



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

ANA VERENA VIANA DOS SANTOS

ANÁLISE QUALITATIVA DO PERFIL QUÍMICO DE *Coffea arabica*
ENRIQUECIDO COM CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO
DE *Hericium erinaceus*

Salvador

2025

ANA VERENA VIANA DOS SANTOS

**ANÁLISE QUALITATIVA DO PERFIL QUÍMICO DE *Coffea arabica*
ENRIQUECIDO COM CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Hericium
erinaceus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rafael Lenz

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Souza dos Santos

Linha de Pesquisa: 1 – Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB
Bibliotecária: Célia Maria da Costa CRB: 5/918

S237a Santos, Ana Verena Viana dos

Análise qualitativa do perfil químico de *Coffea arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *Hericium erinaceus* / Ana Verena Viana dos Santos. – Salvador, 2025.

109 f. : il.

Orientador: Alexandre Rafael Lenz.

Coorientador: Gustavo Souza dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação Stricto Senso em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, Campus I. 2025.

Contém referências e anexos.

1. *Coffea arabica*. 2. Cogumelos – Uso terapêutico. 3. Compostos químicos. 4. Cromatografia. 5. Metabolômica. 6. Ressonância magnética nuclear. I. Alexandre Rafael. II. Santos, Gustavo Souza dos. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

CDD: 635.8


FOLHA DE APROVAÇÃO


ANÁLISE QUALITATIVA DO PERFIL QUÍMICO DE *Coffea arabica* ENRIQUECIDO COM CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE *Hericium erinaceus*

Ana Verena Viana dos Santos

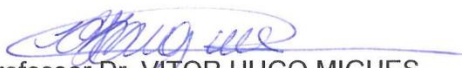
Linha I – Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), em 12 de Setembro de 2025, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Professor Dr. ALEXANDRE RAFAEL LENZ
Universidade do Estado da Bahia – UNEB/PPGFARMA
Doutorado em Biotecnologia
Universidade de Caxias do Sul

Documento assinado digitalmente
 GUSTAVO SOUZA DOS SANTOS
Data: 22/09/2025 12:57:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professor Dr. GUSTAVO SOUZA DOS SANTOS
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Doutorado em Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo


Professor Dr. VITOR HUGO MIGUES
Universidade do Estado da Bahia – UNEB/PGQA
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 ALEX GRAÇA CONTATO
Data: 18/09/2025 12:15:18-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professor Dr. ALEX GRAÇA CONTATO/ FMRP
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ
Doutorado em Bioquímica
Universidade de São Paulo

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos, cujo apoio e incentivo foram fundamentais para a realização desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Para honra e glória de Deus.

A Ana Verena de 2018, entrando na faculdade de Farmácia, nunca imaginaria que a Ana Verena de 2025 estaria recebendo seu título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Eu não conhecia o MUNDO da pesquisa – Sim, MUNDO, em caixa alta, por que é maior do que eu imaginava –. Mas esses 2 anos intensos, de choros, alegrias, desafios vencidos, me moldaram, como pessoa e como profissional. E, todos esses feitos, é para honra de glória de Deus. Foi Ele que me sustentou e me fez chegar até aqui. E sou imensamente grata a Ele.

E, “assim como o trigo moído se torna farinha, a uva pisada se transforma em vinho e a azeitona prensada dá origem ao azeite”, entendo que o processo não destrói, mas revela a essência em uma nova forma. Cada obstáculo, aprendizado e superação foram parte dessa transformação, permitindo-me chegar até aqui com mais conhecimento, maturidade e gratidão.

À minha família — meus pais, Maria José Santos Viana e José Viana dos Santos, meu esposo, Gabriel Ramos Brito, minhas irmãs, Taila Verena Viana dos Santos e Raquel Viana dos Santos, meus cunhados, meus sobrinhos, meus sogros, meus amigos e todos que estiveram ao meu lado — minha eterna gratidão. Nos momentos de incerteza, vocês foram meu refúgio; nas conquistas, minha maior celebração. Obrigada por acreditarem em mim, por me impulsionarem e por serem minha base e minha inspiração. Sei que cada etapa desta jornada foi possível graças ao amor, ao apoio incondicional e à força de vocês. A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa trajetória, meu mais sincero agradecimento. Sem vocês, este momento não seria possível.

Àqueles que guiaram este trabalho, meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Rafael Lenz, e meu coorientador, Prof. Dr. Gustavo Souza dos Santos, expressei minha gratidão. O compromisso com a excelência acadêmica, a paciência e o olhar atento enriqueceram cada etapa deste estudo e contribuíram imensamente para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas de mestrado, sou grata não apenas pelo compartilhamento de conhecimento, mas também pela parceria e pelo apoio ao longo dessa caminhada, especialmente a amiga que o mestrado me deu, Keila Almeida, foram muitas madrugadas compartilhadas, trocas de experiências, e desafios superados. Os momentos de aprendizado tornaram essa jornada mais leve e significativa.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA) da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Departamento de Ciências da Vida I (DCV-I), expressei minha sincera gratidão pelo suporte acadêmico e institucional, pelas

oportunidades de aprendizado e pelo ambiente inspirador que contribuiu para minha formação. Cada aula, cada discussão e cada experiência vivida nesse espaço foram essenciais para a construção deste trabalho.

Epígrafe

“Ebenézer! Até aqui me ajudou o Senhor.”

1 Samuel 7:12

RESUMO

O café é amplamente consumido em todo o mundo e reconhecido por seus compostos bioativos de ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. Em paralelo, o cogumelo medicinal *Hericiium erinaceus* apresenta metabólitos de relevância nutricional e farmacológica, como polissacarídeos (β -glucanas) e terpenoides, com potenciais efeitos imunomodulatórios e cognitivos. A combinação desses dois produtos naturais surge como estratégia promissora para o desenvolvimento de bebidas funcionais, mas carece de estudos científicos que validem sua viabilidade química e tecnológica. Nesta dissertação, investigou-se o perfil metabólico de *Coffea arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *H. erinaceus* em condições que simulam o preparo doméstico. Para isso, foram utilizadas abordagens analíticas complementares: espectroscopia de RMN de ^1H , cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), redes moleculares e análises multivariadas. Os resultados revelaram a presença de metabólitos bioativos provenientes de ambas as matrizes, incluindo cafeína, diterpenos (cafestol e kahweol), fitoesteróis, ácidos graxos e β -glucanas. Embora compostos neurotróficos clássicos do cogumelo, como hericenonas, não tenham sido detectados nas condições de extração avaliadas, a detecção de β -glucanas, promissores para modulação imunológica, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais, e de outros constituintes com propriedades funcionais, reforça o potencial do *blend*. As análises quimiométricas demonstraram que a temperatura de preparo influencia a composição química final, alterando a abundância relativa de metabólitos-chave, em especial a cafeína, o que confere ao modo de preparo doméstico um impacto direto na assinatura metabólica da bebida. Assim, este trabalho representa um passo inicial para a validação científica de cafés enriquecidos com cogumelos medicinais, oferecendo subsídios para futuras investigações sobre eficiência de extração, quantificação, biodisponibilidade e sinergismo dos compostos, além de abrir perspectivas para inovação no setor de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Palavras-chave: *Hericiium erinaceus*; *Coffea arabica*; Compostos químicos; RMN ^1H ; Análises Cromatográficas; Metabolômica.

ABSTRACT

Coffee is widely consumed worldwide and recognized for its bioactive compounds with antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective actions. In parallel, the medicinal mushroom *Hericium erinaceus* contains nutritionally and pharmacologically relevant metabolites, such as polysaccharides (β -glucans) and terpenoids, with potential immunomodulatory and cognitive effects. The combination of these two natural products emerges as a promising strategy for the development of functional beverages, though scientific studies validating their chemical and technological viability are lacking. In this dissertation, the metabolic profile of *Coffea arabica* enriched with fruiting bodies of *H. erinaceus* was investigated under conditions simulating home preparation. Complementary analytical approaches were used: ^1H NMR spectroscopy, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), molecular networks, and multivariate analyses. The results revealed the presence of bioactive metabolites from both matrices, including caffeine, diterpenes (cafestol and kahweol), phytosterols, fatty acids, and β -glucans. Although classic neurotrophic compounds from the mushroom, such as hericenones, were not detected under the evaluated extraction conditions, the detection of β -glucans—promising for immunomodulation, antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor effects—and other constituents with functional properties, reinforces the potential of the *blend*. Chemometric analyses demonstrated that the preparation temperature influences the final chemical composition, altering the relative abundance of key metabolites, particularly caffeine, which gives home preparation methods a direct impact on the metabolic signature of the beverage. Thus, this work represents an initial step towards the scientific validation of coffee enriched with medicinal mushrooms, providing insights for future investigations on extraction efficiency, quantification, bioavailability, and compound synergy, while opening perspectives for innovation in the functional foods and nutraceuticals sector.

Keywords: *Hericium erinaceus*; *Coffea arabica*; Chemical compounds; ^1H NMR; Chromatographic analysis; Metabolomics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CSV	<i>Comma-Separated Values</i> , Valores Separados por Vírgula
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> , Rede Social Molecular de Produtos Naturais Globais
Hx	Hexano
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , União Internacional de Química Pura e Aplicada
MMSE	Mini Exame do Estado Mental (do inglês, <i>Mini mental state examination</i>)
MeOH	Metanol
NF- κ B	Fator Nuclear-KB
OPLS-DA	Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS	Análise por Mínimos Quadrados Parciais
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling by Class Analogy</i> , Modelagem Independente Suave por Analogia de Classe
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
XLSX	Planilha do Microsoft Excel Open XML

LISTA DE FIGURAS, TABELAS, GRÁFICOS E QUADROS

Figura 1. Estruturas moleculares dos compostos bioativos do café.	18
Figura 2. Característica macroscópica do cogumelo <i>H. erinaceus</i> e sua divisão estrutural. <i>Fruiting Body</i> (Corpo de frutificação), <i>Mycelium</i> (Micélio).	21
Figura 3. Estruturas moleculares de hericenonas reportadas em literatura.	23
Figura 4. Modelos multivariados de análise estatística e suas aplicabilidades	34
Figura 5. Método de preparo dos extratos orgânicos.....	38
Figura 6. Método de preparo de extratos aquosos	39
Gráfico 1. Consumo de café de acordo com as regiões do Brasil	17
Quadro 1 - Compostos bioativos comumente encontrados em corpos de frutificação do <i>H. erinaceus</i>	26

CAPÍTULO I. Caracterização química de *Coffea arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *Hericiium erinaceus*: influência da temperatura de extração revelada por CG-EM e análise multivariada

Figura 1. Análises estatísticas realizadas para as amostras de blend extraídos a temperaturas de 94 ± 2 °C (RBA94) e água fervente (RBAF). Em A OPLS-DA Score-plot evidenciando a clara separação entre os grupos RBA94 e RBAF. B VIP scores discriminando os metabólitos responsáveis pela separação das amostras. C S-plot corroborando com os resultados obtidos em B.....	43
Figura 2. Diagramas de caixa representando a abundância relativa (área dos picos) dos metabólitos da cafeína 28.34_0 (A), 28.85_0 (B) e 29.28_0 (C) nas amostras RBA94 (vermelho) e RBAF (verde), apresentados em concentrações originais (esquerda) e normalizadas (direita). As linhas centrais indicam a mediana, os losangos amarelos representam a média e os pontos pretos correspondem às réplicas biológicas.....	44
Figura 3. Rede molecular gerada no GNPS a partir dos espectros de MS dos <i>blends</i> obtidos com água fervente (RBAF, azul) e a 94 ± 2 °C (RBA94, verde). Foram destacados <i>clusters</i> que permitiram a anotação de compostos relevantes, incluindo ácidos graxos (ácido palmítico e ácido esteárico), derivados (palmitato de metila), hidrocarboneto (undecano) e alcaloide (cafeína). Observa-se a presença de metabólitos comuns a ambos os métodos de extração, bem como variações qualitativas no perfil químico em função da temperatura.....	45
Tabela 1. Compostos identificados através de análise cromatográfica das amostras RBAF e RBA94. FM: Fórmula Molecular. RT: Tempo de Retenção / NIST: National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). *Cosine abaix da referência (≥ 7) mas considerado devido a alta similaridade NIST.....	42

Capítulo II. Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in *Hericiium erinaceus*-Enriched Coffee

Figure 1. ¹ H-NMR spectra of RJ+Hx-Rn hexane extract from <i>H. erinaceus</i>	80
Figure 2. ¹ H-NMR spectra of RJ+MeOH-Rn methanol extract from <i>H. erinaceus</i>	80
Figure 3. ¹ H-NMR spectra of Rc+Hx-Rn hexane extract from <i>C. arabica</i>	81
Figure 4. ¹ H-NMR spectra of Rc+MeOH-Rn methanol extract from <i>C. arabica</i>	81
Figure 5. ¹ H-NMR spectra of RJ+A94-Rn and RJ+AF-Rn aqueous extracts from <i>H. erinaceus</i>	82
Figure 6. (A) ¹ H-NMR spectra of aqueous extracts from <i>H. erinaceus</i> (RJ+A94-Rn and RJ+AF-Rn) and <i>H. erinaceus</i> - <i>C. arabica</i> blends (RB+AF-Rn and RB+A94-Rn). (B) Regions highlighting similarities in ¹ H NMR spectra of <i>H. erinaceus</i> aqueous extracts. (C) Regions corresponding to characteristic coffee signals present in the blends.....	82
Figure 7. Key bioactive compounds from <i>H. erinaceus</i> - <i>C. arabica</i> blends (RB+AF-Rn and RB+A94-Rn). (A) β-glucan. (B) Erythritol. (C) Caffeine. (D) Cafestol. (E) Kahweol. (F) β-sitosterol. (G) Stigmasterol. (H) Campesterol.....	83
Figure 8. (A) PCA score plot (PC1–PC2) of the ¹ H NMR aqueous extract profiles (RB+A94-Rn and RB+AF-Rn) of the blend. (B) VIP score plot (OPLS-DA) highlighting the variables most relevant for distinguishing between RB+A94-Rn and RB+AF-Rn samples.....	83
Table 1. Summary of extract samples analyzed in the study. Rc = <i>C. arabica</i> ; RJ = <i>H. erinaceus</i> ; RB = Blend of <i>C. arabica</i> and <i>H. erinaceus</i> ; Hx = hexane; MeOH = methanol; A94 = aqueous extraction at 94 ± 2 °C; AF = aqueous extraction with boiling water. Each condition was prepared in triplicate, denoted as Rn, where n = 1,2,3.....	54
Supplementary Material.....	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
1.2.1 <i>Coffea arabica</i>	16
1.2.2 <i>Hericiium erinaceus</i>	20
1.3 TRABALHOS CORRELATOS	29
1.4 TÉCNICAS DE ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO	30
1.4.1 Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	30
1.4.2 Análise de RMN ¹ H.....	31
1.4.3 Metabolômica e Análise Multivariada de OPLS-DA	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 MATERIAIS	36
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS	37
3.2.1 Extratos Orgânicos.....	37
3.2.2 Extratos Aquosos	38
CAPÍTULO I. Caracterização química de <i>Coffea arabica</i> enriquecido com corpos de frutificação de <i>Hericiium erinaceus</i> : influência da temperatura de extração revelada por CG-EM e análise multivariada	40
CAPÍTULO II. Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in <i>Hericiium erinaceus</i> -Enriched Coffee	60
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS I. Comprovante de Submissão do Artigo	107

1 INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) registrou em 2024 um aumento no consumo interno de café de 1,11%. O produto está presente em 98% dos lares brasileiros, com um consumo médio de 1.430 xícaras por ano. O Brasil mantém-se como o maior consumidor de café produzido no próprio território, destacando-se a região Sudeste, responsável por 41,7% do consumo total.

A nível mundial, constatou-se que:

O consumo de café em nível mundial atingiu o volume físico equivalente a 177 milhões de sacas de 60 kg [...]. Tal performance representou um ligeiro acréscimo de 2,25% em relação ao mesmo período anterior [...] a produção mundial teve um ligeiro crescimento de 5,82%, ao passar de 168,2 milhões de sacas para 178 milhões de sacas. [...] (Embrapa, 2024)

O *Coffea arabica* oferece diversos benefícios à saúde, como ação antioxidante, efeito anti-inflamatório, melhora das habilidades cognitivas e de percepção. Seu consumo tem sido associado à redução do risco de doenças neurodegenerativas, com diversas pesquisas apontando suas propriedades neuroprotetoras (Ciaramelli et al., 2019; Socala et al., 2021). Esses efeitos positivos estão relacionados à sua composição rica em compostos bioativos, como alcalóides, terpenos, ácidos clorogênicos et., que contribuem diretamente para essas vantagens à saúde, além de ser valorizado por suas propriedades organolépticas (Poole et al., 2017; Ali et al., 2022).

Aproveitando seus benefícios e versatilidade, o café tem se tornado uma base ideal para a incorporação de ingredientes funcionais, como cogumelos. O *Hericium erinaceus*, de nome popular, juba de leão, em particular, tem ganhado destaque por seu perfil nutricional rico em proteínas, fibras, vitaminas e compostos bioativos. Essas substâncias contribuem para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como demência e disfunção cognitiva, problemas gastrointestinais, reforço da imunidade e até terapias contra o câncer (Ghosh et al., 2021; Urakami, 2021; Hassan et al., 2023; Lu et al., 2020; Valverde et al., 2015).

Enriquecer o café com o *H. erinaceus* pode fornecer uma maneira prática e acessível de incorporar seus nutrientes e propriedades funcionais ao dia a dia. Essa abordagem inovadora pode atrair consumidores que buscam alternativas saudáveis sem abrir mão de hábitos já consolidados, como o consumo diário de café, promovendo assim uma alimentação mais nutritiva e funcional de forma simples e saborosa (Kalla et al., 2024).

Para compreender melhor os benefícios dessa combinação, é essencial caracterizar os compostos bioativos presentes tanto no café quanto no *H. erinaceus*. Nesse contexto, a ressonância magnética nuclear (RMN) se destaca como uma técnica fundamental. Baseada na

interação dos núcleos atômicos com um campo magnético, a RMN permite a elucidação estrutural de compostos químicos. As análises mais comuns envolvem os núcleos de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C), fornecendo informações detalhadas sobre a disposição atômica nas moléculas (Pavia et al., 2010). Esse método é amplamente utilizado na química analítica e orgânica para a identificação estrutural e o estudo de interações químicas, ajudando a entender como os compostos presentes no café e no cogumelo podem atuar sinergicamente para promover benefícios à saúde.

Além disso, a metabolômica tem se consolidado como uma ferramenta fundamental na pesquisa de produtos naturais, possibilitando a identificação de perfis químicos e compostos com potenciais efeitos farmacológicos. A abordagem pode ser direcionada (*targeted*), quando foca em vias metabólicas específicas, ou não direcionada (*non-targeted*), ao explorar todo o espectro metabólico de uma amostra (Santos, 2022). Para isso, são empregadas técnicas como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e RMN.

A interpretação dos dados metabolômicos requer o uso da quimiometria, que emprega modelos estatísticos para organizar e extrair informações relevantes. Entre esses métodos, destaca-se a Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA), que permite diferenciar frações bioativas de componentes inativos, facilitando a priorização de compostos promissores para estudos futuros.

Dessa forma, o avanço das pesquisas em metabolômica e quimiometria vem ampliando o entendimento sobre compostos bioativos, proporcionando novas perspectivas para o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos inovadores.

A integração desses métodos analíticos modernos à pesquisa em alimentos funcionais e nutracêuticos pode acelerar a validação científica desses produtos e ampliar suas aplicações na saúde humana. O incentivo a novas descobertas e investimentos em inovação são essenciais para consolidar o uso de cogumelos e outros compostos naturais como aliados na promoção do bem-estar e na prevenção de doenças.

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente, no Brasil, é possível encontrar a associação do café e cogumelo Juba de Leão em algumas lojas virtuais e casas de produtos naturais, com os seguintes dizeres:

[...]Com torra média, 100% arábica e orgânico, esse café une a energia revitalizante do grão com o sabor incrível do cogumelo juba de leão. Conhecido por seus potenciais benefícios na parte cognitiva, ele ajuda a aumentar a concentração e o foco. Essa mistura poderosa de alimentos milenares é perfeita para quem busca mais energia e bem-estar no dia a dia[...] (Cultiverso, [2017])

[...]Em um mundo onde a concentração é constantemente desafiada, manter o foco

pode ser difícil. O Elixir Mushroom Coffee é infundido com Lion's Mane, um cogumelo conhecido por apoiar a saúde cerebral e melhorar a cognição. Se você precisa de clareza mental para um projeto importante, ou quer apenas se sentir mais afiado durante o dia, este café é o impulso que você precisa[...] (Gaia *Superfoods*, [2023])

A exploração desta associação é escassa, havendo poucos estudos científicos que comprovem tais afirmações, tampouco referente à sua composição química e possíveis ações farmacológicas. Realizando uma busca rápida de patentes no INPI, aplicando-se apenas a palavra-chave “Cogumelo e Café”, foi encontrada uma invenção de identificação PI 0903613-0, com título “Café do tipo cappuccino enriquecido com cogumelo *Agaricus blazei* Murril, depositada no ano de 2009 (Expansão Científica LTDA, 2009).

A formulação foi desenvolvida pela empresa Expansão Científica LTDA EPP, como resultado de um projeto da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº 06/60825-0 intitulado: “Implantação de uma unidade de obtenção de café tipo capuccino enriquecido com cogumelo *Agaricus blazei* Murril”. Na invenção foi destacado que o cogumelo *A. blazei* detém propriedades, como: manter a homeostase, restaurando o balanço orgânico e a resistência natural às doenças, além de ser uma rica fonte de vitaminas, proteínas, carboidratos e fibras, ajudando no fortalecimento do sistema imunológico. A inovação visa a incorporação do cogumelo em um produto com consumo diário e tradicional no Brasil (Expansão Científica LTDA, 2008).

Diante disso, análises experimentais qualitativas da mistura de café com corpos de frutificação do cogumelo *H. erinaceus*, permitiu investigar a viabilidade dessa combinação e a preservação das propriedades químicas do cogumelo em diferentes temperaturas de extração. A motivação central foi avaliar quais os compostos químicos no *blend* são possíveis de encontrar em uma preparação com água em temperaturas de 94 ± 2 °C e fervente, semelhante ao método tradicional de preparo do café. Essa abordagem inovadora combina o potencial funcional dos cogumelos com o apelo sensorial e cultural do café, criando oportunidades para o desenvolvimento de produtos que unam benefícios à saúde e experiência gastronômica.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O café é uma bebida amplamente estudada por seus efeitos benéficos à saúde e mais consumida no mundo. O *C. arabica*, principal espécie cultivada, é valorizado por suas propriedades organolépticas superiores às de outras variedades (Ali et al., 2022). Seu consumo tem sido associado à redução do risco de doenças neurodegenerativas, com diversas pesquisas apontando suas propriedades neuroprotetoras (Ciaramelli et al., 2019; Socala et al., 2021).

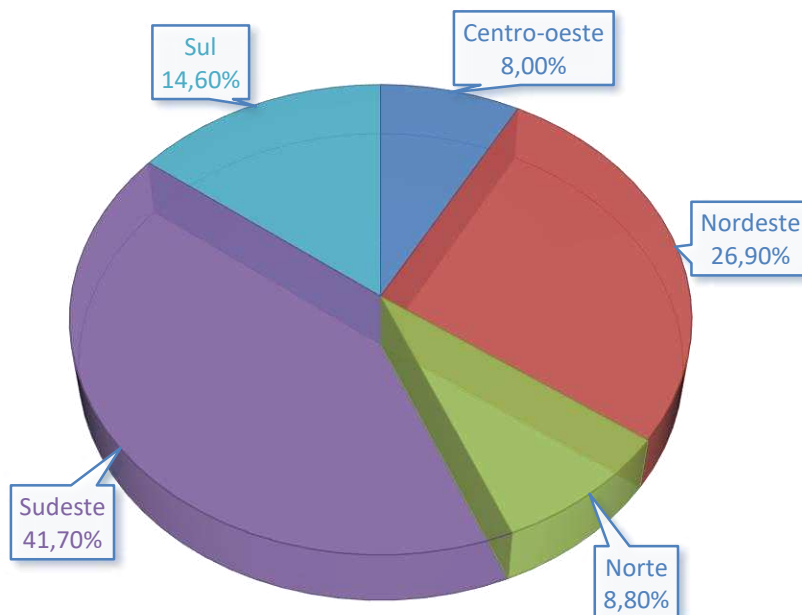
Além do café, outro produto natural amplamente estudado por seus efeitos benéficos à saúde é cogumelo *H. erinaceus*, devido às suas propriedades biológicas, especialmente no contexto de distúrbios neurológicos, como Alzheimer e Parkinson. Sua composição inclui compostos bioativos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), estimulando a atividade do fator de crescimento nervoso (*Nerve Growth Factor* — NGF) e promovendo o crescimento dos axônios e dendritos dos neurônios (Ghosh et al., 2021).

Neste capítulo, serão discutidos os principais aspectos relacionados ao *C. arabica* e ao cogumelo *H. erinaceus*. Primeiramente, serão apresentadas suas características de habitat, formas de obtenção, modos de consumo e composição química. Além disso, serão analisados os estudos científicos que investigaram as possíveis ações farmacológicas desses compostos, destacando seus potenciais benefícios, aplicações terapêuticas e trabalhos correlatos, que destacam o uso do *C. arabica* associado ao cogumelo *H. erinaceus*.

1.2.1 *Coffea arabica*

A ABIC analisou o consumo *per capita* de café no país, que considera a média de consumo por pessoa em um grupo populacional ou área geográfica. De acordo com o estudo, este consumo foi de 5,01 kg de café torrado e moído por habitante ao longo de um ano. Esse dado reforça a importância do mercado interno como o “grande motor de toda a cadeia produtiva cafeeira nacional”. No entanto, é importante destacar que esse consumo pode variar significativamente entre as diferentes regiões do país devido a aspectos culturais, históricos, geografias regionais e fatores de natureza econômica (Innocentini, 2015; Haack et al., 2023).

Historicamente, a cafeicultura se consolidou no Sudeste, especialmente em Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo (Lucena et al., 2021; Oshiiwa et al., 2024), criando uma tradição de consumo local que se mantém até hoje. Além disso, a alta densidade populacional e a urbanização desses estados facilitam o acesso ao produto, ampliando o mercado consumidor. Por outro lado, regiões como Norte e Centro-Oeste apresentam menor tradição cultural no consumo, menor densidade populacional e desafios logísticos (Haack et al., 2023; Alvon et al., 2024), fatores que podem contribuir para seu consumo proporcionalmente mais baixo. Assim, o consumo predominante no Sudeste de 41,7% (Gráfico 1) reflete a interação entre cultura, história, economia e infraestrutura, consolidando a região como o principal polo consumidor de café no país. Esses dados evidenciam não apenas a relevância do café na cultura e na economia brasileiras, mas também consolidam o Brasil como o segundo maior consumidor da bebida do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, e como principal consumidor do café produzido internamente (ABIC, 2024).

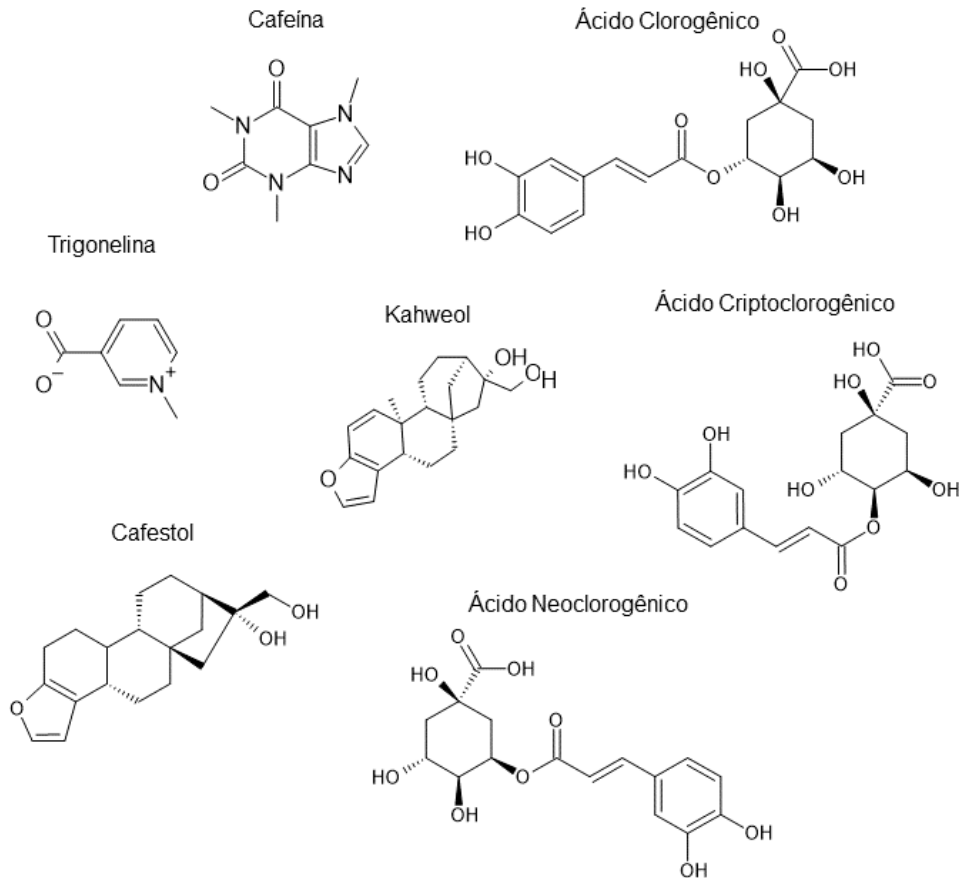
Gráfico 1 - Consumo de Café de acordo com as regiões do Brasil

Fonte: ABIC, 2024.

O café, da espécie *C. arabica*, é obtido a partir da fruta vermelha ácida do cafeeiro perene, o qual é considerado de alta qualidade, com características como baixo amargor e aroma intenso. Pode ser considerada uma bebida universal, farmacologicamente ativa e amplamente consumida em todo o mundo. Sendo conhecida por seus efeitos psicoestimulantes, sabor e aroma, e por suas propriedades benéficas à saúde. Sua composição é complexa e engloba diferentes constituintes bioativos, porém esta vai variar de acordo com a espécie, condições de preparo e moagem do café, o que determina, também, a disponibilidade destes compostos (Socala et al., 2020; Doepker et al., 2022).

Sua composição bioativa inclui, principalmente, cafeína, teofilina, teobromina, polifenóis (como ácidos clorogênicos e seus derivados), diterpenos (cafestol e kahweol), flavonoides, lactonas, trigonelina, ácido nicotínico, entre outros nutrientes (Figura 1) (Angeloni et al., 2019). Estes, responsáveis por promover efeito anti- inflamatório, antioxidante, melhoria de atividade cardiovascular, neurocognição, etc. (Ali et al., 2022; Kala et al., 2024).

Wasim et al. (2020) trazem uma abordagem sobre os aspectos neuroprotetores e neurodegenerativos do café e seus princípios ativos na visão da literatura científica. O estudo retrata que o café, quando consumido de forma moderada, tem potencial em diminuir o risco de declínio neurocognitivo, mas traz à evidência, também, que em altas doses, pode estar associado a efeitos, como nervosismo, palpitações e insônia.

Figura 1 - Estruturas moleculares dos compostos bioativos do café.

Fonte: Adaptado de Socala et al., 2020.

A cafeína, um alcaloide pertencente à família das metilxantinas, é o principal componente psicoativo presente no café. Esse composto bioativo exerce efeitos estimulantes, melhorando o humor, o estado de alerta e o tempo de reação. Devido à sua capacidade de atravessar facilmente a BHE, a cafeína pode atuar em múltiplos alvos, desencadeando uma série de efeitos farmacológicos. Estudos indicam que ela é responsável por grande parte das respostas biológicas associadas ao consumo de café. No entanto, outras pesquisas sugerem que os efeitos farmacológicos da bebida resultam da ação combinada de seus diversos compostos, que atuam de forma sinérgica (Wu et al., 2017; Ruggiero et al., 2022).

Devido à riqueza em polifenóis, em associação com a cafeína, seu consumo moderado pode ter efeitos benéficos à saúde, além de estudos sugerirem impacto neuroprotetor preventivo a condições neurodegenerativas, o que corrobora para o cenário de possíveis tratamentos nutracêuticos utilizando o café, associado ou em combinação com outros compostos (Ciaramelli, et al., 2019; Porro et al., 2024).

Já que se trata de uma medida econômica e atraente, o uso do café como potencial nutracêutico, ou como adjuvante, pode contribuir com a diminuição do consumo de

medicamentos e maior ingestão de produtos naturais, promovendo a saúde e diminuindo os efeitos adversos associados a terapias medicamentosas convencionais (Ciaramelli, et al., 2019; Porro et al., 2024).

Ao longo dos anos surgiram dúvidas sobre o impacto do café na saúde humana, a respeito do seu consumo excessivo, seus benefícios e malefícios. Estudos científicos comprovaram que o efeito benéfico do consumo moderado do café supera os riscos. Logo, este pode ser um potencial alimento funcional, além de proporcionar ação frente à diversas patologias, como as doenças neurológicas (Pourshahidi, et al., 2016; Ciaramelli, et al., 2019).

Tratando-se de benefícios e riscos sobre o consumo do café, um estudo de quase meio milhão de participantes (468.629), com idade média de $56,2 \pm 8,1$ anos, 77,9% consumiam café diariamente, e 58,5% consumiam em torno de 0,5 a 3 xícaras por dia. Este estudo trouxe dados importantes sobre a associação da ingestão regular de café com eventos cardiovasculares, mortalidade por todas as causas (ou seja, o número de mortes em uma população, em certo período de tempo, sem considerar a causa) e alterações estruturais e funções cardíacas. Como resultados sugeriram que este consumo é seguro, apesar da alta ingestão diária de café, esta não foi relacionada a eventos adversos cardiovasculares e, sim, ao menor risco de mortalidade por todas as causas (Simon et al., 2022).

Moreira et al. (2013) avaliou as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dos extratos aquosos de grãos de café torrados e verdes. Como resultado, sugeriram que estes extratos apresentaram considerável ação anti-inflamatória, podendo o seu mecanismo estar ligado à presença de flavonoides e antioxidantes na espécie, sendo o melhor o extrato de café verde, em comparação com o café torrado, já que a torrefação pode interferir na composição polifenólica do café. Com isso, podendo ter considerável valor terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias.

Um estudo preliminar buscou avaliar o efeito do *C. arabica* na neuroproteção de acidente vascular cerebral (AVC) induzido experimentalmente em ratos. Foram utilizadas doses de 100 mg e 200 mg/kg. Concluiu-se que o *C. arabica* atua na ativação da dissolução de coágulos sanguíneos e recuperação de AVC, sendo eficaz na indução da atividade cerebral com poucos efeitos colaterais e modificações no comportamento, visto que sua composição bioativa protege as células neurais, sendo apreciado no desenvolvimento de mais estudos avaliativos de suas potencialidades farmacológicas (Khanum et al., 2020).

Ainda há muito a ser explorado quando o assunto é mecanismo de ação do café, como cada um dos seus componentes podem afetar a saúde neural, já que possuem propriedades

únicas e podem desencadear diferentes efeitos. É necessário maiores detalhes e uma análise aprofundada das variáveis nos estudos científicos, como tipo do café, tempo de consumo, método de preparo, os padrões de tamanho da porção de café, estilo de vida e dieta dos participantes (Wu et al., 2017).

1.2.2 *Hericiium erinaceus*

Estima-se que existam entre 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos descritas globalmente. No entanto, esse número pode ser ainda maior, considerando a existência de habitats pouco explorados e espécies que aguardam reconhecimento formal, o que sugere um potencial vasto e ainda desconhecido dentro do reino Fungi (Hawksworth et al., 2017).

Dentro desse vasto universo de fungos, os macrofungos, popularmente conhecidos como cogumelos, destacam-se por suas propriedades nutricionais e bioativas. Eles são fontes ricas em proteínas, fibras alimentares, vitaminas e compostos bioativos, que apresentam potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas, distúrbios gastrointestinais, fortalecimento do sistema imunológico e terapias anticâncer (Shamim et al., 2023).

Além dos benefícios à saúde, os cogumelos possuem baixo teor calórico de colesterol, lipídios e sódio, tornando-se ingredientes promissores para o desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos (Valverde et al., 2015; Lu et al., 2020; Hassan et al., 2023). Dessa forma, além de sua importância ecológica e taxonômica, os macrofungos apresentam um grande potencial para aplicações na saúde e na indústria alimentícia, reforçando seu valor tanto na pesquisa científica quanto na inovação de produtos.

Esse crescente interesse pelos cogumelos no Brasil reflete uma mudança nos hábitos alimentares da população, que busca opções mais saudáveis e funcionais. Enquanto países asiáticos, como a China, possuem uma longa tradição no consumo e cultivo desses macrofungos, no Brasil, a demanda tem aumentado progressivamente. A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) destacou que:

[...] o consumo de cogumelos no Brasil passou de 30 g per capita na década de 1990 para 210 g em 2017. Atualmente o mercado nacional de cogumelos movimenta mais de 1 bilhão de reais, emprega mais de 50 mil pessoas e possui grande potencial de expansão, pois ainda é necessária a importação de 20 mil toneladas para atender à demanda interna de 42 mil toneladas do produto [...]

É um segmento que pode ser bem lucrativo, ainda mais para agricultura familiar, pois possui alta rentabilidade, alta disponibilidade de insumos, além de serem associados com hortas orgânicas, e utilizados como substratos para produção de mudas, e até mesmo para biorremediação de solos contaminados. Mas, paralelo a isto, tem-se as dificuldades referentes

à sensibilidade do fungo a fatores ambientais, além da falta de tecnologia, de promoção de consumo e de capacitação profissional dos produtores e a perecibilidade do produto, necessitando de uma logística de distribuição eficiente (Capra et al., 2019; Rodrigues et al., 2022).

Rai et al. (2021) retratam em sua revisão que o consumo regular de cogumelos pode potencializar as respostas imunológicas em humanos, devido à sua composição química, que inclui potentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, imunomoduladoras e antimicrobianas. Neste estudo, destacou-se as características associadas à sua atividade nutracêutica, e como contribui para a prevenção da progressão de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e Esclerose Múltipla. Um exemplo de cogumelo citado é o *H. erinaceus*, que possui atividades neuroprotetoras, resultantes de sua composição química, capaz de estimular a regeneração e o crescimento das células nervosas, melhorando as funções cognitivas.

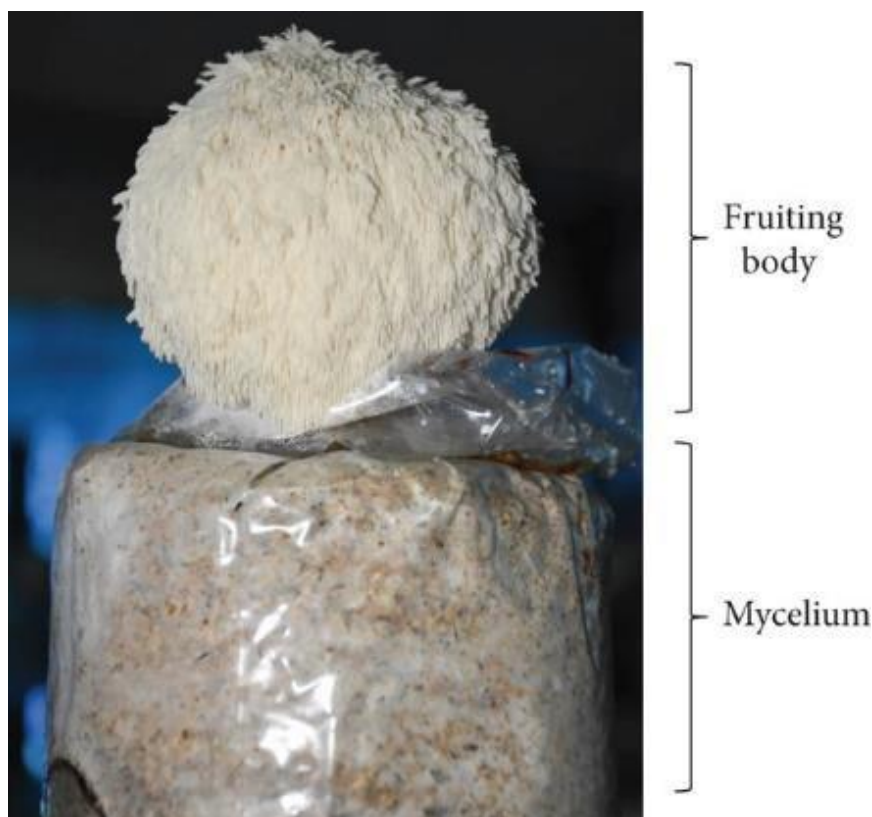
O *H. erinaceus* é um cogumelo medicinal e culinário, amplamente reconhecido como um alimento funcional devido ao seu elevado teor de fibras e aminoácidos essenciais. Pertencente à família *Hericiaceae*, é comum nos países do Leste Asiático. Este cogumelo é classificado como saprófito ou parasita fraco, pois se desenvolve principalmente em árvores de folhas largas, mortas ou em decomposição (Chaiyasut et al., 2017).

Em termos morfológicos, como ilustrado na Figura 2, o *H. erinaceus* apresenta um corpo frutífero maduro, carnudo e semiesférico, com coloração esbranquiçada. Devido a essas características, é popularmente conhecido por nomes como Juba de Leão, Barba Branca, Barba de Velho e Cabeça de Urso. Sua cor pode variar do branco ao acastanhado-marrom, sendo essa variação diretamente relacionada à sua idade (He et al., 2017).

O Juba de Leão, é um dos cinco cogumelos mais consumidos no mundo. O Japão lidera a produção dessa espécie, seguido pela China e pela Coreia do Sul. Os países asiáticos são, de fato, os maiores consumidores de cogumelos, que são componentes típicos das suas culinárias locais. Apesar de sua popularidade, o *H. erinaceus* é mais comumente cultivado em regiões de clima temperado, que oferecem as condições ideais para o crescimento de seus corpos frutíferos, os quais requerem temperaturas entre 18 °C e 24 °C para seu desenvolvimento (Chutimanukul et al., 2023).

Figura 2 - Característica macroscópica do cogumelo *H. erinaceus* e sua divisão estrutural. *Fruiting Body* (Corpo

de frutificação), *Mycelium* (Micélio).



Fonte: Li et al., 2018.

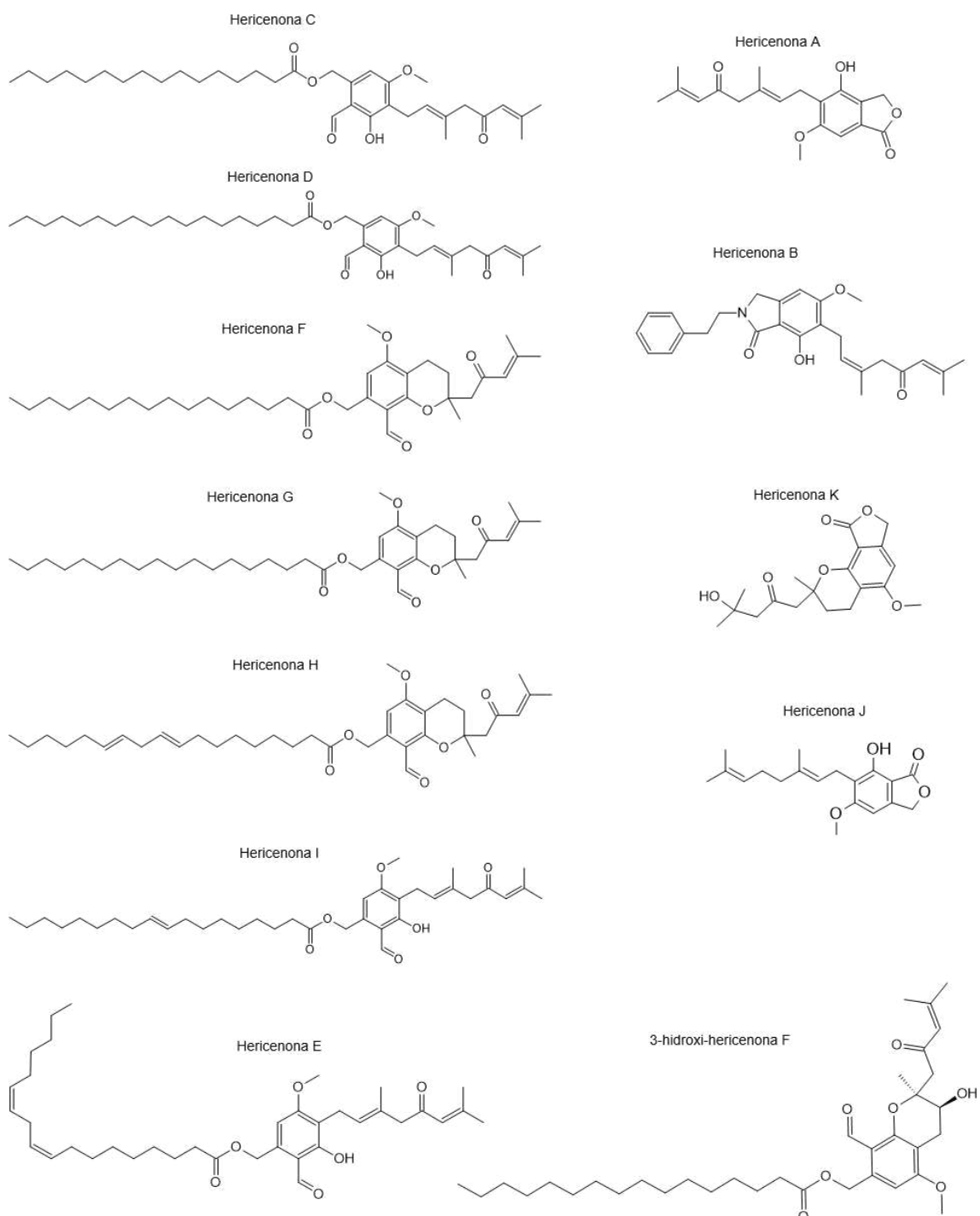
Na China, o *H. erinaceus* tem sido amplamente utilizado devido aos seus efeitos benéficos no sistema gastrointestinal, sendo empregado como suplemento preventivo e terapêutico para doenças crônicas. No Japão, seu uso está mais associado à proteção do sistema nervoso central (SNC). Devido às suas propriedades neuroprotetoras e ao potencial de promoção da saúde cerebral, esse cogumelo tem sido alvo de estudos para o tratamento de doenças neurológicas (Brandalise et al., 2023). Esses efeitos benéficos são atribuídos à presença de compostos bioativos, como as erinacinas e hericenonas, que possuem baixo peso molecular, característica que lhes permite atravessar a BHE. Essas substâncias estimulam a síntese do NGF, promovendo o crescimento de neurites em células nervosas *in vitro* (Li et al., 2020).

Além da atividade neuroprotetora, o *H. erinaceus* apresenta uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo propriedades anti-hiperlipidêmicas, anti-hiperglicêmicas, anticancerígenas, antibacterianas, imunomoduladoras, antioxidantes, anti-osteoporóticas e antidepressivas. Esses benefícios tornaram o cogumelo um alvo promissor para pesquisas científicas e testes *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de desenvolver alimentos funcionais e medicamentos à base desse fungo (Tsai et al., 2021).

Até o momento, foram identificadas aproximadamente 150 pequenas moléculas no *H.*

erinaceus. Entre elas, as hericenonas (Figura 2) e erinacinas se destacam devido às suas atividades neurotróficas e neuroprotetoras. Esses compostos bioativos podem ser encontrados nos corpos de frutificação (hericenonas) e no micélio (erinacinas), incluem ainda esteróides, alcalóides, lactonas e polissacarídeos (β -glucanos) (Gravina et al., 2023). Qiu et al. (2024) resumiram em seu estudo as principais atividades biológicas e os compostos presentes nos corpos de frutificação desse cogumelo (Quadro 1).

Figura 3 - Estruturas moleculares de hericenonas reportadas em literatura.



Fonte: Adaptado de (ChemSpider, 2025)

Dentre essas ações bioativas, destacam-se os efeitos antioxidantes, imunomoduladores, hipoglicêmicos e gastroprotetores, atribuídos principalmente aos polissacarídeos (Sheu et al., 2013; Friedman, 2015). Além disso, as atividades neurotrófica e neuroprotetora do *H. erinaceus* demonstraram, em estudos *in vitro* e *in vivo*, potencial terapêutico para tratamento e prevenção de doenças neurológicas. O cogumelo se mostrou capaz de estimular a expressão e secreção do NGF, essencial para o crescimento, maturação e desenvolvimento dos neurônios colinérgicos (Zhang et al., 2016; Chong et al., 2020).

No campo da oncologia, o *H. erinaceus* tem sido investigado como potencial agente anticancerígeno. Compostos isolados de seus corpos de frutificação, como hericerina A, isohericenona e hericenona J, demonstraram atividade citotóxica contra células de leucemia mielocítica humana (HL-60) (Qiu et al., 2024).

De acordo com os relatos existentes, as erinacinas estão presentes principalmente no micélio do *H. erinaceus*, geralmente na forma de xilosídeos, e algumas delas podem ser convertidas umas nas outras (Qiu et al., 2024). Elas são um dos principais grupos bioativos do cogumelo, os quais têm mostrado grande potencial para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos e neuropatia periférica. Cerca de dezessete (17) erinacinas já foram identificadas (Li et al., 2018; Contato & Conte-Junior, 2025), das quais oito (8) apresentaram atividades neuroprotetoras. Esses compostos pertencem à classe dos diterpenóides e possuem pesos moleculares entre 280 e 360 g/mol (*PubChem*, s/d.; Li et al., 2018).

Outro grupo de compostos bioativos importantes são as hericenonas, encontradas em corpos de frutificação, das quais onze (11) já foram identificadas (Contato & Conte-Junior, 2025). Quatro dessas (C, D, E e H) demonstraram capacidade de estimular a síntese de NGF em estudos com células de astrocitoma de camundongos. Essas substâncias pertencem à classe das lactonas terpênicas, com pesos moleculares variando entre 570 e 600 g/mol (*PubChem*, s/d.; Chong et al., 2020).

Em um estudo clínico randomizado, com 34 participantes, duplo-cego e controlado por placebo, foi avaliada a melhora das funções cognitivas, através do Mini Exame do Estado Mental (do inglês, *Mini mental state examination* - MMSE), realizado por meio de exame oral, de participantes que consumiram suplementos contendo 0,8 g do corpo de frutificação em pó do *H. erinaceus* durante 12 semanas. Os resultados demonstraram que o cogumelo preveniu a deterioração da memória de curto prazo e melhorou as funções cognitivas, atribuindo-se esses efeitos às hericenonas (Saito et al., 2019).

Além dos benefícios cognitivos, a segurança do consumo de *H. erinaceus* também foi

avaliada em um estudo de toxicidade oral subcrônica. O estudo analisou os efeitos tóxicos potenciais do extrato aquoso dos corpos de frutificação do cogumelo em ratas *Sprague Dawley* saudáveis, nulíparas e não prenhes, que receberam doses orais de 250, 500 e 1000 mg/kg de cogumelo diariamente durante 90 dias. Não foram observadas mortalidade ou morbidade em nenhum dos grupos tratados ou controle. Além disso, a administração oral diária do extrato nas três doses não apresentou efeitos adversos sobre o comportamento geral, ganho de peso corporal, parâmetros hematológicos, bioquímicos e pesos relativos dos órgãos. Exames histopatológicos ao final do estudo mostraram uma arquitetura normal dos tecidos, com apenas algumas alterações não relacionadas ao tratamento observadas no fígado, coração e baço. Os achados indicam que a administração oral do extrato é segura até 1000 mg/kg, reforçando que o consumo de *H. erinaceus* é não tóxico (Lakshmanan et al., 2016).

Apesar do vasto potencial nutricional e medicinal deste cogumelo, ainda há desafios em relação ao seu desenvolvimento industrial. A criação de produtos alimentícios e bebidas à base de *H. erinaceus* enfrenta desafios significativos, principalmente relacionados à preservação e estabilidade de seus compostos bioativos. Esses compostos são sensíveis a fatores como temperatura, umidade e exposição à luz, o que pode comprometer sua eficácia durante o processamento e armazenamento dos produtos. Além disso, a variabilidade na composição química devido a diferentes métodos de cultivo e condições ambientais dificulta a padronização dos produtos finais (Menezes, 2017).

Para superar essas limitações, é essencial investir em pesquisas que visem à padronização dos componentes ativos e ao desenvolvimento de tecnologias que garantam a estabilidade e a biodisponibilidade desses compostos bioativos (Qiu et al., 2024). Uma abordagem promissora é a combinação de *H. erinaceus* com outros ingredientes que possam exercer efeitos sinérgicos em atividades biológicas específicas. Por exemplo, a mistura com café, rico em cafeína e antioxidantes, o que poderia potencializar os efeitos neuroprotetores e cognitivos, oferecendo uma alternativa funcional para consumidores que buscam melhorar o desempenho mental. Apesar de seu reconhecido potencial nutricional e funcional, os estudos sobre cogumelos nutracêuticos ainda são escassos (Panda, 2022). A falta de incentivos à pesquisa e à inovação representa um desafio, limitando a disseminação dos benefícios desses recursos naturais nos âmbitos social, científico e econômico.

Quadro 1 - Compostos bioativos comumente encontrados em corpos de frutificação do *H. erinaceus*.

Compostos Bioativos	Atividade Biológica
Polissacarídeos	<p>HEP-I Atividade inibitória significativa contra a hialuronidase</p> <p>HEP-II Atividade inibitória significativa contra hialuronidase</p> <p>HEP-W Atividade antioxidante; Promove atividade fagocítica</p> <p>HEP-S Atividade antioxidante; Aumenta a imunidade</p> <p>HEP-C Atividade antioxidante, inibição da atividade da α-glicosidase e da α-amilase; Atividade hipoglicêmica</p> <p>HEP-A Atividade antioxidante</p> <p>WIP -</p> <p>HEP Atividade antioxidante</p> <p>HEP_N Previne danos causados pelo peróxido de hidrogênio e promove a proliferação celular</p> <p>HEFP_S Induz apoptose de células cancerígenas colorretais</p> <p>HPB-3 Atividade estimulante de macrófagos</p>
Hericenonas	<p>Hericenona A Citotoxicidade em linhas de células de carcinoma</p> <p>Hericenona B Citotoxicidade em linhas de células de carcinoma</p> <p>Hericenona C Estimula a síntese do NGF <i>in vitro</i>, não tóxico para células de carcinoma</p> <p>Hericenona D Estimula a síntese do NGF <i>in vitro</i>, não tóxico para células de carcinoma</p> <p>Hericenona E Estimula a síntese do NGF <i>in vitro</i>, não tóxico para células de carcinoma</p> <p>Hericenona F Estimula a síntese de NGF</p> <p>Hericenona G Estimula a síntese de NGF</p> <p>Hericenona H Estimula a síntese de NGF</p> <p>Hericenona I Nenhum efeito protetor na morte celular dependente do estresse do receptor de estrogênio; Atividade citotóxica contra a linhagem celular Ec109</p> <p>Hericenona J Nenhum efeito protetor na morte celular dependente do estresse do receptor de estrogênio</p> <p>3-hidroxi-hericenona F Protege os neurônios, atividade protetora contra a morte celular neuro2a dependente do estresse do retículo endoplasmático</p> <p>Hericenona L Atividade tóxica contra células Ec109</p> <p>Hericenona K Nenhuma atividade nas células PC12</p>

Continua

Compostos Bioativos		Atividade Biológica
Hericenos	Hericeno A	Atividade inibitória do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e atividade inibitória da α -glicosidase
	Hericeno B	Atividade inibitória do NF- κ B
	Hericeno D	Atividade inibitória do NF- κ B; Atividade antibacteriana fraca <i>in vitro</i> e atividade inibitória de α -glicosidase
Erinacerina	Erinacerina A	-
	Erinacerina B	-
	Erinacerina M	Atividade anticâncer celular <i>in vitro</i>
	Erinacerina N	Atividade anticâncer celular <i>in vitro</i>
Erinaceolactona	Erinaceolactona D	
	Erinaceolactona E	
	Erinaceolactona F	-
	Erinaceolactona G	
	Erinaceolactona H	
Hericerina		Promoção do crescimento axonal em células neuronais N2a e citotoxicidade (HeLa cells, IC ₅₀ : 62.24 μ mol/L)
Isohericerinol A		Estimulador da síntese de NGF
N-de-feniletilisohericerina		Promoção do crescimento axonal em células neuronais N2a e citotoxicidade
Coralocina A		Estimulador da síntese de NGF
4-[3',7'-dimetil-2',6'-octadienil]-2formil-3-hidroxi-5-metoxibenzilálcool		Citotoxicidade (HeLa cells, IC ₅₀ : 4.28 μ mol/L) e atividade inibitória da α -glicosidase
Hericerina A		Citotoxicidade (HeLa cells, IC ₅₀ : 3.06 μ mol/L) e atividade inibitória da α -glicosidase
Isohericenona J		Citotoxicidade (HeLa cells, IC ₅₀ : 59.74 μ mol/L)
Isoericerina		Citotoxicidade (HeLa cells, IC ₅₀ : 5.47 μ mol/L)

Continua

Conclusão

Compostos Bioativos	Atividade Biológica
Erinarol A	Ativou significativamente a atividade transcricional dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) de maneira dose-dependente
Erinarol B	Ativou significativamente a atividade transcricional dos receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) de maneira dose-dependente
Erinarol C	
Erinarol D	-
Erinarol E	
Erinarol F	
Erinarol G	Atividade inibitória moderada da secreção do fator de necrose tumoral α (TNF- α)
Erinarol H	Atividade inibitória moderada da secreção do fator de necrose tumoral α (TNF- α)
Erinarol I	Anti-inflamatório
Erinarol J	Atividade inibitória moderada da secreção do fator de necrose tumoral α (TNF- α)

Fonte: Adaptado de Qiu et al., 2024

1.3 TRABALHOS CORRELATOS

Kalla et al. (2024) avaliaram os efeitos de corpos de frutificação de *H. erinaceus* como aditivo a três tipos de café: instantâneo, café moído e preparado em uma máquina de café disponível em espaços públicos na Polônia. A Tabela 1 apresenta os teores de diferentes minerais e compostos nas bebidas, com e sem a adição do cogumelo.

A adição de *H. erinaceus* ao café resultou em aumentos significativos nas concentrações de ferro, sódio e potássio, especialmente no café preparado tradicionalmente. Isso sugere que o cogumelo pode enriquecer o café com esses minerais, potencialmente oferecendo benefícios adicionais à saúde. O aumento no teor de ferro é particularmente notável, o que pode ser benéfico para indivíduos com deficiências desse mineral (Kalla et al., 2024).

Tabela 1 - Teor de bioelementos dos cafés enriquecidos com *H. erinaceus*

	Café da Máquina (Controle)	Café da máquina com <i>H. erinaceus</i>	Café instantâneo (Controle)	Café instantâneo com <i>H. erinaceus</i>	Café preparado tradicionalmente (Controle)	Café preparado tradicionalmente com <i>H. erinaceus</i>
	mg/200 mL ± SD					
Magnésio	0.0397 ± 0.027	4.25 ± 0.59	1.57 ± 0.11	4.59 ± 0.34	1.77 ± 0.10	5.70 ± 0.43
Zinco	0.196 ± 0.001	0.153 ± 0.011	0.565 ± 0.038	0.253 ± 0.027	1.10 ± 0.07	0.912 ± 0.43
Cobre	0.013 ± 0.001	0.040 ± 0.001	0.018 ± 0.001	0.054 ± 0.009	0.037 ± 0.002	0.072 ± 0.009
Ferro	0.140 ± 0.010	0.424 ± 0.024	0.33 ± 0.01	0.561 ± 0.034	0.767 ± 0.070	0.945 ± 0.079
Sódio	1.32 ± 0.08	3.57 ± 0.26	0.370 ± 0.041	6.14 ± 0.47	1.25 ± 0.16	14.2 ± 0.6
Potássio	2.09 ± 0.14	5.98 ± 0.28	5.27 ± 0.22	6.97 ± 0.37	7.11 ± 0.29	19.3 ± 0.8
Cálcio	0.218 ± 0.014	1.71 ± 0.25	0.408 ± 0.033	2.15 ± 0.09	0.674 ± 0.032	3.44 ± 0.23

Fonte: Adaptado de (Kalla et al., 2024)

O artigo sugere ainda que tanto o café quanto o *H. erinaceus* possuem mecanismos complementares de ação que podem beneficiar a saúde cerebral. O café atua principalmente por meio de seus efeitos antioxidantes e modulação de vias inflamatórias, enquanto o *H. erinaceus* promove a regeneração neuronal e a produção de NGF. Essa combinação pode oferecer uma abordagem promissora para a prevenção e o manejo de doenças neurodegenerativas.

O mesmo estudo também apresenta dados comparativos sobre a atividade antioxidante e os teores de substâncias bioativas nas bebidas enriquecidas com *H. erinaceus*. A atividade antioxidante foi avaliada por métodos como o DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (capacidade de redução do ferro). O café enriquecido com *H. erinaceus* apresentou um aumento significativo na atividade antioxidante em comparação com os controles. Isso indica que o cogumelo contribui para a capacidade do café em neutralizar radicais livres, o que pode ser benéfico para a saúde celular e a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Além disso, o estudo demonstrou que o café enriquecido com *H. erinaceus* apresentou um aumento notável nos teores de polifenóis, flavonoides e ácidos clorogênicos. Esses compostos bioativos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Os autores sugerem que a adição desse cogumelo ao café pode potencializar seus benefícios à saúde.

No entanto, os autores ressaltam a necessidade de mais estudos clínicos e de quantificação de compostos para confirmar a eficácia e a segurança dessas intervenções, bem como para explorar possíveis sinergias entre eles. Mais pesquisas são necessárias para explorar os mecanismos exatos e a eficácia clínica desses efeitos, reforçando a importância de investigações futuras para validar essas descobertas.

1.4 TÉCNICAS DE ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO

Nesta seção serão abordadas as principais técnicas para análise do perfil químico de extratos, detalhando-as em relação aos seus princípios fundamentais, aplicações e contribuições para a identificação de compostos químicos presentes na amostra estudada.

1.4.1 Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

O termo “cromatografia”, derivado das palavras gregas *chrom* (cor) e *grafe* (escrever), surgiu em 1906, quando o botânico Mikhael Semenovich Tswett, através das suas primeiras experiências para separar substâncias coloridas presentes em vegetais, revolucionou a história da química analítica (Altova et al., 2022).

As primeiras experiências com pigmentos de clorofila foram realizadas utilizando uma coluna de vidro preenchida com diversos sólidos finamente divididos, tendo o éter de petróleo como solvente. Após a filtração do extrato de folhas, observou-se a separação de diferentes colorações à medida que o extrato migrava pela coluna. Esses experimentos, conduzidos por Tswett, marcaram o início do desenvolvimento de outros tipos de cromatografia e o aprimoramento de técnicas mais robustas e sofisticadas. Hoje, essas metodologias são

amplamente aplicadas em laboratórios, indústrias farmacêuticas e químicas, além de áreas médicas, entre outras (Collins et al., 2006).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (2019) a cromatografia é definida por “Um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida”.

A cromatografia é um método analítico de identificação e quantificação de compostos químicos. A migração que estes componentes fazem no decorrer da corrida cromatográfica é diferencial, retendo-os em tempos distintos, obtendo-se sinais detectados e traduzidos em formato de cromatograma. Este método pode ser acoplado a técnicas hífenadas, onde há junção de dois ou mais métodos com o objetivo de obter um equipamento com maior eficiência e rapidez do que os convencionais (Danuello et al., 2022).

A CG-EM analisa compostos que tem caráter volátil e que são termicamente estáveis, pois a amostra, para ser analisada, deve estar em sua forma vaporizada. Já a fase móvel utiliza um gás, chamado gás de arraste, que deve ser inerte e de alta pureza, para não haver interação com a amostra, bem como não degradar a fase estacionária. Os principais são: hélio (He), nitrogênio (N₂) e hidrogênio (H₂) (Amorim, 2019).

O gás de arraste tem como objetivo levar os componentes da amostra pela coluna até a chegada ao detector. Os compostos que eluem mais rapidamente são aqueles que tem maior interação com a fase móvel, já aqueles que demoram a chegar ao detector, tem mais afinidade com a fase estacionária (Nascimento et al., 2018).

1.4.2 Análise de RMN ¹H

A ressonância magnética nuclear é uma técnica de elucidção estrutural de compostos que se baseia na interação dos núcleos sob a influência de um campo magnético, as mais comuns são a RMN de hidrogênio (¹H) e de carbono (¹³C). A técnica fornece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado em uma molécula. No caso da RMN de ¹H, revela os diferentes tipos de hidrogênio presentes na estrutura molecular (Leite, 2013).

Para que um núcleo seja detectado por RMN, ele deve possuir uma propriedade chamada spin, que ocorre quando o núcleo apresenta um número atômico ou uma massa atômica ímpar, ou ambos. Ao ser submetido a um campo magnético externo, esses núcleos

absorvem a energia das ondas de radiofrequência e alteram sua orientação de spin em relação ao campo aplicado. Quanto maior a intensidade do campo magnético, maior será a velocidade desse movimento. Após a absorção da radiofrequência, os núcleos excitados retornam a estados menos energéticos, liberando energia para o ambiente — fenômeno denominado ressonância (Pavia et al., 2010).

A frequência da radiofrequência absorvida pelos núcleos varia conforme os elétrons e outros núcleos vizinhos, sendo fortemente influenciada pelo ambiente químico ao redor. A partir dessa análise, é gerado um espectro de RMN, no qual o deslocamento químico é expresso em partes por milhão (ppm). Esse deslocamento é registrado da direita para a esquerda no espectro, indicando que os prótons menos blindados aparecem mais à esquerda, enquanto os mais blindados surgem à direita. A blindagem refere-se à carga eletrônica ao redor do núcleo, que, ao ser submetida ao campo magnético externo, induz os elétrons de valência a girarem, criando um campo magnético secundário de sentido oposto ao campo aplicado, reduzindo assim a intensidade da interação do núcleo com o campo externo (Leite, 2013).

A densidade eletrônica ao redor do próton também influencia a blindagem: quanto maior essa densidade, mais intenso será o campo secundário. Como cada próton está inserido em um ambiente químico ligeiramente distinto, sua blindagem eletrônica varia, resultando em frequências de ressonância diferenciadas. O espectro de RMN apresenta picos que representam os diferentes tipos de prótons na molécula, sendo que a área sob cada pico é proporcional à quantidade de hidrogênios equivalentes responsáveis pelo sinal (Pavia et al., 2010).

Os sinais de RMN são interpretados de acordo com a Regra do N+1, onde N é o número de prótons equivalentes ligados aos carbonos adjacentes. Ou seja, gera a informação estrutural de quantos hidrogênios estão próximos a cada tipo de hidrogênio que gera um pico de absorção, obtendo-se um multipletto de absorção. Estes desdobramentos recebem nomes de acordo com a quantidade de picos obtidos no espectro, quando os carbonos adjacentes não estão ligados a nenhum próton dá-se o nome de singleto, devido ao seu N ser igual a zero (Regra do N+1). Quando o carbono está ligado a um próton, o valor de N será 1, o número de picos observados será 2, e a multiplicidade será chamada de dupletto. Se o carbono estiver ligado a dois prótons, N será igual a 2, e a multiplicidade será denominada triplete, e assim por diante (Silva, 2018).

1.4.3 Metabolômica e Análise Multivariada de OPLS-DA

Na investigação de produtos naturais, a metabolômica tem sido amplamente empregada para a caracterização detalhada e quantitativa dos metabólitos presentes em diversos

organismos, incluindo plantas e fungos. No caso do cogumelo *H. erinaceus* e do *C. arabica*, essa abordagem possibilita a identificação de perfis químicos específicos e a descoberta de compostos químicos com possíveis efeitos farmacológicos (Hong, 2012; Zhao et al., 2018).

A metabolômica pode ser conduzida por meio de dois tipos principais de estudos: direcionados (*targeted*) e não direcionados (*non-targeted*). Nos estudos direcionados, a análise se concentra em vias metabólicas específicas ou em grupos de compostos previamente estabelecidos, como as erinacinas e hericenonas presentes no *H. erinaceus* ou os diterpenos do café. Por outro lado, os estudos não direcionados abrangem a detecção de todos os metabólitos presentes nos extratos, permitindo não apenas a identificação de novos compostos bioativos, mas também a geração de grandes bancos de dados que podem revelar conexões metabólicas ainda não documentadas (Santos, 2022).

A obtenção de informações nesses estudos geralmente se baseia em técnicas analíticas avançadas, como CG-EM, CLAE-EM e RMN (Zhao et al., 2018). Essas metodologias possibilitam a identificação de metabólitos bioativos nos extratos de *H. erinaceus* e *C. arabica*, contribuindo para o aprofundamento do conhecimento sobre suas propriedades farmacológicas e nutricionais.

Estudos metabolômicos não direcionados geralmente exigem o uso de abordagens quimiométricas para organizar e interpretar a grande quantidade de dados gerados. Métodos computacionais, como os utilizados no *Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)*, permitem a mineração de dados e a identificação de padrões metabólicos, tornando-se essenciais para a pesquisa de produtos naturais (Yang et al., 2013; Griffiths et al., 2010; Demarque et al., 2020).

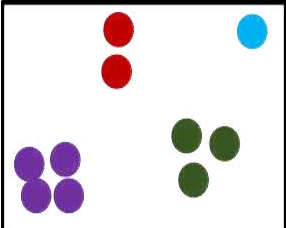
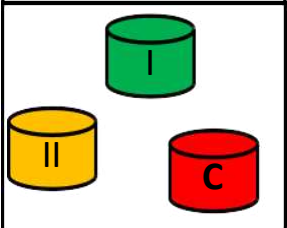
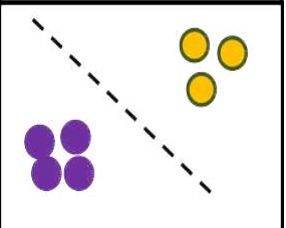
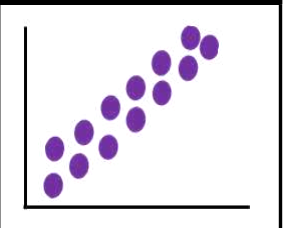
A quimiometria desempenha um papel fundamental na extração de informações químicas relevantes dos experimentos metabolômicos, utilizando modelos matemáticos para essa finalidade. Por exemplo, a diversidade química dos extratos de *H. erinaceus* e *C. arabica* pode ser analisada por meio da técnica de análise de componentes principais (PCA), que permite visualizar padrões de agrupamento de compostos e diferenças entre as amostras (Wolfender et al., 2019).

A análise estatística multivariada dos dados obtidos a partir de CG/CLAE-EM e RMN pode ser aplicada para identificar padrões metabólicos. Métodos de agrupamento não supervisionados, como PCA e *Soft Independent Modelling by Class Analogy (SIMCA)*, são úteis para distinguir variações naturais entre os extratos. Já as abordagens supervisionadas, como análise por mínimos quadrados parciais (PLS), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-

DA), possibilitam a correlação entre determinados metabólitos e suas respectivas atividades biológicas (Robotti et al., 2016; Wold et al., 1987).

A análise supervisionada, como a OPLS-DA, pode ser particularmente relevante para diferenciar frações bioativas daquelas sem atividade significativa nos extratos *C. arabica* e de *H. erinaceus*, auxiliando na seleção de compostos prioritários para futuras investigações. Esse método também pode ser empregado na busca por metabólitos relacionados a efeitos neuroprotetores, direcionando pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias (Wold et al., 1987). Uma representação das diferentes aplicações dos modelos multivariados é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Modelos multivariados de análise estatística e suas aplicabilidades

PCA: Visão	SIMCA: Classificação	PLS-DA/OPLS-DA: Discriminação	O2-PLS Regressão
<p>Geral</p> <p>Tendências</p> <p>Valores atípicos</p> <p>Controle de Qualidade</p> <p>Diversidade Biológica</p> <p>Monitoramento de Pacientes</p>	<p>Padrão</p> <p>Reconhecimento</p> <p>Diagnóstico</p> <p>Saúde/Doença</p> <p>Mecanismos de Toxicidade</p> <p>Progressão da Doença</p>	<p>Discriminando entre grupos</p> <p>Candidatos a Biomarcadores</p> <p>Comparando estudos de instrumentação</p>	<p>Comparando blocos de dados ômicos</p> <p>Metabolômica vs proteômica vs genômica</p> <p>Espectroscopia de correlação</p>
			

Fonte: Adaptado de (Wold et al., 1987)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar de forma qualitativa as principais espécies químicas presentes no *blend* de café (*C. arabica*) enriquecido com corpos de frutificação do cogumelo juba de leão (*H. erinaceus*), a partir da utilização de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extratos das amostras de café e *H. erinaceus* com os solventes orgânicos hexano e metanol;
- Realizar extração aquosa das amostras de *H. erinaceus* e do *blend* com a água a temperatura de $94 \pm 2^\circ\text{C}$ e fervente;
- Utilizar a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas para análise da composição dos extratos aquosos;
- Empregar a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) para identificação do perfil químico dos extratos orgânicos e aquosos.

Diante do exposto, esta dissertação foi estruturada no formato multipaper — uma coletânea de artigos passíveis de publicação — em conformidade com a Instrução Normativa nº 001/2022 do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA). O trabalho foi organizado em capítulos, nos quais foram desenvolvidos os seguintes objetivos:

CAPÍTULO I

- Caracterizar o perfil químico de *C. arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *H. erinaceus*, utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG–EM) integrada a análises multivariadas e redes moleculares.

CAPÍTULO II

- Explorar o perfil metabólico em amostras de corpos de frutificação de *C. arabica*, *H. erinaceus* e uma mistura de ambos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de ^1H) submetidos a diferentes métodos de extração.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico serão apresentados os materiais utilizados para o preparo dos extratos e os métodos aplicados na análise do perfil químico das amostras.

3.1 MATERIAIS

Corpos de frutificação de *H. erinaceus* desidratados a 45 °C foram obtidos da empresa Cogumelos Fungitake Ltda (Umuarama, Paraná, Brasil). A amostra foi triturada no dia 25 de outubro de 2023. O café foi cultivado no Riacho da Tapera à 1.220 m de altitude acima do nível do mar, na cidade de Piatã, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Os grãos foram torrados (torra média) em 3 de agosto de 2023 por Blenditta Torrefação de Bons Cafés Ltda. O café utilizado é de uma variedade da espécie *C. arabica*, conhecido como Catuaí, de origem 100% brasileira, cujo significado em tupi-guarani é “muito bom”. Os grãos possuem características como suavidade, acidez média e sabor levemente adocicado. A moagem dos grãos ocorreu em 13 de novembro de 2023.

As amostras de *Hericiium erinaceus* e de café foram submetidas a um processo de trituração para obtenção do pó. Para a caracterização dos compostos bioativos, foram realizadas extrações utilizando solventes orgânicos de pureza grau HPLC — metanol e hexano — com o objetivo de identificar qualitativamente o teor desses compostos nos diferentes extratos. A água ultrapura utilizada foi obtida em um sistema de purificação modelo Purist (Rephile®).

Para a produção do *blend* (café + *H. erinaceus*), empregou-se uma extração aquosa por infusão, utilizando apenas água como solvente, de modo a simular o preparo doméstico da bebida. A seleção da temperatura de extração foi baseada em práticas comuns de preparo caseiro, considerando variações entre 94 ± 2 °C e fervura, uma vez que indivíduos costumam realizar a infusão tanto com água em ebulição quanto em temperaturas próximas. Essa abordagem permitiu investigar, também, se essas variações de temperatura poderiam influenciar a composição química do extrato final.

De acordo com a recomendação do fornecedor, o preparo padrão do café prevê o uso de 16 g para 200 mL de água. Com base nessa proporção, foi realizada uma adaptação para 50 mL, acrescida de 10% de *H. erinaceus* (1,6 g), resultando em um total de 17,6 g de amostra. Dessa forma, o *blend* final foi composto por 12% (0,528 g) de *H. erinaceus* e 88% (3,872 g) de café. A adoção dessa proporção foi fundamentada em parâmetros técnicos e em estudos científicos (Lu et al., 2021), sendo coerente com os resultados relatados por Łysakowska et al. (2025), que avaliaram a adição de *H. erinaceus*, respectivamente, em diferentes níveis (3,

6, 9 e 12%) em matrizes alimentares e observaram aumento expressivo no teor de polifenóis e na atividade antioxidante. Tais evidências reforçam o potencial do *H. erinaceus* como ingrediente funcional, capaz de enriquecer o perfil nutricional e tecnológico de formulações alimentícias, justificando, portanto, a utilização da proporção de 12% neste estudo.

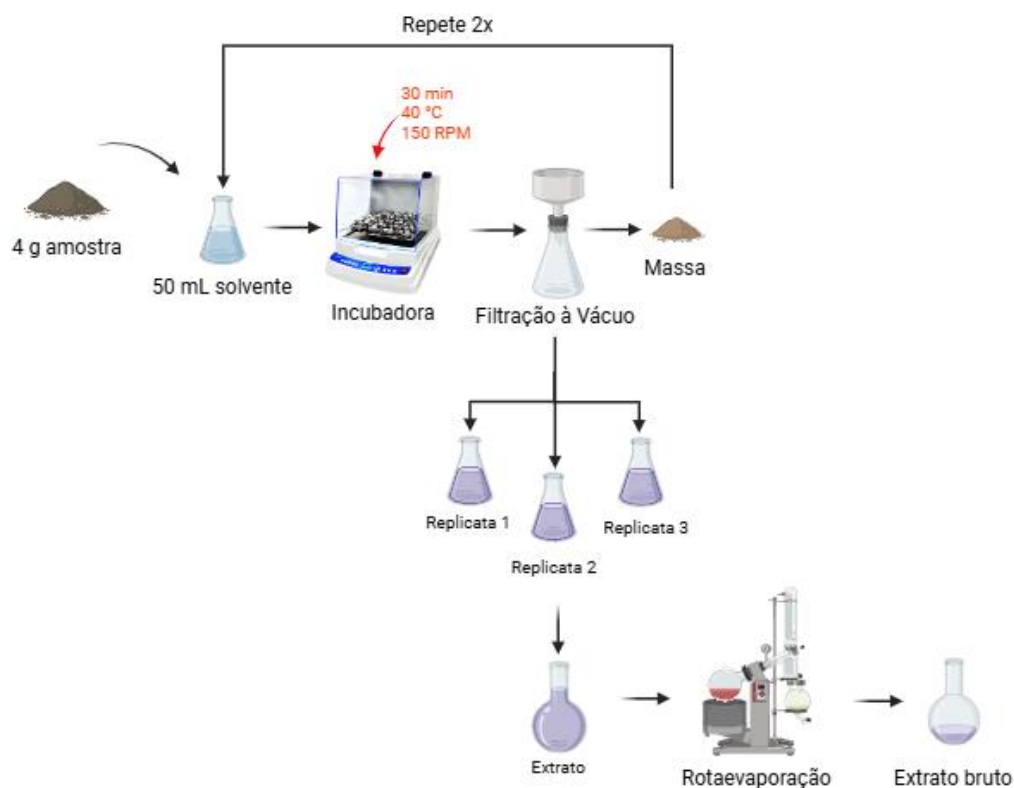
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Nesta seção foram descritos os métodos aplicados no preparo dos extratos orgânicos e aquosos de *C. arabica* e *H. erinaceus*.

3.2.1 Extratos Orgânicos

O processo de preparo dos extratos orgânicos começa com a pesagem de 4 g da amostra triturada. Em seguida, adicionam-se 50 mL de hexano (Hx) à amostra, que é levada à incubadora por 30 minutos a 40 °C e 150 rpm (rotações por minuto). Após a incubação, a mistura é filtrada a vácuo usando papel filtro quantitativo (diâmetro de 90 mm; faixa preta; Unifil), resultando no extrato hexânico H1. A massa restante passa pelo mesmo processo mais duas vezes, gerando os extratos H2 e H3, que são combinados com H1 para formar uma replicata do extrato hexânico.

Posteriormente, adicionam-se 50 mL de metanol (MeOH) à massa remanescente de H3, que é novamente incubada por 30 minutos a 40 °C e 150 rpm. A mistura é então filtrada a vácuo com papel filtro quantitativo, produzindo o extrato metanólico M1. A massa remanescente passa pelo mesmo procedimento mais duas vezes, gerando os extratos M2 e M3, que são misturados com M1 para criar uma replicata do extrato metanólico. Esse processo foi repetido três vezes (em triplicata), tanto para a amostra de *H. erinaceus*, quanto para a amostra de *C. arabica* (Figura 5).

Figura 5 - Método de preparo dos extratos orgânicos

Fonte: Autoral.

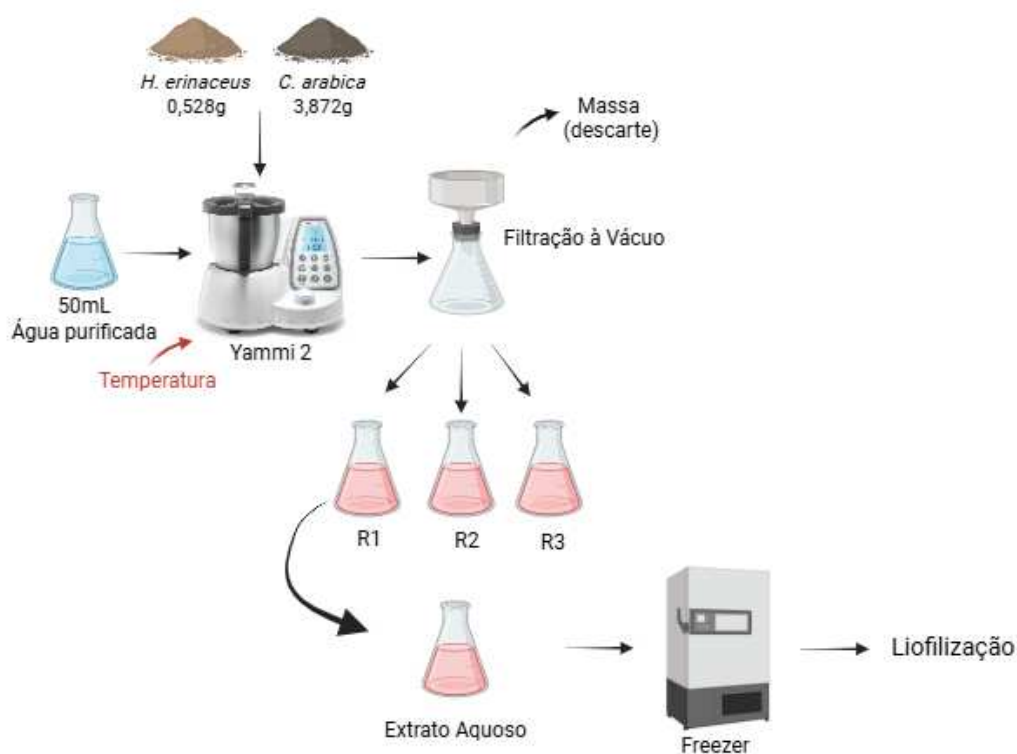
3.2.2 Extratos Aquosos

Para o preparo dos extratos aquosos, foram pesadas 0,528 g das amostras de *H. erinaceus* e 3,872 g de *C. arabica* em pó, separadamente. Para cada replicata foram pesadas novamente as amostras. Foi utilizada uma *Cooking Machine* Yammi 2 (Modelo 5639862) para o preparo. Inicialmente o equipamento foi configurado para a temperatura de 94 ± 2 °C, e em seguida foi adicionado 50 mL de água purificada, após atingir a temperatura indicada, as amostras em pó foram adicionadas (0,528 g de *H. erinaceus* e 3,872 g de *C. arabica*) (Figura 6).

A agitação foi realizada na velocidade 1 por 1 min. Em seguida, o processo foi interrompido por alguns segundos, retomado por 30 segundos e, finalmente, a amostra foi deixada em repouso por mais 30 segundos, totalizando 2 minutos de processo. Após isso, a amostra foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo, utilizando-se o papel filtro quantitativo (diâmetro de 90 mm; faixa preta; Unifil), obtendo-se a primeira replicata (R1). A massa restante foi descartada. O *C. arabica* e o *H. erinaceus* foram pesados novamente para o preparo da segunda replicata (R2) e foi feito o mesmo para a R3. Após esse procedimento, o extrato aquoso do *blend* (RBA94) foi congelado em freezer a - 40 °C para posterior

liofilização.

Figura 6 - Método de preparo de extratos aquosos



Fonte: Autoral.

Na segunda etapa de preparo do *blend*, utilizando água fervendo, foram mantidas as mesmas variáveis de massa das amostras (*C. arabica* e *H. erinaceus*) e processos de agitação. Após a água atingir a temperatura de fervura, as amostras em pó foram adicionadas. Foram obtidas as amostras R1, R2 e R3 que, misturadas (RBAF) seguiram para congelamento e posterior liofilização (Figura 6).

CAPÍTULO I

Caracterização química de *Coffea arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *Hericiium erinaceus*: influência da temperatura de extração revelada por CG–EM e análise multivariada

Ana Verena Viana dos Santos^{1,2*}; Keila Almeida Santana²; Maria Paula Machado Cardoso^{1,2}; Nandjane Bôa Morte^{1,2}; Eduard Ferney Valenzuela Toledo²; Clícia Maria Jesus Benevides²; Aníbal de Freitas Santos Júnior²; Gustavo Souza dos Santos³; Alexandre Rafael Lenz^{1,2*}

¹Grupo de Pesquisa em Bioinformática e Biologia Computacional da UNEB (G2BC), Departamento de Ciências Exatas e da Terra; Campus I, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 41.150-000.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências da Vida; Campus I, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 41.150-000.

³Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14800-060.

*Corresponding authors: alenz@uneb.br / anaverenavds@hotmail.com

RESUMO

O café e o *Hericiium erinaceus* são reconhecidos por suas propriedades nutricionais e bioativas, com potencial para promover benefícios à saúde, especialmente no que diz respeito à neuroproteção e à melhoria das funções cognitivas. No entanto, a combinação desses dois produtos naturais ainda é pouco explorada cientificamente. Este estudo teve como objetivo a caracterização química de extratos aquosos da mistura de café com corpos de frutificação de *H. erinaceus* em pó, submetidos a temperaturas de $94 \pm 2^\circ\text{C}$ e água fervente, assemelhando-se ao método tradicional de preparo do café. Através da cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), com a anotação preliminar de compostos obtidos no GNPS e análise estatística multivariada, foi possível analisar a viabilidade da combinação. Os resultados sugeriram a presença de compostos bioativos de ambas fontes: os ácidos graxos e seus derivados, como constituintes tanto do *H. erinaceus* quanto do *C. arabica*, e a cafeína, como constituinte específico do perfil químico do café. Este trabalho abre novas perspectivas para o desenvolvimento de bebidas funcionais que integram benefícios à saúde e experiência sensorial, contribuindo para a inovação no setor de alimentos funcionais e para o avanço da ciência dos produtos naturais.

Palavras-chave: *Hericiium erinaceus*; *Coffea arabica*; Compostos químicos; CG-EM

1 INTRODUÇÃO

A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) registrou, em 2024, um aumento de 1,11% no consumo interno de café, produto presente em 98% dos lares brasileiros, com média de 1.430 xícaras por pessoa ao ano. O Brasil mantém-se como o maior consumidor do café que produz, destacando-se a região Sudeste, responsável por 41,7%, em seguida a região Nordeste, representando 26,90% do consumo nacional. Esse cenário reforça a relevância

cultural, econômica e científica do café, que se configura como uma das principais bebidas do mundo [1].

Além de seu valor social, os cafés têm sido amplamente estudados como matriz alimentar rica em compostos bioativos, entre os quais se destacam os ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, diterpenos (cafestol e kahweol) e melanoidinas, formadas durante o processo de torra. Esses constituintes estão associados a atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, explicando os efeitos do consumo moderado sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios e cognitivos [2-4]. Estudos recentes têm relacionado o consumo de *Coffea arabica* à redução do risco de doenças neurodegenerativas, atribuindo a ação neuroprotetora à sua composição polifenólica e alcaloídica [5,6]. A variabilidade do perfil químico do *C. arabica* está ligada a fatores genéticos, ambientais e de processamento (torra e preparo), impactando tanto a composição fenólica quanto os produtos da reação de Maillard [7-9].

Em paralelo, cresce o interesse por cogumelos medicinais como ingredientes funcionais. Revisões recentes apontam que o consumo regular desses fungos pode potencializar as respostas imunológicas e contribuir para a prevenção de doenças, devido à presença de polissacarídeos, fenóis, terpenoides e outros metabólitos bioativos com atividades imunomoduladoras, antimicrobianas e até mesmo antitumorais [10-13]. Além disso, cogumelos apresentam baixo teor de lipídios, sódio e colesterol, fortalecendo seu papel como ingredientes promissores no desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos [14,15].

Dentre os cogumelos medicinais, o *Hericium erinaceus*, conhecido como juba de leão, tem perfil nutricional rico em proteínas, fibras, vitaminas e compostos bioativos [13]. Estudos apontam seu potencial na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, distúrbios gastrointestinais, disfunções imunológicas e como coadjuvante em terapias oncológicas [16-18]. Do ponto de vista químico, o fungo apresenta polissacarídeos (β -glucanas) e terpenoides, destacando-se as hericenonas (predominantes nos corpos de frutificação) e as erinacinas (predominantes no micélio), compostos associados a efeitos neurotróficos via estimulação do fator de crescimento nervoso (NGF) [19-21]. A composição de *H. erinaceus* depende do tecido avaliado: o micélio é rico em erinacinas, enquanto os corpos de frutificação concentram hericenonas e polissacarídeos. Portanto, a escolha do corpo de frutificação neste estudo direciona para um conjunto específico de marcadores químicos, distinto do micélio.

O enriquecimento de cafés com cogumelos consiste na adição de extratos ou pó de

macrofungos medicinais ao café, surgindo como estratégia nutricional e tecnológica para ampliar o espectro de bioativos e minerais da bebida, preservando a aceitabilidade sensorial [50]. Contudo, ainda são escassas as caracterizações abrangentes do perfil químico, por técnicas cromatográficas e espectrométricas, de cafés com cogumelos medicinais. Diante disso, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil químico de *C. arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *H. erinaceus*, utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) integrada a análises multivariadas e redes moleculares. Buscou-se, assim, mapear os principais constituintes bioativos da bebida, avaliar a influência da temperatura de extração sobre o perfil metabólico e discutir as implicações tecnológicas e funcionais dessa mistura à luz da literatura atual.

2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.1 Perfil Químico por CG-EM

O perfil químico do *blend* pode ser influenciado por diversos fatores, como a altitude, solo, variações de temperatura e local de cultivo das amostras. Além disso, a torra do café — etapa responsável por transformar os grãos verdes em grãos escuros e aromáticos — promove a formação de uma ampla gama de compostos voláteis, bem como de melanoidinas, polímeros marrons derivados da Reação de Maillard que contribuem não apenas para a cor, aroma e sabor da bebida, mas também para sua atividade antioxidante [22,23].

Considerando essa complexidade química, a caracterização do perfil dos extratos aquosos do *blend* de *H. erinaceus* e *C. arabica* (RBAF e RBA94) foi realizada a partir da anotação preliminar de compostos obtidos por CG-EM, baseada nos tempos de retenção experimentais (TR_{Exp}), bem como nos índices *Cosine score* $\geq 0,7$ e *NIST match* $\geq 70\%$ de similaridade espectral. Esses índices correspondem a medidas de proximidade entre o espectro de massas obtido experimentalmente e os espectros de referência disponíveis em bibliotecas e já reportados, sendo que valores mais próximos de 1 e 100%, respectivamente, refletem maior confiabilidade na identificação do composto.

A análise cromatográfica das amostras RBAF e RBA94 revelou a presença de compostos pertencentes a diferentes classes químicas, dentre elas pirazinas e cetonas — já reportadas como compostos aromatizantes característicos do café [24] —, além de ácidos graxos, compostos furânicos, aldeídos, fenóis, alcaloides, alcanos e ésteres. Observou-se que ambos os extratos apresentaram constituintes em comum, como cafeína, ácidos graxos e seus

derivados metilados (Tabela 1).

	Composto	FM	RT _{Exp.} (min)	Simil. NIST	Cosine	Classe química
RBAF	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	31,603	94,92	0,71	Ácido graxo
			30,466	78,1		
	Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	29,278	94,89	0,69*	Alcalóide
			28,043	94,45		
	Undecano	C ₁₁ H ₂₄	10,640	92,02	0,93	Alcano
			10,422	84,52		
	Ácido Esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35,266	90,58	0,69*	Ácido graxo
	Palmitato de Metila	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	30,850	88,03	0,83	Éster de ácido graxo
	Metil-9,11-octadecadienoato	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	34,020	70,04	-	Éster de ácido graxo
	RBA94	Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	29,293	94,89	0,69*
28,064				94,68		
28,344				94,01		
Undecano		C ₁₁ H ₂₄	10,640	93,44	0,93	Alcano
			10,370	77,81		
Palmitato de Etila		C ₁₇ H ₃₄ O ₂	30,855	85,27	-	Éster de ácido graxo
Estearato de metila		C ₁₉ H ₃₈ O ₂	34,622	73,34	-	Éster de ácido graxo
Ácido palmítico		C ₁₆ H ₃₂ O ₂	31,556	70,82	0,71	Ácido graxo

Tabela 1. Compostos identificados através de análise cromatográfica das amostras RBAF e RBA94. FM: Fórmula Molecular. RT: Tempo de Retenção / NIST: National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). *Cosine abaixo da referência (≥ 7) mas considerado devido a alta similaridade NIST

Entre os compostos identificados, destaca-se a cafeína, alcaloide da família das metilxantinas e principal componente psicoativo do café [25]. Este metabólito exerce efeito estimulante no sistema nervoso central, associado à melhora do humor, do estado de alerta e do tempo de reação, além de apresentar propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias amplamente documentadas [26]. Por sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), atua em múltiplos alvos biológicos, desencadeando efeitos farmacológicos diversos.

Evidências apontam que o consumo moderado de cafeína pode reduzir o risco de distúrbios cognitivos, efeito potencializado pela ação sinérgica com outros constituintes do café, como ácidos clorogênicos, trigonelina, diterpenos, polissacarídeos, peptídeos e melanoidinas [27,29]. Embora o *cosine score* obtido para a cafeína (0,69*) tenha ficado ligeiramente abaixo do valor de referência (< 0,7), sua anotação foi confirmada como marcador químico, com base em evidências da literatura que já a reportaram nesse contexto [30,31].

Além da cafeína, foram detectados ácidos graxos de relevância farmacológica, como ácido palmítico e ácido esteárico, bem como seus ésteres (palmitato de metila, palmitato de etila, estearato de metila e metil-9,11-octadecadienoato). Esses compostos são amplamente encontrados tanto no café [32,33] quanto em *H. erinaceus* [34,35], e desempenham funções estruturais essenciais em membranas celulares, além de exibirem propriedades bioativas reconhecidas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos [36,37].

Evidências experimentais corroboram essa versatilidade: estudos associaram a alta proporção desses ácidos graxos em extratos aquosos de *Labisia pumila* à atividade antioxidante e antimicrobiana, sobretudo contra bactérias Gram-positivas [38], relataram potencial antioxidante e antifúngico de óleos vegetais ricos nesses compostos [39]; e demonstraram o efeito anti-inflamatório significativo de palmitato de metila e palmitato de etila em modelos animais, incluindo a inibição de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e fator nuclear kappa B (NF- κ B) [40]. Nesse contexto, a identificação putativa desses metabólitos em *blends* de café enriquecidos com cogumelos ganha relevância, especialmente diante de estudo recente que avaliou cafés preparados com adição de corpos de frutificação de *H. erinaceus* e *Cordyceps militaris*, os quais evidenciaram alterações no perfil de bioelementos (Fe, Mg, Zn, Cu, Na, K, Ca) e em marcadores selecionados, sugerindo potencial para formulações funcionais [41].

Cabe destacar que alguns derivados, como estearato de metila, palmitato de etila e metil-9,11-octadecadienoato, não apresentaram *cosine* na análise de redes moleculares devido a limitações da cobertura espectral do GNPS ou ausência de pares elegíveis na rede. No entanto, sua identificação permaneceu confiável, sustentada pelos espectros obtidos via CG-EM e pela elevada similaridade - $\geq 70\%$ - em relação à NIST.

2.2 Análise Multivariada PCA e OPLS-DA

A análise multivariada exploratória por PCA (Figura 1A) revelou uma separação clara entre os grupos RBAF e RBA94, ainda que ambos derivem da mesma fonte. O primeiro componente principal (PC1) explicou 64% da variância total dos dados, indicando que quase metade da informação contida na matriz de CG-EM foi resumida neste eixo. Observou-se que as réplicas de RBA94 se agruparam de forma mais consistente, refletindo maior homogeneidade metabólica, enquanto as amostras de RBAF apresentaram maior dispersão, sugerindo heterogeneidade intra-grupo. Considerando que a única variável experimental distinta entre os grupos foi a temperatura de obtenção dos extratos, tais resultados sugerem que o processamento pode influenciar diretamente o perfil químico, favorecendo a extração de determinados metabólitos em detrimento de outros.

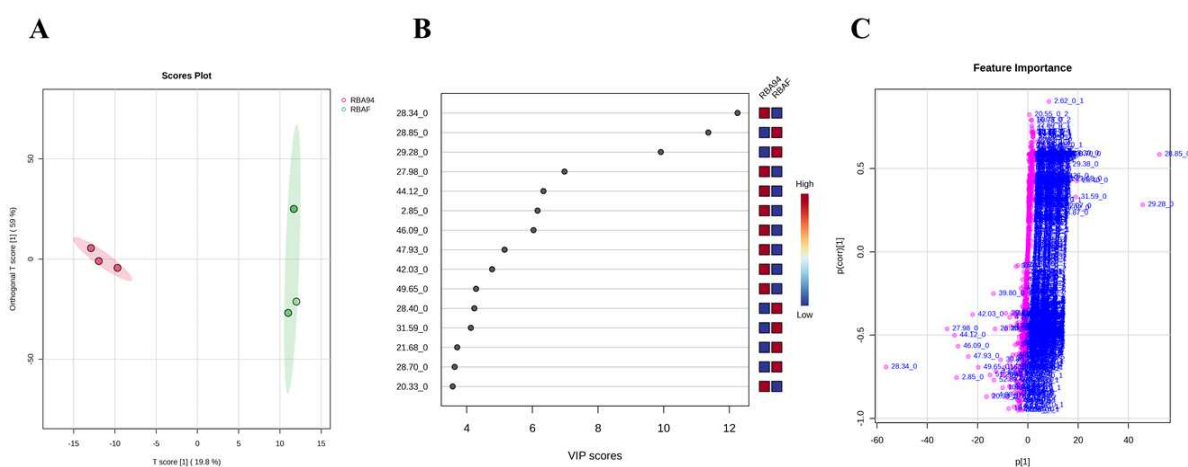


Figura 1. Análises estatísticas realizadas para as amostras de blend extraídos a temperaturas de 94 ± 2 °C (RBA94) e água fervente (RBAF). Em A OPLS-DA Score-plot evidenciando a clara separação entre os grupos RBA94 e RBAF. B VIP scores discriminando os metabólitos responsáveis pela separação das amostras. C S-plot corroborando com os resultados obtidos em B.

Com base na separação observada no PCA, procedeu-se à aplicação da análise supervisionada OPLS-DA (Figura 1B), com o objetivo de identificar os metabólitos que mais contribuem para a distinção entre os grupos RBA94 e RBAF. O gráfico de VIP (*Variable Importance in Projection*) apresentou os 15 metabólitos mais relevantes no modelo, identificados por seus tempos de retenção, com valores superiores a 3, o que indica forte contribuição para a separação entre os grupos. Dentre esses, os metabólitos que aparecem nos tempos de retenção 28.34_0, 28.85_0 e 29.28_0, sugerindo a presença da cafeína e seus derivados, apresentaram os maiores valores de VIP, sendo considerados altamente discriminantes. A escala de cores associada ao gráfico representa a abundância relativa desses compostos, indicando em vermelho aqueles detectados em maior intensidade e em azul os de menor intensidade. Observa-se que a maioria — como 28.85_0 e 29.28_0 — apresenta maior

abundância relativa no grupo RBAF. Na Figura 1C, o S-plot demonstra a relação entre a confiabilidade e a magnitude das variáveis, permitindo identificar os metabólitos mais influentes na diferenciação entre os grupos RBA94 e RBAF. Os pontos destacados no gráfico representam os compostos que exercem maior peso estatístico, reforçando os achados obtidos pelos VIP scores (Figura 1B) e contribuindo para a validação dos marcadores discriminantes.

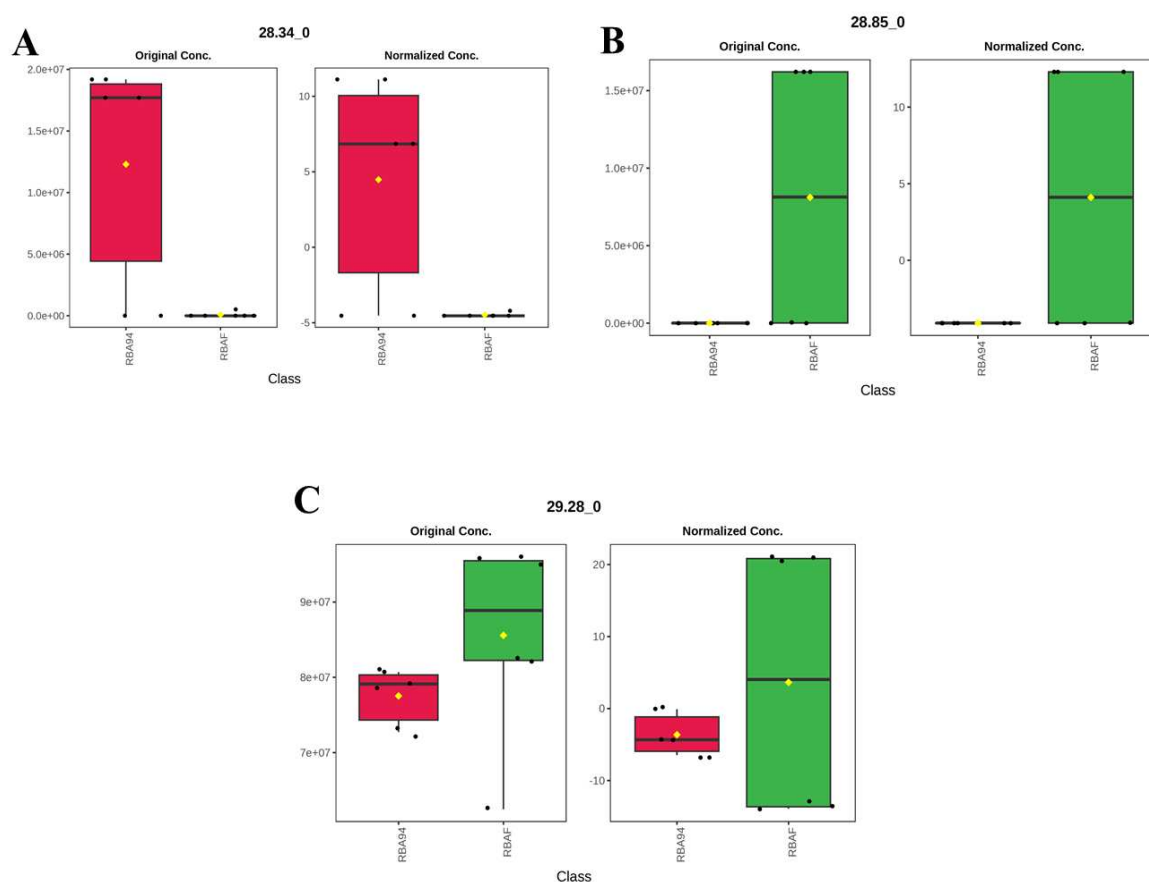


Figura 2. Diagramas de caixa representando a abundância relativa (área dos picos) dos metabólitos da cafeína 28.34_0 (A), 28.85_0 (B) e 29.28_0 (C) nas amostras RBA94 (vermelho) e RBAF (verde), apresentados em concentrações originais (esquerda) e normalizadas (direita). As linhas centrais indicam a mediana, os losangos amarelos representam a média e os pontos pretos correspondem às réplicas biológicas.

O metabólito 28.34_0 (Figura 2A) exibiu abundância relativa significativamente mais elevadas em RBA94 em relação a RBAF, tanto nos valores originais quanto após a normalização, sendo pouco detectado neste último, o que o destaca como um marcador característico da extração a 94 ± 2 °C. Em contraste, o metabólito 28.85_0 (Figura 2B) foi relativamente mais abundante em RBAF, com médias e medianas superiores às observadas em RBA94, reforçando sua contribuição como discriminante do grupo extraído em água fervente. Já o metabólito 29.28_0 (Figura 2C) esteve presente em ambos os grupos, mas em intensidades distintas. Embora RBA94 tenha exibido valores relativamente elevados, RBAF mostrou abundâncias ainda maiores, confirmadas após normalização, sugerindo que as

condições de preparo modulam o perfil relativo dos metabólitos em destaque, resultando em assinaturas químicas específicas para cada grupo.

A fim de assegurar a robustez estatística do modelo OPLS-DA, foi realizado o teste de permutação. Os valores obtidos para R^2 (0,993) e Q^2 (0,876) demonstraram capacidade explicativa e preditiva robusta, respectivamente. Segundo critérios quimiométricos [42,43], valores de Q^2 superiores a 0,5 são considerados satisfatórios para modelos preditivos confiáveis, assim, os resultados confirmam a validade do modelo utilizado.

2.3 Redes Moleculares

As variações na abundância de metabólitos, evidenciadas pelos resultados obtidos na análise estatística de OPLS-DA entre os grupos, foram reforçadas pela análise de rede molecular, que permitiu visualizar a distribuição dos compostos de acordo com sua similaridade estrutural. Esta foi apresentada como um gráfico de pizza, e codificadas com as cores azul para o *blend* feito com água fervente (RBAF) e verde para o *blend* feito com água a 94 ± 2 °C (RBA94). Cada nó da rede corresponde a uma característica detectada (m/z) e está rotulado com o respectivo tempo de retenção, enquanto as conexões (arestas) entre eles refletem a similaridade nos padrões de fragmentação, agrupando compostos estruturalmente relacionados.

A Figura 3 demonstra a formação de diferentes *clusters*, evidenciando a organização química dos ácidos graxos e seus derivados (destaque em amarelo), e dos alcaloides e seus derivados (destaque em vermelho) encontrados nos *blends*. Observa-se que ambos os extratos compartilham diversos nós comuns, indicando a presença de um núcleo metabólico semelhante entre as condições de preparo. Nesses grupos foram identificados os ácidos graxos palmítico e esteárico, bem como o derivado palmitato de metila, além do undecano, um alceno estruturalmente relacionado às cadeias dos ácidos graxos. Nota-se a ocorrência de metabólitos robustos frente à variação de temperatura, representando possíveis marcadores centrais do *blend*, como a cafeína. Por outro lado, a predominância de nós azuis em determinados *clusters* sugere que a extração em água fervente favoreceu os compostos de classes lipídicas e ácidos graxos, como os ácidos palmítico, esteárico, palmitato de metila e undecano.

A tendência encontrada foi consistente com os resultados de VIP scores (Figura 1B), S-plot (Figura 1C) e diagramas de caixa (Figura 2), reforçando a discriminação dirigida pela temperatura. Embora a NIST tenha atribuído aos diferentes picos uma similaridade superior a

94% com a cafeína, o índice cosine do GNPS (0,69*) (Tabela 1) indicou uma correspondência parcial entre os espectros. Esse resultado sugere que o nodo principal, de maior abundância, (29.28_0, Figura 3) representa a cafeína, enquanto os nodos adjacentes à ela podem corresponder a picos redundantes gerados pelo processo de deconvolução do CG-MS ou a pequenas variações estruturais relacionadas a compostos da família dos alcalóides. Já a ausência de alguns compostos na rede molecular construída pode ser explicada pela cobertura da biblioteca espectral do GNPS, que não contempla todas as classes químicas detectadas por CG-EM.

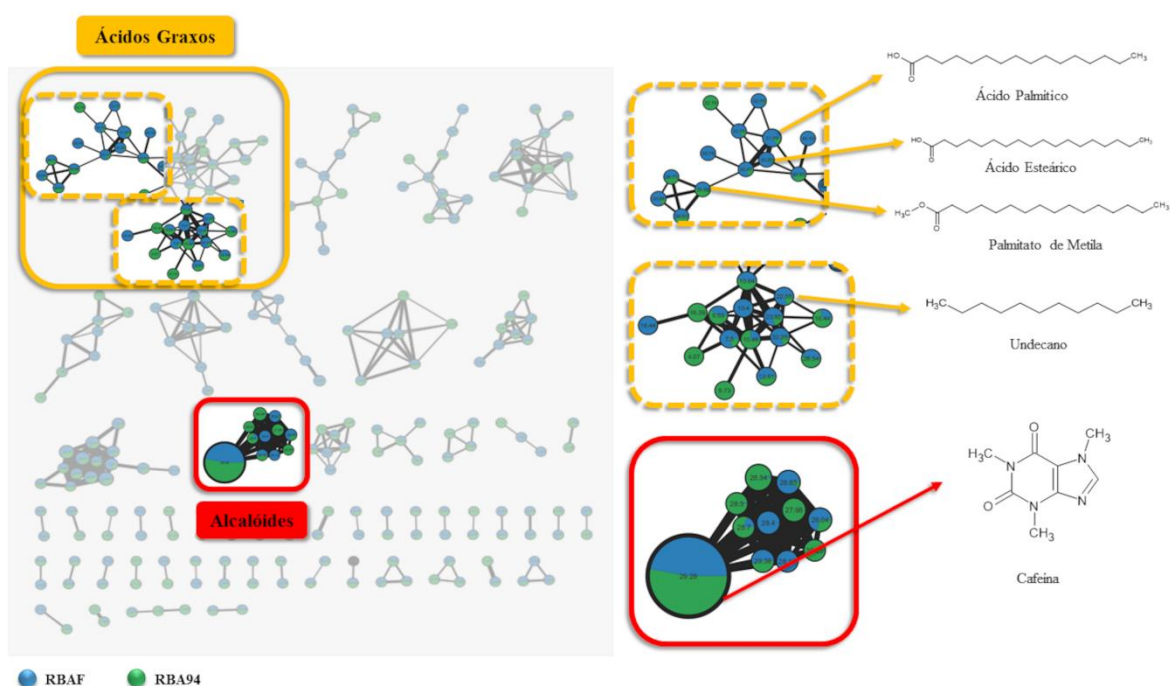


Figura 3. Rede molecular gerada no GNPS a partir dos espectros de MS dos *blends* obtidos com água fervente (RBAF, azul) e a 94 ± 2 °C (RBA94, verde). Foram destacados *clusters* que permitiram a anotação de compostos relevantes, incluindo ácidos graxos (ácido palmítico e ácido esteárico), derivados (palmitato de metila), hidrocarboneto (undecano) e alcaloide (cafeína). Observa-se a presença de metabólitos comuns a ambos os métodos de extração, bem como variações qualitativas no perfil químico em função da temperatura.

A rede molecular possibilitou a anotação de metabólitos comuns entre os extratos, evidenciando, contudo, que a eficiência de extração tanto de alcalóides, quanto dos ácidos graxos e seus derivados, variou de acordo com a temperatura da água, sendo favorecida pelo uso de água em ebulição. Estudos demonstraram que a temperatura exerce impacto direto nas características físico-químicas e sensoriais do café expresso em diferentes variedades [44]. De forma complementar, em outro estudo, foi investigada a extração de lipídios a partir de resíduos de café utilizando solventes distintos em diferentes temperaturas, observando que aqueles com ponto de ebulição mais elevado proporcionaram rendimentos superiores de óleo

[45]. Resultados semelhantes foram relatados através da avaliação da influência da temperatura e do grau de umidade em extrações sob alta pressão, nesse caso, temperaturas entre 90 e 120 °C favoreceram a extração de ácidos graxos específicos, como o ácido palmítico, ressaltando que o controle térmico é determinante para otimizar tanto o rendimento quanto o perfil lipídico obtido [46].

Essa correlação entre temperatura e rendimento metabólico sugere que o uso de água fervente favorece a liberação de compostos bioativos tanto do café quanto do cogumelo, reforçando o papel da temperatura como um parâmetro crítico para otimizar a caracterização química de misturas funcionais como a utilizada neste estudo. Complementarmente, tais variações podem impactar tanto a atividade estimulante e neuroprotetora do *blend* (pela maior extração de cafeína) quanto suas potenciais propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (pela modulação de ácidos graxos e ésteres), reforçando o caráter funcional e inovador da combinação entre *C. arabica* e *H. erinaceus*.

3 CONCLUSÕES

A caracterização do perfil químico de *C. arabica* enriquecido com corpos de frutificação de *H. erinaceus* revelou a presença de metabólitos relevantes, como cafeína, ácidos graxos e seus derivados, cuja abundância foi modulada pela temperatura de extração, evidenciando a influência do preparo na composição química da mistura. A predominância de metabólitos relacionados à amostra RBAF sugere que a extração com água fervente favoreceu uma maior liberação desses compostos, indicando que essa condição pode ser mais eficiente para a obtenção de perfis químicos e nutricionais enriquecidos. Embora esses achados apontem para o potencial funcional e inovador do *blend*, especialmente no contexto da combinação de compostos bioativos de diferentes origens, tratam-se de evidências iniciais.

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 Fonte e Preparação de Materiais Experimentais

Os corpos de frutificação de *Hericiium erinaceus*, previamente desidratados a 45 °C, foram adquiridos da empresa Cogumelos Fungitake Ltda. (Umuarama, Paraná, Brasil). O material seco foi triturado até a obtenção de pó fino e armazenado em dessecador sob baixa umidade até o uso. Já os grãos de *Coffea arabica* utilizados pertencem à variedade Catuaí, de origem brasileira, cultivados a 1.220 m de altitude em Riacho da Tapera, município de Piatã, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. A composição do solo da região, associada à altitude e

condições climáticas, confere perfil sensorial distintivo ao café. A torra média, foi realizada pela empresa Blenditta Torrefação de Bons Cafés Ltda., seguida de moagem e armazenamento dos grãos em dessecador até análise.

4.2 Preparação dos extratos aquosos

Os extratos foram preparados por infusão aquosa, simulando práticas domésticas de preparo de café. Para cada extração, 4,4 g de amostra foram combinados com 50 mL de água ultrapura Milli-Q®. A proporção da mistura de café com cogumelo (*C. arabica* + *H. erinaceus*) foi definida com base na recomendação do fornecedor responsável pela torra (16 g/200 mL a 94 °C), ajustada para 4,4 g/50 mL. Assim, cada amostra continha 12% de *H. erinaceus* (0,528 g) e 88% de *C. arabica* (3,472 g). As extrações foram conduzidas sob duas condições térmicas: 94 ± 2 °C (temperatura recomendada para o preparo do café, um pouco abaixo do ponto de ebulição da água) [47,48] e 100 °C (água fervente), para padronização, utilizou-se um aparelho multifuncional (Yammi 2). Ao atingir a temperatura desejada, adicionou-se a amostra, que foi agitada manualmente por 2 min, com breves pausas intermitentes. Após a infusão, a solução foi filtrada e o procedimento repetido três vezes com amostras frescas, posteriormente os extratos foram submetidos a congelamento à -40 °C, liofilizados e armazenados até análise.

4.3 Perfil químico por CG-EM

A análise dos extratos por CG-EM foi conduzida conforme a metodologia adaptada [49]. Empregou-se um sistema de CG Agilent 7890B acoplado a um detector seletivo de massas MSD 5977C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), utilizando os parâmetros a seguir: volume de injeção de 1 µL, no modo split (1:10); temperatura do injetor de 260 °C; coluna cromatográfica DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25µm); gás de arraste hélio, com vazão constante de 1 mL/min. O programa de temperatura começou a 60 °C, com uma rampa de aquecimento de 4 °C/min até 320 °C, resultando em um tempo total de corrida de 75 min. A fonte de íons foi mantida a 230 °C, enquanto a interface permaneceu a 260 °C. Os espectros de massa foram registrados e comparados com a biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) 11, do próprio instrumento. Os dados brutos foram convertidos para o formato .cdf e carregados na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS - <https://gnps.ucsd.edu>) para o processo de deconvolução e subsequente criação de redes moleculares. As redes foram visualizadas no software Cytoscape (v.3.9.1),

no qual os nós foram organizados de acordo com a similaridade espectral (*Cosine score* $\geq 0,7$), permitindo o agrupamento de compostos estruturalmente relacionados. O processamento dos cromatogramas foi realizado no software OpenChrom® (v.1.5.17), incluindo correção de linha de base, suavização de picos e sobreposição de espectros para identificação.

4.4 Análise multivariada

As análises estatísticas foram conduzidas para explorar padrões globais, discriminar grupos e integrar os dados químicos com parâmetros biológicos. Para a análise estatística dos dados obtidos, empregou-se uma abordagem multivariada sistemática. Inicialmente, utilizou-se o PCA com o intuito de explorar a estrutura dos dados de forma não supervisionada, avaliar a variabilidade global entre as amostras e identificar possíveis valores atípicos. Na sequência, foi aplicado o OPLS-DA, uma técnica supervisionada que permite maximizar a separação entre os grupos experimentais ao remover variações ortogonais não relacionadas à classe e, o gráfico S-plot para integrar a magnitude da influência e a confiabilidade estatística dessas variáveis. Os gráficos de VIP scores foram utilizados para identificar os metabólitos discriminantes entre os grupos, assegurando a identificação de potenciais biomarcadores com relevância estatística e biológica.

ABREVIações

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
BHE	Barreira Hematoencefálica
CG-EM	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FM	Fórmula Molecular
GNPS	Produtos Naturais Globais - Redes Sociais Moleculares, do inglês <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
IL-6	Interleucina-6
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Tandem
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NGF	Fator de Crescimento Nervoso, do inglês <i>Nerve Growth Factor</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of</i>

Standards and Technology

OPLS-DA	Análise Discriminante Ortogonal de Mínimos Quadrados Parciais, do inglês <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PC1	Componente Principal 1
RBA94	Replicata <i>Blend</i> a temperatura de 94±2 °C
RBAF	Replicata <i>Blend</i> a temperatura de água fervente
TR _{Exp}	Tempo de Retenção Experimental
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VIP	Importância Variável na Projeção, do inglês <i>Variable Importance in Projection</i>

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira da Indústria de Café. (2024). *Indicadores da indústria de café*. ABIC.
2. Moreira, M. L. C., Pereira, R. G. F. A., Dias, D. F., Gontijo, V. S., Vilela, F. C., Moraes, G. O. I., Giusti-Paiva, A., & Santos, M. H. (2013) Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 466-474. <https://doi.org/10.12691/jfnr-8-12-5>
3. Bresciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F. & Del Rio, D. (2014) Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.047>
4. Khanum, A. B., Shakira, L., Rehman, Z-U., Khan, T. A., Najam, K., Saeed, N., Khan, M. A., Nazeer, A., Nazir, T., & Aslam, S. (2020) Prophylactic treatment of ischemic stroke with *Coffea arabica* in rats: A preliminary study. *Biomedical Research and Therapy*, 7(5), 3768-3777. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i5.604>
5. Ciaramelli, C., Palmioli, A., & Airoidi, C. (2019) Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. *Food Chemistry*, 278, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.063>
6. Socala, K., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E., & Wlaz, P. (2021) Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1),

- 1-64. <https://doi.org/10.3390/ijms22010107>
7. Angeloni, G., Guerrini, L., Masella, P., Bellumori, M., Daluiso, S., Parenti, A., & Innocenti, M. (2019) What kind of coffee do you drink? Na investigation on effects of eight diferente extraction methods. *Food Research International*, 116, 1327-1335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.022>
8. Makiso M. U., Tola Y.B., Ogah O. & Endale FL. (2023) Bioactive compounds in coffee and their role in lowering the risk of major public health consequences: A review. *Food Science & Nutrition*, 12(2), 734-764. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3848>
9. Gamboa-Gómez, C., Morales-Castro, J., Barragán-Zúniga, J., Herrera, M. D., Zamilpa-Álvarez, A., González, J. L., Martínez-Aguilar, G., Morales-Castro, E. P., Anese, M., & Alongi, M. (2024) Influence of coffee roasting degree on antioxidant and metabolic parameters: comprehensive in vitro and in vivo analysis. *Current Research in Food Science*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100861>
10. Valverde, M. E., Pérez, T. H., & López, O. P. (2015) Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015(1), 376-387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
11. Lu, H., Lou, H. H., Hu, J. J., Liu, Z., & Chen, Q. H. (2020) Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2333-2356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12602>
12. Rai, S. N., Mishra, D., Singh, P., Vamanu, E., & Singh, D. (2021) Therapeutic applications of mushrooms and their biomolecules along with a glimpse of in silico approach in neurodegenerative diseases. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 137(111306). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111377>
13. Hassan, M., Shahzadi, S., Ransom, R. F., & Kloczkowski, A. (2023) Nature's Own Pharmacy: Mushroom-Based Chemical Scaffolds and Their Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15596. <https://doi.org/10.3390/ijms242115596>
14. Capra, R. S., & Tonin, F. B. (2019). *Ascensão do cultivo de cogumelos comestíveis no Brasil*. In *8ª Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu*, São Paulo, Brasil.

Recuperado em 7 de janeiro de 2024, de <http://www.jornacitec.fatecbt.edu.br/index.php/VIIIJTC/VIIIJTC/paper/viewFile/1755/2174>

15. Rodrigues, G. M., & Okura, M. H. (2022) Cogumelos comestíveis no Brasil: uma revisão bibliográfica. *Research, Society and Development*, 11(8). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30830>
16. Gosh, S., Nandi, S., Benerjee, A., Sarkar, S., Chakraborty, N., & Acharya, K. (2021) Prospecting medicinal properties of Lion's mane mushroom. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8) <https://doi.org/10.1111/jfbc.13833>
17. Urakami, E. M. (2021). *Processo de produção de alimento funcional compreendendo cogumelo comestível* (BR102021010636-0 A2). Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito em 1 de junho de 2021, concessão em 1 de fevereiro de 2022.
18. Brandalise, F., Roda, E., Ratto, D., Goppa, L., Gargano, M. L., Cirilincione, F., Priori, E. C., Venuti, M. T., Pastorelli, E., Savino, E., & Rossi, P. (2023) *Hericium erinaceus* in Neurodegenerative Diseases: From Bench to Bedside and Beyond, How Far from the Shoreline? *Journal of Fungi*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/jof9050551>
19. Li, I. C., Lee, L. Y., Tzeng, T. T., Chen, W. P., Chen, Y. P., Shiao, Y. J. & Chen, C. C. (2018) Neurohealth Properties of *Hericium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behavioural Neurology*, 2018(1). <https://doi.org/10.1155/2018/5802634>
20. Qiu, Y., Lin, G., Liu, W., Zhang, F., Linhardt, R. J., Wang, X., & Zhang, A. (2024). Bioactive substances in *Hericium erinaceus* and their biological properties: A review. *Food Science and Human Wellness*, 13(4), 1825-1844. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250152>
21. Contato, A. G., & Conte-Junior, C. A. (2025). Lion's Mane Mushroom (*Hericium erinaceus*): A Neuroprotective Fungus with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Potential—A Narrative Review. *Nutrients*, 17(8), 1307. <https://doi.org/10.3390/nu17081307>
22. Marcucci, C. T., Benassi, M. T., Almeida, M. B. & Nixdorf, S. L. (2013) Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. *Química Nova*, 36(4). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000400011>

23. Rabelo, D. M., Henriques, B., Castilho, R. O. & Labanca, R. (2018) Influência do método de extração de café no perfil químico e atividade antioxidante “in vitro” e “in vivo” nas bebidas. *Brazilian Journal of Food Research*, 9(2). <https://doi.org/10.3895/rebrapa.v9n2.5270>
24. Caporaso, N., Whitworth, M. B., Cui, C. & Fisk, I. D. (2018) Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. *Food Research International*, 108(2018), 628-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.077>
25. Ruggiero, M., Calvello, R., Porro, C., Messina, G., Cianciulli, A. & Panaro, M. A. (2022) Neurodegenerative Diseases: Can caffeine be a powerful ally to weaken neuroinflammation? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12958. <https://doi.org/10.3390/ijms232112958>
26. Doepker, C., Movva, N., Cohen, S. S., & Wikoff, D. S. (2022) . Benefit-risk of coffee consumption and all-cause mortality: A systematic review and disability adjusted life year analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 170 (113472). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113472>
27. Wu, L., Sun, D. & He, Y. (2017) Coffee intake and the incident risk of cognitive disorders: a dose-response meta-analysis of nine prospective cohort studies. *Clinical Nutrition*, 36(3), 730-736. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.05.015>
28. Kolb, H., Kempf, K. & Martin, S. (2020) Health effects of coffee: mechanism unraveled?. *Nutrients*, 12(6), 1842. <https://doi.org/10.3390/nu12061842>
29. Porro, C., Cianciulli, A., & Panaro, M. A. (2024) A cup of coffee for a brain long life. *Neural Regeneration Research*, 19(1), 158-159. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.375324>
30. Al-Bratty, M., Alhazmi, H. A., Rehman, Z. U., Javed, S. A., Ahsan, W., Najmi, A., Khuwaja, G., Makeen, H. A. & Khalid, A. (2020) Determination of Caffeine Content in Commercial Energy Beverages Available in Saudi Arabian Market by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis. *Journal of Spectroscopy*, 2020(1). <https://doi.org/10.1155/2020/3716343>
31. Salahdeen, H. M., Omoaghe, A. O., Isehunwa, G. O., Murtala, B. A. & Alada, A. R. A. (2015) Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of ethanolic extracted of

kolanut (*Cola nitida*) (vent) and its toxicity studies in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(3), 56-70. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5711>

32. Koshima, Y., Kitamura, Y., Islam, M. Z. & Kokawa, M. (2020) Quantitative and Qualitative Evaluation of Fatty Acids in Coffee Oil and Coffee Residue. *Food Science and Technology Research*, 26(4), 545-552. <https://doi.org/10.3136/fstr.26.545>

33. Tsegay, G., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., Mohammed, A. M. & Mamo, H. (2020) Effect of altitude of coffee plants on the composition of fatty acids of green coffee beans. *BMC Chemistry*, 14(36). <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00688-0>

34. Rahman, M. A., Abdullah, N. & Aminudin, N. (2014) Inhibitory Effect on *In Vitro* LDL Oxidation and HMG Co-A Reductase Activity of the Liquid-Liquid Partitioned Fractions of *Hericum erinaceus* (Bull.) Persoon (Lion's Mane Mushroom). *BioMed Research International*, 2014(1). <https://doi.org/10.1155/2014/828149>

35. Xie, G., Tang, L., Xie, Y. & Xie, L. Y. (2022) Secondary metabolites from *Hericum erinaceus* and their anti-inflammatory activities. *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072157>

36. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Din, A. (2009). Physicochemical and functional properties of barley β -glucan as affected by different extraction procedures. *International journal of food science & technology*, 44(1), 181-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01721.x>

37. Sande, D., Oliveira, G. P., Moura, M. A. F., Martins, B. A., Lima, M. T. N. S. & Takahashi, J. A. (2019) Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. *Food Research International*, 125, 108524. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108524>

38. Karimi, E., Jaafar, H. Z. E., Ghasemzadeh, A. & Ebrahimi, M. (2015) Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial properties of the microwave aqueous extract of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Biological Research*, 48(9). <https://doi.org/10.1186/0717-6287-48-9>

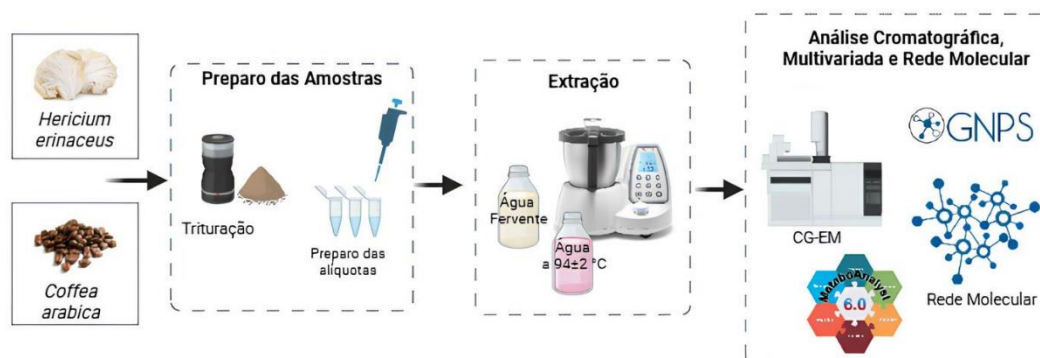
39. Pinto, M. E. A., Araújo, S. G., Morais, M. I., Sá, N. P., Lima, C. M., Rosa, C. A., Siqueira, E. P., Johann, S., Lima, & Lucia A. R. S. (2017) Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Health Sciences*, 83(03). <https://doi.org/10.1590/0001->

[3765201720160908](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020)

40. Saeed, N. M., El-Dermedash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A & Abdel-Naim, A. B. (2012) Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in dif experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(2012), 84-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020>
41. Kała, K., Cicha-Jeleń, M., Hnatyk, K., Krakowska, A., Sułkowska-Ziaja, K., Szewczyk, A., Lazur, J., & Muszyńska, B. (2024). Coffee with *Cordyceps militaris* and *Hericium erinaceus* Fruiting Bodies as a Source of Essential Bioactive Substances. *Pharmaceuticals*, 17(7), 955. <https://doi.org/10.3390/ph17070955>.
42. Santacruz, L., Hurtado, D. X., Doohan, R., Thomas, O. P., Puyana, M., & Tello, E. (2020). Metabolomic study of soft corals from the Colombian Caribbean: PSYCHE and 1H-NMR comparative analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 541. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62413-0>
43. Pineda-Alegría, J. A., Peña-Rodríguez, L. M., Cardoso-Taketa, A., Sánchez, J. E., Torres-Acosta, J. F. J., Hernández-Bolio, G. I., Ortiz-Caltempa, A., Villarreal, M. L., & Aguilar-Marcelino, L. (2024). 1H-NMR Metabolomic Study of the Mushroom *Pleurotus djamor* for the Identification of Nematocidal Compounds. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 17(5), 580. <https://doi.org/10.3390/ph17050580>
44. Salamanca, C. A., Fiol, N., González, C., Saez, M., Villaescusa, I. (2017) Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso. *Food Chemistry*, 214(2017), 622-630. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.120>
45. Efthymiopoulos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo-Perfil, A., Eveleigh, A., Aliev, A., Kay, A. & Mills-Lampsey, B. (2018) Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops and Products*, 119, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.008>
46. Islam, M. A., Brown, R. J., O'Hara, I., Kent, M. & Heimann, K. (2014) Effect of temperature and moisture on high pressure lipid/oil extraction from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 88(2014), 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.08.038>

47. Lingle, T. R. *The Coffee Brewing Handbook: A Systematic Guide to Coffee Preparation*. (Specialty Coffee Association of America, 2011).
48. Liang, J., Chan, K.C. & Ristenpart, W.D. (2021). An equilibrium desorption model for the strength and extraction yield of full immersion brewed coffee. *Scientific Reports*, 11, 6904. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85787-1>
49. Santos, G. S. (2022). *Phaeurus antarcticus e seus fungos endofíticos: Diversidade química de uma farmácia oculta sob o oceano Antártico* (Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto). Universidade de São Paulo
50. Yang, J-Y., Tao, L., Lou, D., Patabendige, N. M., Ediriweera, A. N., Liu, S., Lu, W., Tarafder, E., Rapior, S., Hapuarachchi, K. K. Innovative applications of medicinal mushrooms in functional foods and nutraceuticals: a focus on health-boosting beverages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2025**, 20(15), 1605301.

Resumo Gráfico



Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade do Estado da Bahia, à Universidade Federal da Bahia pelo apoio técnico e colaboração fornecendo acesso aos recursos necessários, o apoio financeiro das agências brasileiras de financiamento à pesquisa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Dan Morais pela generosa doação do aparelho de cozimento multifuncional Yammi 2 e por sua valiosa assistência na preparação do extrato aquoso.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Universidade do Estado da Bahia - UNEB (PROINOVAÇÃO

013/2022). Esta pesquisa recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil – bolsa 406331/2023-5).

Informações do Autor

Contribuições dos autores

Ana Verena Viana dos Santos: conceituação, metodologia, investigação, escrita – preparação do rascunho original. Keila Almeida Santana: metodologia, investigação, escrita – revisão e edição. Maria Paula Machado Cardoso: metodologia, investigação, escrita – revisão e edição. Nandjane Bôa Morte: metodologia, investigação, escrita – revisão e edição. Eduard Ferney Valenzuela Toledo: metodologia, supervisão, escrita – revisão e edição. Clicia Maria Jesus Benevides: supervisão, obtenção de financiamento. Aníbal de Freitas Santos Júnior: supervisão, obtenção de financiamento, escrita – revisão e edição. Gustavo Souza dos Santos: supervisão, obtenção de financiamento, escrita – revisão e edição; Alexandre Rafael Lenz: supervisão, obtenção de financiamento, escrita – revisão e edição. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Declarações de Ética

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesses relacionados à elaboração e publicação deste artigo.

CAPÍTULO II

Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in *Hericium erinaceus*-Enriched Coffee

Ana Verena Viana dos Santos^{1,2}; Victor Pena Ribeiro⁴; Erika Maria de Oliveira Ribeiro²; Keila Almeida Santana²; Maria Paula Machado Cardoso^{1,2}; Nandjane Silva Bôa Morte^{1,2}; Clícia Maria de Jesus Benevides²; Ian Castro-Gamboá³; Aníbal de Freitas Santos Júnior²; Gustavo Souza dos Santos^{3*}; Alexandre Rafael Lenz^{1,2*}

¹Grupo de Pesquisa em Bioinformática e Biologia Computacional da UNEB (G2BC), Departamento de Ciências Exatas e da Terra; Campus I, Universidade do Estado da Bahia, Bahia, Brasil, 41.150-000.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências da Vida; Campus I, Universidade do Estado da Bahia, Bahia, Brasil, 41.150-000.

³Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil, 14800-060.

⁴Agricultural Research Service, Department of Agriculture, Mississippi, United States, 38677.

*Corresponding authors: alenz@uneb.br gustavo.souza-santos07@unesp.br

ABSTRACT

Coffee is increasingly recognized as a functional beverage due to its diverse bioactive compounds, particularly those with antioxidant and neuroprotective properties. Its widespread consumption provides an attractive platform for incorporating additional health-promoting ingredients. *Hericium erinaceus* (lion's mane mushroom) produces bioactive metabolites, including the neurotrophic compounds hericenones and erinacines, as well as antioxidant and anticancer constituents, positioning it as a promising ingredient for the development of functional coffee blends. However, little is known about the efficiency of extracting these compounds under typical domestic brewing conditions. Here, we evaluated the extractability of *H. erinaceus* metabolites in coffee prepared by hot water infusion. Samples of *Coffea arabica*, *H. erinaceus* fruiting bodies, and their blend were subjected to hot water, methanol, and hexane extractions, followed by ¹H NMR spectroscopy and chemometric analysis. Characteristic resonances corresponding to bioactive metabolites from both sources were observed in the hot water extracts, including β-glucans (HEBG), erythritol, caffeine, cafestol, kahweol, and phytosterols. In contrast, neurotrophic compounds such as hericenones, ergosterol peroxide, and cerevisterol were not detected. The detection of HEBG, a polysaccharide with recognized immunomodulatory and health-promoting activities, supports the potential of *H. erinaceus*-enriched coffee as a functional beverage. This study represents an initial step toward validating this combination and highlights the need for further investigations into extraction efficiency, compound quantification, bioaccessibility, and optimal blending strategies.

Key-words: Functional beverage; Enriched coffee; *Coffea arabica*; *Hericium erinaceus*; Bioactive compounds.

1 INTRODUCTION

Coffee, a beverage consumed by billions worldwide, is undergoing a significant transformation from a simple morning ritual to a scientifically recognized matrix for functional beverages [1,2,3,4,5,6]. The inherent composition of *Coffea arabica*, rich in

bioactive compounds such as caffeine, chlorogenic acids, caffeic acid, trigonelline, cafestol, and kahweol, already provides a baseline of health benefits, including antioxidant activity, anti-inflammatory effects, neuroprotective properties, and enhancement of cognitive and perceptual abilities [7,8,9,10,11,12].

Regular coffee consumption has been associated with protective effects against various chronic disorders. It appears to correlate with a reduced risk of developing certain neurodegenerative conditions, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and dementia [9,13,14]. The neuroprotective mechanisms are attributed to coffee's bioactive constituents, which modulate pathways involved in reducing neuroinflammation and oxidative stress [15,16,17].

The global market's embrace of wellness and functional foods has spurred innovation within the coffee industry, leading to the development of novel products fortified with specific bioactive compounds [18,19,20]. These additions aim to enhance the beverage's natural health-promoting profile, creating customized blends that target a range of health concerns, with a particular and growing interest in cognitive enhancement [14,21,22].

Building upon its well-documented health benefits and widespread consumption, coffee has emerged as an ideal vehicle for the incorporation of functional ingredients, such as medicinal mushrooms [21,22,23]. Among these, *Hericium erinaceus*, commonly known as lion's mane, has attracted significant attention due to its rich nutritional profile, which includes proteins, dietary fiber, vitamins, and various bioactive compounds [24]. These components have been associated with a variety of health-promoting effects, including potential benefits for gastrointestinal health, enhancement of immune function, and anticancer/antitumor effects [25,26,27,28].

β -glucans from *H. erinaceus* (HEBG) exhibit diverse bioactivities, including glycemic and lipid regulation, immune modulation, antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor effects [28]. The incorporation of these polysaccharides into foods has been shown to lower the glycemic index, attenuate postprandial blood glucose levels, and contribute to diabetes prevention, supporting their potential as functional food and nutraceutical ingredients [29]. However, the growing interest and the widespread application of this mushroom are primarily driven by its efficacy in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases, attributed to its neuroprotective properties [28,30].

Approximately 150 small molecules have been isolated and identified from *H. erinaceus*, among which the two most extensively studied classes are hericenones and erinacines, due to their notable neurotrophic and neuroprotective properties [28]. Hericenones, currently comprising 14 known compounds, are typically extracted from the fruiting bodies of *H. erinaceus* using various extraction methods [28]. These molecules have demonstrated a range of bioactivities, most notably the stimulation of nerve growth factor (NGF) synthesis [31,32] and neuronal protection [33]. Additionally, some hericenones have shown cytotoxic effects against carcinoma cell lines [34,35,36]. Erinacines, by contrast, are primarily found in the mycelium and include 20 identified compounds to date [28]. Like hericenones, they exhibit neurotrophin-inducing activity, with erinacine A displaying potent antioxidant effects [37].

Integrating medicinal mushrooms into a familiar and culturally accepted beverage like coffee presents a promising strategy for promoting a more nutrient-dense and health-supportive diet in a convenient and enjoyable form [38,39]. Fortifying coffee with powdered *H. erinaceus* fruiting bodies offers a practical and accessible means of incorporating functional compounds into daily routines [21,23]. This approach aligns with the interests of health-conscious consumers who seek to enhance their nutritional intake without altering established habits, such as regular coffee consumption. However, despite the growing market presence and consumer interest in mushroom-enriched functional beverages, scientific studies evaluating their metabolic profile and health-promoting efficacy remain scarce. This lack of rigorous evidence is particularly concerning given the widespread marketing of these products, which is frequently accompanied by health claims that remain insufficiently substantiated by research.

This study addresses a key question: *Are the main bioactive compounds present in the fruiting bodies of H. erinaceus effectively extracted when prepared as a coffee blend using a homemade hot water brewing method?* To answer this, we conducted a metabolic profiling using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) on samples of *C. arabica*, *H. erinaceus* fruiting bodies, and a blend of both, subjected to different extraction methods. This work advances our understanding of the metabolic profile and extractability of functional compounds in such blends, thereby supporting the development of functional beverages that combine nutritional benefits with widely accepted consumption habits.

2 RESULTS AND DISCUSSION

Eight extract samples, each prepared in triplicate, were analyzed to compare the

metabolic profiles of *C. arabica*, *H. erinaceus*, and their blended formulation across different extraction solvents and conditions. The extract codes and corresponding sample types are detailed in **Table 1**. These replicates were used in multivariate analyses to evaluate solvent-dependent variation in metabolite composition and potential markers of each extract group.

Extract Code	Description
RJ+Hx-Rn	<i>H. erinaceus</i> hexane extract
RJ+MeOH-Rn	<i>H. erinaceus</i> methanol extract
Rc+Hx-Rn	<i>C. arabica</i> hexane extract
Rc+MeOH-Rn	<i>C. arabica</i> methanol extract
RJ+A94-Rn	<i>H. erinaceus</i> aqueous extract at 94 ± 2 °C
RJ+AF-Rn	<i>H. erinaceus</i> aqueous extract (boiling water)
RB+A94-Rn	Blend aqueous extract at 94 ± 2 °C
RB+AF-Rn	Blend aqueous extract (boiling water)

Table 1. Summary of extract samples analyzed in the study. Rc = *C. arabica*; RJ = *H. erinaceus*; RB = Blend of *C. arabica* and *H. erinaceus*; Hx = hexane; MeOH = methanol; A94 = aqueous extraction at 94 ± 2 °C; AF = aqueous extraction with boiling water. Each condition was prepared in triplicate, denoted as Rn, where n = 1,2,3.

2.1 Metabolic Profiling and Chemometric Characterization of Hexane and Methanol Extracts from *H. erinaceus* and *C. arabica*

2.1.1 Hexane Extracts of *H. erinaceus*

The spectra obtained from the hexane extracts **RJ+Hx-Rn** of *H. erinaceus* (**Figure 1**) through ¹H-NMR revealed a complex metabolic profile. The signal observed at $\delta = 10.27$ may correspond to protons of carboxylic groups, while the signals between $\delta = 6.0$ – 6.8 suggest the presence of conjugated aromatic systems, carbonyl-conjugated alkenes, or ring double bonds. A multiplet identified between $\delta = 5.18$ – 5.42 (m, 2H) may be associated with olefinic protons, characteristic of unsaturated fatty acids, and the regions around $\delta = 2.5$ and 3.8 which may indicate protons bound to ester or methoxyl groups. Signals at $\delta = 1.2$ and 2.0 are likely attributable to methyl protons, typical of aliphatic chains.

Collectively, the identified signals and spectral structure auto-assignments of compounds previously reported in *H. erinaceus*, presented in the **Supplementary Figure 1**, suggest the presence of six metabolites—cervisterol, ergosterol, ergosterol acetate, ergosteryl palmitate, erinarol C, and taraxasterol acetate—whose hydrogen proton signals were

completely matched and confidently detected in the hexane spectra. In addition, 29 other compounds showed near-complete correspondence, with all but ≤ 5 protons accounted for, suggesting their likely presence in the extracts. These include structurally diverse metabolites such as ergosterol peroxide, dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine (DLPE), erinarols (A-B), eriocarpin, multiple hericenones (A-H), hericenones (C-I, K), 3-hydroxyhericenone F, and common fatty acids (linoleic, oleic, palmitic, and stearic acids). A complete list of auto-assigned structures and proton assignments is provided in **Supplementary Table 1**.

Ergosterol peroxide, cerevisterol, and DLPE, commonly isolated from *H. erinaceus* fruiting bodies, do not strongly induce NGF independently but act synergistically with NGF to promote neurite outgrowth in PC12 cells, suggesting potential neuroprotective benefits [46]. DLPE, a phospholipid, has been shown to protect neurons from ER stress-induced cell death [47]. In addition, the presence of fatty acids is consistent with the lipophilic profile of the hexane extract. It is associated with potential biological activities, such as anti-inflammatory and antioxidant effects [48].

Among the 29 compounds showing near-complete correspondence, several represent key chemical markers of *H. erinaceus*, reinforcing its broad repertoire of bioactivities spanning neuroprotection, anti-inflammatory effects, and anticancer potential [28]. Erinarols A and B were shown to significantly enhance the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in a dose-dependent manner, highlighting their potential role in lipid metabolism and related regulatory pathways [49]. Hericenones (B-C) demonstrated neuroprotective effects by suppressing tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress [50,51]. 3-Hydroxyhericenone F protects Neuro2a cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis, a process implicated in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, and prion disorders [32,33]. Several hericenones (C-E, H) stimulate NGF synthesis in astroglial cells, promoting neuronal survival and regeneration, with hericenone F additionally showing anti-inflammatory activity in RAW264.7 macrophages, neuroprotection, and cognitive-enhancing effects [31,32,35,52]. Hericenones G and H further support neuroprotective and nootropic functions, with hericenone H also contributing to nerve repair [32,53,54,55]. In contrast, hericenone I exhibits cytotoxicity against the Ec109 cancer cell line [35].

The hexane extract of *H. erinaceus* exhibited a highly complex spectral profile, consistent with the extraction of a diverse set of nonpolar and moderately polar metabolites,

including sterols, terpenoids, and fatty acids. The richness of this profile provides a valuable baseline for comparative analyses with aqueous extracts, enabling the identification of polarity-dependent extraction patterns and offering insights into the differential recovery of bioactive constituents across solvent systems.

2.1.2 Methanol Extracts of *H. erinaceus*

The spectra obtained from the methanol extracts **RJ+MeOH-Rn** of *H. erinaceus* (**Figure 2**) through $^1\text{H-NMR}$ revealed a predominant singlet at $\delta = 6.24$, suggesting the presence of aromatic protons or protons in deshielded environments, characteristic of unsaturated compounds [56]. Additionally, a broad multiplet in the $\delta = 4.1-4.5$ region indicates the presence of protons bound to functional groups such as alcohols or esters. Doublets observed at $\delta = 2.25-2.26$ (d, $J = 3.42$ Hz) and $\delta = 2.29-2.30$ (d, $J = 3.42$ Hz) may be attributed to methylene protons, possibly originating from methyl or methylene groups. Several signals in the $\delta = 3.00-3.50$ region suggest the presence of functional groups such as esters, ether moieties, or glycosylated metabolites [30].

The combined analysis of the identified NMR signals and spectral auto-assignments (**Supplementary Figure 2**) suggests the presence of HEBG, a naturally occurring polysaccharide commonly found in mushrooms, known for its immunomodulatory, antibacterial, antiviral, and reported metabolic activities [57]. Erythritol was also identified as a sugar alcohol widely used in the food industry due to its contribution to flavor profiles [58]. In addition, erythritol exhibits anticariogenic activity by inhibiting the growth and acid production of cariogenic bacteria, and is recommended for individuals with diabetes [59].

2.1.3 Hexane Extracts of *C. arabica*

The spectra obtained from the hexane extracts **Rc+Hx-Rn** of *C. arabica* (**Figure 3**) through $^1\text{H-NMR}$ revealed low-intensity signals in the region $\delta = 7.39-7.5$, suggesting the presence of aromatic compounds in low concentrations. In the region between $\delta = 6.25-6.45$, characteristic signals of allylic protons were observed [56]. Signals attributed to methoxy groups ($-\text{OCH}_3$), which may be associated with carbohydrates and sugars, were detected in the $\delta = 3.20-4.39$ region [60]. In region $\delta = 0.5-2.0$, two intense signals around $\delta = 1.1$ and 1.3 were identified, along with additional minor signals within the same range, characteristic of methyl ($-\text{CH}_3$) and methylene ($-\text{CH}_2-$) groups. These are typical of long aliphatic chains, indicative of compounds from the lipid fraction of coffee [61].

The combined analysis of the identified signals and auto-assigned spectra, as shown in **Supplementary Figure 3**, suggests the presence of β -sitosterol, stigmasterol, and campesterol as the main phytosterols in *C. arabica*, which, like other plant sterols/stanols, are associated with LDL cholesterol-lowering, anticancer, and hepatoprotective activities [62]. In addition, components of the coffee lipid fraction were identified, such as palmitic acid and pregnenolone-derived compounds, which have been reported to exhibit antioxidant activity [63].

2.1.4 Methanol Extracts of *C. arabica*

The spectra obtained from the methanol extracts **Rc+MeOH-Rn** of *C. arabica* (**Figure 4**) through $^1\text{H-NMR}$ exhibit signals predominantly distributed within the aromatic region ($\delta = 6.5\text{-}9.0$), indicating the presence of protons bonded to aromatic rings. Signals observed between $\delta = 7.5\text{-}8.0$ are associated with the purine system, characteristic of caffeine [64]. Multiple signals within the $\delta = 6.5\text{-}7.5$ region suggest the presence of polyphenols commonly found in *C. arabica*, such as chlorogenic and caffeic acids, due to their substituted benzene rings [65]. In the $\delta = 3.0\text{-}4.5$ region, intense signals indicate the presence of methoxy groups, sugars, and additional signals characteristic of caffeine [66]. Furthermore, minor signals in the $\delta = 2.0\text{-}5.0$ region may correspond to aliphatic methyl groups in fatty acids or lipids in low concentrations in the sample.

The integrated analysis of the identified $^1\text{H NMR}$ signals and spectral structure auto-assignments (**Supplementary Figure 4**) of the methanolic extracts of *C. arabica* suggested the presence of diterpenes, including kahweol and cafestol [67]. The combined administration of kahweol and cafestol exerted antiproliferative effects on renal carcinoma cells, suggesting their potential as therapeutic agents for kidney cancer [68]. Kahweol is known for its diverse biological activities, including anti-inflammatory, antiangiogenic, and antitumor effects [69]. Furthermore, chlorogenic acids and quinic acid were also detected, compounds known to contribute to the anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotective properties attributed to coffee consumption [11].

2.2 Metabolic Profiling and Chemometric Characterization of Aqueous Extracts from *H. erinaceus* and *H. erinaceus*-coffee blend

2.2.1 Aqueous Extracts of *H. erinaceus*

$^1\text{H NMR}$ analysis of aqueous extracts of *H. erinaceus* (**RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn**) (**Figure 5**) revealed predominant signals in the $\delta = 3.20\text{-}3.80$ region, consistent with

methylene and methine protons adjacent to heteroatoms, particularly oxygen, as typically observed in alcohols, esters, ethers, and sugar moieties. Additional resonances were observed in the $\delta = 4.10\text{--}4.54$ region, consistent with allylic protons, along with discrete signals between $\delta = 5.94\text{--}6.15$, indicative of vinylic protons. The relatively low intensity of these signals suggests that hot water extraction was less efficient at recovering lipophilic compounds, as expected, since hexane interacts more effectively with such compounds. Furthermore, deshielded resonances at $\delta = 8.51\text{--}8.53$ are consistent with protons in heterocyclic structures. Collectively, these findings support the assignment of molecular structures corresponding to polysaccharides, such as β -glucans, and low-molecular-weight sugars commonly reported in *H. erinaceus* [28]. Integrated analysis of these resonances with auto-assigned molecular structures (**Supplementary Figure 5**) further confirmed the presence of β -glucan and erythritol, as previously discussed.

2.2.2 Aqueous Extracts of the *H. erinaceus*–coffee blend

The spectra of the blends (**RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn**) (**Figure 6A**) revealed a broad distribution of signals consistent with a diverse metabolite profile. Resonances in the $\delta = 3.2\text{--}4.5$ region indicated sugars, while signals in the $\delta = 2.5\text{--}3.2$ region may correspond to protons adjacent to nitrogen atoms, such as in amines or amino acid residues, among other electronegative environments. Signals at $\delta = 1.5\text{--}2.5$ and $\delta = 0.74\text{--}1.5$ suggested aromatic-linked methyl groups, amino acids, and aliphatic protons from fatty acids. Notably, intense resonances at $\delta = 6.0\text{--}8.5$, particularly $\delta = 7.8\text{--}8.2$, were assigned to phenolics including caffeic acid, chlorogenic acid derivatives, and caffeine, in agreement with previous studies [70,71,72].

Comparative spectral analysis revealed overlapping signals for sugars ($\delta = 3.0\text{--}4.5$) and aliphatic protons ($\delta = 1.14\text{--}1.27$) across all extracts. As expected, *H. erinaceus* samples displayed more intense β -glucan resonances, while the blends exhibited stronger aromatic signals, consistent with the known phenolic-rich composition of coffee and the predominance of β -glucan in *H. erinaceus* extracts (**Figures 6B–C**) [60,73]. Subtle shifts in carbohydrate regions, likely due to caffeine–chlorogenic acid interactions in solution, explain minor differences between matrices and align with previously reported spectra [64,74,75].

Auto-assignment of ^1H NMR signals of the blends (**RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn**) suggest the presence of diverse compounds with all proton signals confidently matched in the spectra (**Figure 7**), including β -glucan, erythritol, caffeine, cafestol, kahweol, β -sitosterol,

stigmasterol, and campesterol. Additionally, eight other metabolites showed near-complete proton correspondence (≤ 5 unmatched protons). Auto-assignments of ^1H NMR signals for the blends (**RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn**) are presented in **Supplementary Figures 6** and **7**, respectively. A complete list of auto-assigned structures and proton assignments is provided in **Supplementary Table 1**.

Most phytosterols exhibit ^1H NMR signals similar to those of cholesterol and its derivatives, reflecting structural, functional, and biosynthetic parallels [76,77]. High spectral overlap among phytosterols, mycosterols, and cholesterol complicates individual compound identification in complex mixtures. Nevertheless, phytosterol signals are detectable even at low concentrations [76]. Thermally labile sterols are sensitive to high temperatures, which may explain their absence in hot-water extracts of *H. erinaceus* [62].

HEBG are prominent bioactive polysaccharides, commonly extracted from *H. erinaceus* fruiting bodies using hot water [78]. Three distinct fractions—HEBG-1, HEBG-2, and HEBG-3—have been characterized, particularly HEBG-2 is predominantly composed of β -1,6-glucan, whereas HEBG-3 contains mainly β -1,3-glucan [29]. These HEBG have attracted considerable interest due to their diverse health-promoting effects, including the modulation of blood glucose and lipid levels, enhancement of immune function, and broad bioactivity profiles [29].

Immunomodulatory properties of HEBG have been demonstrated through stimulation and regulation of immune responses, thereby enhancing host defense mechanisms [79,80]. Antitumor activity has been reported, with HEBG inhibiting the growth of certain cancer cell lines and exerting immunological effects that contribute to tumor suppression [81,82]. Their antioxidant capacity, attributed to free radical scavenging, helps protect cells from oxidative stress-induced damage [83,84,85]. Furthermore, HEBG exhibit anti-inflammatory effects, including attenuation of inflammatory responses in inflammatory bowel disease models via immune regulation and modulation of gut microbiota composition [86,87].

Notably, foods enriched with HEBG have been shown to reduce the glycemic index, attenuate postprandial blood glucose levels, and contribute to diabetes prevention [29]. Although β -glucans from other edible mushrooms, such as *Auricularia polytricha*, have demonstrated neuroprotective effects in animal models of cerebral injury [88], such activity has not yet been reported for β -glucans derived from *H. erinaceus*. Collectively, these findings

highlight the potential of HEBG to enhance the functional value of *H. erinaceus*-enriched coffee blends, supporting their development as nutraceutical formulations with added health benefits.

2.2.3 Impact of Extraction Temperature on Bioactive Compound Profiles

Exploratory PCA analysis (**Figure 8A**) was used to evaluate the overall variation among the spectra of blends prepared at 94 ± 2 °C (**RB+A94-Rn**) and with boiling water (**RB+AF-Rn**). The first two principal components accounted for 83.7% of the total variance, indicating a well-represented model; however, no clear separation between the groups was observed, as the samples overlapped across all components. The p-values associated with the PCs consistently revealed no statistically significant differences between the extraction temperatures, suggesting highly similar global chemical profiles. In contrast, the supervised OPLS-DA analysis (**Figure 8B**) detected subtle but statistically significant differences between the two preparation conditions. The model displayed an excellent fit ($R^2 = 0.998$) and moderate predictive ability ($Q^2 = 0.543$). According to established chemometric criteria [43,89], Q^2 values above 0.5 are considered satisfactory, confirming the robustness of the model for discriminating between groups.

The Variable Importance in Projection (VIP) plot revealed that multiple ^1H NMR signals exhibited VIP values greater than 1.0, thereby emerging as relevant markers for distinguishing between the groups. Specifically, the chemical shifts $\delta = 3.34, 3.38, 3.18, 3.54, 3.42, 3.58, 3.66, 7.42, 6.74, 3.62,$ and 3.46 displayed higher intensities in the samples extracted under boiling conditions (**RB+AF-Rn**), suggesting that elevated temperatures favor the extraction of more polar or thermally stable compounds, such as caffeine and chlorogenic acids, which are characteristic constituents of coffee. Conversely, the signals at $\delta = 2.46, 2.50, 3.30,$ and 1.86 were more intense in the samples extracted at 94 ± 2 °C (**RB+A94-Rn**), indicating that protons associated with these spectral regions may undergo degradation or volatilization under higher extraction temperatures.

These findings confirm that temperature strongly influences the extraction of specific compound classes, emphasizing the importance of thermal control in determining the final chemical composition of the beverage, particularly in coffee. Notably, coffee extraction is a complex process in which multiple variables interact to shape both chemical and sensory profiles. While volatile organic compounds (VOCs) largely define aroma, non-volatile constituents such as caffeine, and chlorogenic acids are key contributors to bitterness and

astringency [90]. Overall, both volatile and non-volatile fractions must be considered when assessing the impact of extraction conditions on coffee quality.

3 CONCLUSIONS

This study demonstrates that key bioactive compounds from *Hericium erinaceus*, including β -glucans and erythritol, can be effectively extracted using a hot water method similar to homemade coffee preparation.

Although several commercial products claim cognitive benefits from *H. erinaceus* coffee blends, scientific evidence on their chemical composition and bioactive compounds, including hericenones, remains limited. In this study, aqueous extraction at 94 ± 2 °C did not show detectable hericenone signals by ^1H NMR, suggesting that typical preparation methods may not provide sufficient concentration for NMR detection. High-resolution mass spectrometry would be required to confirm or discard their presence.

Future research should aim to precisely quantify β -glucans, evaluate their bioaccessibility through *in vitro* digestion assays, determine optimal blending ratios, establish evidence-based recommendations for daily intake, and assess potential synergistic effects on human health. Collectively, this study represents an important first step toward the development of a scientifically supported functional beverage that unites traditional consumption practices with emerging nutraceutical innovations.

4 EXPERIMENTAL SECTION

4.1 Source and Preparation of Experimental Materials

Roasted coffee beans and dehydrated mushroom fruiting bodies were obtained from commercial suppliers. Fruiting bodies of *Hericium erinaceus*, previously dehydrated at 45 °C, were acquired from Cogumelos Fungitake Ltda. (Umuarama, Paraná, Brazil). The dried material was ground into a fine powder and stored in a desiccator under dry conditions until further use.

The coffee utilized in this study belongs to the Catuaí variety of *Coffea arabica*, a cultivar of exclusively Brazilian origin. The beans were cultivated at 1,220 meters above sea level in Riacho da Tapera, within the municipality of Piatã, Chapada Diamantina region, Bahia, Brazil (13°08'16.0" S, 41°46'38.5" W). The distinctive sensory profile of coffees produced in the Chapada Diamantina region is attributed to the unique terroir, characterized

by specific soil composition, climatic conditions, and high-altitude cultivation. Blenditta Torrefação de Bons Cafés Ltda performed roasting, and the roasted beans were subsequently ground and stored in a desiccator until analysis.

4.2 Preparation of Hexane and Methanol Extracts

To enable broad metabolic profiling, hexane and methanol extracts were prepared from dried mushroom and roasted coffee powders using an identical sequential extraction protocol adapted from [40], which is described in detail below. Initially, 4 g of each powdered sample was combined with 50 mL of hexane and incubated at 40 °C with constant agitation at 150 rpm for 30 minutes. After incubation, the mixture was filtered using qualitative filter paper, and the resulting filtrate (hexane extract) was collected. The remaining solid residue was subjected to two additional extractions under the same conditions, each time with fresh 50 mL aliquots of hexane. The three hexane extracts were pooled and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator to obtain a single replicate of the hexane extract.

The residual solid material was used for methanol extraction after the hexane extraction. The same procedure was repeated: 50 mL of methanol was added to the residue, incubated at 40 °C and 150 rpm for 30 minutes, followed by filtration. This step was also repeated two more times using fresh methanol aliquots. The three methanol extracts were combined and concentrated using a rotary evaporator, yielding one replicate of the methanol extract. All hexane and methanol extracts were prepared in triplicate and stored in amber vials at 4 °C until further analysis.

4.3 Preparation of Aqueous Extracts

An infusion-based aqueous extraction was employed to simulate conventional domestic coffee preparation and to generate a metabolic profile that more accurately reflects real-world consumer exposure. Aqueous extracts were prepared in triplicate from dried mushroom powder and from blends of dried mushroom and roasted coffee powders. For each extraction, 4 g of sample was combined with 50 mL of Milli-Q® ultrapure water, following an identical standardized infusion protocol described below.

For experimental purposes, a mushroom–coffee blend was prepared according to the proportion recommended by the coffee supplier: 16 g of powder per 200 mL of water, which was proportionally scaled to 4 g of blend per 50 mL of water. The blend consisted of 12% *H. erinaceus* (0.528 g) and 88% *C. arabica* (3.472 g), and was thoroughly homogenized to ensure

uniform distribution of components. Aqueous extraction of dried mushroom powder and the mushroom–coffee blend was conducted under two thermal conditions representative of domestic practices: boiling water and 94 ± 2 °C, the latter within the brewing temperature range recommended by the Specialty Coffee Association's *Coffee Brewing Handbook* [41,42]. This design aimed to evaluate the influence of extraction temperature on the metabolic profile of the resulting aqueous extracts.

A Yammi 2 multifunctional cooking machine was used for all aqueous extractions to standardize the infusion temperature. Milli-Q® ultrapure water (50 mL) was first added to the device, which was then activated to reach the target temperature. Once the desired temperature was achieved, 4 g of dried powder were added and manually stirred for 2 minutes, with brief intermittent pauses to simulate typical domestic infusion practices. Following extraction, the mixture was filtered using qualitative filter paper, and the resulting filtrate (aqueous extract) was collected. The solid residue was discarded, and two additional extractions were performed under the same conditions, each using a fresh 4 g sample and 50 mL of water. The three resulting filtrates were pooled to obtain a single replicate of the aqueous extract. All aqueous extracts were prepared in triplicate for each sample type. The pooled extracts were frozen at -40 °C, lyophilized, and stored in amber vials at 4 °C until further analysis.

4.4 ^1H -NMR Metabolic Profiling and Multivariate Analysis

For ^1H -NMR analysis, 1 mg of each sample was dissolved in 300 μL of deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d_6). The resulting solutions were transferred into 3 mm NMR tubes. ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker BioSpin 600 MHz spectrometer (Probe: CP TCI 600S3 H-C/N-D-05 Z) at 298.1 K. Samples were analyzed using a standard 1D pulse sequence (zg30). Each experiment consisted of 128 scans with a relaxation delay of 1.0 s, a pulse width of 7.75 μs , an acquisition time of 2.7263 s, and a receiver gain of 64. The spectral width was set to 12,019.2 Hz, and the acquired data size was 32,768 points, zero-filled to 131,072 points for processing, resulting in a digital resolution of 0.09 Hz per point.

Spectroscopic data were preprocessed using MNova® v16.0.0 (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain), following a modified protocol based on [43]. Manual phase and baseline corrections were performed to ensure optimal spectral quality and accuracy. The chemical shift scale was calibrated by setting the residual solvent signal of DMSO-d_6 to 2.50 ppm. Subsequently, spectra were visually stacked to facilitate comparative evaluation across samples. Binning was applied to the ^1H -NMR spectra using a bin width of

0.04 ppm to reduce spectral complexity and facilitate data interpretation. The intensity within each bin region was calculated using the peak widths and the summed area ("Sum"). This approach enabled dimensionality reduction and data normalization for subsequent multivariate analysis. Finally, the processed spectral data were exported in comma-separated values (CSV) format for further statistical and chemometric analyses.

A set of 98 metabolites was retrieved from the PubChem database in SDF format, including 79 compounds from *H. erinaceus* (e.g., β -glucan, ergosterol derivatives, cerevisterol, erinacerins, hericenones, hericerins, hericenols, and related terpenoids) and 19 compounds previously reported in *C. arabica* (e.g., caffeine, chlorogenic acids, cafestol, kahweol, and phytosterols). These molecular structures were imported into Mnova, where simulated $^1\text{H-NMR}$ spectra were generated using the software's auto-assignment tool. The auto-assigned spectra served as references to facilitate interpretation of the experimental NMR data obtained from the sample extracts.

The atom colors in the auto-assigned molecular structures (Supplementary Figures) represent the confidence levels in the correlation between the observed $^1\text{H-NMR}$ signals and their corresponding hydrogen atoms within the molecular framework. Green indicates high confidence, reflecting a precise match between the spectral signal and the assigned atom. Yellow represents moderate confidence, typically associated with signal overlap or minor discrepancies in spectral alignment. Red denotes low confidence or significant inconsistencies in the assignment. Lastly, atoms shown in gray, or without any coloration, indicate the absence of automatic assignment by the software or manual removal of the assignment, usually due to a lack of correspondence with the spectral data [44].

It is important to note that complete correspondence with auto-assigned $^1\text{H NMR}$ spectra does not guarantee the actual presence of searched compounds in the extracts, as factors such as overlapping signals, matrix effects, and structural similarities among metabolites can confound spectral assignments. On the other hand, low-quality matches or missing proton signals in the auto-assignment may arise from multiple factors, including solvent effects (e.g., DMSO interactions), spectral noise, baseline distortions, peak overlap, and dynamic conformational changes, among others.

Chemometric analyses were performed using MetaboAnalyst version 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) [45], following a modified protocol based on [43]. Irrelevant

spectral signals were excluded, and the dataset, formatted as unpaired samples in rows with peak intensities, was filtered using mean intensity. Normalization was performed using the “Sum” method, and Pareto scaling was applied to adjust data variance. Multivariate analysis, including Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA), were performed to explore overall variation and identify discriminant metabolic markers among the extract samples.

ABBREVIATIONS

HEBG	β -glucans from <i>H.erinaceus</i>
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
A94	Aqueous extraction at 94 ± 2 °C
AF	Aqueous extraction with boiling water
CSV	Comma-separated values
DLPE	dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine
DMSO-d ₆	Deuterated dimethyl sulfoxide
ER	Endoplasmic Reticulum
Hx	Hexane
MeOH	Methanol
NGF	Nerve Growth Factor
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
PCA	Principal Component Analysis
PPARs	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PC	Principal Component
Rc	<i>Coffea arabica</i>
RDI	Recommended Daily Intake
RB	Blend of <i>C. arabica</i> and <i>H. erinaceus</i>
RJ	<i>Hericium erinaceus</i>
SDF	Structured Data File

VIP	Variable Importance in Projection
VOCs	Volatile Organic Compounds

CAPTIONS OF TABLES AND FIGURES

Table 1. Summary of extract samples analyzed in the study. Rc = *C. arabica*; RJ = *H. erinaceus*; RB = Blend of *C. arabica* and *H. erinaceus*; Hx = hexane; MeOH = methanol; A94 = aqueous extraction at 94 ± 2 °C; AF = aqueous extraction with boiling water. Each condition was prepared in triplicate, denoted as Rn, where n = 1,2,3.

Figure 1. $^1\text{H-NMR}$ spectra of **RJ+Hx-Rn** hexane extract from *H. erinaceus*.

Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra of **RJ+MeOH-Rn** methanol extract from *H. erinaceus*.

Figure 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of **Rc+Hx-Rn** hexane extract from *C. arabica*.

Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ spectra of **Rc+MeOH-Rn** methanol extract from *C. arabica*.

Figure 5. $^1\text{H-NMR}$ spectra of **RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn** aqueous extracts from *H. erinaceus*.

Figure 6. (A) $^1\text{H-NMR}$ spectra of aqueous extracts from *H. erinaceus* (**RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn**) and *H. erinaceus-C. arabica* blends (**RB+AF-Rn** and **RB+A94-Rn**). (B) Regions highlighting similarities in $^1\text{H NMR}$ spectra of *H. erinaceus* aqueous extracts. (C) Regions corresponding to characteristic coffee signals present in the blends.

Figure 7. Key bioactive compounds from *H. erinaceus-C. arabica* blends (**RB+AF-Rn** and **RB+A94-Rn**). (A) β -glucan. (B) Erythritol. (C) Caffeine. (D) Cafestol. (E) Kahweol. (F) β -sitosterol. (G) Stigmasterol. (H) Campesterol.

Figure 8. (A) PCA score plot (PC1–PC2) of the $^1\text{H NMR}$ aqueous extract profiles (**RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn**) of the blend. (B) VIP score plot (OPLS-DA) highlighting the variables most relevant for distinguishing between **RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn** samples.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Auto-assignment of $^1\text{H NMR}$ signals of 94 metabolites retrieved from the PubChem database across the eight extract samples. (A) Summary of auto-assignments. (B) **RJ+Hx-Rn**. (C) **RJ+MeOH-Rn**. (D) **Rc+Hx-Rn**. (E) **Rc+MeOH-Rn**. (F) **RB+A94-Rn**. (G) **RB+AF-Rn**. (H) **RJ+A94-Rn**. (I) **RJ+AF-Rn**.

Supplementary Figure 1. Auto-assignment of $^1\text{H NMR}$ signals for molecular structures of candidate compounds in **RJ+Hx-Rn** hexane extracts from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 2. Auto-assignment of $^1\text{H NMR}$ signals for molecular structures of candidate compounds in **RJ+MeOH-Rn** methanol extracts from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 3. Auto-assignment of $^1\text{H NMR}$ signals for molecular structures of candidate compounds in **Rc+Hx-Rn** hexane extracts from *C. arabica*. Metabolites whose

hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 4. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in **Rc+MeOH-Rn** methanol extracts from *C. arabica*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 5. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in **RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn** aqueous extract from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 6. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in **RB+A94-Rn** aqueous extracts from *H. erinaceus* - coffee blend prepared at 94 ± 2 °C. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

Supplementary Figure 7. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in **RB+AF-Rn** aqueous extracts from *H. erinaceus* - coffee blend prepared with boiling water. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).

REFERENCES

1. Farah, A. (2009). Coffee as a speciality and functional beverage. In *Functional and speciality beverage technology* (pp. 370-395). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695569.3.370>
2. Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petrucci, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(6), 1192-1206. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>
3. Dini, I. (2019). An overview of functional beverages. *Functional and medicinal beverages*, 1-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00001-7>
4. Romualdo, G. R., Rocha, A. B., Vinken, M., Cogliati, B., Moreno, F. S., Chaves, M. A. G., & Barbisan, L. F. (2019). Drinking for protection? Epidemiological and experimental evidence on the beneficial effects of coffee or major coffee compounds against gastrointestinal and liver carcinogenesis. *Food Research International*, 123, 567-589. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.029>
5. Rashidinejad, A., Tarhan, O., Rezaei, A., Capanoglu, E., Boostani, S., Khoshnoudi-Nia, S., ... & Jafari, S. M. (2022). Addition of milk to coffee beverages; the effect on functional, nutritional, and sensorial properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6132-6152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1897516>

6. Konstantinidis, N., Franke, H., Schwarz, S., & Lachenmeier, D. W. (2023). Risk assessment of trigonelline in coffee and coffee by-products. *Molecules*, 28(8), 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules28083460>
7. Celli, G. B., & de Camargo, A. C. (2019). What is in a “Cup of Joe”? From green beans to spent grounds: a mini-review on coffee composition and health benefits. *Journal of Food Bioactives*, 6. <https://doi.org/10.31665/JFB.2019.6185>
8. Muñoz, A. E., Hernández, S. S., Tolosa, A. R., Burillo, S. P., & Herrera, M. O. (2020). Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. *Lwt*, 128, 109457. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109457>
9. Socała, K., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E., & Wlaź, P. (2020). Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: a review. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 107. <https://doi.org/10.3390/ijms22010107>
10. Yamagata, K. (2018). Do coffee polyphenols have a preventive action on metabolic syndrome associated endothelial dysfunctions? An assessment of the current evidence. *Antioxidants*, 7(2), 26. <https://doi.org/10.3390/antiox7020026>
11. Ali, A., Zahid, H. F., Cottrell, J. J., & Dunshea, F. R. (2022). A comparative study for nutritional and phytochemical profiling of *Coffea arabica* (*C. arabica*) from different origins and their antioxidant potential and molecular docking. *Molecules*, 27(16), 5126. <https://doi.org/10.3390/molecules27165126>
12. Kobylińska, Z., Biesiadecki, M., Kuna, E., Galiniak, S., & Mołoń, M. (2025). Coffee as a Source of Antioxidants and an Elixir of Youth. *Antioxidants*, 14(3), 285. <https://doi.org/10.3390/antiox14030285>
13. Arendash, G. W., & Cao, C. (2010). Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s1), S117-S126. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091249>
14. Raise-Abdullahi, P., Raeis-Abdollahi, E., Meamar, M., & Rashidy-Pour, A. (2024). Effects of coffee on cognitive function. *Progress in Brain Research*, 288, 133-166. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2024.06.016>

15. Chu, Y. F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., ... & Cheng, I. H. (2009). Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9801-9808. <https://doi.org/10.1021/jf902095z>
16. Barrea, L., Pugliese, G., Frias-Toral, E., El Ghoch, M., Castellucci, B., Chapela, S. P., ... & Muscogiuri, G. (2023). Coffee consumption, health benefits and side effects: a narrative review and update for dietitians and nutritionists. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(9), 1238-1261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963207>
17. Raza, M. L. (2024). Coffee and brain health: An introductory overview. *Progress in Brain Research*, 288, 1-22. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2024.06.010>
18. Corso, M. P., Vignoli, J. A., Benassi, M. T. (2016) Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 1380-1388. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2163-y>
19. Rojas-González, A., Figueroa-Hernández, C. Y., González-Rios, O., Suárez-Quiroz, M. L., González-Amaro, R. M., Hernández-Estrada, Z. J., & Rayas-Duarte, P. (2022). Coffee chlorogenic acids incorporation for bioactivity enhancement of foods: A review. *Molecules*, 27(11), 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules27113400>
20. Teixeira, C. F., Azzolin, V. F., Dos Passos, G. R., Turra, B. O., de Oliveira Alves, A., Bressanim, A. C. M., ... & da Cruz, I. B. M. (2023). A coffee enriched with guarana, selenium, and l-carnitine (GSC) has nutrigenomic effects on oxi-inflammatory markers of relapsing-remitting multiple sclerosis patients: A pilot study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 71, 104515. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104515>
21. Kała, K., Cicha-Jeleń, M., Hnatyk, K., Krakowska, A., Sułkowska-Ziaja, K., Szewczyk, A., ... & Muszyńska, B. (2024). Coffee with *Cordyceps militaris* and *Hericium erinaceus* fruiting bodies as a source of essential bioactive substances. *Pharmaceuticals*, 17(7), 955. <https://doi.org/10.3390/ph17070955>
22. Contato, A. G., & Conte-Junior, C. A. (2025). Mushrooms in innovative food products: Challenges and potential opportunities as meat substitutes, snacks and functional beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 104868. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.104868>

23. Mali, S. V., Shaikh, N. S., Shaikh, M. C., Shelake, S. N., Shelke, S. D., & Shendge, N. H. (2023). Formulation and Evaluation of Herbalmushroom Coffee Powder as a Immunoboosting drink. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 8(5), 2202–2205. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8008489>
24. Hassan, M., Shahzadi, S., Ransom, R. F., & Kloczkowski, A. (2023). Nature's own pharmacy: mushroom-based chemical scaffolds and their therapeutic implications. *International journal of molecular sciences*, 24(21), 15596. <https://doi.org/10.3390/ijms242115596>
25. Friedman, M. (2015). Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(32), 7108-7123. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02914>
26. Tung, S. Y., Lee, K. C., Lee, K. F., Yang, Y. L., Huang, W. S., Lee, L. Y., ... & Kuo, H. C. (2021). Apoptotic mechanisms of gastric cancer cells induced by isolated erinacine S through epigenetic histone H3 methylation of FasL and TRAIL. *Food & Function*, 12(8), 3455-3468. <https://doi.org/10.1039/d0fo03089a>
27. Gravina, A. G., Pellegrino, R., Auletta, S., Palladino, G., Brandimarte, G., D'Onofrio, R., ... & Federico, A. (2023). *Herichium erinaceus*, a medicinal fungus with a centuries-old history: Evidence in gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology*, 29(20), 3048. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i20.3048>
28. Qiu, Y., Lin, G., Liu, W., Zhang, F., Linhardt, R. J., Wang, X., & Zhang, A. (2024). Bioactive substances in *Herichium erinaceus* and their biological properties: A review. *Food Science and Human Wellness*, 13(4), 1825-1844. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250152>
29. Ma, B., Feng, T., Zhang, S., Zhuang, H., Chen, D., Yao, L., & Zhang, J. (2021). The inhibitory effects of *Herichium erinaceus* β -glucan on in vitro starch digestion. *Frontiers in Nutrition*, 7, 621131. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.621131>
30. Zhang, J., An, S., Hu, W., Teng, M., Wang, X., Qu, Y., ... & Wang, D. (2016). The neuroprotective properties of *Herichium erinaceus* in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model. *International journal of molecular sciences*,

17(11), 1810. <https://doi.org/10.3390/ijms17111810>

31. Kawagishi, H., Ando, M., Sakamoto, H., Yoshida, S., Ojima, F., Ishiguro, Y., ... & Furukawa, S. (1991). Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, 32(35), 4561-4564. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)80039-9](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)80039-9)

32. Kawagishi, H., Ando, M., Shinba, K., Sakamoto, H., Yoshida, S., Ojima, F., ... & Furukawa, S. (1993). Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Phytochemistry*, 32(1), 175-178. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80127-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80127-Z)

33. Ueda, K., Tsujimori, M., Kodani, S., Chiba, A., Kubo, M., Masuno, K., ... & Kawagishi, H. (2008). An endoplasmic reticulum (ER) stress-suppressive compound and its analogues from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(21), 9467-9470. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.044>

34. Kawagishi, H., Ando, M., & Mizuno, T. (1990). Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron letters*, 31(3), 373-376. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)94558-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)94558-1)

35. Ma, B. J., Yu, H. Y., Shen, J. W., Ruan, Y., Zhao, X., Zhou, H., & Wu, T. T. (2010). Cytotoxic aromatic compounds from *Herichium erinaceum*. *The journal of Antibiotics*, 63(12), 713-715. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.112>

36. Bing-Ji, M. A., Jin-Chuan, M. A., & Yuan, R. U. A. N. (2012). Hericenone L, a new aromatic compound from the fruiting bodies of *Herichium erinaceus*. *Chinese journal of natural medicines*, 10(5), 363-365. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(12\)60072-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(12)60072-7)

37. Valu, M. V., Soare, L. C., Sutan, N. A., Ducu, C., Moga, S., Hriteu, L., ... & Carradori, S. (2020). Optimization of ultrasonic extraction to obtain erinacine a and polyphenols with antioxidant activity from the fungal biomass of *Herichium erinaceus*. *Foods*, 9(12), 1889. <https://doi.org/10.3390/foods9121889>

38. Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology*, 2015(1), 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>

39. Lu, H., Lou, H., Hu, J., Liu, Z., & Chen, Q. (2020). Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(5), 2333-2356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12602>
40. Suleiman, W. B., Shehata, R. M., & Younis, A. M. (2022). In vitro assessment of multipotential therapeutic importance of *Hericium erinaceus* mushroom extracts using different solvents. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00592-6>
41. Lingle, T. R. *The Coffee Brewing Handbook: A Systematic Guide to Coffee Preparation*. (Specialty Coffee Association of America, 2011).
42. Liang, J., Chan, K.C. & Ristenpart, W.D. (2021). An equilibrium desorption model for the strength and extraction yield of full immersion brewed coffee. *Scientific Reports*, 11, 6904. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85787-1>
43. Pineda-Alegría, J. A., Peña-Rodríguez, L. M., Cardoso-Taketa, A., Sánchez, J. E., Torres-Acosta, J. F. J., Hernández-Bolio, G. I., Ortiz-Caltempa, A., Villarreal, M. L., & Aguilar-Marcelino, L. (2024). 1H-NMR Metabolomic Study of the Mushroom *Pleurotus djamor* for the Identification of Nematocidal Compounds. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 17(5), 580. <https://doi.org/10.3390/ph17050580>
44. Mestrelab Research. (2025). *Mestrelab*. <https://mestrelab.com/>
45. Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G., Hui, F., Xu, L., Viau, C., Spigelman, A. F., MacDonald, P. E., Wishart, D. S., Li, S., & Xia, J. (2024). MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic acids research*, 52(W1), W398–W406. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae253>
46. Zhang, C. C., Yin, X., Cao, C. Y., Wei, J., Zhang, Q., & Gao, J. M. (2015). Chemical constituents from *Hericium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(22), 5078-5082. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.016>
47. Kawagishi, H., Zhuang, C., & Yunoki, R. (2008). Compounds for dementia from *Hericium erinaceum*. *Drugs of the Future*, 33(2), 149. <https://doi.org/10.1358/dof.2008.033.02.1173290>

48. Gosh, S., Nandi, S., Banerjee, A., Sarkar, S., Chakraborty, N., Acharya, K. (2021) Prospecting medicinal properties of Lion's mane mushroom. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13833>
49. Li, W., Zhou, W., Song, S. B., Shim, S. H., & Kim, Y. H. (2014). Sterol fatty acid esters from the mushroom *Hericiium erinaceum* and their PPAR transactivational effects. *Journal of natural products*, 77(12), 2611-2618. <https://doi.org/10.1021/np500234f>
50. Kobayashi, S., Hamada, Y., Yasumoto, T., Hashino, Y., Masuyama, A., & Nagai, K. (2018). Total syntheses and endoplasmic reticulum stress suppressive activities of hericenones A– C and their derivatives. *Tetrahedron Letters*, 59(18), 1733-1736. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.03.065>
51. Kobayashi, S., Tamura, T., Koshishiba, M., Yasumoto, T., Shimizu, S., Kintaka, T., & Nagai, K. (2021). Total synthesis, structure revision, and neuroprotective effect of hericenones C–H and their derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(3), 2602-2620. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02681>
52. Lee, D. G., Kang, H. W., Park, C. G., Ahn, Y. S., & Shin, Y. (2016). Isolation and identification of phytochemicals and biological activities of *Hericiium erinaceus* and their contents in *Hericiium* strains using HPLC/UV analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.038>
53. Kim, Y. O., Lee, S. W., & Kim, J. S. (2014). A comprehensive review of the therapeutic effects of *Hericiium erinaceus* in neurodegenerative disease. *Journal of Mushroom*, 12(2), 77-81. <https://doi.org/10.14480/JM.2014.12.2.77>
54. Chen, Z. G., Bishop, K. S., Zhang, J., & Quek, S. Y. (2022). Neuroprotective and anticarcinogenic properties of *Hericiium* mushrooms and the active constituents associated with these effects: A review. *Food Science and Engineering*, 69-90. <https://doi.org/10.37256/fse.3120221166>
55. Xie, G., Tang, L., Xie, Y., & Xie, L. (2022). Secondary metabolites from *Hericiium erinaceus* and their anti-inflammatory activities. *Molecules*, 27(7), 2157. <https://doi.org/10.3390/molecules27072157>

56. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2010). *Introdução à espectroscopia*. Cengage Learning.
57. Mironczuk-Chodakowska, I., Kujawowicz, K., & Witkowska, A. M. (2021). Beta-glucans from fungi: Biological and health-promoting potential in the COVID-19 pandemic era. *Nutrients*, 13(11), 3960. <https://doi.org/10.3390/nu13113960>
58. Ibrahim, O. (2021). Erythritol Chemical Structure, Biosynthesis Pathways, Properties, Applications, and Production. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(3), 59-70. <https://doi.org/10.11648/j.ijmb.20210603.11>
59. Diamantopoulou, P., & Papanikolaou, S. (2023). Biotechnological production of sugar-alcohols: Focus on *Yarrowia lipolytica* and edible/medicinal mushrooms. *Process Biochemistry*, 124, 113-131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.008>
60. Consonni, R., Polla, D., Cagliani, L.R. (2018) Organic and conventional coffee differentiation by NMR spectroscopy. *Food control*, 94(2018), 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.013>
61. Ribeiro, M.V.M., Boralle, N., Pezza, H.R., Pezza, L., Toci, A.t. (2017) Authenticity of roasted coffee using ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57(2017), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.004>
62. Nzekoue, F. K., Alessandrini, L., Caprioli, G., Khamitova, G., Navarini, L., Ricciutelli, M., ... & Vittori, S. (2021). Analysis of Phytosterols content in Italian-standard espresso coffee. *Beverages*, 7(3), 61. <https://doi.org/10.3390/beverages7030061>
63. Supanivatin, P., Thipayarat, A., Siriwattanayotin, S., Ekkaphan, P., Deepatana, A., & Wongwiwat, J. (2023). A comparative analysis of phenolic content, antioxidant activity, antimicrobial activity, and chemical profile of *Coffea robusta* extracts using subcritical fluid extraction and supercritical carbon dioxide extraction. *Foods*, 12(18), 3443. <https://doi.org/10.3390/foods12183443>
64. Nemzer, B., Edwards, J., & Kalita, D. (2022). Matrix-Specific Effects on Caffeine and Chlorogenic Acid Complexation in a Novel Extract of Whole *Coffea arabica* Coffee Cherry by NMR Spectroscopy. *Molecules*, 27(22), 7803. <https://doi.org/10.3390/molecules27227803>

65. Wei, F., Furihata, K., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2014). A pilot study of NMR-based sensory prediction of roasted coffee bean extracts. *Food chemistry*, 152, 363-369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.161>
66. Gottstein, V., Lachenmeier, D. W., Kuballa, T., & Bunzel, M. (2024). ¹H NMR-based approach to determine the geographical origin and cultivation method of roasted coffee. *Food Chemistry*, 433, 137278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137278>
67. Berti, F., Navarini, L., Guercia, E., Oreški, A., Gasparini, A., Scoltock, J., & Forzato, C. (2020). Interaction of the coffee diterpenes cafestol and 16-O-methyl-cafestol palmitates with serum albumins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1823. <https://doi.org/10.3390/ijms21051823>
68. Makino, T., Izumi, K., Hiratsuka, K., Kano, H., Shimada, T., Nakano, T., ... & Mizokami, A. (2021). Anti-proliferative and anti-migratory properties of coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol in human renal cancer cells. *Scientific reports*, 11(1), 675. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80302-4>
69. Ren, Y., Wang, C., Xu, J., & Wang, S. (2019). Cafestol and kahweol: A review on their bioactivities and pharmacological properties. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4238. <https://doi.org/10.3390/ijms20174238>
70. Bae, J-H., Park, J-H., Im, S-S., Song, D-K. (2014) Coffee and health. *Integrative Medicine Research*, 3(4), 189-191. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.08.002>
71. Erskine, E., Subasi, B. G., Vahapoglu, B., Capanoglu, E. (2022) Coffee phenolics and their interaction with other food phenolics: antagonistic and synergistic effects. *ACS Omega*, 7(2), 1595-1601. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06085>
72. González, A-R., Hernández, C. Y. F., Rios, O. G., Quiroz, M. L. S., Amaro, R. M. G., Estrada, Z. J. H., Duarte, P. R. (2022) Coffee chlorogenic acids incorporation for bioactivity enhancement of foods: a review. *Molecules*, 27(11), 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules27113400>
73. Xin, Y., Ji, H., Roh, K-B., You, J., Park, D., Jung, E. (2022) Immune-Immune-enhancing effect of water-soluble beta-glucan derived from enzymatic hydrolysis of yeast glucan. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 30(101256).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101256>

74. Mengistu, M. W., Workie, M. A., Mohammed, A. S., Yildiz, F. (2020) Biochemical compounds of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) varieties grown in northwestern highlands of Ethiopia. *Food Science & Technology*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1741319>

75. Makiso, M. U., Tola, Y. B., Ogah, O., Endale, F. L. (2023) Bioactive compounds in coffee and their role in lowering the risk of major public health consequences: A review. *Food Science & Nutrition*, 12(7), 734-764. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3848>

76. Horník, S., Sajfrtová, M., Karban, J., Sýkora, J., Březinová, A., Wimmer, Z. (2013) LC-NMR Technique in the analysis of phytosterols in natural extracts. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013(1). <https://doi.org/10.1155/2013/526818>

77. Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Bracht, A., Ferreira, I. C. F. R. (2017) The emerging use mycosterols in food industry along with the current trend of extended use of bioactive phytosterols. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 19-35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.012>

78. Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Din, A. (2009). Physicochemical and functional properties of barley β -glucan as affected by different extraction procedures. *International journal of food science & technology*, 44(1), 181-187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01721.x>

79. Chaiyasut, C., Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., Kesika, P., Saelee, M., ... & Peerajan, S. (2018). Extraction of β -glucan of *Hericium erinaceus*, *Avena sativa* L., and *Saccharomyces cerevisiae* and in vivo evaluation of their immunomodulatory effects. *Food Science and Technology*, 38(Suppl. 1), 138-146. <https://doi.org/10.1590/fst.18217>

80. Sheng, X., Yan, J., Meng, Y., Kang, Y., Han, Z., Tai, G., ... & Cheng, H. (2017). Immunomodulatory effects of *Hericium erinaceus* derived polysaccharides are mediated by intestinal immunology. *Food & Function*, 8(3), 1020-1027. <https://doi.org/10.1039/c7fo00071e>

81. Kim, S. P., Kang, M. Y., Kim, J. H., Nam, S. H., & Friedman, M. (2011). Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericium erinaceus* mushroom extracts in tumor-

bearing mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 9861-9869. <https://doi.org/10.1021/jf201944n>

82. Liu, C., Gao, P., Qian, J., & Yan, W. (2000). Immunological study on the antitumor effects of fungus polysaccharides compounds. *Wei Sheng yan jiu= Journal of Hygiene Research*, 29(3), 178-180. PMID: 12725070.

83. Qiao, Z., Jia, X., Wang, Y., Wang, Y., Zhou, Y., Li, F., ... & Cheng, H. (2024). Structural analysis and antioxidant activity of alkaline-extracted glucans from *Hericiium erinaceus*. *Foods*, 13(17), 2742. <https://doi.org/10.3390/foods13172742>

84. Jiang, S., Liu, S., & Qin, M. (2019). Effects of extraction conditions on crude polysaccharides and antioxidant activities of the lion's mane medicinal mushroom, *Hericiium erinaceus* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(10). <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019032566>

85. Lew, S. Y., Yow, Y. Y., Lim, L. W., & Wong, K. H. (2019). Antioxidant-mediated protective role of *Hericiium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. against oxidative damage in fibroblasts from Friedreich's ataxia patient. *Food Science and Technology*, 40(Suppl. 1), 264-272. <https://doi.org/10.1590/fst.09919>

86. Diling, C., Xin, Y., Chaoqun, Z., Jian, Y., Xiaocui, T., Jun, C., ... & Yizhen, X. (2017). Extracts from *Hericiium erinaceus* relieve inflammatory bowel disease by regulating immunity and gut microbiota. *Oncotarget*, 8(49), 85838. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20689>

87. Ge, F., Chen, Y., Wang, B., Zhou, W., Du, B., & Hou, L. (2025). Bioactive Polysaccharides from *Hericiium erinaceus*: Extraction, Structure, Bioactivities, and Applications. *Molecules*, 30(8), 1850. <https://doi.org/10.3390/molecules30081850>

88. Agbor, C. A., Fischer, C. E., Agaba, E. A., & Nnenna, W. A. (2022). Neuroprotective effect of beta-D-glucan polysaccharide on hyperglycaemia-induced cerebral injury in diabetic animal model. *Eur J Anat*, 26(2), 217-224. <https://doi.org/10.52083/WCXG2854>

89. Santacruz, L., Hurtado, D. X., Doohan, R., Thomas, O. P., Puyana, M., & Tello, E. (2020). Metabolomic study of soft corals from the Colombian Caribbean: PSYCHE and 1H-NMR comparative analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 5417.

90. Cordoba, N., Fernandez-Alduenda, M., Moreno, F. L., & Ruiz, Y. (2020). Coffee extraction: A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.004>

Acknowledgments

The authors would like to thank Dan Morais for generously providing the Yammi 2 multifunctional cooking machine and for his valuable assistance in the preparation of the aqueous extract. The authors would like to thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brasil)” for its financial support (No. 406331/2023-5) and grants;

Funding

This work was supported by Universidade do Estado da Bahia - UNEB (PROINOVAÇÃO 013/2022). This research received financial support from the ‘Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico’ (CNPq, Brasília, Brazil—grant 406331/2023-5).

Author information

Author Contributions

Conceptualization, A.R.L., A.d.F.S.J., G.S.S. and A.V.V.S.; methodology, A.V.V.S., A.R.L., G.G.S. and A.d.F.S.J.; validation, A.R.L., G.S.S., E.M.O.R., and A.d.F.S.J.; formal analysis, A.V.V.S., G.G.S., V.P.R., K.A.S., M.P.M.C., C.M.J.B. and N.B.M.; investigation, A.V.V.S., G.G.S., V.P.R., K.A.S., M.P.M.C. and N.B.M.; writing—original draft preparation, A.V.V.S., A.R.L. and G.G.S.; writing—review and editing, A.R.L., G.G.S. and E.M.O.R.; visualization, A.V.V.S.; supervision, A.R.L. and A.d.F.S.J.; project administration, A.R.L.; funding acquisition, A.d.F.S.J.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ORCID

Ana Verena Viana dos Santos 0009-0005-1575-0220

Keila Almeida Santana 0009-0003-7400-4207

Erika Maria de Oliveira Ribeiro 0000-0002-64917585

Clicia Maria de Jesus Benevides 0000-0001-7763-6857

Ian Castro-Gamboa 0000-0002-2353-0181

Anibal de Freitas Santos Junior 0000-0002-3022-0771

Alexandre Rafael Lenz 0000-0001-6699-2899

Ethics declarations

Availability of data and materials

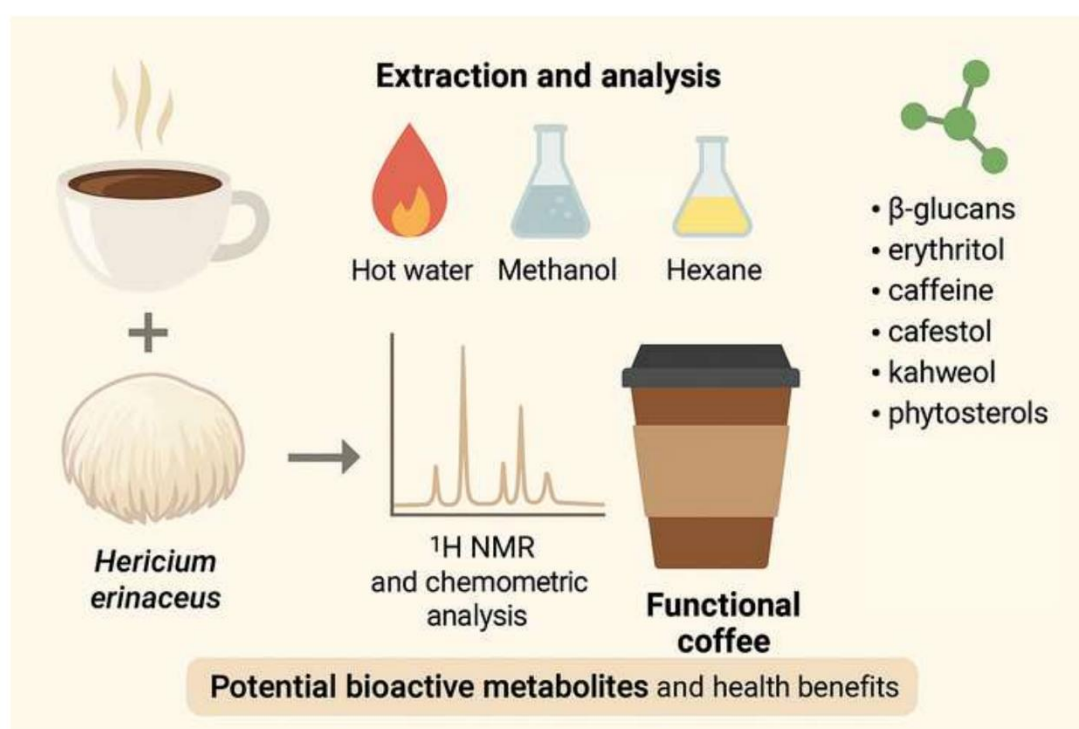
The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material; further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Graphical Abstract

[Click here to access/download;Figure;Graphical_Abstract.png](#)



Supplementary Material

Figure 1. ¹H-NMR spectra of **RJ+Hx-Rn** hexane extract from *H. erinaceus*.

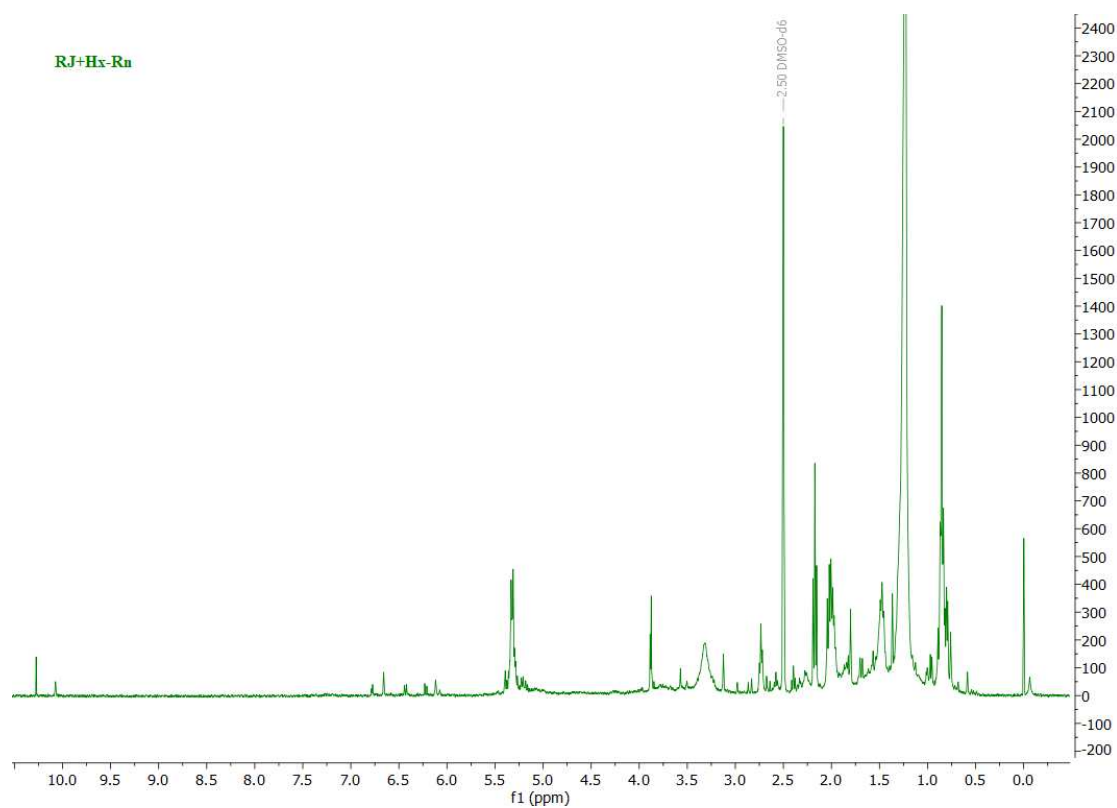


Figure 2. ¹H-NMR spectra of **RJ+MeOH-Rn** methanol extract from *H. erinaceus*.

Figure 2

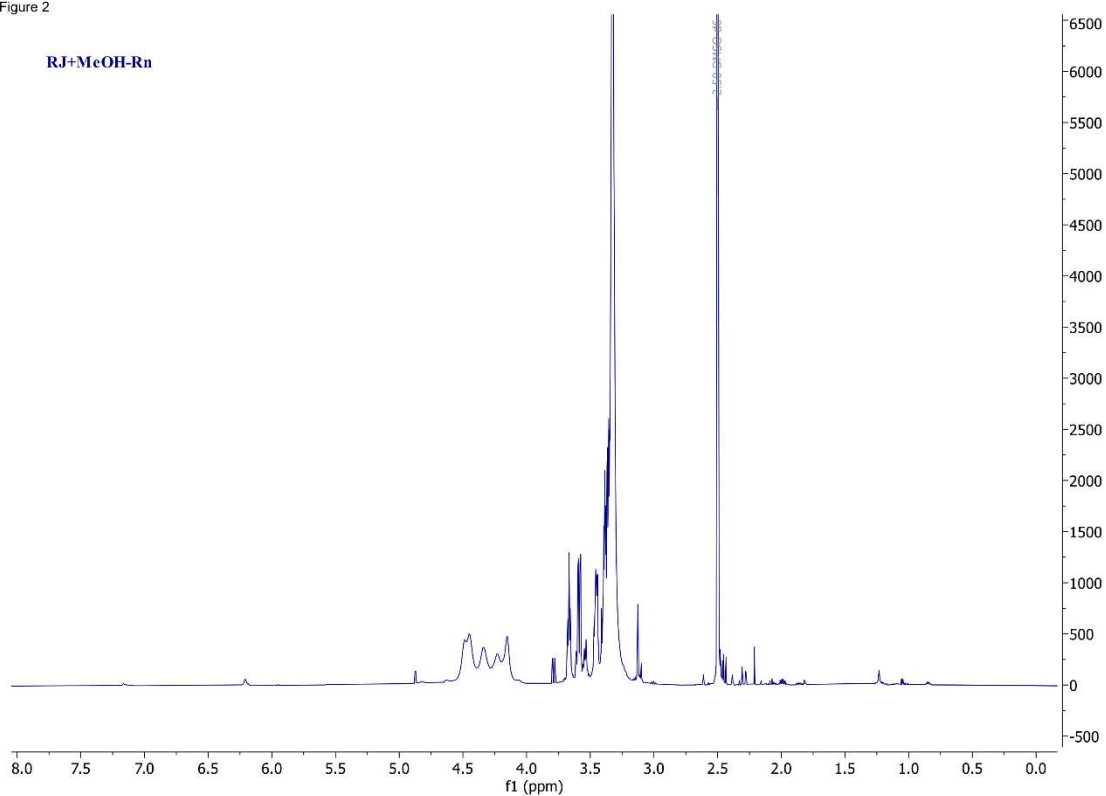


Figure 3. ¹H-NMR spectra of **Rc+Hx-Rn** hexane extract from *C. arabica*.

Figure 3

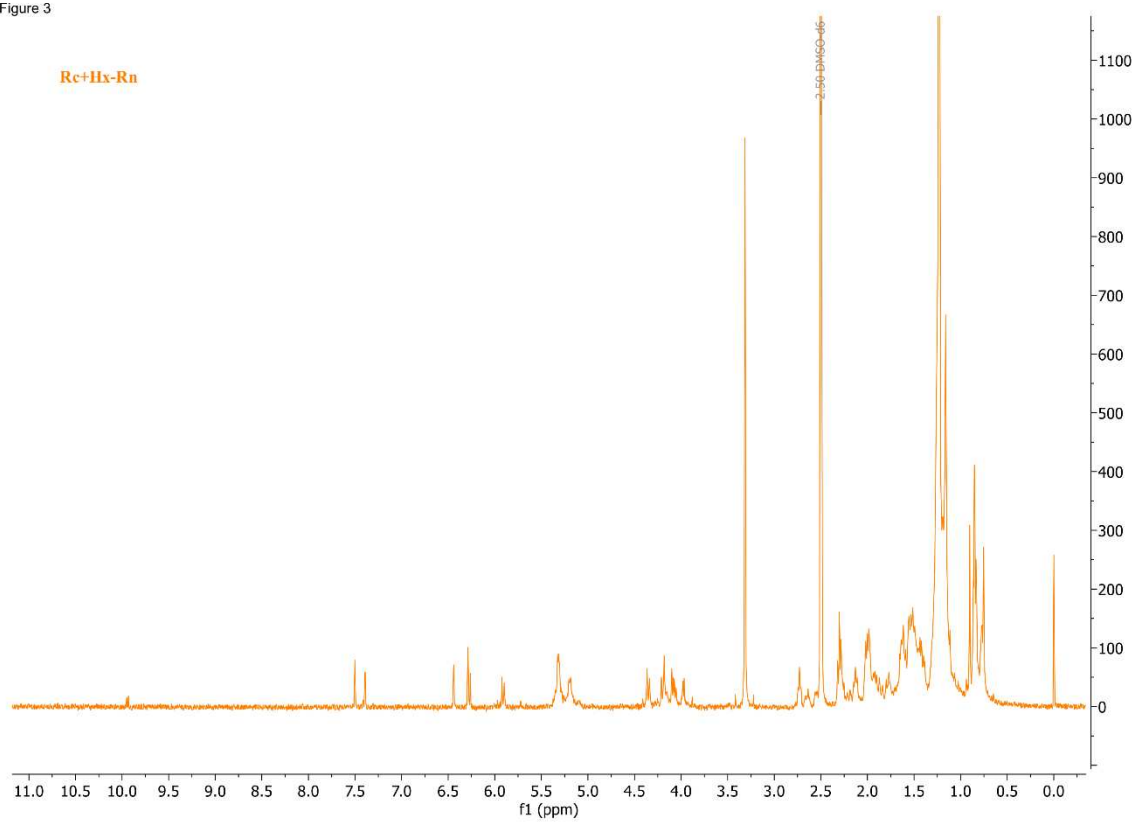
**Figure 4.** ¹H-NMR spectra of **Rc+MeOH-Rn** methanol extract from *C. arabica*.

Figure 4

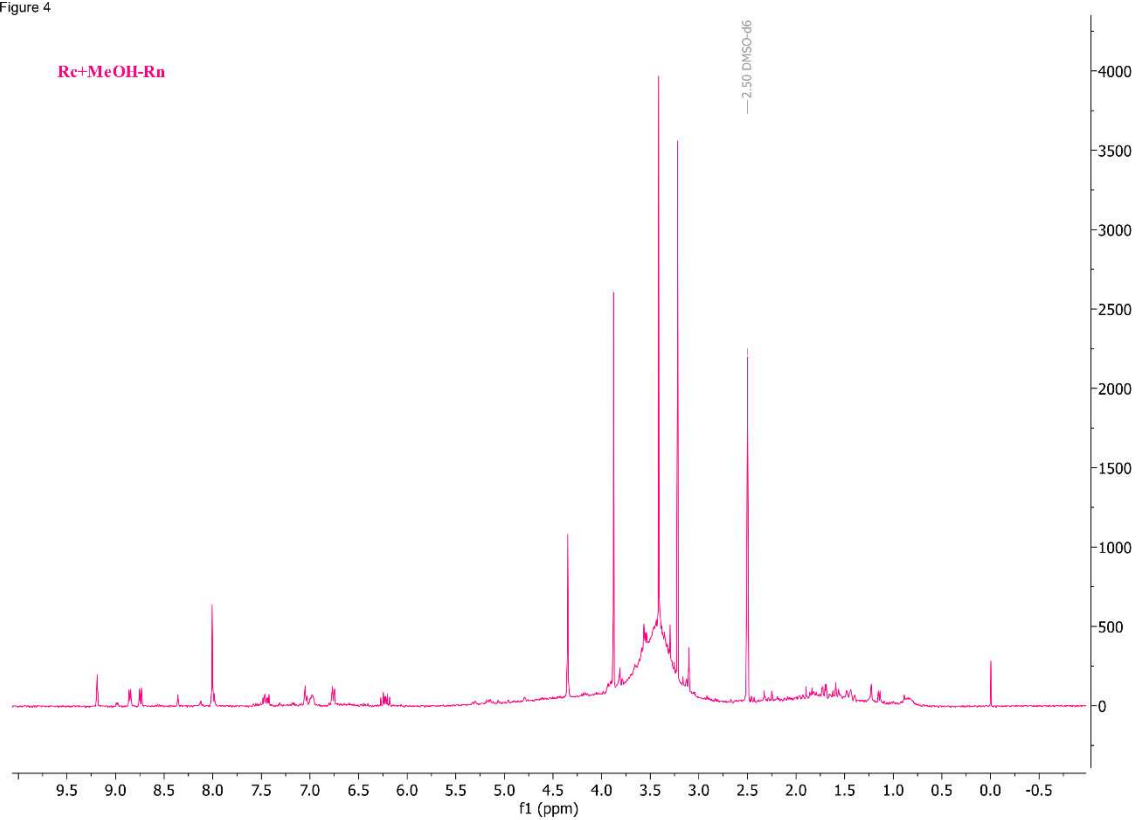
**Figure 5.** ¹H-NMR spectra of **RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn** aqueous extracts from *H. erinaceus*.

Figure 5

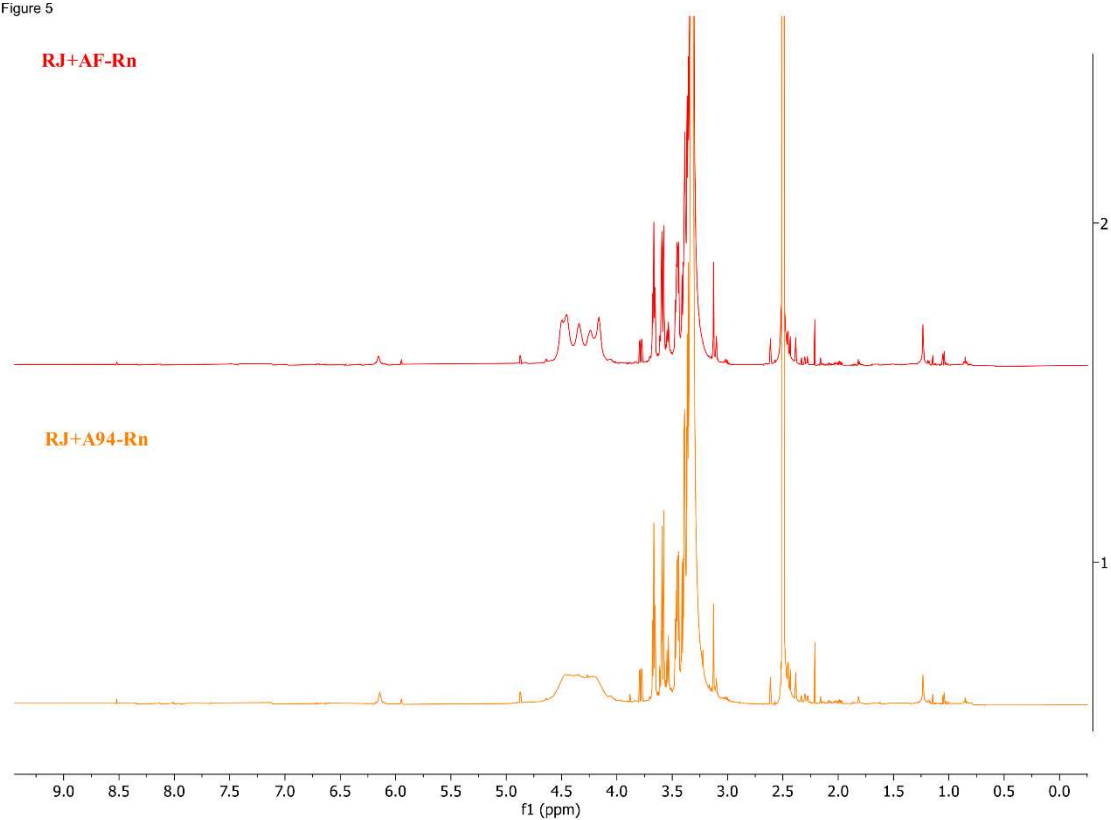


Figure 6. (A) ^1H -NMR spectra of aqueous extracts from *H. erinaceus* (**RJ+A94-Rn** and **RJ+AF-Rn**) and *H. erinaceus*-*C. arabica* blends (**RB+AF-Rn** and **RB+A94-Rn**). **(B)** Regions highlighting similarities in ^1H NMR spectra of *H. erinaceus* aqueous extracts. **(C)** Regions corresponding to characteristic coffee signals present in the blends.

Figure 6

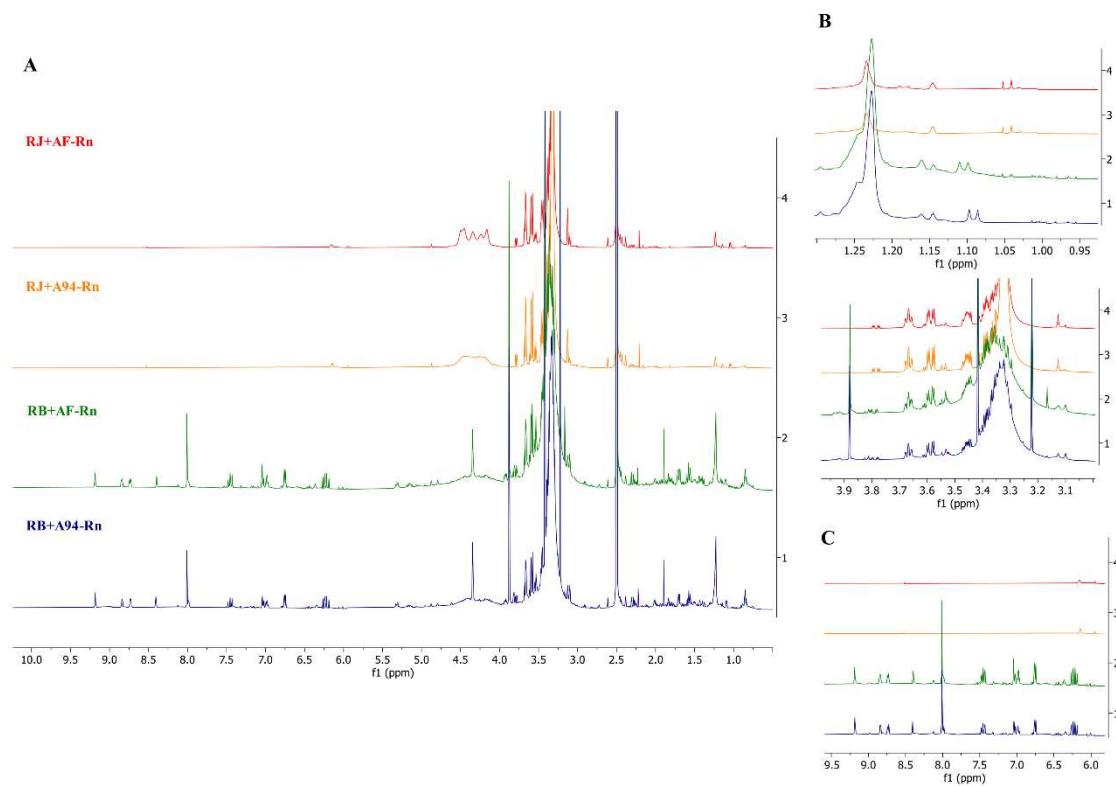


Figure 7. Key bioactive compounds from *H. erinaceus*-*C. arabica* blends (**RB+AF-Rn** and **RB+A94-Rn**). (**A**) β -glucan. (**B**) Erythritol. (**C**) Caffeine. (**D**) Cafestol. (**E**) Kahweol. (**F**) β -sitosterol. (**G**) Stigmasterol. (**H**) Campesterol.

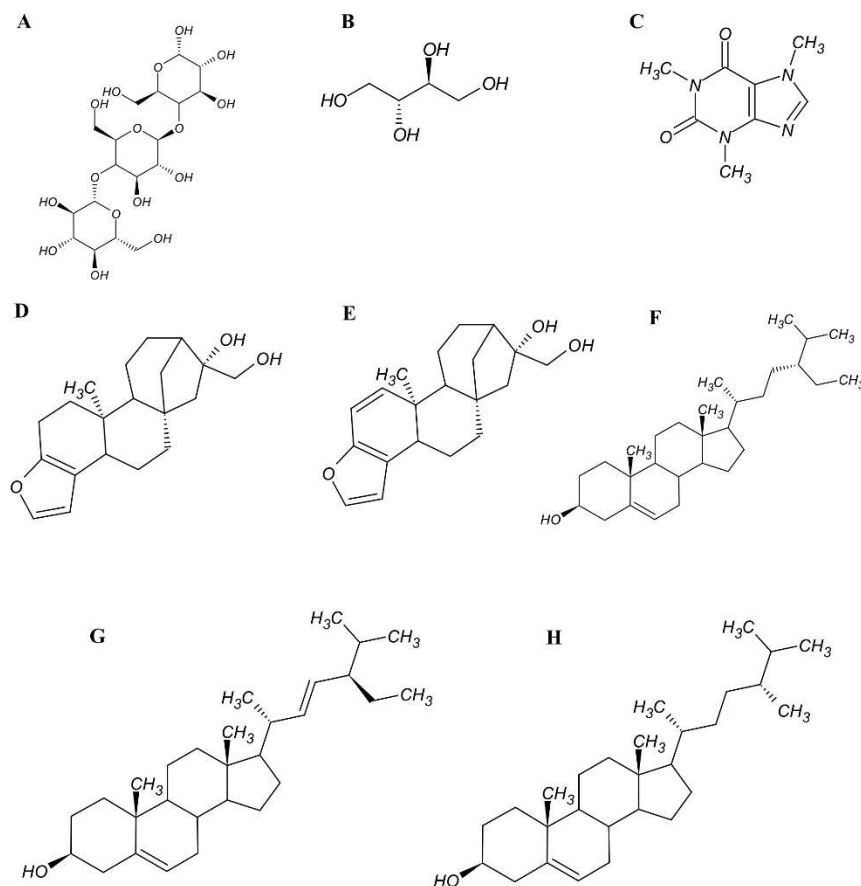
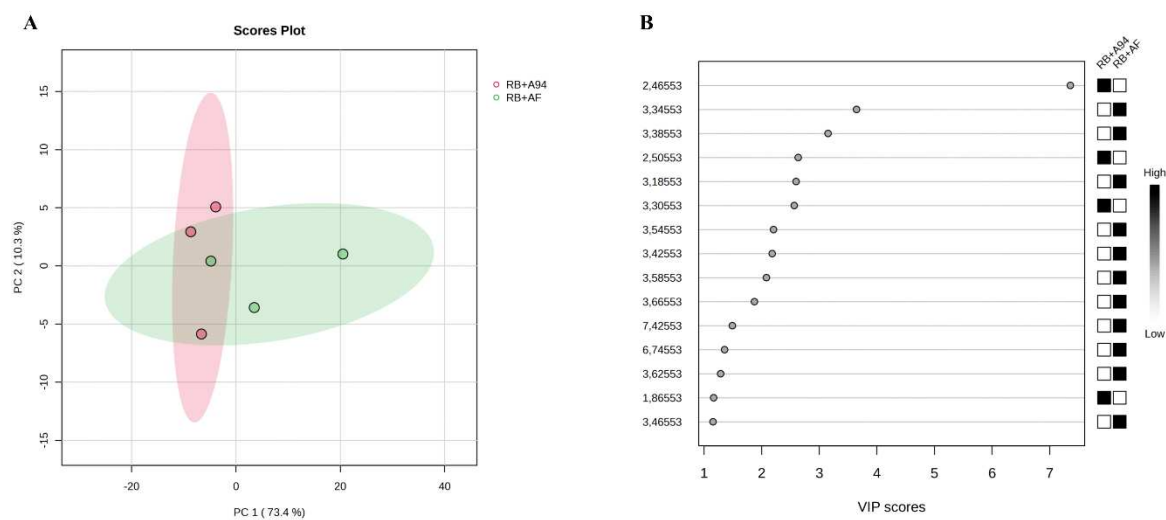
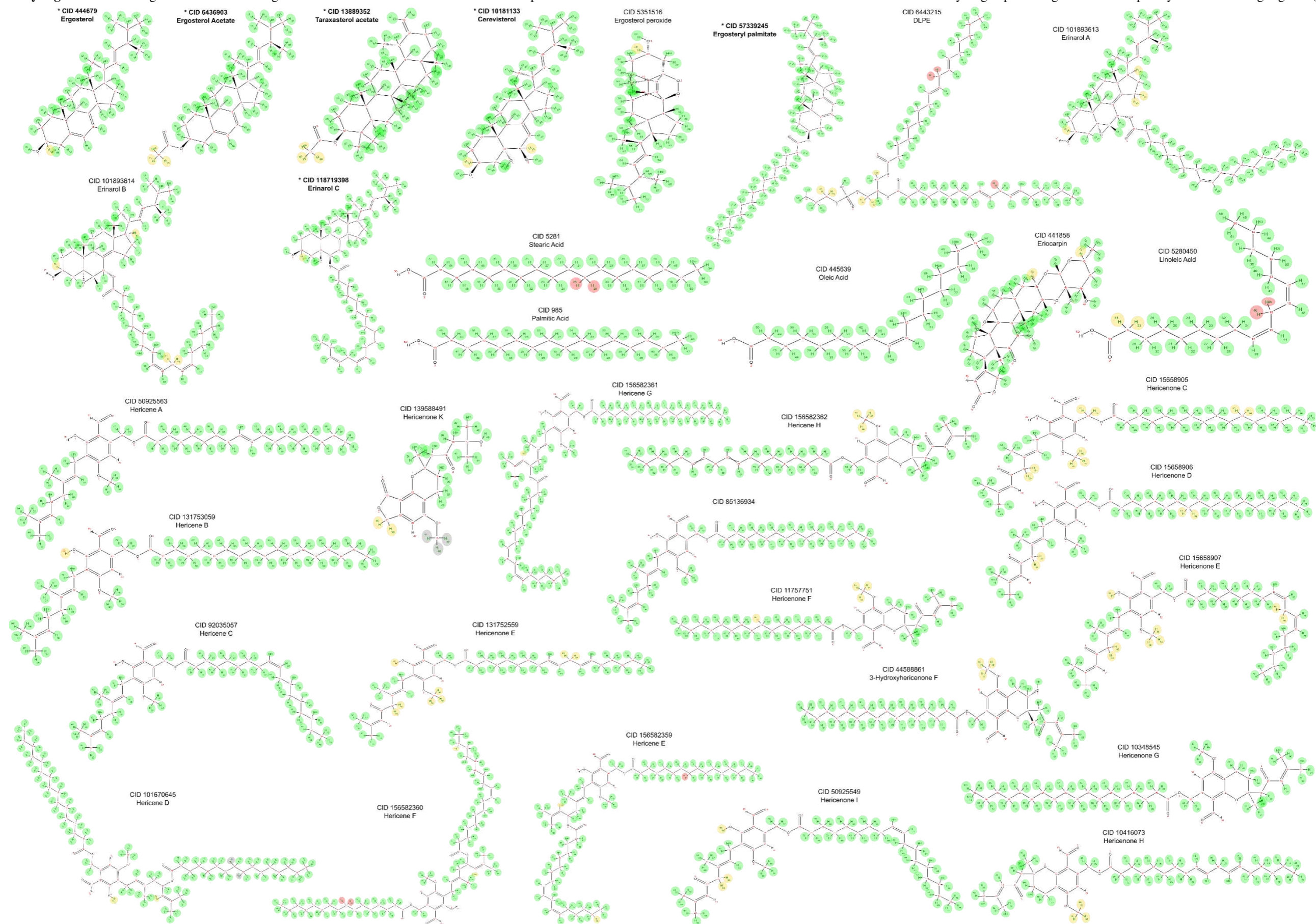


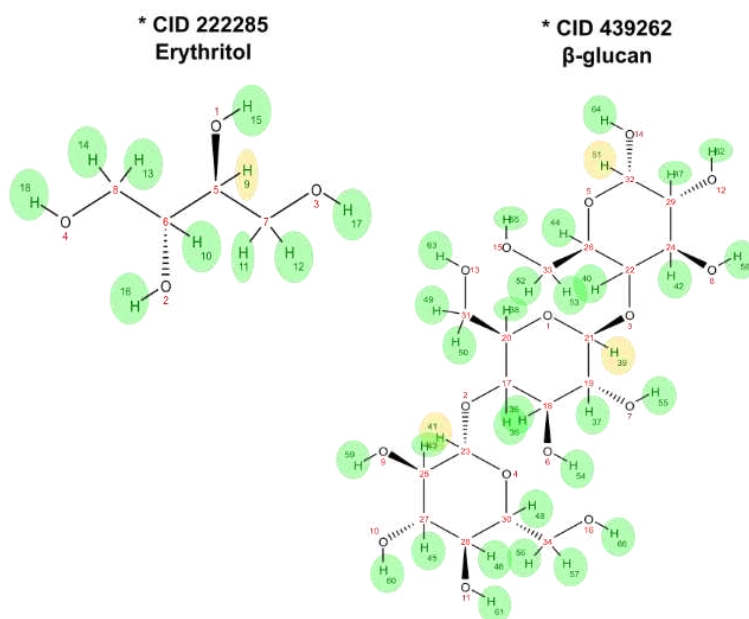
Figure 8. (**A**) PCA score plot (PC1–PC2) of the ^1H NMR aqueous extract profiles (**RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn**) of the blend. (**B**) VIP score plot (OPLS-DA) highlighting the variables most relevant for distinguishing between **RB+A94-Rn** and **RB+AF-Rn** samples.



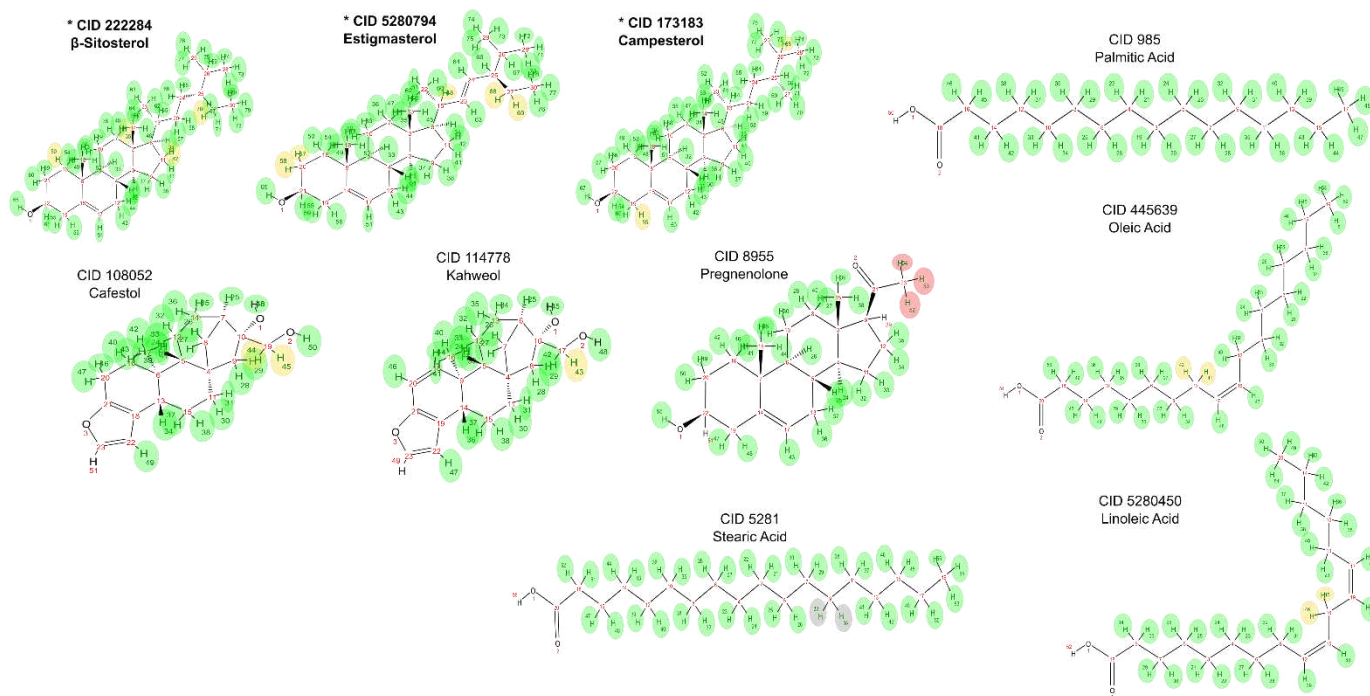
Supplementary Figure 1. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in RJ+Hx-Rn hexane extracts from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



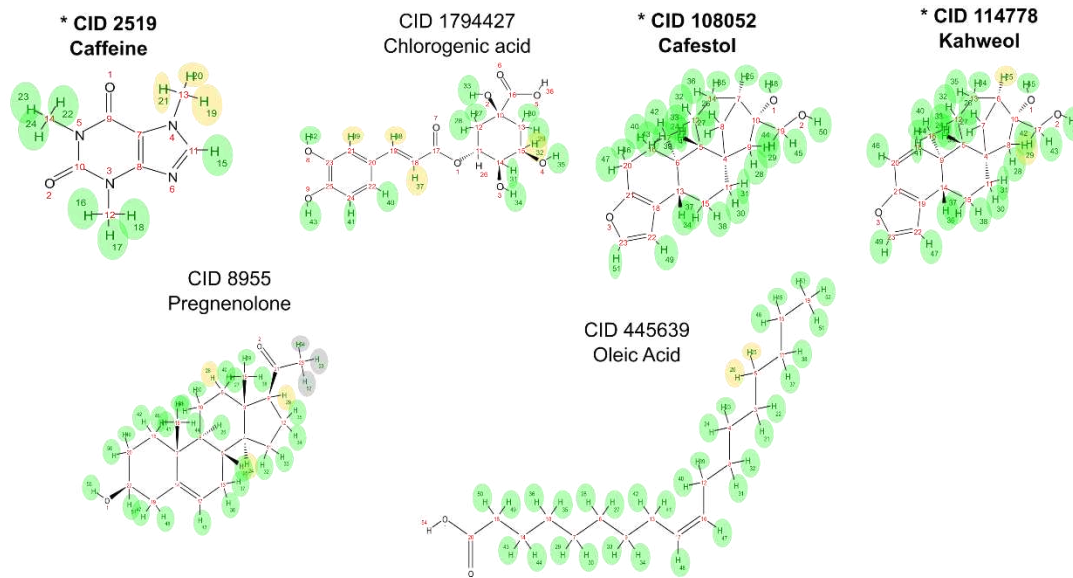
Supplementary Figure 2. Auto-assignment of ^1H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in RJ+MeOH-Rn methanol extracts from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



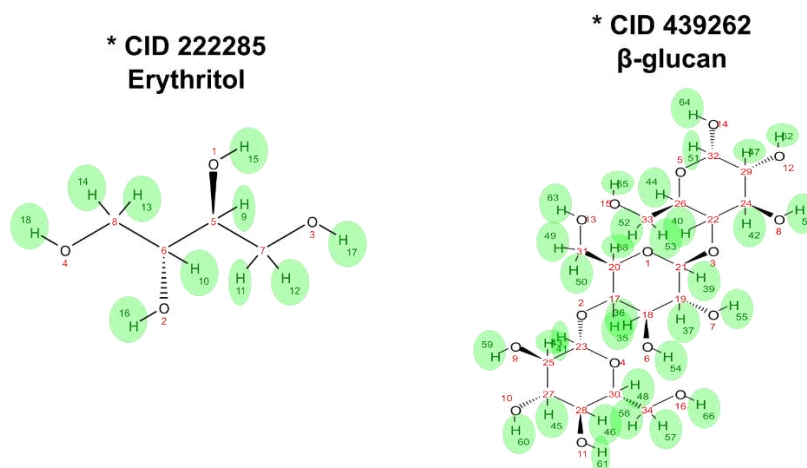
Supplementary Figure 3. Auto-assignment of ^1H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in Rc+Hx-Rn hexane extracts from *C. arabica*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



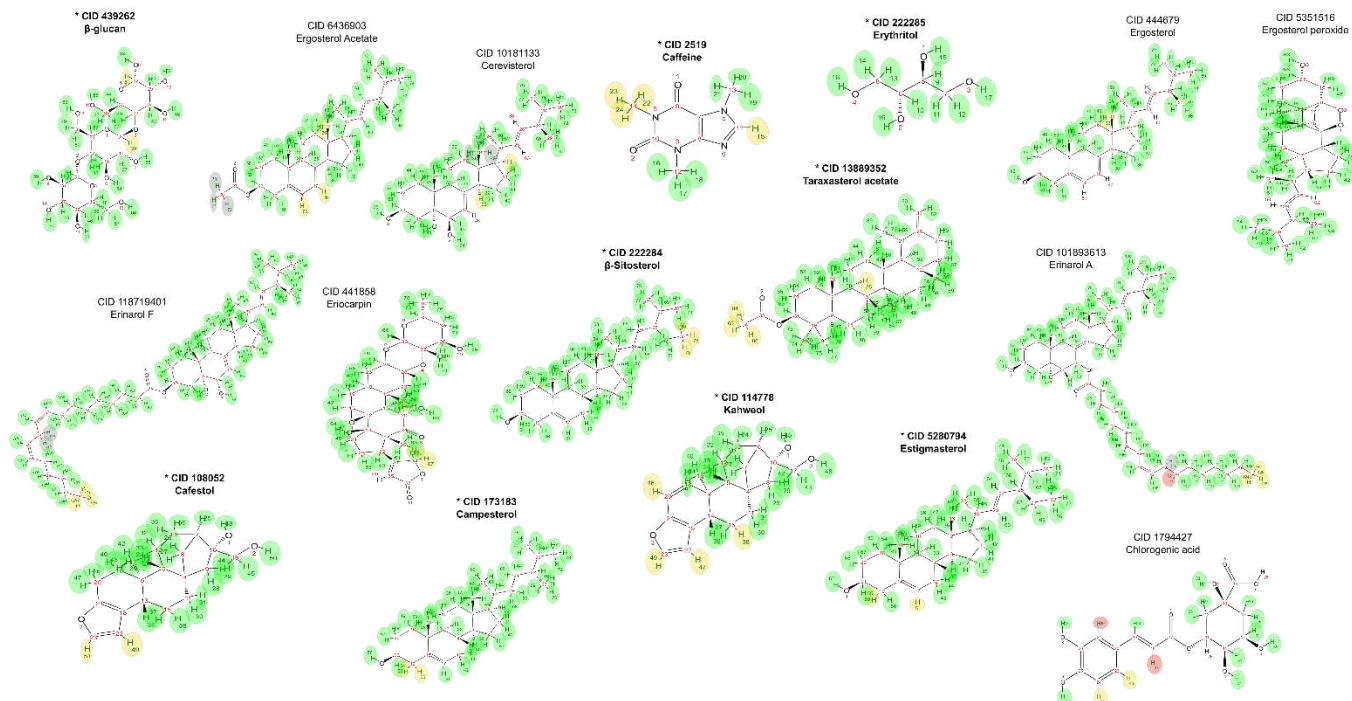
Supplementary Figure 4. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in Rc+MeOH-Rn methanol extracts from *C. arabica*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



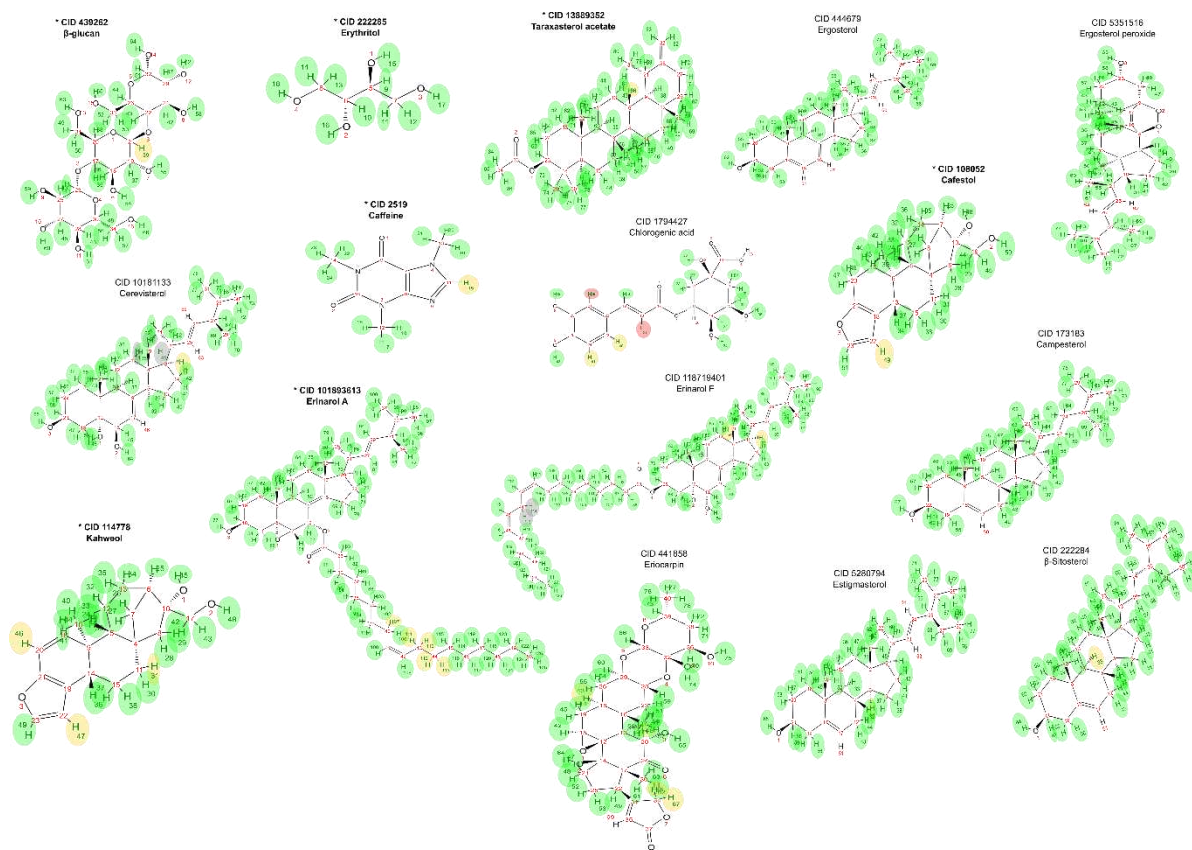
Supplementary Figure 5. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in RJ+A94-Rn and RJ+AF-Rn aqueous extract from *H. erinaceus*. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



Supplementary Figure 6. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in RB+A94-Rn aqueous extracts from *H. erinaceus* - coffee blend prepared at 94 ± 2 °C. Metabolites whose hydrogen proton signals were completely matched are highlighted (*).



Supplementary Figure 7. Auto-assignment of ¹H NMR signals for molecular structures of candidate compounds in RB+AF-Rn aqueous extracts from *H. erinaceus* - coffee blend prepared with boiling water. Metabolites whose hydrogen proton signals were.



Supplementary Table 1. Supplementary Table 1. Auto-assignment of 1H NMR signals of 94 metabolites retrieved from the PubChem database across the eight extract samples. (A) Summary of auto-assignments. (B) RJ+Hx-Rn. (C) RJ+MeOH-Rn. (D) Rc+Hx-Rn. (E) Rc+MeOH-Rn. (F) RB+A94-Rn. (G) RB+AF-Rn. (H) RJ+A94-Rn. (I) RJ+AF-Rn.

Compounds of <i>H. erinaceus</i>	Molecular Formula	PubChem CID	RJ+Hx-Rn	RJ+MeOH-Rn	RB+A94-Rn	RB+AF-Rn	RJ+A94-Rn	RJ+AF-Rn
[8-formyl-3,4-dihydro-5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-3-hydroxy)hericenone F	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	85136934	Partially Found (Missing Protons 53 and 56)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
6-(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl)-2,3-dihydro-7-hydroxy-β-D-glucopyranose	C ₂₅ H ₄₀ O ₇	44588861	Partially Found (Missing Protons 52 and 69)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Beta-Glucan	C ₇ H ₁₀ NO ₅	131752403	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Cerevisisterol	C ₁₉ H ₃₂ O ₆	439262	Not Found	Found	Found	Found	Found	Found
Corallocin A	C ₂₀ H ₃₂ O ₆	10181133	Found	Not Found	Partially Found (Missing Proton 32, 34, 29 and 51)	Not Found	Not Found	Not Found
DLPE (dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine)	C ₄₀ H ₇₆ NO ₈	132524618	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O	6443215	Partially Found (Missing Protons 90, 91 and 92)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Ergosterol Acetate	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	444679	Found	Not Found	Partially Found (Missing Protons 47, 51, 60 and 61)	Partially Found (Missing Protons 47, 51, 60 and 61)	Not Found	Not Found
Ergosterol peroxide	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	6436903	Found	Not Found	Partially Found (Missing Protons 70, 71 and 72)	Not Found	Not Found	Not Found
Ergosteryl palmitate	C ₅₆ H ₁₀₀ O ₂	5351516	Partially Found (Missing Protons 45 and 46)	Not Found	Partially Found (Missing Protons 62 and 64)	Partially Found (Missing Protons 62 and 64)	Not Found	Not Found
Ergothioneine	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	57339245	Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacene D	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	5351619	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin A	C ₁₉ H ₂₆ NO ₄	122376327	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin B	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	11524866	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin C	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	11515478	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin D	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910489	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin E	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910490	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin F	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910491	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin G	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910492	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin H	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910493	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin I	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910494	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin J	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910495	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin K	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910496	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin L	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	101910497	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin M	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	139588050	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin N	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	139585426	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin O	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	132599511	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin P	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₆	132599512	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin Q	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₆	132599513	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin R	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₆	132599514	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin S	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	132599515	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin T	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	132599516	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinacerin U	C ₁₈ H ₂₂ NO ₃	132599517	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinapyrone A	C ₁₆ H ₁₇ NO ₆	139584511	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinapyrone B	C ₁₆ H ₁₇ NO ₆	146683976	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol A	C ₇ H ₁₀ O ₃	10396933	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol B	C ₇ H ₁₀ O ₃	10011999	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol C	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	101893613	Partially Found (Missing Proton 77)	Not Found	Partially Found (Missing Protons 110, 112, 124, 125 and 126)	Found	Not Found	Not Found
Erinarol D	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	101893614	Partially Found (Missing Proton 77)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol E	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	118719398	Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol F	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	118719399	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol G	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	118719400	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Erinarol H	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	118719401	Not Found	Not Found	Partially Found (Missing Protons 113, 114, 125, 126 and 127)	Partially Found (Missing Protons 113 and 114)	Not Found	Not Found
Eriocarpin	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₁	441858	Partially Found (Missing Proton 69)	Not Found	Partially Found (Missing Proton 69)	Partially Found (Missing Proton 69)	Not Found	Not Found
Erythritol	C ₄ H ₈ O ₄	222285	Not Found	Found	Found	Found	Found	Found
Hericiene A	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	50925563	Partially Found (Missing Protons 76, 85 and 87)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene B	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	131753059	Partially Found (Missing Protons 80, 89 and 91)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene C	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	92035057	Partially Found (Missing Protons 82 and 88)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene D	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	101670645	Partially Found (Missing Protons 80, 89 and 91)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene E	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	156582359	Partially Found (Missing Protons 60, 61, 133 and 140)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene F	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	156582360	Partially Found (Missing Protons 63, 115, 123 and 138)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene G	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	156582361	Partially Found (Missing Protons 63, 64, 134, 138 and 145)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericiene H	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	156582362	Partially Found (Missing Protons 120, 129 and 143)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenol A	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	10403738	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenol B	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	11823905	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenol C	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	10247319	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenol D	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	636778	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone A	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	11782478	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone B	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	14482559	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone C	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	15658905	Partially Found (Missing Protons 75, 79, 82 and 89)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone D	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	15658906	Partially Found (Missing Protons 81, 85, 88 and 95)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone E	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	15658907	Partially Found (Missing Protons 72, 81 and 91)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found

Hericenone E	C ₇ H ₈ O ₆	131752559	Partially Found (Missing Protons 72, 81 and 91)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone F	C ₉ H ₈ O ₆	11757751	Partially Found (Missing Protons 51 and 74)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone G	C ₇ H ₈ O ₆	10348545	Partially Found (Missing Protons 53 and 80)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone H	C ₇ H ₈ O ₆	10416073	Partially Found (Missing Protons 53 and 56)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone I	C ₇ H ₈ O ₆	50925549	Partially Found (Missing Protons 81, 83 and 93)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone J	C ₇ H ₈ O ₆	44588895	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericenone K	C ₇ H ₈ O ₆	139588491	Partially Found (Missing Protons 37, 47, 48 and 49)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Hericerin	C ₇ H ₉ NO ₃	102195678	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Herierin III	C ₈ H ₁₀ O ₄	131340	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Herierin IV	C ₈ H ₁₀ O ₄	131341	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	853433	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Isohericerin	C ₇ H ₉ NO ₃	57330600	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Linoleic Acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5280450	Partially Found (Missing Protons 45, 46 and 52)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
N-de(phenylethyl)isohericerin	C ₉ H ₉ NO ₃	76512895	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	445639	Partially Found (Missing Proton 54)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	985	Partially Found (Missing Proton 50)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Stearic Acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	5281	Partially Found (Missing Protons 25, 26 and 56)	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Taraxasterol acetate	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	13889352	Found	Not Found	Found	Found	Not Found	Not Found

Compounds of <i>C. arabica</i>	Formula	PubChem CID	RC+Hx-Rn	RC+MeOH-Rn	RB+A94-Rn	RB+AF-Rn
Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	2519	Not Found	Found	Found	Found
Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	5570	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Neochlorogenic acid (5-Caffeoylquinic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5280633	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Isochlorogenic acid C (3,4-Dicaffeoylquinic acid)	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	6474309	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Isochlorogenic acid A (3,5-Dicaffeoylquinic acid)	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₂	6474310	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Chlorogenic acid (3-Caffeoylquinic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1794427	Not Found	Partially Found (Missing Protons 26 and 36)	Partially Found (Missing Protons 26, 36, 37 and 39)	Partially Found (Missing Protons 26, 36, 37 and 39)
Cryptochlorogenic acid (4-Caffeoylquinic acid)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	9798666	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	445858	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	637542	Not Found	Not Found	Not Found	Not Found
Cafestol	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	108052	Partially Found (Missing Proton 51)	Found	Found	Found
Kahweol	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	114778	Partially Found (Missing Proton 49)	Found	Found	Found
β-Sitosterol	C ₂₇ H ₄₈ O	222284	Found	Not Found	Found	Found
Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	5280794	Found	Not Found	Found	Found
Campesterol	C ₂₅ H ₄₆ O	173183	Found	Not Found	Found	Found
Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	985	Partially Found (Missing Proton 50)	Not Found	Not Found	Not Found
Linoleic Acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	5280450	Partially Found (Missing Proton 52)	Not Found	Not Found	Not Found
Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	445639	Partially Found (Missing Proton 54)	Partially Found (Missing Proton 54)	Not Found	Not Found
Stearic Acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	5281	Partially Found (Missing Protons 33, 34 and 56)	Not Found	Not Found	Not Found
Pregnenolone	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	8955	Partially Found (Missing Protons 29, 51, 52, 53 and 54)	Partially Found (Missing Protons 52, 53 and 54)	Not Found	Not Found

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu para a compreensão do potencial do café enriquecido com *Hericium erinaceus* como bebida funcional, ao integrar diferentes abordagens analíticas e quimiométricas para caracterização de seu perfil químico. A combinação de técnicas complementares — RMN, CG-EM e análises multivariadas — permitiu a anotação de compostos bioativos característicos tanto do café quanto do cogumelo, sugerindo a presença de β -glucanas, eritritol, cafeína, diterpenos (cafestol e kahweol), fitoesteróis e ácidos graxos, além de metabólitos discriminantes que variam conforme a temperatura de preparo.

Os resultados mostraram que, embora compostos neurotróficos clássicos presente nos corpos de frutificação de *H. erinaceus* (hericenonas) não tenham sido detectados nas condições de preparo doméstico simuladas, a presença de β -glucanas e outros metabólitos com reconhecida ação antioxidante, imunomodulatória e anti-inflamatória reforça o valor funcional do *blend*. Adicionalmente, a análise multivariada demonstrou que a temperatura exerce impacto direto no perfil metabólico, influenciando a abundância relativa de compostos-chave como a cafeína, o que confere ao preparo doméstico um papel determinante na composição final da bebida.

Esses achados evidenciam que a associação de *Coffea arabica* e *Hericium erinaceus* representa uma estratégia viável para o desenvolvimento de novas formulações funcionais, unindo benefícios à saúde com uma matriz culturalmente consolidada de consumo. Contudo, a ausência de detecção de alguns marcadores neurotróficos ressalta a necessidade de estudos complementares que avaliem eficiência de extração, quantificação precisa de β -glucanas, biodisponibilidade, sinergismo entre compostos e efeitos biológicos *in vivo*.

Assim, esta dissertação representa um passo inicial e fundamental para consolidar bases científicas no desenvolvimento de cafés enriquecidos com cogumelos medicinais, abrindo perspectivas para inovação no setor de alimentos funcionais e para futuras investigações que possam sustentar de forma robusta os benefícios atribuídos a esse tipo de produto.

REFERÊNCIAS

- ANGELONI, G.; GUERRINI, L.; MASELLA, P.; BELLUMORI, M.; DALUIISO, S.; PARENTI, A.; INNOCENTI, M. What kind of coffee do you drink? Na investigation on effects of eight diferente extraction methods. **Food Research International**, v. 116, p. 1327-1335, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.022>
- ALI, A.; ZAHID, H.F.; COTTRELL, J.J.; DUNSHEA, F.R.; A Comparative Study for Nutritional and Phytochemical Profiling of Coffea arabica (C. arabica) from Different Origins and Their Antioxidant Potential and Molecular Docking. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5126, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27165126>
- ALTOVA, E.P.; HARGITTAI, I. Mikhail S. Tsvet - pioneer of chromatography - 150 years from his birth. **Structural Chemistry**, v. 33, p. 1-33, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11224-021-01804-z>
- ALVON, D.L.; DA SILVA, H.R.M.V.; FEITOSA, M.M.; GUIMARÃES, L.M.; SILVA, F.C. **O transporte do café no Brasil**. In: Anais do Congresso Nacional Integra Portos. Anais Santos (SP), CENEP Santos, 2023. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/cnit2023/760853-O-TRANSPORTE-DO-CAFE-NO-BRASIL>. Acesso em: 24, set. 2025.
- AMORIM, A.F.V. **Métodos Cromatográficos**. 1ª ed. Fortaleza: Copyright, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da Indústria de Café**. ABIC, 2024.
- BRANDALISE, F.; RODA, E.; RATTO, D.; GOPPA, L.; GARGANO, M. L.; CIRLINCIONE, F.; PRIORI, E. C.; VENUTI, M.T.; PASTORELLI, E.; SAVINO, E.; ROSSI, P. (2023). Hericium erinaceus in Neurodegenerative Diseases: From Bench to Bedside and Beyond, How Far from the Shoreline? **Journal of Fungi**, v. 9, n. 5. <https://doi.org/10.3390/jof9050551>
- CAPRA, R.S.; TONIN, F.B. **Ascensão do cultivo de cogumelos comestíveis no Brasil. 8ª Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu**, 2019, São Paulo, Brasil. Disponível em: <http://www.jornacitec.fatecbt.edu.br/index.php/VIIIJTC/VIIIJTC/paper/viewFile/1755/2174>. Acesso em: 07 jan. 2024
- CHEMSPIDER. **Search and share chemistry**. Disponível em: <https://www.chemspider.com/>. Acesso em: 21 mar. 2025
- CHONG, P.S.; FUNG, M-L.; WONG, K.H.; LIM, L.W. Therapeutic Potential of Hericium erinaceus for Depressive Disorder. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 1, p. 163, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21010163>
- CHUTIMANUKUL, P.; PHATTANAMAS, W.; THEPSILVISUT, O.; CHANTARACHOT, T.; THONGTIP, A.; CHUTIMANUKUL P. Commercial scale production of Yamabushitake mushroom (Hericium erinaceus (Bull.) Pers. 1797) using rubber and bamboo sawdust

substrates in tropical regions. **Scientific Reports**, v. 13, n. 13316, 2013.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40601-y>

CIARAMELLI, C.; PALMIOLI, A.; AIROLDI, C. Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. **Food Chemistry**, v. 278, p. 47–55, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.063>

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 7ª Ed. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 2006.

CULTIVERSO. **Inovação em Cogumelos**. [2017]. Disponível em:
<https://www.cultiverso.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2025.

DANUELLO, A.; MARTINS, M.M.; SOUZA, R.A.C.; NASCIMENTO, M.N.G.; MARTINS, C.M.; PETRUCI, J.F.S.; MORAIS, S.A.L.; PIVATTO, M. Técnicas Cromatográficas: Princípios, Classificações e Aplicações. **Editora Científica**, v. 2, p. 200–214, 2022.

DEMARQUE, D.P.; DUSI, R.G.; DE SOUSA, F.D.M.; GROSSI, S.M.; SILVÉRIO, M.R. S.; LOPES, N.P.; ESPINDOLA, L.S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58046-y>

DOEPKER, C.; MOVVA, N.; COHEN, S.S.; WIKOFF, D.S. Benefit-risk of coffee consumption and all-cause mortality: A systematic review and disability adjusted life year analysis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 170, n. 113472, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113472>

EMBRAPA. **Artigo – Consumo mundial de café atinge total de 177 milhões de sacas anualmente que correspondem a 485 mil sacas por dia**. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/98956051/consumo-mundial-de-cafe-atinge-total-de-177-milhoes-de-sacas-anualmente-que-correspondem-a-485-mil-sacas-por-dia>. Acesso em: 13 mar. 2025

EMBRAPA. **Transferência de tecnologia expande consumo de cogumelos no Brasil**. Disponível em: <https://bs.sede.embrapa.br/2017/destaque4.html>. Acesso em: 07 jan. 2024

EXPANSÃO CIENTÍFICA LTDA - EPP. Angelica Megda da Silva. **Implantação de uma unidade de obtenção de café tipo cappuccino dotado com cogumelo- *Agaricus blazei murrii***. 08/52150-8, 01 fev. 2008

EXPANSÃO CIENTÍFICA LTDA - EPP. Elita Urano de Carvalho; Humberto Gracher Riella; Leila Antony Barros. **Café do tipo cappuccino enriquecido com cogumelo *Agaricus blazei Murrii***. PI0903613-0 A2, 25 set. 2009

FAPESP. **Busca de processos**. Disponível em: <https://agilis.fapesp.br/agilis/publico/>. Acesso em: 10 jan. 2024

GAIA SUPERFOODS. **Elixir Mushroom Coffee**. [2023]. Disponível em:

<https://www.gaiasuperfoods.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2025

GHOSH, S.; NANDI, S.; BANERJEE, A.; SARKAR, S.; CHAKRABORTY, N.; ACHARYA, K. Prospecting medicinal properties of Lion's mane mushroom. **Journal of Food Biochemistry** 2021, 45(8). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13833>

GNPS. **Análise de Dados**. Disponível em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>. Acesso em: 24 jan. 2025.

GRAVINA, A.G.; PELLEGRINO, R.; AULETTA, S.; PALLADINO, G.; BRANDIMARTE, G.; D'ONOFRIO, R.; ARBORETTO, G.; IMPERIO, G.; VENTURA, A.; CIPULLO, M.; ROMANO, M.; FEDERICO, A. Hericium erinaceus, a medicinal fungus with a centuries-old history: Evidence in gastrointestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 20, p. 3048-3065, 2023. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i20.3048>

GRIFFITHS, W.J.; KOAL, T.; WANG, Y.; KOHL, M.; ENOT, D.P.; DEIGNER, H-P. Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 32, p. 5426–5445, 2010. <https://doi.org/10.1002/anie.200905579>

HAACK, D. M. P.; GONÇALVES, L. B.; FERREIRA, K. R. M.; AZEREDO, M. F. Cenário do café no território brasileiro: a influência dos elementos da geografia regional sobre os cafés especiais. **Ciência Geográfica**, v. 27(3). <https://doi.org/10.57243/26755122.XXVII3008>.

HASSAN, M.; SHAHZADI, S.; RANSOM, R.F.; KLOCZKOWSKI, A. Nature's Own Pharmacy: Mushroom-Based Chemical Scaffolds and Their Therapeutic Implications. **Int. J. Mol. Sci.**, 2023, 24(21), 15596. <https://doi.org/10.3390/ijms242115596>

HAWKSWORTH, D.L.; LUCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum** 2017, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>

HONG, Y-S. NMR-based metabolomics in wine science. **Magnetica Ressonance in Chemistry**, v. 49, n. S1, p. S13-S21, 2012. <https://doi.org/10.1002/mrc.2832>

INNOCENTINI, M. Política brasileira do agronegócio do café: Desafios e propostas. **Revista de Política Agrícola**, v. 24, n. 2, 2015. Disponível em: <https://rpa.sede.embrapa.br/RPA/article/view/1008>. Acesso em: 24, set. 2025

IUPAC. Chromatography. **Compendium of Chemical Terminology**, 3^a ed, 2006. Versão online 3.0.1, 2019.

KALLA, K.; CICHA-JELEN, M.; HNATYK, K.; KRAKOWSKA, A.; SULKOWSKA-ZIAJA, K.; SZEWCZYK, A.; LAZUR, J.; MUSZYNSKA, B. Coffee with Cordyceps militaris and Hericium erinaceus fruiting bodies as a source of essential bioactive substances. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 7, p. 955, 2024. <https://doi.org/10.3390/ph17070955>

KHANUM, A.B.; SHAKIR, L.; REHMAN, Z-U.; KHAN, T.A.; NAJAM, K.; SAEED, N.; KHAN, M.A.; NAZEER, A.; NAZIR, T.; ASLAM, S. Prophylactic treatment of ischemic

stroke with *Coffea arabica* in rats: A preliminary study. **Biomedical Research and Therapy**, v. 7, n. 5, p. 3768-3777, 2020. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i5.604>

LEITE, Lídia Lúcia Bezerra. **Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-1H) na área farmacêutica e afins**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, 2013.

LUCENA, M.A.; SOUSA, E.P.; CORONEL, D.A. Desempenho dos principais estados brasileiros exportadores de café. **Revista de Política Agrícola**, v. 30, n. 3, 2021. Disponível em: <https://rpa.sede.embrapa.br/RPA/article/view/1608>. Acesso em: 24, set. 2025

LU, H.; LOU, H.H.; HU, J.J.; LIU, Z.; CHEN, Q.H. Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2333-2356, 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12602>

LU, X.; BRENNAN, M. A.; GUAN, W.; ZHANG, J.; YUAN, L.; BRENNAN, C. S. Enhancing the Nutritional Properties of Bread by Incorporating Mushroom Bioactive Compounds: The Manipulation of the Pre-Dictive Glycaemic Response and the Phenolic Properties. **Foods**, 10(4), 731, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10040731>

ŁYSAKOWSKA, P.; SOBOTA, A.; WIRKIJOWSKA, A.; IVANISOVÁ, E. Lion's Mane (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.) as a functional component for wheat bread production: influence on physicochemical, antioxidant, and sensory properties. **Int. Agrophys**, 39(1), 13-28, 2025. <https://doi.org/10.31545/intagr/194613>

MENEZES, Bruna dos Santos. **Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante de compostos bioativos de cogumelos comestíveis**. 2017. 129 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2017

MOREIRA, M.L.C.; PEREIRA, R.G.F.A.; DIAS, D.F.; GONTIJO, V.S.; VILELA, F.C.; MORAES, G.O.I.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M.H. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 466-474, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.12.002>

NASCIMENTO, R.F.; LIMA, A.C.A.; BARBOSA, P.G.A.; SILVA, V.P.A. **Cromatografia Gasosa: Aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018

OSHIIWA, M.; DORTA, C.; ALVES, W.S.; ROSSI, P.H.S.; OTOBONI, A.M.M.B.; GUTIERREZ, V.C.P.; IGNÁCIO, E.O.; FAVONI, S.P.G. Consumo do café especial no Brasil e sua exportação. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, v. 17, n. 10, p. 01-18, 2024. <https://doi.org/10.55905/revconv.17n.10-272>

PANDA, S.K.; SAHOO, G.; SWAIN, S.S.; LUYTEN, W. Anticancer activities of mushrooms: a neglected source for drug Discovery. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 176, 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15020176>

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à**

Espectroscopia. 1ª ed. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2010

POOLE, R.; KENNEDY, O.J.; RODERICK, P.; FALLOWFIELD, J.A.; HAYES, P.C.; PARKES, J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. **BMJ**, v. 2017, n. 359, 2017. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5024>

PORRO, C.; CIANCIULLI, A.; PANARO, M.A. A cup of coffee for a brain long life. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 1, p. 158-159, 2024. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.375324>

POURSHAHIDI, L.K.; NAVARINI, L.; PETRACCO, M.; STRAIN, J.J. A Comprehensive Overview of the Risks and Benefits of Coffee Consumption. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 671– 684, 2016. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12206>

PUBCHEM. **Quickly find chemical information from authoritative sources**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 23 dez. 2024.

QIU, Y.; LIN, G.; LIU, W.; ZHANG, F.; LINHARDT, R.J.; WANG, X.; ZHANG, A. Bioactive substances in *Hericium erinaceus* and their biological properties: a review. **Food Science and Human Wellness**, v. 13, n. 4, p. 1825-1844, 2024. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250152>

RAI, S.N.; MISHRA, D.; SINGH, P.; VAMANU, E.; P SINGH, M. Therapeutic applications of mushrooms and their biomolecules along with a glimpse of in silico approach in neurodegenerative diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, n. 111306, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111377>

ROBOTTI, E.; MARENCO, E. Chemometric Multivariate Tools for Candidate Biomarker Identification: LDA, PLS-DA, SIMCA, Ranking-PCA. *In: Methods in Molecular Biology*. p. 237–267, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3255-9_14

RODRIGUES, G.M.; OKURA, M.H. Cogumelos comestíveis no Brasil: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30830>

RUGGIERO, M.; CALVELLO, R.; PORRO, C.; MESSINA, G.; CIANCIULLI, A.; PANARO, M.A. Neurodegenerative Diseases: Can Caffeine Be a Powerful Ally to Weaken Neuroinflammation? **Int. J. Mol. Sci**, v. 23, n. 21, p. 12958, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232112958>

SAITSU, Y.; NISHIDE, A.; KIKUSHIMA, K.; SHIMIZU, K.; OHNUKI, K. Improvement of cognitive functions by oral intake of *Hericium erinaceus*. **Biomedical Research**, v. 40, n. 4, p. 125-131, 2019. <https://doi.org/10.2220/biomedres.40.125>

SANTOS, Gustavo Souza. ***Phaeurus antarcticus e seus fungos endofíticos: Diversidade química de uma farmácia oculta sob o oceano Antártico***. 2022. 364 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2022.

SHAMIM, M.Z.; MISHRA KUMAR A.; KAUSAR, T.; MAHANTA, S.; SARMA, B.; KUMAR, V.; MISHRA KUMAR, P.; PANDA, J.; BAEK, K-H.; MOHANTA, Y.K. Exploring edible mushrooms for diabetes: unveiling their role in prevention and treatment. **Molecules**, v. 28, n. 6, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28062837>

SHEU, S-C.; LYU, Y.; LEE, M-S.; CHENG, J-H. Immunomodulatory effects of polysaccharides isolated from *Hericium erinaceus* on dendritic cells. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1402-1408, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.012>

SILVA, Luiz Guilherme de Melo Silva. **Uma breve revisão sobre RMN e algumas de suas aplicações**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Uberlândia, 2018.

SIMON, J.; FUNG, K.; RAISI-ESTABRAGH, Z.; AUNG, N.; KHANJI, M.Y.; KOLOSSVÁRY, M.; MERKELY, B.; MUNROE, P.B.; HARVEY, N.C.; PIECHNIK, S.K.; NEUBAUER, S.; PETERSEN, S.E.; HORVAT, P.M. Light to moderate coffee consumption is associated with lower risk of death: a UK Biobank study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 29, n. 5, p. 982-991, 2022. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwac008>

SOCALA, K.; SZOPA, A.; SEREFKO, A.; POLESZAK, E.; WLAZ, P. Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–64, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22010107>

TSAI, P.C.; WU, Y.K.; KUO, C.F.; HU, J.H.; LI, I.C.; LIN, T.W.; CHEN, C.C. Preclinical bioavailability, tissue distribution, and protein binding studies of erinacine a, a bioactive compound from *hericium erinaceus* mycelia using validated lc-ms/ms method. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4510, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26154510>

U.COFFEE. **Café Catuaí: Aprenda Tudo Sobre Essa Variedade 100% Brasileira**. 2019. Disponível em: <https://blog.ucoffee.com.br/cafe-catuai/#:~:text=Para%20dar%20uma%20ideia%20dessa,contabiliza%20mais%20de%2060%20esp%C3%A9cies>. Acesso em: 11, dez. 2023.

URAKAMI, E.M. **Processo de produção de alimento funcional compreendendo cogumelo comestível**. Depositante: EDUARDO MASSAKI URAKAMI. BR102021010636-0 A2. Depósito: 01 jun. 2021. Concessão: 01 fev. 2022.

VALVERDE, M.E.; PÉREZ, T.H.; LÓPEZ, O.P. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology** 2015, 2015(1), 376–387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>

WASIM, S.; KUKKAR, V.; AWAD, V.; SAKHAMURU, S.; MALIK, B.H. Neuroprotective and Neurodegenerative Aspects of Coffee and Its Active Ingredients in View of Scientific Literature. **Cureus**, v. 12, n. 8, 2020. <https://doi.org/10.7759/cureus.9578>

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

WOLFENDER, J.L.; NUZILLARD, J.M.; VAN DER HOOFT, J.J.J.; RENAULT, J. H.; BERTRAND, S. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05112>

WORTEN. **Robô de Cozinha YÄMMI 2**. Disponível em: <https://www.worten.pt/produtos/robo-de-cozinha-yammi-2-upgrade-bandeja-1-livro-de-receitas-3-3-1-1500-w-10-acessorios-7263801>. Acesso em: 23 jan. 2025.

WU, L.; SUN, D.; HE, Y. Coffee intake and the incident risk of cognitive disorders: A dose–response meta-analysis of nine prospective cohort studies. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 730-736, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.05.015>

YANG, J-Y.; SANCHEZ, L.M.; RATH, C.M.; LIU, X.; BOUDREAU, P.D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W.R.; LININGTON, R.G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H.M.; GERWICK, W.H.; DORRESTEIN, P.C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013. <https://doi.org/10.1021/np400413s>

YANG, J-Y.; TAO, L.; LOU, D.; PATABENDIGE, N. M.; EDIRIWEERA, A. N.; LIU, S.; LU, W.; TARAFDER, E.; RAPIOR, S.; HAPUARACHCHI, K. K. Innovative applications of medicinal mushrooms in functional foods and nutraceuticals: a focus on health-boosting beverages. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 20(15), 1605301, 2025. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1605301>

ZHANG, J.; AN, S.; HU, W.; TENG, M.; WANG, X.; QU, Y.; LIU, Y.; YUAN, Y.; WANG, D. The neuroprotective properties of hericium erinaceus in glutamate- damaged differentiated PC12 cells and an alzheimer’s disease mouse model. **International Journal of Molecular Sciences** 2016, 17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111810>

ZHAO, Q.; ZHANG, J-L.; LI, F. Application of Metabolomics in the Study of Natural Products. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 4, p. 321–334, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0175-9>

ANEXOS I. Comprovante de Submissão do Artigo

Natural Products and Bioprospecting Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in *Hericium erinaceus*-Enriched Coffee --Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in <i>Hericium erinaceus</i> -Enriched Coffee				
Article Type:	Original Article				
Corresponding Author:	Alexandre Rafael Lenz, Dr. Universidade do Estado da Bahia Departamento de Ciências da Vida: Universidade do Estado da Bahia Departamento de Ciências da Vida BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Universidade do Estado da Bahia Departamento de Ciências da Vida: Universidade do Estado da Bahia Departamento de Ciências da Vida				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Ana Verena Viana dos Santos				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Ana Verena Viana dos Santos Victor Pena Ribeiro Erika Maria de Oliveira Ribeiro Keila Almeida Santana Maria Paula Machado Cardoso Nandjane Silva Bôa Morte Clícia Maria de Jesus Benevides Ian Castro-Gamboia Aníbal de Freitas Santos Júnior Gustavo Souza dos Santos Alexandre Rafael Lenz, Dr.				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Universidade do Estado da Bahia (PROINOVAÇÃO 013/2022)</td> <td>Mr. Alexandre Rafael Lenz</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (406331/2023-5)</td> <td>Mr. Aníbal de Freitas Santos Júnior</td> </tr> </table>	Universidade do Estado da Bahia (PROINOVAÇÃO 013/2022)	Mr. Alexandre Rafael Lenz	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (406331/2023-5)	Mr. Aníbal de Freitas Santos Júnior
Universidade do Estado da Bahia (PROINOVAÇÃO 013/2022)	Mr. Alexandre Rafael Lenz				
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (406331/2023-5)	Mr. Aníbal de Freitas Santos Júnior				
Abstract:	Coffee is increasingly recognized as a functional beverage due to its diverse bioactive compounds, particularly those with antioxidant and neuroprotective properties. Its widespread consumption provides an attractive platform for incorporating additional health-promoting ingredients. <i>Hericium erinaceus</i> (lion's mane mushroom) produces bioactive metabolites, including the neurotrophic compounds hericenones and erinacines, as well as antioxidant and anticancer constituents, positioning it as a promising ingredient for the development of functional coffee blends. However, little is known about the efficiency of extracting these compounds under typical domestic brewing conditions. Here, we evaluated the extractability of <i>H. erinaceus</i> metabolites in coffee prepared by hot water infusion. Samples of <i>Coffea arabica</i> , <i>H. erinaceus</i> fruiting bodies, and their blend were subjected to hot water, methanol, and hexane extractions,				

	<p>followed by ¹H NMR spectroscopy and chemometric analysis. Characteristic resonances corresponding to bioactive metabolites from both sources were observed in the hot water extracts, including β-glucans (HEBG), erythritol, caffeine, cafestol, kahweol, and phytosterols. In contrast, neurotrophic compounds such as hericenones, ergosterol peroxide, and cerevisterol were not detected. The detection of HEBG, a polysaccharide with recognized immunomodulatory and health-promoting activities, supports the potential of <i>H. erinaceus</i>-enriched coffee as a functional beverage. This study represents an initial step toward validating this combination and highlights the need for further investigations into extraction efficiency, compound quantification, bioaccessibility, and optimal blending strategies.</p>
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

12/10/2025, 12:56

Email – Ana Verena – Outlook



NPAB-D-25-00953 - Submission Notification to co-author - [EMID:5c44cc9a83bf2901]

De Natural Products and Bioprospecting (NPAB) <em@editorialmanager.com>

Data Qui, 28/08/2025 23:15

Para Ana Verena Viana dos Santos <anaverenavs@hotmail.com>

Re: "Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in Hericium erinaceus-Enriched Coffee"
Full author list: Ana Verena Viana dos Santos; Victor Pena Ribeiro; Erika Maria de Oliveira Ribeiro; Keila Almeida Santana; Maria Paula Machado Cardoso; Nandjane Silva Bôa Morte; Clícia Maria de Jesus Benevides; Ian Castro-Gamboa; Aníbal de Freitas Santos Júnior; Gustavo Souza dos Santos; Alexandre Rafael Lenz

Dear Ms. dos Santos,

We have received the submission entitled: "Metabolic Profiling and Bioactive Compound Extraction in Hericium erinaceus-Enriched Coffee" for possible publication in Natural Products and Bioprospecting, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Mr. Alexandre Rafael Lenz who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Natural Products and Bioprospecting

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/npab/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.