relative abundance of Firmicutes and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio

while increasing *Cyanobacteria*. Quercetin altered the gut microbiota in mice with metabolic disorders by reducing *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Shigella*, and *Escherichia coli*.⁴⁹ Therefore, the presence of these compounds in *P. djamor* used in this study provides access to components with prebiotic effects that benefit human health.⁵⁰

Food-rich antioxidants, such as *P. djamor*, play a crucial role in modulating the intestinal microbiota and promoting gut health. These compounds can protect against oxidative stress, modulate the composition and richness of gut microbiota, protect intestinal barrier function, influence the immune system, and affect gut microbiota metabolites.⁵¹ A decrease in antioxidant activity during colonic fermentation is expected, indicating the metabolization of phenolic compounds and polysaccharides by the intestinal microbiota.⁵² However, MUS still presented antioxidant activity (DPPH, ABTS, and FRAP) at 48 h of colonic fermentation. The interaction between dietary antioxidants and gut microbes is bidirectional since antioxidants promote microbial diversity and microbes influence antioxidant bioavailability.²⁰ This interplay has significant implications for human health, alleviating gut microbial dysbiosis and offering therapeutic opportunities for various diseases related to oxidative stress.⁵³

MUS increased the relative abundance of *Lactobacillus* spp. - *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., and *R. albus* - *R. flavefaciens* during *in vitro* colonic fermentation, presenting a positive prebiotic index (Tables 2 and 3). The prebiotic activity of *P. djamor* has been little explored in the literature. However, there are more consistent reports of studies with other species of *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes*, *Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, or their non-digestible polysaccharides. These compounds, including β -glucans, inulin, and other short-chain carbohydrates, stimulate the growth of beneficial gut microorganisms like *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species⁵⁴, agreeing with results of this study. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *P. ostreatus* and *P. eryngii* showed prebiotic activity using nine probiotic strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus*.⁵⁵ But different from us, they used an isolated bioactive component of mushroom (glucans), in different method of culture medium, fermentation and counting of viable cells. Another study using Polysaccharide peptides from *P. citrinopileatus* increased the relative abundance of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, and *Prevotella* in an *in vitro* fermentation system.⁵⁶ *P. ostreatus* increased the relative abundance of *Oscillospira*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacterium*, while decreasing the relative abundance of *Bacteroides* and *Roseburia*. Consequently, the mushroom upregulated lipid and carbohydrate metabolism and bile acid biosynthesis in mice with obesity induced by a high-fat diet.⁵⁷ As we can see in these studies

and compared to our results, the *Pleurotus* genus or their isolated bioactive components can positively modulate the intestinal bacteria.

Changes in intestinal microbiota composition have been associated with various chronic diseases, such as obesity, atherosclerosis, chronic kidney disease, type 2 diabetes mellitus, heart failure, and hypertension. Most of these functional attributes are also associated with the consumption of edible mushrooms.^{58,59} While clinical studies on the efficacy of *P. djamor* are yet to be found in the literature, preclinical studies have demonstrated its pharmacological properties. For instance, dietary supplementation with *P. djamor* in healthy male mice showed no effect on anxiety-like behavior and potential for memory improvement, highlighting its safety and potential benefits.⁶⁰

SCFA and lactic acid are crucial in maintaining intestinal and metabolic human health. These organic acids contribute to gut integrity by regulating luminal pH and mucus production and providing energy for epithelial cells, in addition to modulate energy expenditure, appetite, and glucose homeostasis.⁶¹ SCFA enhance immune responses by stimulating cytokine production (TNF- α , IL-2, IL-6, and IL-10) and promoting the differentiation of T cells into T regulatory cells, as well as improve intestinal barrier function by promoting tight junction assembly and alleviating inflammation.⁶² After absorption by colonocytes, these organic acids may be converted into acetyl-CoA or propionyl-CoA, which enter the tricarboxylic acid cycle in the mitochondria to generate energy. Moreover, they may activate signaling pathways via G protein-coupled receptors, namely, GPR41 (involved in leptin production in adipocytes and lipid profile regulation),⁶³ GPR43 (involved in the modulation of inflammation and secretion of glucagon-like peptide-1),⁶⁴ and GPR109A (involved in suppression of colonic inflammation and the differentiation of regulatory and IL-10-producing T cells).⁶⁵ Butyrate appears to be the most important regulator of tight junctions through the upregulation of genes encoding tight-junction proteins, contributing to maintaining the integrity of the intestinal barrier.⁶⁶

MUS showed a great diversity of microbiome components, including essential amino acids and branched-chain amino acids detected by ¹HNMR during 48 h of colonic fermentation. BCAA, including leucine, isoleucine, and valine, cannot be synthesized by humans and are, therefore, essential dietary components that must originate from ingested food. In addition to direct dietary intake, BCAA can also be metabolized by the gut microbiome.⁶⁷ In this sense, *P. djamor* can be an alternative option to bioaccess BCAAs and improve the human microbiome. BCAA are crucial in maintaining intestinal health, enhancing enterocyte proliferation, improving intestinal absorption of nutrients, and strengthening immune defenses.⁶⁸ BCAA regulate gene expression and protein synthesis associated with various signaling pathways,

particularly the PI3K/AKT/mTOR pathway.⁶⁹ These amino acids support the intestinal barrier and endocrine function, as well as promote the growth of beneficial bacteria in the intestine.⁶⁸

In vitro colonic fermentation models offer a cost-effective and reproducible alternative to *in vivo* studies, potentially leading to significant insights and advancements in understanding the impact of new foods on the human colonic microbiome. However, these models have limitations, including the lack of standardized methodologies and the challenge of fully replicating human colonic conditions.⁷⁰ A validated *in vitro* model showed fair agreement with *in vivo* symptom reports, demonstrating its potential for predicting the gastrointestinal effects of food compounds.⁷¹ Despite these advances, integrating metaomic data and addressing inter-individual variations in intestinal microbiota remain challenges in fully understanding the influence of diet on colonic fermentation.⁷⁰

This study has uncovered the prebiotic activity of *P. djamor*, and antioxidant activity remained even after *in vitro* colonic digestion and fermentation. This is demonstrated by the positive prebiotic index and the parameters of intense metabolic activity of probiotic bacteria, including increased SCFA, BCAA, decreased pH, and antioxidant activity confirmed in this study. This discovery is a significant step forward, inspiring further research and development. The importance of well-structured preclinical and clinical studies, randomized and double-blind, including placebo controls, should be considered. These studies are necessary to ensure safety and efficacy in humans and to better understand the mechanisms of action, especially regarding cardiometabolic diseases influenced by the modulation of the intestinal microbiota. *P. djamor* is a biodiverse food produced sustainably, contributing to achieving the 2030 Agenda for Sustainable Development, precisely objectives 2, 3, and 12. Furthermore, the data from this study already provide relevant information on the potential use of mushrooms as functional foods demonstrating that can be classified as a prebiotic food in conventional form or through processes that facilitate access to nutrients and bioactive compounds, such as the formulation of nutraceuticals and dietary supplements.

REFERENCES

- (1) Li, H.; Tian, Y.; Menolli, N.; Ye, L.; Karunarathna, S. C.; Perez-Moreno, J.; Rahman, M. M.; Rashid, M. H.; Phengsintham, P.; Rizal, L.; Kasuya, T.; Lim, Y. W.; Dutta, A. K.; Khalid, A. N.; Huyen, L. T.; Balolong, M. P.; Baruah, G.; Madawala, S.; Thongklang, N.; Hyde, K. D.; Kirk, P. M.; Xu, J.; Sheng, J.; Boa, E.; Mortimer, P. E. Reviewing the World's Edible Mushroom Species: A New Evidence-Based Classification System. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2021**, 20 (2), 1982–2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12708>.

- (2) Li, D.-W.; Castañeda-Ruiz, R. F.; LaMondia, J. Evolution of Fungi and Update on Ethnomycology. In *Biology of Microfungi*; Li, D.-W., Ed.; Springer Cham, 2016; Vol. 1, pp 237–266. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_11.
- (3) Carvalho, A. J. S.; Zárate-Salazar, J. R.; Jacob, M. C. M.; Araújo, P. L.; Gomes, S. M.; Pereira, F. D. O. The Role of Edible Mushrooms in the Brazilian Diet: A Comprehensive Analysis. *Nutr Food Sci* **2024**, *54* (4), 821–834. <https://doi.org/10.1108/NFS-12-2023-0301>.
- (4) Jacob, M. C. M.; Medeiros Souza, A.; Martins de Carvalho, A.; Alves de Vasconcelos Neto, C. F.; Tregidgo, D.; Hunter, D.; de Oliveira Pereira, F.; Ros Brull, G.; V. Kunhlein, H.; Juliane Guedes da Silva, L.; Mont’Alverne Jucá Seabra, L.; Drewinski, M. de P.; Menolli Jr, N.; Carignano Torres, P.; Mayor, P.; F. M. Lopes, P.; Vasconcelos da Silva, R. R.; Marcelino Gomes, S.; da Silva-Maia, J. K. Food Biodiversity as an Opportunity to Address the Challenge of Improving Human Diets and Food Security. *Ethnobiology and Conservation* **2023**. <https://doi.org/10.15451/ec2023-02-12.05-1-14>.
- (5) Shirur, M.; Barh, A.; Annepu, S. K. Sustainable Production of Edible and Medicinal Mushrooms: Implications on Mushroom Consumption. In *Climate Change and Resilient Food Systems*; Hebsale Mallappa, V. K., Shirur, M., Eds.; Springer : Singapore, 2021; pp 315–346. https://doi.org/10.1007/978-981-33-4538-6_12/TABLES/7.
- (6) Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAOSTAT*.
- (7) Royse, D. J.; Baars, J.; Tan, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. In *Edible and Medicinal Mushrooms*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2017; pp 5–13. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2>.
- (8) Grimm, D.; Wösten, H. A. B. Mushroom Cultivation in the Circular Economy. *Appl Microbiol Biotechnol* **2018**, *102* (18), 7795–7803. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9226-8>.
- (9) Vega, A.; De León, J. A.; Miranda, S.; Reyes, S. M. Agro-Industrial Waste Improves the Nutritional and Antioxidant Profile of *Pleurotus Djamon*. *Cleaner Waste Systems* **2022**, *2*, 100018. <https://doi.org/10.1016/J.CLWAS.2022.100018>.
- (10) Medeiros, R. L. de; Andrade, G. M.; Crispim, R. B.; Silva, N. N. dos S.; Silva, S. A. da; Souza, H. A. N. de; Zárate-Salazar, J. R.; Medeiros, F. D. de; Dantas, C. E. A.; Viera, V. B.; Silva, A. L. e; Tavares, J. F.; Pereira, F. de O. Nutritional and Antioxidant Potential of *Pleurotus Djamon* (Rumph. Ex Fr.) Boedijn Produced on Agronomic Wastes Banana Leaves and Sugarcane Bagasse Substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* **2024**, *55* (2), 1117–1129. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01336-8>.
- (11) Sanuma, O. I.; Tokimoto, K.; Sanuma, C.; Autuori, J.; Sanuma, L. R.; Sanuma, M.; Martins, M. S.; Menolli Jr, N.; Ishikawa, N. K.; Apiamo, R. M. Enciclopédia Dos Alimentos Yanomami (Sanöma): Cogumelos. **2016**, 108.
- (12) Cruz-Moreno, B. A.; Pérez, A. A. F.; García-Trejo, J. F.; Pérez-García, S. A.; Gutiérrez-Antonio, C. Identification of Secondary Metabolites of Interest in *Pleurotus Djamon* Using Agave Tequilana Bagasse. *Molecules* **2023**, *28* (2), 557. <https://doi.org/10.3390/molecules28020557>.
- (13) Bach, F.; Zielinski, A. A. F.; Helm, C. V.; Maciel, G. M.; Pedro, A. C.; Stafussa, A. P.; Ávila, S.; Haminiuk, C. W. I. Bio Compounds of Edible Mushrooms: *In Vitro* Antioxidant

and Antimicrobial Activities. *LWT* **2019**, *107*, 214–220.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.017>.

(14) Sawangwan, T.; Wansanit, W.; Pattani, L.; Noysang, C. Study of Prebiotic Properties from Edible Mushroom Extraction. *Agriculture and Natural Resources* **2018**, *52* (6), 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.020>.

(15) González-Cortázar, M.; Sánchez, J. E.; Huicochea-Medina, M.; Hernández-Velázquez, V. M.; Mendoza-de-Gives, P.; Zamilpa, A.; López-Arellano, Ma. E.; Pineda-Alegría, J. A.; Aguilar-Marcelino, L. *In Vitro* and *In Vivo* Nematicide Effect of Extract Fractions of *Pleurotus djamor* Against *Haemonchus Contortus*. *J Med Food* **2021**, *24* (3), 310–318.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0054>.

(16) Jandaik, S.; Sharma, A.; Thakur, N. Comparison of Yield, Nutrient Content and Antibacterial Activities of Wild and Cultivated Isolates of *Pleurotus Djamor*. *Agricultural Science Digest - A Research Journal* **2020**, *40* (3). <https://doi.org/10.18805/ag.D-5099>.

(17) Borges, G. M.; De Barba, F. F. M.; Schiebelbein, A. P.; Pereira, B. P.; Chaves, M. B.; Silveira, M. L. L.; Pinho, M. S. L.; Furlan, S. A.; Wisbeck, E. Extracellular Polysaccharide Production by a Strain of *Pleurotus Djamor* Isolated in the South of Brazil and Antitumor Activity on Sarcoma 180. *Brazilian Journal of Microbiology* **2013**, *44* (4), 1059–1065.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000019>.

(18) Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

(19) Setyawan, R. H.; Saskiawan, I.; Widhyastuti, N.; Kasirah, K.; Mulyadi, M. Potensi Prebiotic Dari Ekstrak Jamur Tiram Putih (*Pleurotus Ostreatus*). *Ber Biol* **2023**, *22* (1), 51–59.
<https://doi.org/10.55981/beritabiologi.2023.806>.

(20) Naliyadhara, N.; Kumar, A.; Kumar Gangwar, S.; Nair Devanarayanan, T.; Hegde, M.; Alqahtani, M. S.; Abbas, M.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A. Interplay of Dietary Antioxidants and Gut Microbiome in Human Health: What Has Been Learnt Thus Far? *J Funct Foods* **2023**, *100*, 105365. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105365>.

(21) Riaz Rajoka, M. S.; Thirumdas, R.; Mehwish, H. M.; Umair, M.; Khurshid, M.; Hayat, H. F.; Phimolsiripol, Y.; Pallarés, N.; Martí-Quijal, F. J.; Barba, F. J. Role of Food Antioxidants in Modulating Gut Microbial Communities: Novel Understandings in Intestinal Oxidative Stress Damage and Their Impact on Host Health. *Antioxidants* **2021**, *10* (10), 1563.
<https://doi.org/10.3390/antiox10101563>.

(22) Xiong, H.-H.; Lin, S.-Y.; Chen, L.-L.; Ouyang, K.-H.; Wang, W.-J. The Interaction between Flavonoids and Intestinal Microbes: A Review. *Foods* **2023**, *12* (2), 320.
<https://doi.org/10.3390/foods12020320>.

(23) de Oliveira, S. P. A.; de Albuquerque, T. M. R.; Massa, N. M. L.; Rodrigues, N. P. A.; Sampaio, K. B.; do Nascimento, H. M. A.; dos Santos Lima, M.; da Conceição, M. L.; de Souza, E. L. Investigating the Effects of Conventional and Unconventional Edible Parts of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.) on Target Bacterial Groups and Metabolic Activity of Human

Colonic Microbiota to Produce Novel and Sustainable Prebiotic Ingredients. *Food Research International* **2023**, 171, 112998. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112998>.

(24) Duan, H.; Yu, Q.; Ni, Y.; Li, J.; Fan, L. Effect of Agaricus Bisporus Polysaccharides on Human Gut Microbiota during *In Vitro* Fermentation: An Integrative Analysis of Microbiome and Metabolome. *Foods* **2023**, 12 (4), 859. <https://doi.org/10.3390/foods12040859>.

(25) Padilha, C. V. da S.; Miskinis, G. A.; de Souza, M. E. A. O.; Pereira, G. E.; de Oliveira, D.; Bordignon-Luiz, M. T.; Lima, M. dos S. Rapid Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Grape Juices and Wines by RP-HPLC/DAD: Method Validation and Characterization of Commercial Products of the New Brazilian Varieties of Grape. *Food Chem* **2017**, 228, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>.

(26) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* **1999**, 26 (9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

(27) Rufino, M. do S. M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacities of 18 Non-Traditional Tropical Fruits from Brazil. *Food Chem* **2010**, 121 (4), 996–1002. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.01.037>.

(28) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* **1996**, 239 (1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

(29) Massa, N. M. L.; de Oliveira, S. P. A.; Rodrigues, N. P. A.; Menezes, F. N. D. D.; dos Santos Lima, M.; Magnani, M.; de Souza, E. L. *In Vitro* Colonic Fermentation and Potential Prebiotic Properties of Pre-Digested Jaboticaba (*Myrciaria Jaboticaba* (Vell.) Berg) by-Products. *Food Chem* **2022**, 388, 133003. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133003>.

(30) Guergoletto, K. B.; Costabile, A.; Flores, G.; Garcia, S.; Gibson, G. R. *In Vitro* Fermentation of Juçara Pulp (*Euterpe Edulis*) by Human Colonic Microbiota. *Food Chem* **2016**, 196, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>.

(31) Andrade, R. M. S. de; Silva, S.; Costa, C. M. da S. F.; Veiga, M.; Costa, E.; Ferreira, M. S. L.; Gonçalves, E. C. B. de A.; Pintado, M. E. Potential Prebiotic Effect of Fruit and Vegetable Byproducts Flour Using *in Vitro* Gastrointestinal Digestion. *Food Research International* **2020**, 137, 109354. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109354>.

(32) Menezes, F. N. D. D.; Melo, F. H. C.; Vieira, A. R. S.; Almeida, É. T. C.; Lima, M. S.; Aquino, J. S.; Gomez-Zavaglia, A.; Magnani, M.; Souza, E. L. Acerola (*Malpighia Glabra* L.) and Guava (*Psidium Guayaba* L.) Industrial Processing By-products Stimulate Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Growth and Induce Beneficial Changes in Colonic Microbiota. *J Appl Microbiol* **2021**, 130 (4), 1323–1336. <https://doi.org/10.1111/jam.14824>.

(33) de Albuquerque, T. M. R.; Magnani, M.; Lima, M. dos S.; Castellano, L. R. C.; de Souza, E. L. Effects of Digested Flours from Four Different Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* L.) Root Varieties on the Composition and Metabolic Activity of Human Colonic Microbiota *in Vitro*. *J Food Sci* **2021**, 86 (8), 3707–3719. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15852>.

(34) Official Methods of Analysis of the AOAC International. *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*. Gaithersburg 2019.

(35) Coelho, E. M.; da Silva Padilha, C. V.; Miskinis, G. A.; de Sá, A. G. B.; Pereira, G. E.; de Azevêdo, L. C.; dos Santos Lima, M. Simultaneous Analysis of Sugars and Organic Acids in Wine and Grape Juices by HPLC: Method Validation and Characterization of Products from Northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, *66*, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>.

(36) de Sousa Rocha, S.; da Silva, S. R. F.; da Silva, J. Y. P.; de Medeiros, V. P. B.; Aburjaile, F. F.; de Oliveira Carvalho, R. D.; da Silva, M. S.; Tavares, J. F.; do Nascimento, Y. M.; dos Santos Lima, M.; Sassi, C. F. C.; Monteiro, M.; de Brito Alves, J. L.; de Albuquerque, T. M. R.; de Oliveira, M. E. G.; de Souza, E. L. Exploring the Potential Prebiotic Effects of *Opuntia Dillenii* (Ker Gawl). Haw (Cactaceae) Cladodes on Human Intestinal Microbiota. *J Funct Foods* **2024**, *118*, 106259. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106259>.

(37) Cotillard, A.; Kennedy, S. P.; Kong, L. C.; Prifti, E.; Pons, N.; Le Chatelier, E.; Almeida, M.; Quinquis, B.; Levenez, F.; Galleron, N.; Gougis, S.; Rizkalla, S.; Batto, J.-M.; Renault, P.; Doré, J.; Zucker, J.-D.; Clément, K.; Ehrlich, S. D.; Blottière, H.; Leclerc, M.; Juste, C.; de Wouters, T.; Lepage, P.; Fouqueray, C.; Basdevant, A.; Henegar, C.; Godard, C.; Fondacci, M.; Rohia, A.; Hajduch, F.; Weissenbach, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Gauchi, J.-P.; Gibrat, J.-F.; Loux, V.; Carré, W.; Maguin, E.; van de Guchte, M.; Jamet, A.; Boumezeur, F.; Layec, S. Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness. *Nature* **2013**, *500* (7464), 585–588. <https://doi.org/10.1038/nature12480>.

(38) Nayak, H.; Kushwaha, A.; Behera, P. C.; Shahi, N. C.; Kushwaha, K. P. S.; Kumar, A.; Mishra, K. K. *The Pink Oyster Mushroom, Pleurotus Djamar (Agaricomycetes): A Potent Antioxidant and Hypoglycemic Agent*; 2021. www.begellhouse.com.

(39) Carrasco-González, J. A.; Serna-Saldívar, S. O.; Gutiérrez-Urbe, J. A. Nutritional Composition and Nutraceutical Properties of the *Pleurotus* Fruiting Bodies: Potencial Use as Food Ingredient. *Journal of Food Composition and Analysis*. Academic Press Inc. May 1, 2017, pp 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.016>.

(40) Puttaraju, N. G.; Venkateshaiah, S. U.; Dharmesh, S. M.; Urs, S. M. N.; Somasundaram, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. *J Agric Food Chem* **2006**, *54* (26), 9764–9772. <https://doi.org/10.1021/JF0615707>.

(41) Ozen, T.; Kizil, D.; Yenigun, S.; Cesur, H.; Turkecul, I. Evaluation of Bioactivities, Phenolic and Metal Content of Ten Wild Edible Mushrooms from Western Black Sea Region of Turkey. *Int J Med Mushrooms* **2019**, *21* (10), 979–994. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019031927>.

(42) Rincón, E.; Balu, A. M.; Luque, R.; Serrano, L. Mechanochemical Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Mediterranean and Medicinal *Laurus Nobilis*: A Comparative Study with Other Traditional and Green Novel Techniques. *Ind Crops Prod* **2019**, *141*, 111805. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111805>.

(43) Quality Assessment and Antioxidant Study of *Pleurotus Djamar* (Rumph. Ex Fr.) Boedijn. *J Appl Pharm Sci* **2017**, *7* (6), 105–110. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70614>.

- (44) Arunachalam, K.; Sreeja, P. S.; Yang, X. The Antioxidant Properties of Mushroom Polysaccharides Can Potentially Mitigate Oxidative Stress, Beta-Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Front Pharmacol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.874474>.
- (45) Maity, G. N.; Maity, P.; Khatua, S.; Acharya, K.; Dalai, S.; Mondal, S. Structural Features and Antioxidant Activity of a New Galactoglucan from Edible Mushroom *Pleurotus Djamor*. *Int J Biol Macromol* **2021**, *168*, 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.131>.
- (46) Oliveira, A.; Amaro, A. L.; Pintado, M. Impact of Food Matrix Components on Nutritional and Functional Properties of Fruit-Based Products. *Curr Opin Food Sci* **2018**, *22*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.002>.
- (47) Alves-Santos, A. M.; Sugizaki, C. S. A.; Lima, G. C.; Naves, M. M. V. Prebiotic Effect of Dietary Polyphenols: A Systematic Review. *J Funct Foods* **2020**, *74*, 104169. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104169>.
- (48) Liu, C.; Gan, R.-Y.; Chen, D.; Zheng, L.; Ng, S. B.; Rietjens, I. M. C. M. Gut Microbiota-Mediated Metabolism of Green Tea Catechins and the Biological Consequences: An Updated Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2024**, *64* (20), 7067–7084. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2180478>.
- (49) Yuan, M.; Sun, T.; Zhang, Y.; Guo, C.; Wang, F.; Yao, Z.; Yu, L. Quercetin Alleviates Insulin Resistance and Repairs Intestinal Barrier in Db/Db Mice by Modulating Gut Microbiota. *Nutrients* **2024**, *16* (12), 1870. <https://doi.org/10.3390/nu16121870>.
- (50) Assemie, A.; Abaya, G. The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. *Int J Microbiol* **2022**, *2022*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2022/8744788>.
- (51) Riaz Rajoka, M. S.; Thirumdas, R.; Mehwish, H. M.; Umair, M.; Khurshid, M.; Hayat, H. F.; Phimolsiripol, Y.; Pallarés, N.; Martí-Quijal, F. J.; Barba, F. J. Role of Food Antioxidants in Modulating Gut Microbial Communities: Novel Understandings in Intestinal Oxidative Stress Damage and Their Impact on Host Health. *Antioxidants* **2021**, *10* (10), 1563. <https://doi.org/10.3390/antiox10101563>.
- (52) Chaves, N.; Santiago, A.; Alías, J. C. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants* **2020**, *9* (1), 76. <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>.
- (53) Deledda, A.; Annunziata, G.; Tenore, G. C.; Palmas, V.; Manzin, A.; Velluzzi, F. Diet-Derived Antioxidants and Their Role in Inflammation, Obesity and Gut Microbiota Modulation. *Antioxidants* **2021**, *10* (5), 708. <https://doi.org/10.3390/antiox10050708>.
- (54) Balakrishnan, K.; Dhanasekaran, D.; Krishnaraj, V.; Anbukumaran, A.; Ramasamy, T.; Manickam, M. Edible Mushrooms: A Promising Bioresource for Prebiotics. In *Advances in Probiotics*; Dhanasekaran, D., Sankaranarayanan, A., Eds.; Elsevier, 2021; Vol. 1, pp 81–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00005-8>.
- (55) Synytsya, A.; Míčková, K.; Synytsya, A.; Jablonský, I.; Spěváček, J.; Erban, V.; Kovářiková, E.; Čopíková, J. Glucans from Fruit Bodies of Cultivated Mushrooms *Pleurotus Ostreatus* and *Pleurotus Eryngii*: Structure and Potential Prebiotic Activity. *Carbohydr Polym* **2009**, *76* (4), 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>.

- (56) Huang, Y.; Gao, Y.; Pi, X.; Zhao, S.; Liu, W. *In vitro* Hepatoprotective and Human Gut Microbiota Modulation of Polysaccharide-Peptides in *Pleurotus Citrinopileatus*. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.892049>.
- (57) Hu, Y.; Xu, J.; Sheng, Y.; Liu, J.; Li, H.; Guo, M.; Xu, W.; Luo, Y.; Huang, K.; He, X. *Pleurotus Ostreatus* Ameliorates Obesity by Modulating the Gut Microbiota in Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Nutrients* **2022**, *14* (9), 1868. <https://doi.org/10.3390/nu14091868>.
- (58) Tang, W. H. W.; Kitai, T.; Hazen, S. L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* **2017**, *120* (7), 1183–1196. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>.
- (59) Li, M.; Yu, L.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W.; Zhai, Q.; Tian, F. Role of Dietary Edible Mushrooms in the Modulation of Gut Microbiota. *J Funct Foods* **2021**, *83*, 104538. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104538>.
- (60) Fijałkowska, A.; Rychlik, M.; Krakowska, A.; Muszynska, B. Effects of Dietary Supplementation with In Vitro-Cultivated Arboreal Medicinal Mushrooms on Long-Term Memory and Anxiety-Like Behavior of Male Mice. *Int J Med Mushrooms* **2023**, *25* (5), 49–60. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2023047830>.
- (61) Blaak, E. E.; Canfora, E. E.; Theis, S.; Frost, G.; Groen, A. K.; Mithieux, G.; Nauta, A.; Scott, K.; Stahl, B.; van Harsselaar, J.; van Tol, R.; Vaughan, E. E.; Verbeke, K. Short Chain Fatty Acids in Human Gut and Metabolic Health. *Benef Microbes* **2020**, *11* (5), 411–455. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>.
- (62) Liu, L.; Li, Q.; Yang, Y.; Guo, A. Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry. *Front Vet Sci* **2021**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.736739>.
- (63) Stoddart, L. A.; Smith, N. J.; Milligan, G. International Union of Pharmacology. LXXI. Free Fatty Acid Receptors FFA1, -2, and -3: Pharmacology and Pathophysiological Functions. *Pharmacol Rev* **2008**, *60* (4), 405–417. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00802>.
- (64) Tolhurst, G.; Heffron, H.; Lam, Y. S.; Parker, H. E.; Habib, A. M.; Diakogiannaki, E.; Cameron, J.; Grosse, J.; Reimann, F.; Gribble, F. M. Short-Chain Fatty Acids Stimulate Glucagon-Like Peptide-1 Secretion via the G-Protein–Coupled Receptor FFAR2. *Diabetes* **2012**, *61* (2), 364–371. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>.
- (65) Singh, N.; Gurav, A.; Sivaprakasam, S.; Brady, E.; Padia, R.; Shi, H.; Thangaraju, M.; Prasad, P. D.; Manicassamy, S.; Munn, D. H.; Lee, J. R.; Offermanns, S.; Ganapathy, V. Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. *Immunity* **2014**, *40* (1), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>.
- (66) Feng, W.; Wu, Y.; Chen, G.; Fu, S.; Li, B.; Huang, B.; Wang, D.; Wang, W.; Liu, J. Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2018**, *47* (4), 1617–1629. <https://doi.org/10.1159/000490981>.
- (67) Pedersen, H. K.; Gudmundsdottir, V.; Nielsen, H. B.; Hyötyläinen, T.; Nielsen, T.; Jensen, B. A. H.; Forslund, K.; Hildebrand, F.; Prifti, E.; Falony, G.; Le Chatelier, E.; Levenez, F.; Doré, J.; Mattila, I.; Plichta, D. R.; Pöhö, P.; Hellgren, L. I.; Arumugam, M.;

Sunagawa, S.; Vieira-Silva, S.; Jørgensen, T.; Holm, J. B.; Trošt, K.; Consortium, M.; Kristiansen, K.; Brix, S.; Raes, J.; Wang, J.; Hansen, T.; Bork, P.; Brunak, S.; Oresic, M.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O. Human Gut Microbes Impact Host Serum Metabolome and Insulin Sensitivity. *Nature* **2016**, 535 (7612), 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature18646>.

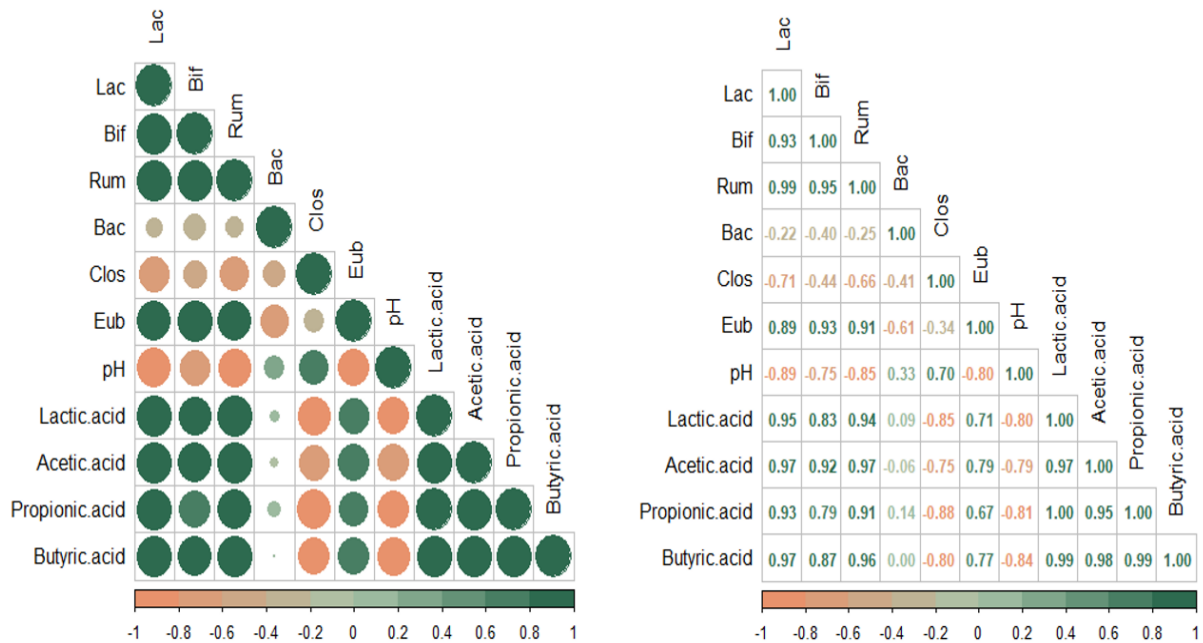
(68) Zhou, H.; Yu, B.; Gao, J.; Htoo, J. K.; Chen, D. Regulation of Intestinal Health by Branched-chain Amino Acids. *Animal Science Journal* **2018**, 89 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1111/asj.12937>.

(69) Nie, C.; He, T.; Zhang, W.; Zhang, G.; Ma, X. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *Int J Mol Sci* **2018**, 19 (4), 954. <https://doi.org/10.3390/ijms19040954>.

(70) Veintimilla-Gozalbo, E.; Asensio-Grau, A.; Calvo-Lerma, J.; Heredia, A.; Andrés, A. In Vitro Simulation of Human Colonic Fermentation: A Practical Approach towards Models' Design and Analytical Tools. *Applied Sciences* **2021**, 11 (17), 8135. <https://doi.org/10.3390/app11178135>.

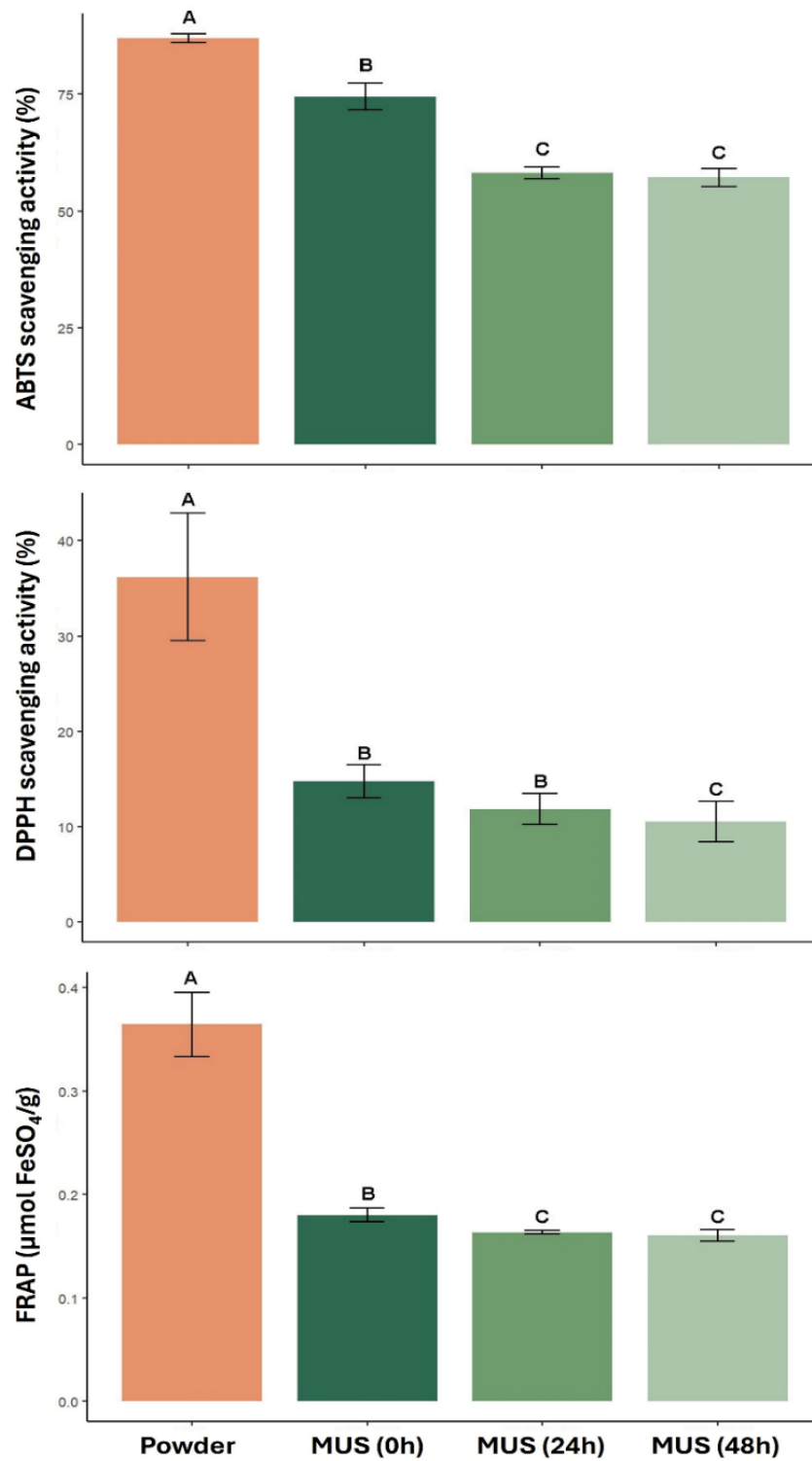
(71) Thomson, C. L.; Garcia, A. L.; Edwards, C. A. Validation of an In Vitro Fermentation Model of Colonic Gas Production. *The 14th European Nutrition Conference FENS 2023* **2023**, 91 (1), 65. <https://doi.org/10.3390/proceedings2023091065>.

Figure 1. Pearson correlation matrix for data from variables measured in media with *Pleurotus djamor* (MUS) during colonic fermentation.



The Pearson correlation was analyzed between the changes in the relative abundance of different bacterial groups *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. (Lac), *Bifidobacterium* spp. (Bif), *R. albus*/*R. flavefaciens* (Rum), *Bacteroides* spp./*Prevotella* spp (Bac), *Clostridium histolyticum* (Clos), and *E. rectale*/*C. coccoides* (Eub), pH values, and short-chain fatty acids.

Figure 2. Antioxidant activity of *Pleurotus djamor* powder and medium with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS) during colonic fermentation.



A – C: Different superscript capital letters denote differences ($p < 0.05$)

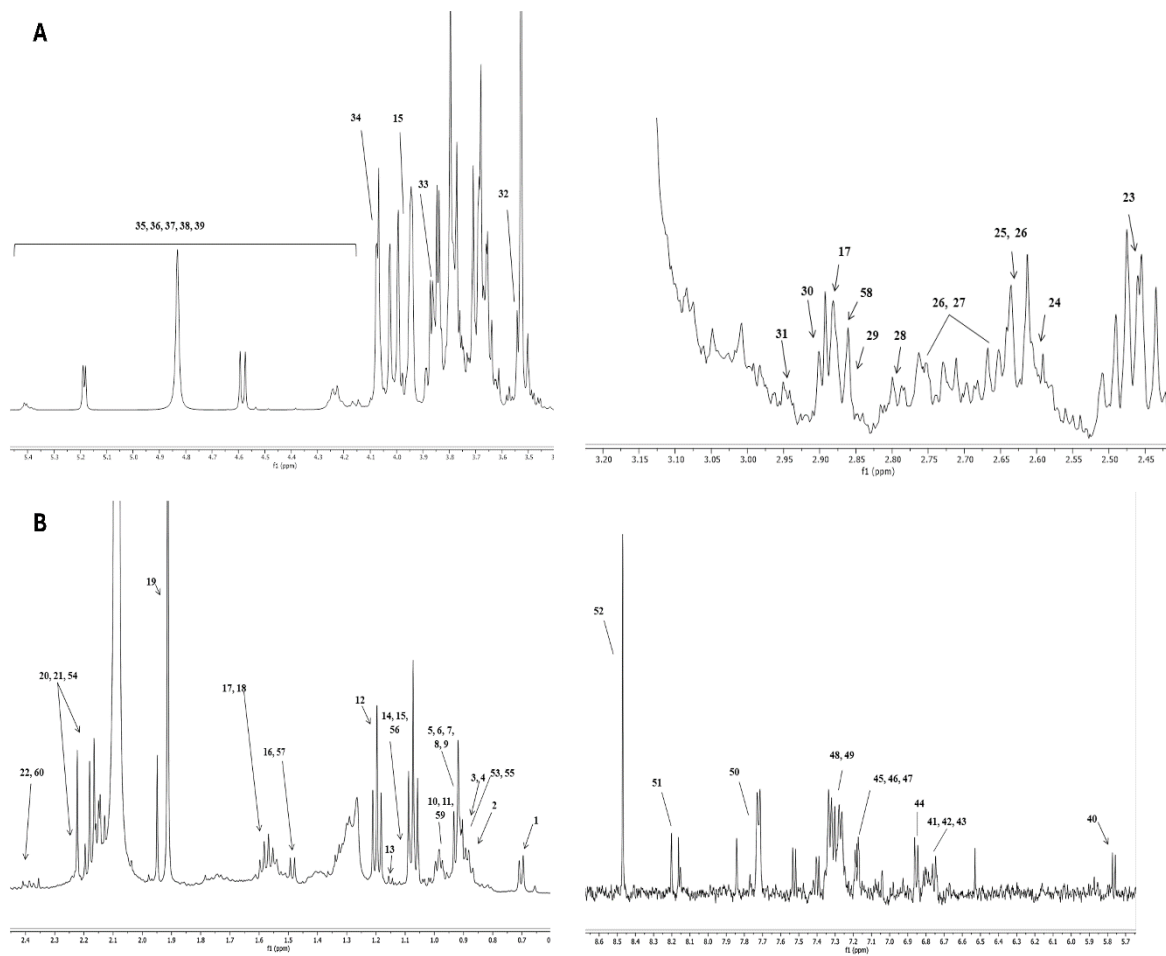


Figure 3 - Representative ^1H NMR spectra of the media with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS) at 0 (A) and 48 h (B) of *in vitro* colonic fermentation analyzed by ^1H NMR.

1: biliary salts; 2: 2-methylbutyrate; 3: valerate; 4: n-butyrate; 5: leucine; 6: isoleucine; 7: valine; 8: propionate/propionic acid; 9: isobutyrate/butyric acid; 10: 3-methyl-2-oxoisovalerate; 11: 2-oxoisovalerate; 12: ethanol; 13: 3-hydroxybutyrate; 14: threonine; 15: lactate/lactic acid; 16: alanine; 17: lysine; 18: ornithine; 19: acetate/acetic acid; 20: proline; 21: glutamate; 22: 5-aminopentanoate; 23: succinate/succinic acid; 24: methylamine; 25: methionine; 26: citrate/citric acid; 27: aspartate; 28: asparagine; 29: trimethylamine; 30: putrescine; 31: malonate; 32: glycine; 33: fructose; 34: dihydroxyacetone; 35: α -xylose; 36: β -xylose; 37: β -glucose; 38: α -glucose; 39: D-galactose; 40: UDP-glucuronate; 41: homovanillate; 42: 3-hydroxyphenylacetate; 43: p-cresol; 44: tyrosine; 45: 5-aminosalicylate; 46: phenylalanine; 47: uracil; 48: N-acetyl-5-aminosalicylate; 49: phenylacetate; 50: tryptophan; 51: hypoxanthine; 52: formate/formic acid; 53: caprylate; 54: isocaproate; 55: isovalerate; 56: 3-hydroxyisovalerate; 57: total lipids; 58: gamma-aminobutyric acid (GABA); 59: ketoisovalerate; 60: acetone.

Table 1. Phenolic compounds (mean $\pm$ standard deviation, n = 3) of *Pleurotus djamor* powder.

Phenolic compounds	Content (mg/L)
Phenolic acids	
Gallic acid	2.71 $\pm$ 1.54
Syringic acid	0.23 $\pm$ 0.76
p-Coumaric acid	0.17 $\pm$ 1.54
Flavonoids	
Catechin	1.28 $\pm$ 1.54
Procyanidin B2	1.97 $\pm$ 2.67
Epigallocatechin gallate	0.44 $\pm$ 3.45
Epicatechin	3.03 $\pm$ 1.54
Epicatechin gallate	0.34 $\pm$ 0.75
Procyanidin A2	1.37 $\pm$ 0.80
Quercetin 3-Glucoside	2.40 $\pm$ 1.54

Table 2. Relative abundance (% mean $\pm$ standard deviation; n = 3) of different bacterial groups in media with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation.

Bacterial groups	Fermentation medium	Time of fermentation		
		0 h	24 h	48 h
<i>Lactobacillus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> spp.	MUS	1.12 $\pm$ 0.15 ^{Aa}	3.12 $\pm$ 0.21 ^{Bb}	4.83 $\pm$ 0.32 ^{Cc}
	FOS	2.20 $\pm$ 0.24 ^{Ab}	2.64 $\pm$ 0.31 ^{Ab}	3.78 $\pm$ 0.49 ^{Bb}
	NC	1.83 $\pm$ 0.35 ^{Bb}	0.29 $\pm$ 0.07 ^{Aa}	0.51 $\pm$ 0.13 ^{Aa}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	MUS	0.59 $\pm$ 0.14 ^{Aa}	1.59 $\pm$ 0.26 ^{Ba}	1.85 $\pm$ 0.37 ^{Ba}
	FOS	1.19 $\pm$ 0.27 ^{Aa}	2.59 $\pm$ 0.34 ^{Bb}	4.13 $\pm$ 0.59 ^{Cb}
	NC	1.24 $\pm$ 0.22 ^{Aa}	1.08 $\pm$ 0.25 ^{Aa}	0.92 $\pm$ 0.14 ^{Ac}
<i>Ruminococcus albus</i> - <i>R. flavefaciens</i>	MUS	0.37 $\pm$ 0.16 ^{Aa}	1.25 $\pm$ 0.14 ^{Ba}	1.88 $\pm$ 0.17 ^{Ca}
	FOS	1.58 $\pm$ 0.21 ^{Ab}	2.61 $\pm$ 0.32 ^{Bb}	3.23 $\pm$ 0.26 ^{Cb}
	NC	1.15 $\pm$ 0.16 ^{Ab}	0.94 $\pm$ 0.27 ^{Aa}	0.31 $\pm$ 0.08 ^{Bc}
<i>Bacteroides</i> spp. - <i>Prevotella</i> spp.	MUS	5.37 $\pm$ 0.31 ^{Ab}	2.31 $\pm$ 0.33 ^{Ba}	4.73 $\pm$ 0.22 ^{Ab}
	FOS	5.14 $\pm$ 0.55 ^{Ab}	3.43 $\pm$ 0.24 ^{Bb}	4.54 $\pm$ 0.38 ^{Ab}
	NC	4.56 $\pm$ 0.38 ^{Aa}	3.88 $\pm$ 0.31 ^{Ab}	3.23 $\pm$ 0.26 ^{Aa}
<i>Clostridium histolyticum</i>	MUS	2.89 $\pm$ 0.17 ^{Aa}	3.55 $\pm$ 0.28 ^{Aa}	1.22 $\pm$ 0.38 ^{Ba}
	FOS	4.26 $\pm$ 0.45 ^{Cb}	3.21 $\pm$ 0.37 ^{Ba}	2.49 $\pm$ 0.34 ^{Ab}
	NC	3.35 $\pm$ 0.36 ^{Aa}	3.03 $\pm$ 0.32 ^{Aa}	2.86 $\pm$ 0.29 ^{Ab}
<i>Eubacterium rectale</i> - <i>C. coccoides</i>	MUS	1.50 $\pm$ 0.35 ^{Aa}	3.37 $\pm$ 0.28 ^{Ba}	3.78 $\pm$ 0.17 ^{Ba}
	FOS	3.93 $\pm$ 0.42 ^{Ab}	2.34 $\pm$ 0.32 ^{Bb}	2.18 $\pm$ 0.24 ^{Bb}
	NC	3.12 $\pm$ 0.71 ^{Ab}	3.19 $\pm$ 0.54 ^{Aa}	2.95 $\pm$ 0.36 ^{Aa}

A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium indicate differences (p < 0.05); a-c: different superscript small letters in the same column at the same time interval and bacterial group indicate difference (p < 0.05).

Table 3. Prebiotic index (mean $\pm$ standard deviation; n = 3) calculated for media with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) at 24 and 48 h of colonic fermentation.

Fermentation medium	Prebiotic index	
	24 h	48 h
MUS	4.41 $\pm$ 0.76 ^{Ab}	6.52 $\pm$ 1.03 ^{Bb}
FOS	7.22 $\pm$ 1.15 ^{Ac}	10.29 $\pm$ 1.38 ^{Bc}
NC	-0.98 $\pm$ 0.14 ^{Aa}	-0.49 $\pm$ 0.24 ^{Aa}

Table 4. pH values and contents of sugars, lactic acid, and short-chain fatty acids in media with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS), fructooligosaccharides (FOS), and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation.

Parameters	Fermentation medium	Time of fermentation		
		0 h	24 h	48 h
pH	MUS	6.68 $\pm$ 0.74 ^{Aa}	5.12 $\pm$ 0.35 ^{Ab}	4.02 $\pm$ 0.28 ^{Cb}
	FOS	6.58 $\pm$ 0.66 ^{Aa}	3.48 $\pm$ 0.37 ^{Ba}	3.14 $\pm$ 0.21 ^{Ba}
	NC	6.62 $\pm$ 0.71 ^{Aa}	5.04 $\pm$ 0.44 ^{Bb}	5.01 $\pm$ 0.46 ^{Bc}
Glucose	MUS	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	8.38 $\pm$ 0.96 ^{Aa}	4.92 $\pm$ 0.38 ^B	2.22 $\pm$ 0.27 ^C
	NC	0.10 $\pm$ 0.17 ^b	<LOD	<LOD
Fructose	MUS	<LOD	<LOD	<LOD
	FOS	7.09 $\pm$ 0.48 ^{Ba}	7.15 $\pm$ 0.63 ^B	3.60 $\pm$ 0.29 ^A
	NC	0.06 $\pm$ 0.17 ^b	<LOD	<LOD
Maltose	MUS	0.02 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.02 $\pm$ 0.00 ^{Aa}	<LOD
	FOS	0.24 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.14 $\pm$ 0.02 ^{Ab}	<LOD
	NC	<LOD	<LOD	<LOD
Rhamnose	MUS	0.06 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.05 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	<LOD
	FOS	<LOD	<LOD	<LOD
	NC	0.19 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.11 $\pm$ 0.01 ^{Ab}	<LOD
Lactic acid	MUS	0.45 $\pm$ 0.07 ^A	0.70 $\pm$ 0.09 ^{Ba}	1.38 $\pm$ 0.12 ^{Ca}
	FOS	<LOD	5.94 $\pm$ 0.36 ^{Ab}	8.39 $\pm$ 0.77 ^{Bb}
	NC	<LOD	<LOD	<LOD
Acetic acid	MUS	0.62 $\pm$ 0.09 ^{Ab}	1.03 $\pm$ 0.22 ^{Ba}	1.58 $\pm$ 0.14 ^{Ca}
	FOS	0.30 $\pm$ 0.06 ^{Aa}	1.36 $\pm$ 0.15 ^{Bb}	1.81 $\pm$ 0.18 ^{Ca}
	NC	0.23 $\pm$ 0.02 ^{Aa}	0.30 $\pm$ 0.01 ^{Ac}	0.45 $\pm$ 0.03 ^{Ab}
Propionic acid	MUS	0.73 $\pm$ 0.06 ^{Aa}	1.59 $\pm$ 0.24 ^{Bb}	4.76 $\pm$ 0.57 ^{Cc}
	FOS	0.77 $\pm$ 0.03 ^{Aa}	1.48 $\pm$ 0.17 ^{Ab}	1.66 $\pm$ 0.19 ^{Bb}
	NC	0.98 $\pm$ 0.05 ^{Ab}	0.30 $\pm$ 0.02 ^{Ba}	0.23 $\pm$ 0.01 ^{Ba}
Butyric acid	MUS	0.62 $\pm$ 0.07 ^{Ab}	1.22 $\pm$ 0.14 ^{Bb}	2.32 $\pm$ 0.28 ^{Cc}
	FOS	0.31 $\pm$ 0.02 ^{Aa}	1.13 $\pm$ 0.18 ^{Bb}	1.29 $\pm$ 0.17 ^{Bb}
	NC	0.31 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.73 $\pm$ 0.05 ^{Ba}	0.85 $\pm$ 0.09 ^{Ba}

<LOD: below the limit of detection. A – C: Different superscript capital letters in the same row for the same fermentation medium indicate differences (p < 0.05); a-c: different superscript small letters in the same column at the same time interval and measured parameter indicate difference (p < 0.05).

Table 5. Metabolites in media with digested mushroom *Pleurotus djamor* (MUS). fructooligosaccharides (FOS). and negative control (NC; without fermentable substrate) during colonic fermentation analyzed by ¹H-NMR.

Number	Metabolites	NC		FOS		MUS	
		0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
1	Biliary salts	x	x	x	x	x	x
2	2-methylbutyrate	x	x	x	x	x	x
3	Valerate	x	x	x	x	x	x
4	N-butyrate	x	x	x	x	x	x
5	Leucine	x		x	x	x	x
6	Isoleucine	x		x	x	x	x
7	Valine	x		x	x	x	x
8	Propionate/propionic acid	x		x	x	x	x
9	Isobutyrate/butyric acid	x		x	x	x	x
10	3-methyl-2-oxoisovalerate	x		x	x	x	x
11	2-oxoisovalerate	x		x	x	x	x
12	Ethanol	x	x	x	x	x	x
13	3-hydroxybutyrate	x	x	x	x	x	x
14	Threonine					x	x
15	Lactate/lactic acid	x	x	x	x	x	x
16	Alanine	x	x	x	x	x	x
17	Lysine	x	x	x	x	x	x
18	Ornithine	x	x	x	x	x	x
19	Acetate/acetic acid	x	x	x	x	x	x
20	Proline	x	x	x		x	x
21	Glutamate	x	x	x		x	x
22	5-aminopentanoate	x		x		x	x
23	Succinate/succinic acid	x			x	x	x
24	Methylamine	x	x	x	x	x	x
25	Methionine	x		x		x	x
26	Citrate/citric acid	x		x		x	x
27	Aspartate	x		x		x	x
28	Asparagine	x	x	x	x	x	x
29	Trimethylamine	x	x	x	x	x	x
30	Putrescine	x	x	x	x	x	x
31	Malonate	x	x	x	x	x	x
32	Glycine	x	x		x	x	x
33	Fructose	x	x	x	x	x	x
34	Dihydroxyacetone	x	x	x	x	x	x
35	α -Xylose	x				x	x
36	β -Xylose	x				x	x
37	B-Glucose	x				x	
38	α -Glucose	x				x	

39	β-galactose		x				x	x
40	UDP-glucuronate		x	x	x		x	
41	Homovanillate		x		x	x	x	x
42	3-hydroxyphenylacetate						x	x
43	P-cresol		x	x	x		x	x
44	Tyrosine		x	x	x		x	x
45	5-aminosalicylate		x		x		x	x
46	Phenylalanine		x	x	x		x	x
47	Uracil		x	x	x		x	x
48	N-acetyl-5-aminosalicylate		x	x	x		x	x
49	Phenylacetate		x	x	x		x	x
50	Tryptophan		x				x	x
51	Hypoxanthine		x		x		x	
52	Formate/formic acid		x	x	x		x	x
53	Caprylate		x		x	x	x	x
54	Isocaproate		x	x	x		x	x
55	Isovalerate		x		x	x	x	x
56	3-hydroxyisovalerate						x	x
57	Total lipids		x	x	x	x	x	x
58	Gamma-aminobutyric (GABA)	acid	x	x	x	x	x	x
59	Ketoisovalerate		x		x	x	x	x
60	Acetone		x		x		x	x

x: indicate the presence of the metabolite.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde / Programa de Pós-graduação
em Ciências da Nutrição
Pesquisador (a): Giuliane Moura Andrade
Orientador: Prof^o. Dr^o. Fillipe de Oliveira Pereira

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) PARTICIPANTE DA PESQUISA,

Os pesquisadores **Prof^o. Dr^o. Fillipe de Oliveira Pereira e Giuliane Moura Andrade** convidam você a participar da pesquisa intitulada “Avaliação do potencial prebiótico de cogumelo *Pleurotus djamor* em fermentação colônica *in vitro*”. Para tanto você precisará assinar esse TCLE que visa assegurar a proteção, a autonomia e o respeito aos participantes desta pesquisa em todas as suas dimensões: física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e/ou espiritual – e que a estruturação, o conteúdo e forma de obtenção dele observam as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos preconizadas pela Resolução 466/2012 e/ou Resolução 510/2016, do Conselho Nacional de Saúde e Ministério da Saúde.

Sua decisão de participar neste estudo deve ser voluntária e ela não resultará em nenhum custo ou ônus financeiro para você, nem sofrerá nenhum tipo de prejuízo ou punição caso decida não participar desta pesquisa, ou desistir de participar em qualquer uma das etapas. Todos os dados e informações fornecidos por você serão tratados de forma anônima/sigilosa, não permitindo a sua identificação durante a pesquisa e / ou quando da publicação dos resultados em meios científicos.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar as propriedades prebióticas de cogumelos da espécie *Pleurotus djamor* por meio da determinação dos seus efeitos *in vitro* sobre o crescimento e aspectos relacionados à atividade metabólica de diferentes cepas probióticas, bem como os seus efeitos moduladores sobre a microbiota intestinal humana em sistema de fermentação colônica *in vitro*. Trata-se de uma pesquisa de laboratório, onde será realizada uma fermentação colônica *in vitro* (com inóculo fecal humano) por 48h utilizando a fração pré-

digerida do cogumelo, sendo acompanhados durante a fermentação alguns compostos e grupos bacterianos encontrados como parte da microbiota intestinal humana para determinação de índice prebiótico.

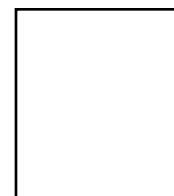
Informamos ainda que essa pesquisa oferece risco mínimo previsível ou imprevisível, para a sua saúde, relacionados ao seu deslocamento, caso necessário. Bem como, mesmo sendo orientados a coleta e manuseio das amostras fecais de forma segura e asséptica, poderá ocorrer algum desconforto quanto a esse procedimento.

A realização da pesquisa possibilitará identificar efeitos benéficos promotores de saúde a partir do consumo de cogumelo comestível das espécies estudadas, gerando informações de interesse para elaboração de novos ingredientes funcionais, aspecto de corrente interesse ao campo científico, a indústria alimentícia e a comunidade que busca o consumo de uma alimentação mais saudável.

Em virtude de que este TCLE se encontra em mais de uma página, as demais serão rubricadas pelo pesquisador e sujeito da pesquisa. Solicitamos a sua colaboração para realizar a doação de material fecal, o qual será colhido no referido dia e armazenado em frasco anaeróbio cedido pelos envolvidos na pesquisa, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e, eventualmente, publicação em revista científica. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa



Assinatura da Testemunha

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DE COGUMELOS (*Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor*) EM FERMENTAÇÃO COLÔNICA IN VITRO

Pesquisador: GIULIANE MOURA ANDRADE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68322923.2.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.033.148

Apresentação do Projeto:

Nos últimos anos, com o aumento da população mundial e o estresse do estilo de vida moderno associado, houve um sério impacto a saúde das pessoas, que se tornam cada vez mais conscientes da necessidade de uma alimentação nutritiva e equilibrada, que agreguem benefícios a saúde. O que tem levado a uma crescente demanda por novos ingredientes naturais e alimentos com essa finalidade. Muitos estudos tem demonstrado que alguns compostos dos alimentos apresentam atividade significativa na manutenção da saúde e prevenção de algumas doenças (YIN et al., 2021).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O presente estudo tem como objetivo avaliar as propriedades prebióticas dos cogumelos das espécies *P. ostreatus* e *P. djamor*.

Objetivo Secundário: Determinação dos efeitos in vitro de ambas as espécies de cogumelos comestíveis no crescimento e aspectos relacionados à atividade metabólica de diferentes cepas probióticas, bem como os seus efeitos moduladores sobre a microbiota intestinal humana em sistema de fermentação colônica in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os aspectos de riscos e benefícios foram devidamente considerados pela pesquisadora.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de caráter científico relevante.

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 6.033.148

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta de pesquisa está em conformidade com as recomendações deste CEP.

Recomendações:

Recomendamos a aprovação da proposta pelo colegiado deste CEP.

Sugerimos definir a faixa etária dos participantes de "18 a 39 anos de idade" para 20 a 39 anos de idade, para evitar envolver adolescentes entre os participantes, e prescindir de TALE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a registrar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2051287.pdf	29/03/2023 09:00:18		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Giuliane.pdf	27/03/2023 10:36:40	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito
Outros	Certidao_de_aprovacao.pdf	13/03/2023 15:11:05	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	13/03/2023 15:05:01	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	13/03/2023 15:04:21	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_GIULIANE_MOURA.pdf	13/03/2023 15:02:18	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	07/03/2023 16:29:40	GIULIANE MOURA ANDRADE	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)32 16-7791

Fax: (83)32 16-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB



Continuação do Parecer: 6.033.148

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 02 de Maio de 2023

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: Prédio do CCS UFPB - 1º Andar

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br