UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Sara Rosicler Vieira Spim

EFEITOS DA INGESTÃO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Sorocaba/SP
2016

Sara Rosicler Vieira Spim

EFEITOS DA INGESTÃO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPíDICA

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª. Drª. Denise Grotto

Sorocaba/SP

2016

Sara Rosicler Vieira Spim

EFEITOS DA INGESTÃO DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPíDICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Profª Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Profª Dra. Maria Aparecida Lopes da Costa
Universidade de Sorocaba

Dra. Maria Fernanda Hornos Carneiro
Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho ao meu querido e amado esposo Adilson Spim e meu adorável filho Nikolas Spim. Parceitos, companheiros e alegria da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pela graça da vida, pela sabedoria e oportunidade de realizar esse trabalho.

À Prof. Denise Grotto, por ter me conduzido na orientação dessa dissertação, pelo companheirismo e amizade que foram de grande importância para a conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Adilson Spim pelo incentivo, paciência e presença constante na minha vida. Ao meu filho amado Nikolas Spim por todo seu apoio e carinho. À minha família pelo apoio, incentivo e orações.

Agradeço à Coordenadora de Nutrição Luciane Lopes Sant'Ana e a Prof. Maria Aparecida "Cida" por todo o carinho, amizade e contribuição neste momento tão importante na minha vida. Ao Coordenador do mestrado Sílvio Barberato, ao corpo docente do mestrado Luciane Cruz Lopes, Dr. Newton Polimeno, Marli Gerenutti, Daniela Junqueira por todos os ensinamentos transmitidos. Aos amigos conquistados e que tanto me ajudaram nesta pesquisa, Fernanda Gomes, Bruna Chrispim, Thaisa Borim, Júnior Poles, Bianca Hessel, Valéria Orsi, Néia, Marcia, Gustavo.

Muito agradecida ao patrocinador Yuri Cogumelos, a Universidade de Sorocaba pela confiança. À CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro deste trabalho.

À todos a minha gratidão!

RESUMO

O estilo de vida e as facilidades do mundo contemporâneo têm influenciado os hábitos alimentares, favorecendo o consumo de dietas hipercalóricas e inadequadas. Por outro lado, os alimentos funcionais ou nutracêuticos são capazes de prevenir ou reduzir o risco de obesidade e doenças relacionadas. O cogumelo *Lentinula edodes* (*L. edodes*) é um alimento com excelentes características nutricionais por possuir baixo teor lipídico, alto teor protéico, ser fonte de vitaminas e minerais, e rico em fibras. Alguns estudos têm demonstrado que o *L. edodes* apresenta ação antitumoral, hipoglicêmica, redutora de colesterol e antitrombótica. Assim, com objetivo de verificar o efeito da ingestão de doses adequadas do cogumelo *L. edodes* associado à dieta hiperlipídica, 18 ratos machos Wistar foram separados em três grupos conforme descrito a seguir (n=6 ratos/grupo): I- Controle (dieta normal). II – Dieta hiperlipídica; III – Dieta hiperlipídica + *L. edodes* (100 mg/Kg). Após 30 dias expostos às dietas, foram avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos, do peso e de estresse oxidativo. Para tanto, foram analisados, por kit comercial, glicose, triglicerídeos, colesterol (total e frações), frutosamina e gama glutamil transferase. Foram analisados os marcadores de estresse oxidativo peroxidação lipídica, glutationa reduzida, catalase e glutationa peroxidase por métodos espectrofotométricos. E parâmetros hematológicos, creatinina, ureia e transaminases foram avaliados em equipamentos automatizados Sysmex Xs 1000i e COBAS C111, respectivamente, Roche®. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a dieta hiperlipídica induziu aumento de colesterol total e triglicerídeo. O *L. edodes* reduziu significativamente estes parâmetros a valores semelhantes aos encontrados no grupo controle. Além disso, a dieta hiperlipídica aumentou a atividade das enzimas hepáticas alanina aminotranferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que indicam possíveis danos hepáticos. O *L. edodes* reverteu este quadro, normalizando a atividade das enzimas. Com relação aos marcadores renais, o *L. edodes* se mostrou capaz de normalizar os níveis séricos de ureia, que estavam aumentados devido à dieta hiperlipídica, e também reduziu a glicose urinária e sanguínea. Observando os marcadores de estresse oxidativo, a dieta rica em lipídeos induziu o aumento nos níveis de peroxidação lipídica, e o *L. edodes*, por sua vez, reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a valores semelhantes àqueles encontrados no grupo controle, prevenindo assim a oxidação dos ácidos graxos, com

possível ação antioxidante. Diante disso, o *L. edodes* foi capaz de reduzir as desordens metabólicas induzidas pelo consumo de dieta hiperlipídica, revertendo principalmente injúrias hepáticas e colesterolêmicas. As propriedades bioativas do cogumelo *L. edodes*, como a hipolipidêmica, hipoglicêmica, e hepatoprotetora, podem ser provenientes das β-glucanas e das fibras, encontadas em concentrações significativas neste estudo. Desta forma, o *L. edodes* pode ser uma boa indicação como suplemento alimentar.

Palavras-chave: Nutracêuticos. *Lentinula edodes*. Obesidade. Desordem metabólica. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The lifestyle and the amenities of the modern world have influenced the eating habits, favoring the consumption of a high fat and inadequat diets. On the other hand, functional foods or nutraceuticals are able to prevent or reduce the risk of obesity and related diseases. *Lentinula edodes* mushroom (*L. edodes*) is a food with excellent nutritional characteristics because it has low fat and high protein content, is source of vitamins and minerals, besides its high fiber content. Some studies have shown *L. edodes* has antitumor, hypoglycemic, cholesterol reducer, antithrombotic actions. Thus, in order to determine the effect of appropriate doses of *L. edodes* intake associated with fat diet, 18 male Wistar rats were divided into three groups as follows (n = 6 mice / group): I- control (diet normal). II – High-fat diet; III – High-fat diet + *L. edodes* (100 mg / kg). After 30 days in treatment, rats were evaluated regarding hematologic parameters, biochemical profile, weight and oxidative stress. Therefore, glucose, triglycerides, cholesterol (total and fractions), fructosamine and gamma-glutamyl transferase were analyzed by commercial kit. Oxidative stress biomarkers as lipid peroxidation, reduced glutathione, catalase and glutathione peroxidase were analyzed by spectrophotometric methods. Hematological parameters, creatinine, urea and transaminases were evaluated in automated equipment Sysmex XS 1000i and COBAS C111, respectively, from Roche®. From the results obtained, it was observed the high-fat diet increased total cholesterol and triglyceride levels. *L. edodes* significantly reduced these parameters to values similar to those found in the control group. Furthermore, the high-fat diet increased the activity of hepatic enzymes alanine aminotranferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), indicating potential liver damage. *L. edodes* reversed this state, controlling the enzume activities. Regarding renal markers, *L. edodes* was able to regulate the serum levels of urea, which were increased due to the high-fat diet, and also reduced urinary and blood glucose levels. Observing the oxidative stress markers, the high-fat diet increased the lipid peroxidation, and *L. edodes*, in turn, reduced the levels of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) similar to that found in the control group, thus preventing the oxidation of fatty acids, with possible antioxidant property. Therefore, *L. edodes* was able to reduce metabolic disorders induced by high-fat diet consumption, mostly reversing the liver injury and the hypercholesterolemia. The bioactive properties from *L. edodes* mushroom, as hypolipidemic, hypoglycemic, and hepatoprotective may be

from the β-glucans and fibers, found in high concentrations in this study. Thus, L. edodes can be a good indication as a food supplement.

Key words: Nutraceuticals. *Lentinula edodes*. Obesity. Metabolic disorder. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotranferase

AST - Aspartato aminotranferase

ATP - Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CCK - Colecistocinina

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

DRI - Dietary Reference Intakes

DTNB - 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ɣ-GT - Gama glutamil tranferase

GR - Glutationa redutase

GSH - Glutationa reduzida

GSH-Px - Glutationa peroxidase

Hb - Hemoglobina

HCL - *Á*cido clorídrico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

H_3PO_4 - Ácido fosfórico

HTC - Hematócrito

IMC - Indice de massa corporal

KOH - Hidróxido de potássio

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

L. edodes - Lentinula edodes

MCH - Hemoglobina corpuscular média

MCHC - Concentração de hemoglobina globular média

MCV - Volume corpuscular médio

MDA – Malondialdeído

mM - Milimolar

NADH **-** Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADPH - Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina

NAOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanometro

OH - Radical hidroxila

O_2 - Oxigênio

PLQ - Número de plaquetas

RBC - Contagem total de eritrócitos

rpm - Rotação por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SOD - Superóxido dismutase

TAS - Tampão acetato de sódio

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TFK - Tampão fosfato de potássio

TNF - Fator de necrose tumoral

UV/VIS - Ultravioleta visível

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

WBC - Contagem total de Leucócitos

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....**12**

2 INTRODUÇÃO.....**13**
2.1 Alterações no metabolismo energético.....**13**
2.2 Alimentos funcionais.....**17**
2.3 Cogumelo como alimento funcional.....**20**
2.3.1 *Lentinula edodes*.....*22*

3 OBJETIVOS.....**24**
3.1 Geral.....**24**
3.2 Específicos.....**24**

4 MATERIAL E MÉTODOS.....**25**
4.1 Reagentes e soluções.....**25**
4.2 Tratamento dos animais.....**25**
4.3 Processamento do *L. edodes*.....**27**
4.4 Composição Nutricional do *L. edodes*.....**27**
4.5 Parâmetros hematológicos.....**29**
4.6 Parâmetros bioquímicos.....**29**
4.7 Parâmetros do estresse oxidativo.....**32**
4.8 Análise estatística.....**33**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....**34**
5.1 Pesos e medidas.....**34**
5.2 Artigo Científico.....**36**

6 CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO.....**66**

REFERÊNCIAS.....**67**

ANEXO A – Carta de Aprovação da Comissão de Ética Animal.....**74**

ANEXO B – Atestado de Sanidade Animal.....**75**

ANEXO C – Submissão do artigo à revista European Journal of Nutrition.**76**

ANEXO D - Guia da Revista "European Journal of Nutrition" **77**

ANEXO E - Participação em Congressos.....**82**

ANEXO F – Apresentação de Pôsteres em Congressos.....**87**

ANEXO G – Premiações **92**

ANEXO H – Participação em Bancas de Trabalho de Conclusão de Curso.....**94**

ANEXO I - Orientação e monitoramento em laboratório de alunos de Graduação em Nutrição.....**96**

ANEXO J – Membro da organização do VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil.....**98**

ANEXO K – Estágio de docência.....**99**

1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada em formato de artigo científico, seguindo as “Orientações para apresentação de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba”.

Assim, as seções “Resultados” e “Discussão” encontram-se agrupadas, e apresentam o manuscrito, redigido na língua inglesa e o texto segue as normas indicadas pela revista a qual o artigo foi submetido.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Alterações no metabolismo energético

A obesidade configura um dos maiores problemas de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Embora os fatores ambientais e genéticos desempenhem papel importante na obesidade, fatores endógenos como o sistema endócrino e hereditariedade e fatores exógenos como ingestão excessiva de alimentos com alto teor energético e o sedentarismo também contribuem de forma significativa para sua etiologia (LANDSBERG et al., 2013).

Algumas doenças como síndrome metabólica, dislipidemias, resistência à insulina, doenças cardiovasculares entre outras, estão diretamente ligadas à obesidade. A principal causa da obesidade é o desequilíbrio entre as calorias ingeridas e o gasto energético. Isto se deve à ingestão excessiva de alimentos com alto teor calórico, como gordura e açúcares, associado ao aumento da inatividade física devido ao sedentarismo (WHO, 2013). Em 2014 a população com sobrepeso atingiu o número de 1,9 bilhão de pessoas no mundo e 95 milhões de brasileiros (SBCBM, 2014).

O acúmulo de gordura anormal ou excessiva pode ser mensurada por meio do cálculo do índice de massa corporal (IMC), que consiste em dividir o peso do indivíduo pela altura ao quadrado. Esse método é baixo custo e de simples obtenção, tanto em inquéritos populacionais, como na prática clínica e no monitoramento em saúde (TOMASI et al., 2014). Uma pessoa com IMC de 25 a 29 é considerada com sobre peso. Uma pessoa com IMC de 30 a 39 é considerada obesa, e acima de 39 é considerada com obesidade mórbida (WHO, 2013).

A epidemia da obesidade tem acelerado o interesse em pesquisas na área de metabolismo e, em especial, no imunometabolismo. Essa é uma área que investiga a interface da imunologia e do metabolismo, anteriormente separados. Segundo Carvalheira et al. (2013), a obesidade afeta a função imunológica e promove inflamação no organismo, uma vez que o excesso no armazenamento de nutrientes resulta em disfunção metabólica. Essa disfunção, por sua vez, ativa a inflamação inata e adaptativa no tecido adiposo. O efeito direto da resposta inflamatória é promover resistência à insulina e desenvolvimento de doença metabólica induzida pela obesidade (CARVALHEIRA et al., 2013).

Desordem metabólica é o conjunto de fatores que, associados, vão levar ao aumento do risco de problemas cardiovasculares. Esses fatores são aumento da cintura abdominal, da pressão alta, alterações do colesterol, dos triglicerídeos e da glicemia (WISSE, 2004). A obesidade associada ao aumento da relação cintura/quadril ou gordura visceral reflete o estado metabólico anormal de gorduras em excesso.

O tecido adiposo visceral é o principal local de produção de citocinas que contribuem para a progressão da aterosclerose. Elas desempenhas papel importante na resistência à insulina, dislipidemia e na indução de estados trombóticos e inflamatórios (SIDDIQUI et al., 2014).

Além disso, o processo inflamatório decorrente das desordens metabólicas causa modificações nas condições fisiológicas, associadas às doenças crônicas não transmissíveis. De fato, a interação entre o metabolismo e o sistema imunológico sugere a existência de mecanismos patogênicos que podem não apenas explicar as complicações da obesidade, mas também oferecem informações substanciais para novas intervenções terapêuticas (CARVALHEIRA et al., 2013; BARBIERI et al., 2001).

Os resultados encontrados por Mozaffarian et al. (2004), em estudo com humanos, sugeriram que a ingestão de gorduras “trans” está relacionada com a inflamação sistêmica. Isto ocorre devido a concentrações elevadas de receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF) em indivíduos com maiores IMCs, gerando processos patológicos como doenças coronarianas e diabetes.

Os níveis elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) desempenham papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Por outro lado, níveis aumentados de lipoproteínas de alta densidade (HDL) equilibram o efeito deletério da LDL na parede vascular. Outras intervenções para regularizar a hipercolesterolemia vão desde mudanças no estilo de vida, com a alimentação equilibrada a tratamentos farmacológicos. Existem estratégias de sucesso para abordar esta questão, como o aumento da ingestão das lipoproteínas HDL para aumentar a proteção vascular, prevenindo eventualmente doenças coronarianas (BADIMON; VILAHUR, 2012).

Além das lipoproteínas, os parâmetros hematológicos também são amplamente utilizados para diagnósticos de doenças. Quando apresentam valores fora da normalidade podem auxiliar no diagnóstico de doenças como o câncer, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (PINI et al., 2011). Além destas

doenças, Barbieri et al. (2001) consideraram que a resistência insulínica e a gordura abdominal poderiam estimular a proliferação de eritroblastos e consequentemente o número de células vermelhas.

Tao et al. (2013) acompanharam o tratamento de 3.180 adultos com síndrome metabólica e mostraram que a utilização de marcadores hematológicos se fez importante e necessário para um diagnóstico precoce de risco, pois a síndrome metabólica está relacionada com alterações nas contagens de leucócitos em adultos de 20 a 35 anos de idade.

Um mecanismo importante na patogênese e progressão da obesidade e de doenças relacionadas a ela é a inflamação derivada do estresse oxidativo. Em condições fisiológicas, espécies reativas (ERs) de oxigênio e de nitrogênio são produzidas pelo organismo. São, porém, efetivamente eliminadas por sistemas antioxidantes intra e extracelulares. Todavia, quando há desequilíbrio entre a produção de ER e as defesas antioxidantes, gera-se um estado pró-oxidante, denominado de estresse oxidativo (HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

Na patogênese da obesidade, o excesso de nutrientes desencadeia, entre outras respostas celulares, a produção excessiva de ERs (ROBERTS; SINDHU, 2009). As ERs são geradas durante a oxidação de glicose e de ácidos graxos livres pelas mitocôndrias, e a partir de processos metabólicos em outras partes da célula (HOPPS et al., 2010). Além disso, aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias podem também conduzir ao aumento do estresse oxidativo (BONDIA-PONS et al., 2012).

O nível de estresse oxidativo é determinado pelas quantidades de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) nas células. As enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT) trabalham em defesa das células contra as ERs de oxigênio. A SOD é a enzima que converte o $O^{2\bullet -}$ em H_2O_2, e está intimamente ligada à CAT, pois é essa última que converte o H_2O_2 em água, garantindo o balanço oxidativo e reduzindo os danos causados por essas ERs. A GSH-Px, por sua vez, é uma enzima antioxidante selênio-dependente, responsável pela redução de hidroperóxidos orgânicos e H_2O_2 em alcoóis e água, respectivamente, a partir da glutationa reduzida (GSH). A GSH-Px atua de maneira importante na proteção celular quanto às mudanças oxidativas, sendo este um dos mecanismos de defesa antioxidante mais importante do sistema (CAMPANELLA et al., 2014).

Quantidades elevadas de ERs estão relacionadas ao processo de envelhecimento, bem como, com várias doenças, incluindo o câncer, a isquêmia e os danos nas funções imunológicas e endócrinas. Portanto, quando o estresse oxidativo surge como consequência de uma patologia, o sistema de defesa promove a regulação e expressão destas enzimas. Em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio, por exemplo, há aumento do quadro de estresse oxidativo, com redução da atividade enzimática antioxidante (MATÉS et al., 1999).

As desordens metabólicas também influenciam a fisiologia das funções hepáticas e renais. A enzima alanina aminotranferase (ALT), encontrada comumente no plasma e outros tecidos, está geralmente associada ao fígado, e a enzima aspartato aminotranferase (AST) é encontrada nas células do fígado, coração, rins, pâncreas e músculos. Tanto a ALT quanto a AST são liberadas na corrente sanguínea exacerbadamente quando há algum dano à membrana dos hepatócitos. Deste modo, o aumento das transaminases é muito utilizado como um marcador da função hepática (SCHINDHELM et al., 2006; WARREN; SWANSON, 1999).

O sistema renal exerce papel fundamental no equilíbrio dos líquidos e eletrólitos e na eliminação dos resíduos metabólicos, essenciais à homeostase corpórea. A obesidade está associada ao aumento do fluxo plasmático renal e taxa de filtração glomerular, elevando assim a concentração de ureia na urina (CHAGNAC et al., 2003). O controle da ureia pelo hormônio antidiurético permite ao organismo criar urina mais concentrada que o plasma sanguíneo para prevenir a perda de água. Dessa forma, economiza água para manter a pressão sanguínea adequada e os íons de sódio no plasma sanguíneo (MARSICANO et al., 2015).

A creatinina é uma substância proveniente da degradação da creatina fosforilada. A creatina é produzida pelo fígado, rins e pâncreas e transportada até os músculos onde é degradada por meio da catalisação pela enzima creatina quinase. Essa reação se dá por meio da contração muscular, posteriormente a creatinina é lançada na corrente sanguínea e eliminada na urina. Desta forma, a creatinina é um importante parâmetro de avaliação da função renal, uma vez que sua excreção se dá por filtração glomerular (NAVES et al., 2003).

Em estudo com 8 indivíduos obesos (observados antes e após emagrecimento) e 9 indivíduos saudáveis (tidos como controle), no qual o fluxo plasmático renal e taxa de filtração glomerular de todos foram avaliados com o objetivo de comparar se a perda de peso poderia alterar ou não estes indicadores. Os resultados apontaram

melhora na filtração glomerular após a perda de peso, podendo ainda prevenir o desenvolvimento de alguma glomerulopatia relacionada à obesidade (CHAGNAC et al., 2003).

Assim, percebe-se que evitar a obesidade é o mais adequado na prevenção das desordens metabólicas. Entretanto, quando se trata de população já obesa, o objetivo passa a ser diminuir a prevalência da obesidade, especialmente em população de risco. Trata-se de um desafio primordial, mas de longo prazo, pois requer abordagens como parte de um plano terapêutico, que requer ainda múltiplos esforços, com envolvimento de órgãos governamentais, novas legislações para alimentos industrializados e investimentos no atendimento multiprofissional na saúde. Fazem-se necessárias também mudanças nos hábitos e estilo de vida, como inserção de alimentos funcionais, com foco na perda de peso e redução de riscos (LANDSBERG et al., 2013)**.**

2.2 Alimentos funcionais

Alimento funcional foi definido por meio da Portaria nº 398, em 30 de abril de 1999, de responsabilidade do Ministério da Saúde, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC nº 398, 1999), como sendo,

> "alimento ou ingrediente com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e que pode, além de funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica, porém a eficácia desses alimentos deve ser assegurada por estudos científicos".

Avanços na ciência dos alimentos e na nutrição têm destacado a possibilidade de modular algumas patologias, como a obesidade, com a ingestão de alimentos funcionais (SERRANO; SANCHEZ-GONZALEZ, 2008). Os mecanismos pelos quais os alimentos funcionais podem atuar no controle e/ou prevenção do sobrepeso e de doenças relacionadas são vários:

1) inibição de sinais orexígenos que aumentam a sensação de fome ou melhora de sinais anorexígenos, inibindo a vontade de ingerir alimentos. Por exemplo, o amendoim contém inibidores de tripsina que estimulam o aumento plasmático de colecistocinina (CCK), sugerindo que o efeito sacietógeno ocorre por meio do mecanismo de *feedback* em níveis

luminal e sanguíneo, consequentemente, gerando efeitos fisiológicos induzindo menor ingestão alimentar (SERQUIZ, 2012);

2) inibição de enzimas associadas à digestão e absorção de gorduras, diminuindo a biodisponibilidade do colesterol, por exemplo, a aveia e a maçã (FIGUEIREDO et al., 2009);
3) estimulação do gasto energético, uma vez que muitos alimentos são termogênicos, exemplo a linhaça, o chá verde e a pimenta (CARDOSO et al., 2010); e
4) modificação da composição da microbiota intestinal, a qual altera a absorção de substâncias como o colesterol (KUMAR et al., 2012). Por exemplo, os alimentos probióticos como o leite fermentado (ROCHA, 2012).

Os alimentos funcionais capazes de prevenir ou reduzir o risco de obesidade e doenças relacionadas poderiam ser selecionados com base nos seus principais componentes, desde que possam estar relacionados aos mecanismos acima citados (SERRANO; SANCHEZ-GONZALEZ, 2008; YUN, 2010).

Os alimentos funcionais são fontes de importantes substâncias bioativas, as quais podem agir em processos biológicos, impactando nas funções e condições do organismo. Dentre estas substâncias podem-se citar as vitaminas, proteínas, peptídeos e compostos fenólicos entre muitas outras (MOLLER et al., 2008).

Os ácidos fenólicos, os flavonóides, as cumarinas e os taninos também são compostos de grande importância encontrados nos alimentos funcionais (ANGELO; JORGE, 2007). Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, e têm grande capacidade antioxidante (ANDREO; JORGE, 2011).

De acordo com Anjo (2004), os flavonóides protegem contra a oxidação do colesterol LDL à medida que reduzem as espécies ERs de oxigênio, quelam os íons metálicos e regeneram o alfa-tocoferol. Atuam também diminuindo significativamente a produção de ERs no processo inflamatório, nos tumores e na inibição da agregação plaquetária, reduzindo as cardiopatias e as tromboses. As antocianinas, flavonóides solúveis em água, são consideradas antioxidantes *in vitro* e *in vivo* e antimutagênicas *in vivo*. A ação antioxidante também é observada nas catequinas, nos flavonóides e nos ácidos fenólicos presentes no vinho (JACQUES et al., 2009).

Segundo as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), o sobrepeso e a obesidade podem ser reduzidos por meio da simples escolha saudável de alimentos, aumentando-se o consumo de frutas, verduras, leguminosas e grãos integrais. Assim, muitos alimentos com possíveis propriedades para diminuir níveis de colesterol, glicemia e peso corporal já foram estudados, com sucesso cientificamente comprovado, como por exemplo, a aveia (MAKI et al., 2010; CHANG et al., 2013).

Zani et al. (2015) avaliaram dois grupos de 66 mulheres idosas com síndrome metabólica, apresentando hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade abdominal. Os grupos participavam de palestras educativas a cada 15 dias, um grupo recebia 30 gramas de aveia ao dia. Avaliações físicas e bioquímicas foram realizadas mensalmente por 90 dias. As idosas que recebiam suplementação alimentar com aveia, apresentaram redução significativa na circunferência abdominal e no colesterol total. Os dois grupos apresentaram redução de LDL. Os resultados encontrados sugeriram que as intervenções educativa e dietética (com aveia), associadas ao tratamento medicamentoso convencional poderiam ser eficazes no controle do perfil lipídico e para redução da circunferência abdominal.

Outro alimento que atua no metabolismo lipídico e de carboidratos é a canela (IMPARL-RADOSEVICH et al., 1998; KHAN et al., 2003). Indivíduos com diabetes tipo 2 foram expostos a diferentes concentrações de canela (1, 3 e 6 g/dia) na forma de cápsulas por vinte dias. Ao término deste período, os pacientes tiveram seus níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol reduzidos em todas as doses, quando comparados aos indivíduos diabéticos que consumiram placebo (KHAN et al., 2003).

A jabuticaba também possui propriedades que podem auxiliar nas doenças relacionadas à obesidade. A casca liofilizada e moída da jabuticaba foi administrada por dez semanas, nas doses de 1, 2 e 4% ao dia, para ratos recebendo uma dieta com alta concentração de lipídeo, comparado a ratos recebendo dieta normal. Apesar dos resultados de massa corpórea não terem sofrido alteração com o consumo de jabuticaba, os níveis de insulina foram reduzidos e o níveis de colesterol HDL aumentaram (LENQUISTE et al., 2012).

Outros componentes importantes dos alimentos funcionais são as fibras, polissacarídeos, lignina, oligossacarídeos e substâncias associadas, resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2002). De acordo com Anjo (2004), dentre os efeitos da ingestão de oligossacarídeos e polissacarídeos

estão a redução do nível de colesterol sanguíneo e a redução da obesidade, visto que promovem rápida eliminação do bolo fecal, com redução do tempo de contato do epitélio intestinal com substâncias mutagênicas ou carcinogênicas, e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos da alimentação.

No estudo de Moraes e Colla (2006), os autores relataram que dentre as fibras solúveis estão as pectinas e hemiceluloses, e estas tendem a formar géis em contato com água, aumentando a viscosidade dos alimentos parcialmente digeridos no estômago. As fibras solúveis diminuem a absorção de ácidos biliares e têm atividades hipocolesterolêmicas. Quanto ao metabolismo lipídico, as fibras parecem diminuir os níveis de triglicerídeos, colesterol e reduzir a insulinemia.

As fibras alimentares apresentam grande variedade de propriedades físico-químicas e efeitos fisiológicos. A função da fibra na saúde vai além do tratamento de constipação intestinal; inclui também benefícios sobre fatores de risco para doença cardiovascular, controle de peso, função imunológica e integridade do cólon. Contudo, nem todas as fibras são iguais em termos de extensão de benefícios para a saúde. Características como solubilidade, capacidade de fermentação, e viscosidade são determinantes no efeito que a fibra terá no metabolismo. Devido à variabilidade de efeitos de fibras no corpo, é importante o consumo de várias fontes de alimentos (SLAVIN, 2013).

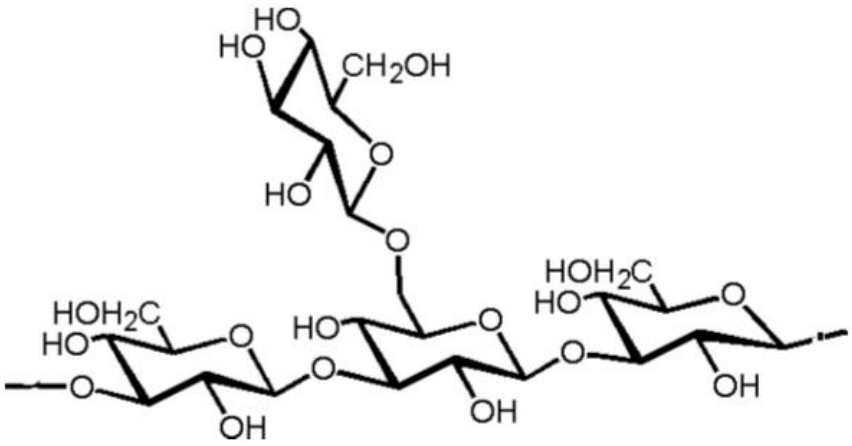
A ingestão de fibras em todo o mundo ainda é menos da metade do recomendado para a promoção da saúde e prevenção de doenças (PADOVANI et al., 2006). Segundo a *Dietary Reference Intakes* (DRIs) seu consumo está estimado de 25 a 38 g/dia para um adulto (PADOVANI et al., 2006).

2.3 Cogumelos como alimento funcional

Os cogumelos são fungos utilizados na alimentação desde a antiguidade, apreciados por seu valor nutricional e medicinal (LEMOS, 2009; PAULI, 2010). Os cogumelos são alimentos saudáveis, com baixo valor calórico, baixa concentração de gorduras, ricos em proteínas, e possuem todos os aminoácidos essenciais. Além de serem fonte de vitaminas, minerais e fibras alimentares (MANZI et al., 1999), ademais também possuem vários compostos biologicamente ativos, funcionais, como polissacarídeos, glicoproteínas e antioxidantes. Por isso, também são utilizados como fonte medicinal (NOVAES; FORTES, 2005).

Os polissacarídeos dos cogumelos têm se tornado bem conhecidos e amplamente utilizados em muitos países como parte da dieta e medicina tradicional chinesa, e nas últimas décadas têm sido intensificados as pesquisas para a inclusão e a utilização das suas propriedades medicinais em produtos farmacêuticos. Na verdade, algumas dessas substâncias, principalmente b-glucanas (Figura 1) ou polissacarídeos foram incluídas no mercado, em alguns países, como fitoterápico antitumoral e imunoestimulante (ISRAILIDES et al., 2008).

Figura 1- Estrutura de β-glucana e suas ligações.



Fonte: Zekovic et al. (2005)

De acordo com Angelo; Jorge (2007), o mecanismo de ação dos antioxidantes presentes em cogumelos comestíveis tem papel importante na redução da oxidação lipídica. Quando incorporados na alimentação, os antioxidantes não conservam somente a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias relacionadas à obesidade.

Os principais mecanismos envolvidos nos efeitos hipocolesterolêmicos dos cogumelos comestíveis são i) ácidos graxos dos cogumelos contribuem para reduzir o colesterol sérico; ii) a fibra alimentar pode afetar as concentrações de lipídeos pela formação de géis viscosos a partir de fibra solúvel, contribuindo na não absorção do colesterol e triglicerol; iii) aumento na excreção fecal de ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta, o que inibe a incorporação do acetato (substrato para a síntese de esteróis e ácidos graxos) aos lipídios séricos; iiii) presença de substâncias como

lentinacina, β-glucanas, que têm mostrado efeito hipocolesterolêmico (GUILLAMÓN et al., 2010).

O fato de muitas destas substâncias serem produzidas por cogumelos comestíveis os torna bons candidatos para a formulação de novos alimentos funcionais e nutracêuticos. Na dose correta, pode-se fazer uso dos cogumelos para ação imunomoduladora (ISRAILIDES et al., 2008), anticâncer (ROP et al., 2009), antiviral (RINCÃO et al., 2012), hipocolesterolêmico (ALAM et al., 2011; ZHU et al., 2013), hipoglicêmico (MIRCEA et al., 2013; FORTES et al., 2008) e outras propriedades promotoras de saúde (GIAVASIS, 2014).

2.3.1 *Lentinula edodes*

O *Lentinula edodes* (*L. edodes*) chegou ao Brasil há algumas décadas com os imigrantes japoneses. O mercado é promissor e cresce a nível nacional, porém é muito influenciado por questões culturais de alimentação. Por outro lado, apresenta incremento comercial devido ao seu uso medicinal (BETT; PERONDI, 2011). O *L. edodes*, popularmente conhecido como Shiitake, é o segundo cogumelo comestível mais cultivado no mundo, correspondendo a 25% da produção mundial, e assim, como todo cogumelo comestível, é um alimento completo do ponto de vista nutricional por possuir baixo teor lipídico, alto teor protéico e fonte de vitaminas e minerais (PAULI, 2010).

A utilização do *L. edodes* contribui para o enriquecimento nutricional e tem aumentado o interesse em alimentos que desempenham mais que a função puramente nutritiva, ou seja, apresentem também atividades funcionais. Estudo com ratos alimentados por 42 dias com dieta hipercolesterolêmica mostrou que a adição de 5% de *L. edodes* à dieta foi capaz de reduzir o colesterol total, o colesterol LDL e os triglicerídeos (YOON et al., 2011). A concentração de *L. edodes* utilizada por Yoon et al., entretanto, é uma concentração elevada, correspondendo a algo em torno 30 kg/habitante/ano, e não reflete um consumo real. Se considerar os chineses, população que mais consumia cogumelos no mundo em 2008, aproximadamente 10 kg de cogumelos/pessoa/ano (ZHANG et al., 2014).

As propriedades do extrato de *L. edodes* apresentados no trabalho de Israilides et al. (2008) sugeriram ação citotóxica com efeito antitumoral em células cancerígenas, agindo também como imunomodulador, estimulando diretamente a proliferação de timócitos.

Apesar da crescente demanda na ingestão de cogumelos no ocidente, o *L. edodes* é ainda um alimento que não é hábito alimentar do brasileiro. Assim, diante da problemática da obesidade e do cogumelo *L. edodes* como alimento funcional, fica evidente a necessidade de estudos que não apenas forneçam subsídios para a inserção dos cogumelos na dieta dos brasileiros, mas estudos que determinem qual a quantidade ideal de consumo humano para obtenção de resultado benéfico à saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos terapêuticos nutricionais da ingestão de quantidades ideais ao real consumo humano de cogumelos *L. edodes* em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

3.2 Específicos

- Determinar a composição centesimal do *L. edodes*.
- Determinar os efeitos da ingestão do cogumelo *L. edodes* sobre os parâmetros hematológicos - contagem total de leucócitos e eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina globular média e plaquetas em ratos alimentados com ração hiperlipídica.
- Determinar os efeitos da ingestão do cogumelo *L. edodes* sobre os parâmetros bioquímicos – glicose, triglicerídeos, colesterol (total e frações), frutosamina, ɣ-glutamil transferase, transaminases, creatinina e ureia em ratos alimentados com ração hiperlipídica.
- Determinar os efeitos da ingestão do cogumelo *L. edodes* sobre os parâmetros do estresse oxidativo - glutationa reduzida, glutationa peroxidase, catalase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em ratos alimentados com ração hiperlipídica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Éter etílico, ácido sulfúrico, sulfato de cobre e potássio, ácido bórico, ácido clorídrico (HCl), ácido acético, ácido nítrico, ácido tricloroacético (TCA), álcool etílico, hidróxido de potássio (KOH), tampão acetato de sódio (TAS), Triton X-100, tampão fosfato de potássio (TFK), 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase (GR), fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), azida sódica, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), exo-β-1,3-glucanase, β-glicosidase, glucose-oxidase/peroxidase, amiloglicosidase e invertase, hidróxido de sódio (NaOH), malondialdeído (MDA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido fosfórico (H_3PO_4), dodecil sulfato de sódio (SDS).

4.2 Tratamento dos animais

Esta pesquisa foi apresentado à Comissão de ética no uso de animais (CEUA) para análise, segundo a Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e foi aprovado com o Protocolo nº 008/2012 no Anexo A.

A dose utilizada de *L. edodes* (100 mg/kg) foi baseada em estudos prévios do grupo de pesquisa (GROTTO et al., 2015), que utilizaram doses de 100, 400 e 800 mg/kg para determinar o grau de toxicidade associado à dieta hiperlipídica, composta por 60% de lipídeos, e dieta controle com 10% de lipídeos. Para manter a mesma porcentagem de proteína nos grupos, foi necessário ajustes das porcentagens de amido de milho e caseína conforme Fraulob et al., 2010. As rações foram adquiridas comercialmente da empresa Rhoster, especializada no desenvolvimento de produtos para pesquisa, e os constituintes de cada uma delas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético da dieta controle e da dieta com alto teor de lipídeo.

Componentes (g/kg)	Dieta Controle	Dieta Hiperlipídica
Caseína	140	190
Amido de milho	620,7	250,7
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	-	320
Fibras	50	50
Vitaminas totais	10	10
Sais minerais	35	35
L-Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Carboidratos (%)	76	26
Proteínas (%)	14	14
Lipídeos (%)	10	60

Fonte: FRAULOB et al., (2010).

Foram utilizados 18 ratos machos Wistar, com 45 ± 3 dias, peso médio de 153 (g) divididos em 3 grupos (n = 6 animais por grupo).

GRUPO 1: controle, recebendo ração habitual;

GRUPO 2: ração hiperlipídica;

GRUPO 3: ração hiperlipídica e *L. edodes* 100 mg/kg, via gavagem.

Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox-Uniso) e alocados individualmente em gaiolas metabólicas por 7 dias para adaptação mais 30 dias para controle do consumo de água e ração e coleta de urina. A sala onde os animais estavam alocados tinha temperatura controlada (21 ± 2˚C), ciclo de 12 horas claro/escuro, e sistema de trocas de ar. Os animais receberam água filtrada e as respectivas rações *ad libitum* por 30 dias.

A gavagem era dada sempre no mesmo horário (entre 13h00min e 14h00min). Aos animais do grupo 1 e 2, uma dose de água (2 mL) era administrada via gavagem para manter semelhante o nível de estresse nos ratos.

Para todos os amimais, a ingestão de ração e de água foi aferida diariamente e individualmente, por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras. A urina foi também coletada para análises de glicose e microalbuminúria. Os ratos foram pesados e medidos (medida naso-anal) semanalmente. A raiz cúbica da massa corpórea foi dividida pelo comprimento naso-anal e multiplicado por 10 para o cálculo

de Índice de Lee (BERNARDIS; PATTERSON, 1968), preditor da obesidade para roedores, pois equivale ao IMC obtido para humanos (ARAÚJO et al., 2009).

Ao final do experimento, os ratos foram eutanasiados com sobredose de uma mistura do anestésico cetamina (100mg/kg) e do relaxante muscular xilasina (6mg/kg). O sangue (cerca de 5 mL) foi coletado por punção venosa hepática da veia porta e dividido em tubos com anticoagulante EDTA e tubos sem anticoagulante, para separação de plasma e soro, respectivamente. Parte do sangue com EDTA foi aliquotado para posteriores análises e parte foi centrifugado. Todas as amostras foram armazenados em biofreezer a - 80ºC para posterior análise.

4.3 Processamento do *L. edodes*

Os cogumelos *L. edodes* foram fornecidos pela Empresa Yuri Cogumelos localizada em Sorocaba (São Paulo - Brasil). Considerando que o *L. edodes* possui alto teor de proteínas e fibras, estes compostos seriam perdidos com a produção de um extrato. Assim, optou-se pela confecção de uma farinha do cogumelo, assim como ocorre com outros alimentos funcionais (chia, aveia, linhaça). Para tanto, as amostras de cogumelo *in natura* foram picadas, desidratadas em estufa com circulação e renovação de ar quente (38 ± 2ºC). O material seco foi submetido à moagem em moinho de facas e martelos e tamizado até obtenção de pó fino e homogêneo. Este pó foi diluído em água filtrada e administrado por gavagem aos animais.

4.4 Composição Nutricional do *L. edodes*

Foi determinada a composição centesimal do *L. edodes* com a somatória de porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e por diferença de 100%, os teores de carboidratos.

Para verificação da umidade, cinco amostras de 4g foram pesadas em cadinho de porcelana previamente tarados, e foram secas a 105ºC até peso constante. Para determinar as cinzas, 3g da amostra foram carbonizadas em bico de Bunsen, em seguida as amostras foram incineradas em Mufla (Quimis Enila) a 550ºC por aproximadamente seis horas, até que restasse somente pó branco.

O método utilizado para determinação quantitativa de lipídeos seguiu-se utilizando solvente éter etílico e o equipamento extrator de Soxhlet (Tecnal modelo TE-044). Os reboilers do Soxhlet foram colocados em estufa a 105°C por uma hora para secagem, após resfriados em dessecador, foram pesados e anotados os pesos.

Em triplicata 3g da amostra foram pesadas no cartucho com proteção de algodão, já tarados. O mesmo foi inserido dentro da cesta de metal e conectado ao tubo de ebulição. Aos reboilers preparados conforme descrito acima, foram adicionados 100 ml do reagente éter etílico, ou até que encobrisse as amostras, que ficou em movimento no extrator de lipídios a 80ºC por seis horas (ARAÚJO et al., 2013). Os frascos de Soxhlet contendo os lipídios ficaram na capela com fluxo de ar por um dia, em seguida foram levados para a estufa a 105°C por uma hora, para total evaporação da umidade presente nos lipídios. Na sequência foram resfriados em dessecador por uma hora e pesados para obtenção do teor de lipídios (ARAÚJO et al., 2013).

As proteínas foram quantificadas utilizando o método micro Kjeldahl Te-036/1 segundo Zhou et al. (2015) com algumas alterações, que consiste em três fases: digestão, destilação e a titulação. A digestão baseia-se no aquecimento e oxidação de aproximadamente 70 mg da amostra (matéria orgânica) à 390ºC com ácido sulfúrico, sulfato de cobre e potássio, por aproximadamente seis horas, ou até que o carbono e hidrogênio sejam totalmente oxidados. No destilador o nitrogênio da proteína, por reação do hidróxido de sódio, foi reduzido e transformado em sulfato de amônia. Em contato com ácido bórico e vermelho de metila, o sulfato de amônia forma borato de amônia, titulado com ácido clorídrico. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se a medida utilizada da solução de ácido clorídrico, pela normalidade e fator de correção do ácido clorídrico, multiplicando pelo fator de conversão do nitrogênio em proteína (6,25) e dividido pelo peso da amostra utilizada.

A composição centesimal do *L. edodes* foi determinada somando-se a umidade, cinzas, lipídios, proteínas, e carboidratos por diferença de 100% (PINELA et al., 2012).

A quantificação de fibras foi feita utilizando a metodologia de Mccleary et al. 2010. A amostra foi desengordurada seguindo o mesmo método para quantificar lipídeos. Após a amostra seca, passou por digestão em balão de 500 ml e equipamento de refluxo com ácido acético glacial, ácido nítrico, ácido tricloroacético e areia diatomácea em aquecimento por 40 minutos. A amostra foi filtrada a vácuo, lavada com água fervente até a neutralização do pH, para em seguida, ser lavada com álcool e éter. Posteriormente, a amostra foi seca e pesada, em seguida foi incinerada a 550ºC até sobrar cinzas. A diferença entre o peso inicial da amostra e o peso das cinzas são as fibras totais (ORSI, 2011).

A determinação de glucanas totais foi realizada, com auxílio de kit comercial Yeast & Mushroom - Megazyme®. Para isso 100 mg de amostra de *L. edodes* e 1,5 ml de HCl 37% foram incubados por 45 min. a 30ºC. Em seguida, O volume foi ajustado para 10 ml, com água deionizada e incubado por mais 2 horas. Após, 10 ml de KOH 2M foram adicionados e o conteúdo foi avolumado para 100 ml com TAS 200 mM pH 5,0 e centrifugado a 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante (0,1 ml) foi misturado à 0,1 ml da solução exo-β-1,3-glucanase e β-glicosidase e incubado a 40ºC por 60 min. Após, 1,5 ml de glucose-oxidase/peroxidase foram adicionados e incubado por mais 20 min. a 40ºC. A absorbância foi lida a 510 nm.

Para as α-glucanas, adicionou-se 2 ml de KOH 2M à 100 mg da amostra. Após 20 minutos de agitação, adicionou-se 0,2 ml de amiloglicosidase e invertase, incubado a 40ºC por 30 min. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 min. A um volume de 0,1 ml do sobrenadante foi adicionado 0,1 ml de TAS e 3,0 ml de reagente enzimático e incubado por 20 min. a 40ºC. A absorbância foi medida a 510 nm em espectrofotômetro. Para a quantificação de β-glucana, foi feito uma subtração de α-glucana da glucana total.

4.5 Parâmetros hematológicos

Para as análises hematológicas, foi utilizado o equipamento automatizado Sysmex Xs 1000i-Roche®. Os parâmetros analisados foram: Contagem total de Leucócitos (WBC), Contagem Total de Eritrócitos (RBC), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (HTC), Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração de Hemoglobina Globular Média (MCHC) e número de plaquetas (PLQ).

4.6 Parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram feitas no soro dos ratos expostos e controle, utilizando kits comerciais. Os parâmetros analisados em soro foram glicose, triglicerídeos, colesterol (total e frações), frutosamina, enzimas hepáticas que fazem parte das provas de função hepática - aspartato Aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e ɣ-glutamil transferase (ɣ-GT) - além de ureia e creatinina, que fazem parte da função renal. Os testes bioquímicos seguem as especificações do fabricante, conforme metodologias abaixo.

Para o teste de glicemia, a glicose foi oxidada pela glicose oxidase, produzindo ácido glucônico e H_2O_2, sendo este último associado oxidativamente ao 4-amino-antipireno e ao fenol na presença de peroxidase, produzindo a quinoeimina, de coloração vermelha, medida a absorbância em 505 nm em espectrofotômetro (Lambda 35, PerkinElmer).

Os triglicerídeos do soro foram hidrolisados a glicerol e ácido graxos livres, pela lipoproteína lipase. Na presença de adenosina trifosfato (ATP) e glicerol quinase. O glicerol foi fosforilado a glicerol-3-fosfato, o qual foi oxidado a acetona dihidrogênio fosfato e H_2O_2 pela enzima glicerol fosfato oxidase. O H_2O_2, 4-aminoantipirina e p-clorofenol sofreu o mesmo processo de reação reportado acima, pela peroxidase, em banho-maria 37ºC por 10 minutos até formação de coloração vermelha. A absorbância foi lida em 500 nm. Foi utilizado o kit comercial Triglicérides Monoreagente K117, Bioclin®.

Para o procedimento de ésteres de colesterol utilizou-se 10 µL de amostra e 1,0 mL do reagente enzimático em temperatura de 37ºC por 10 minutos, que por meio da enzima lipoproteína lipase se transformou em colesterol livre. A reação subsequente envolveu a oxidação de colesterol livre em colesterol-3-ona e H_2O_2, pela enzima colesterol oxidase. E com a ação da peroxidase no fenol com 4-aminoantipirina formou um cromógeno cereja, sendo a coloração proporcional à concentração de colesterol. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 500 nm e para a análise foi utilizado o kit comercial colesterol monoreagente K083, Bioclin®.

Para a determinação da Lipoproteína de alta densidade (HDL), o soro foi tratado com ácido fosfotungstato e cloreto de magnésio, assim a Lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foram precipitadas, e após a centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm, a fração HDL permaneceu dissolvida no sobrenadante e a análise prosseguiu conforme a análise de colesterol. A cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra. Foi utilizado na análise o kit Colesterol enzimático InVitro®. O LDL foi calculado subtraindo a concentração do colesterol HDL do colesterol total. Já o VLDL foi calculado pela fórmula de Friedewald, dividindo a concentração de triglicérides por cinco (FRIEDEWALD et al., 1972).

As frutosaminas agem no sangue como "memória glicêmica", ou seja, a concentração de frutosamina representa o índice da variação na concentração da glicose sanguínea durante as duas ou três semanas prévias à coleta de sangue. O

método baseia-se na propriedade do grupo cetoamino das proteínas glicosiladas de reduzir o sal de tetrazólio a formazan, que foi medido colorimetricamente a 530 nm. A velocidade de formação do formazan é diretamente proporcional à concentração de frutosamina na amostra. Foi utilizado para a determinação de frutosamina o kit comercial Fructosamina AA da Wiener lab.®. Para a realização dos procedimentos e dosagens foram seguidas as recomendações do fabricante. As absorbâncias foram lidas nos tempos de reação de 10 e 15 minutos, em espectrofotômetro, em comprimento de onda a 530 nm.

Para a análise das transaminases AST e ALT, ureia e creatinina foi utilizado o equipamento automatizado COBAS C111 Roche®. Para ambas, o consumo de NADH foi avaliado por absorbância em espectrofotometria a 340 nm.

A enzima ɣ-GT, a L-ɣ-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, é catalisada a L-ɣ--glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitrobenzoato. A velocidade de formação do composto 5-amino-2-nitrobenzoato é diretamente proporcional à atividade da ɣ-GT na amostra, que é lida a 405 nm.

Foram analisadas glicose e microalbuminúria nas amostras de urina. Concentrações elevadas de glicose, a capacidade de reabsorção tubular é ultrapassada, surgindo a glicosúria. A dosagem de glicosúria foi realizada por kit comercial como descrito anteriormente na dosagem de glicose sérica.

A dosagem de microalbuminúria é importante para verificar início de nefropatia diabética, que é acompanhada por danos irreversíveis do rim e proteinúria persistente. Quando a diabetes progride para a doença renal, há excreção de pequenas quantidades de albumina (microalbuminúria) na urina. Portanto, detecção de albumina na urina é uma ferramenta importante para o reconhecimento de danos renais (glomerular) quando esses são mínimos e reversíveis (BANDELA et al., 2013).

Para sua dosagem foi utilizado kit comercial, seguindo método turbidimétrico quantitativo (Microalbumin, InVitro®). A pipetagem e a leitura espectrofotométricas foram divididas em duas etapas, primeiro 900 µL de reagente tampão e 60 µL de amostra a 37 ºC, após 5 minutos foi inserido e homogeinezado mais 150 µL de reagente antisoro, a albumina da amostra reagiu com o anti-albumina presente no reagente e a aglutinação provocou aumento da absorbância, lida em espectrofotômetro a 340 nm, proporcional à concentração de albumina da amostra.

4.7 Parâmetros do estresse oxidativo

Foram analisadas glutationa reduzida (GSH), enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e o biomarcador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme segue abaixo.

A determinação da GSH foi por quantificação dos tióis totais, e foi realizado por espectrometria UV-VIS, baseado no método de Ellman (1959). Para isso, 150 µL do sangue, mantido em banho de gelo, foi submetido ao vórtex com 100 µl de Triton X-100 a 10% e 100 µL de TCA a 30% por 20 segundos, para homogeneização. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm, em temperatura de 4ºC, para separar os sobrenadantes. Em 900µL de TFK, 50 µL da amostra (sobrenadante límpido), 50 µL de DTNB 10 mM foram adicionados, formando um complexo amarelo. A leitura foi feita em seguida, em comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em mM de glutationa. Foi feita curva de calibração com concentrações de 0,005; 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1 mM.

A atividade da enzima antioxidante GSH-Px foi determinada em sangue total, baseada na oxidação do NADPH. O sangue foi diluído 40 vezes em tampão fosfato de potássio com EDTA, pH 7,0. Após, 20 µL da amostra diluída foi acrescentada em 880 µL de uma solução contendo: glutationa reduzida, glutationa redutase, NADPH, azida sódica e 100 µL de H_2O_2. A atividade da GSH-Px foi monitorada em espectrofotômetro por dois minutos, a 340 nm, de acordo com a metodologia de Paglia e Valentine (PAGLIA; VALENTINE, 1967). Pela medida do decaimento da absorbância do NADPH foi possível determinar a atividade da GSH-Px, uma vez que ela é proporcional ao consumo de NADPH. Os dados foram expressos em nmol NADPH/min/mL de Hb.

A atividade da enzima CAT foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS, utilizando método de Aebi (1984). O método fundamentou-se na decomposição do H_2O_2 pela catalase ao longo do tempo, monitorada a 240 nm. Para tanto, o sangue foi diluído 60 vezes em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. Uma alíquota de 20 µL foi misturada a 1910 µL do mesmo tampão e 70 µL de H_2O_2 foram adicionados, dando início à reação. As mudanças na absorbância foram monitoradas por cinco minutos. Os resultados foram expressos em k/gHb/min.

A concentração de TBARS foi utilizado como biomarcador da peroxidação lipídica, por ser considerado o método mais comumente utilizado de acordo com estudo de Ohkawa et al. (1979). Alíquotas de plasma foram acondicionadas em microtubos e a elas adicionou-se 50 µL de NaOH 3N e 50 µL de água ultrapura Milli-

Q (Direct 8, Millipore®) e colocadas em banho (Water Bath 1102, Fanem®) a 60 ºC por trinta minutos com agitação, para hidrólise. Foram acrescentadas às amostras 250 µL de H_3PO_4 6%, 250 µL de TBA 0,8% e 100 µL de SDS 10%, e levado ao banho 95 ºC por uma hora. O MDA reage com o TBA em meio ácido e, após fervura, apresenta uma coloração rosa, lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm. Para o cálculo da concentração em plasma foi utilizado uma curva de calibração com concentrações pré-definidas de MDA (0,28; 0,56; 1,7; 3,4; 6,6 µM).

4.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Foi utilizada a análise de variância de fator único, seguida do teste estatísticos de Ducan, em que valores de $p<0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas Statistica® 8.0 e GraphPad Prism® 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pesos e medidas

Semanalmente foram realizadas pesagem e medição naso-anal nos três grupos de ratos em tratamento. Além disso, baseado na massa corpórea e comprimento, calculou-se o Índice de Lee, preditor de obesidade em ratos. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de massa corpórea (g), comprimento naso-anal (cm) e Índice de Lee dos ratos ao longo dos respectivos tratamentos. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão.

	Controle	**Dieta hiperlipídica (DH)**	**DH + *L. edodes***
		Semana 1	
Massa corpórea (g)	202 ± 28	233 ± 14	228 ± 23
Medida (cm)	18,8 ± 0,8	18,8 ± 0,8	19,5 ± 1,0
Índice de Lee	3,11 ± 0,09	3,17 ± 0,13	3,13 ± 0,11
		Semana 2	
Massa corpórea (g)	251 ± 26	270 ± 15	270 ± 6
Medida (cm)	19,5 ± 0,5	19,7 ± 0,5	19,8 ± 1,0
Índice de Lee	3,23 ± 14	3,29 ± 15	3,26 ± 0,16
		Semana 3	
Massa corpórea (g)	290 ± 31	306 ± 18	311 ± 8
Medida (cm)	20,5 ± 0,5	20,2 ± 0,4	20,5 ± 0,5
Índice de Lee	3,23 ± 0,12	3,34 ± 0,10	3,28 ± 0,10
		Semana 4	
Massa corpórea (g)	314 ± 33	346 ± 21	350 ± 9
Medida (cm)	20,8 ± 0,4	21,0 ± 0,6	21,2 ± 0,4
Índice de Lee	3,26 ± 0,09	3,35 ± 14	3,33 ± 0,06
		Semana 5	
Massa corpórea (g)	341 ± 40	372 ± 24	378 ± 11
Medida (cm)	21,0 ± 0	21,3 ± 0,5	21,5 ± 0,5
Índice de Lee	3,32 ± 0,13	3,4 ± 0,09	3,36 ± 0,7

Fonte: elaboração própria.

A dieta hiperlipídica administrada aos grupos 2 e 3 induziu um pequeno aumento na massa corpórea destes animais em relação ao grupo controle. Resultado semelhante ocorreu em relação às medidas de crescimento. Entretanto, essa

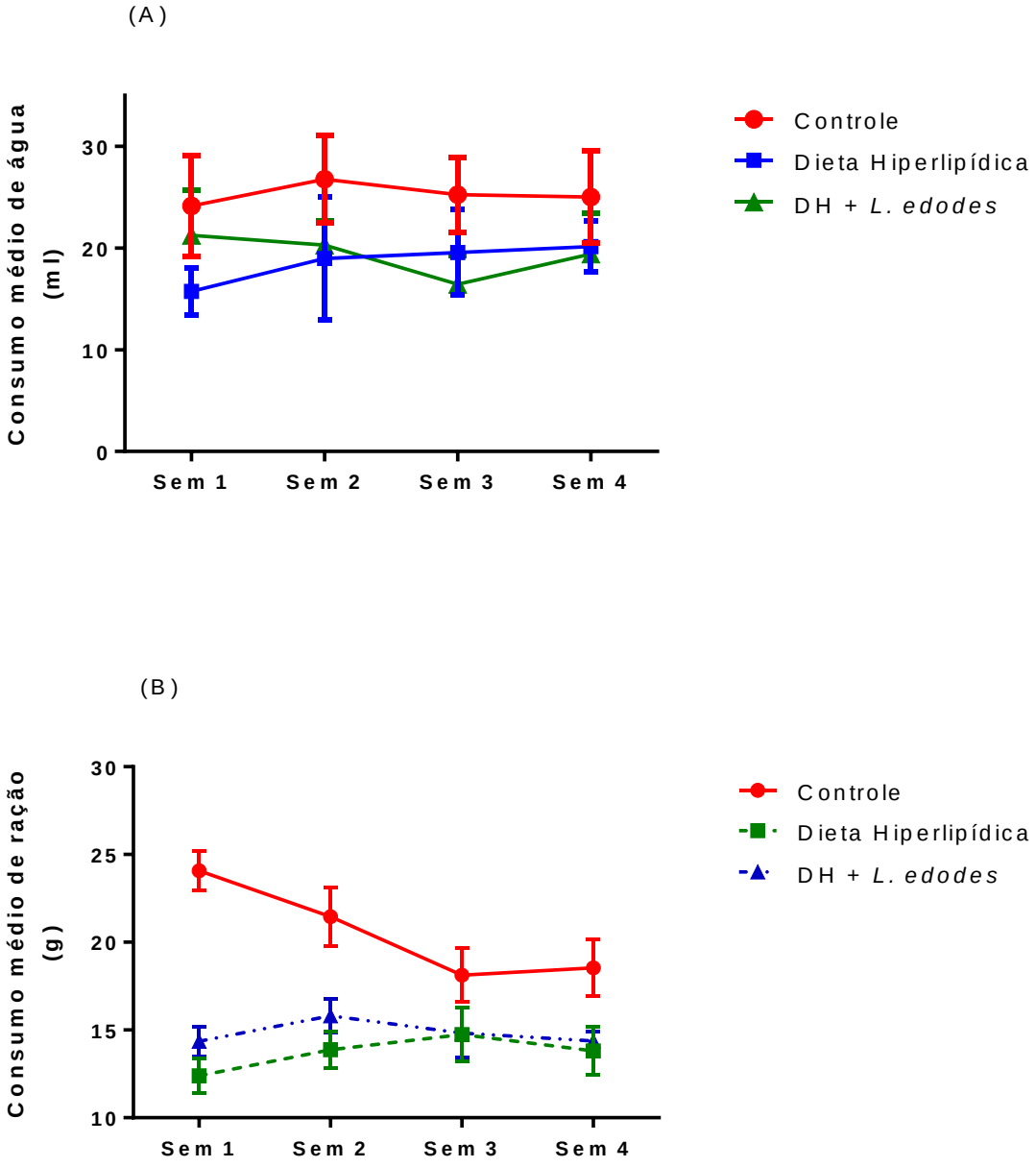
desigualdade, em números absolutos, não apresenta diferença estatística. Assim, o estudo não foi baseado em sobrepeso, mas em desordens metabólicas.

Handayani et al. (2011) em estudo com ratos também alimentados com dieta hiperlipídica (50%) avaliaram os efeitos da ingestão de *L. edodes* em pó, porém em doses muito maiores (7g/kg, 20g/kg e 60g/kg/dia, por 6 semanas), que aquelas utilizadas nesse estudo. Os autores idenficaram que o grupo de ratos que recebeu maior concentração de *L. edodes* (60g/kg) mostrou ação positiva no controle de peso, evitando o aumento de gordura abdominal, porém apresentou concentração de gordura hepática extremamente elevada**,** mesmo considerando que o grupo ingeriu a maior dose de *L. edodes*. Nesse estudo, não houve influência do *L. edodes* na massa corpórea dos animais muito provavelmente pela baixa concentração administrada, lembrando, entretanto, que apesar de baixa essa é a dose condizente ao consumo humano.

Monteiro et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato de *L. edodes*, em 40 ratos com obesidade induzida, por 4 semanas. Por mais trinta dias os grupos de animais receberam 5% e 10% do cogumelo. Os tratamentos com os extratos induziram redução significativa na massa corporal comparado ao controle. Yoon et al. (2011) administraram dieta contendo 5% *L. edodes* por 42 dias em ratos com hipercolesterolemia induzida. Além de reverter o quadro de colesterolemia e trigliceridemia, o *L. edodes* também reduziu significativamente a massa corporal dos animais.

O consumo de água e de ração foi aferido diariamente, porém, para melhor entendimento, os dados foram agrupados por semana. Os resultados encontram-se na Figura 1A e 1B, representando, respectivamente, o consumo médio de água e o consumo médio de alimento. Apesar de o grupo controle ter aparentemente maior consumo tanto de água bem como de ração, estas diferenças não foram significativas. Assim, tanto dieta hiperlipídica quanto cogumelo *L. edodes* não induziram aumento ou diminuição na procura por água ou alimento.

Figura 2- Média do consumo de água dos ratos Controle, Dieta Hiperlipídica (DH) e Dieta Hiperlipídica + *L. edodes* (100 mg/kg) durante tratamento. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão.



Fonte: elaboração própria.

5.2 Artigo científico

Os demais resultados obtidos nesse estudo e a discussão dessa dissertação estão apresentados no formato de artigo científico, seguindo as “Orientações para apresentação de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências

Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba". Assim, as seções Resultados e Discussão encontram-se agrupadas no artigo científico, redigido na língua inglesa.

O artigo foi submetido à revista "European Journal of Nutrition" e encontra-se no formato definido pela revista (Anexo C). Dessa forma, as referências também se encontram no padrão da revista.

Sara Rosicler Vieira Spim[1]; Bruna Giovanna Corrêa Chrispim de Oliveira[1]; Fernanda Gomes Leite[1]; Marli Gerenutti[1], Denise Grotto[1]*

Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, haematological and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet

[1]University of Sorocaba, Laboratory of Toxicological Research - Lapetox, Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5, Zip Code 18023-000. Sorocaba, São Paulo State, Brazil.

*Corresponding author
denise.grotto@prof.uniso.br
Phone: +55 1521017147
Fax: +55 15 21017000

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful for financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2013/05765-5) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-01.10.0659.00), and for fellowship of Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP/CAPES). We also thank Thaisa Borim Pickler for technical support.

Abstract

Purpose Functional foods can prevent/reduce the risks related to obesity. *Lentinula edodes* is a highly nutritious mushroom rich in protein, vitamins and minerals. Some studies have demonstrated the hypocholesterolemic effects from *L. edodes* in high doses, which does not represent the consumption in humans. We evaluated ingestion of a realistic dose of *L. edodes* associated with a high-fat diet (HFD) on hematologic, biochemical and oxidative-stress parameters.

Methods Eighteen male Wistar rats were divided into three groups: control (normal diet); HFD; and HFD + *L. edodes* (100 mg/kg/day). After 30 days, blood was collected. Biochemical and hematologic parameters were analyzed, as well as oxidative-stress biomarkers.

Results The HFD increased levels of total cholesterol and triglycerides. *L. edodes* reduced these parameters significantly to concentrations found in the control group. The HFD increased levels of alanine transaminase and aspartate transaminase (markers of liver damage). *L. edodes* returned the levels of these enzymes to normal levels, and normalized serum levels of urea (which were also increased owing to consumption of the HFD). *L. edodes* reduced levels of urea and glucose. Lipid peroxidation was increased in rats receiving the HFD, and *L. edodes* reduced malondialdehyde levels, thereby preventing oxidation of fatty acids.

Conclusions L. edodes was shown to have hypolipidemic, hypoglycemic, hepatoprotective and renoprotective features in doses that are suitable for humans.

Keywords: Nutraceuticals, *Lentinula edodes*, metabolic disorder, oxidative stress, glucans.

INTRODUCTION

Obesity is a major public-health problem worldwide. Environmental and genetic factors have important roles in obesity, but inappropriate eating habits and sedentary lifestyles also contribute [1]. Cavalheira *et al*. [2] stated that excessive ingestion of food and, consequently, storage of carbohydrate and fat, results in metabolic dysfunction, which activates innate and adaptive inflammation in adipose tissue. The inflammatory reaction promotes the resistance to insulin and metabolic diseases caused by obesity [3].

Hutcheson and Rocic [4] have hypothesized that the metabolic syndrome is associated with oxidative stress, which is a risk factor for the development of cardiovascular diseases. They have suggested that antioxidants can be useful for the treatment and prevention of cardiovascular diseases in patients with the metabolic syndrome.

Several resources have been used for the prevention and treatment of obesity and related diseases, including “nutraceuticals” [2]. For example, mushrooms have been used as food for thousands of years, and have nutritional and medical properties [5,6]. *Lentinula edodes* is a mushroom low in calories and lipids yet rich in proteins, vitamins, minerals, and fibers [7,8,9].

β-Glucans are polysaccharides found in the cellular walls of *L. edodes.* They are bioactive compounds that can activate leukocytes, stimulate the immune system to produce inflammatory mediators, and have anticarcinogenic activity [10]. β-Glucans can also participate in lipid metabolism to reduce levels of total cholesterol and reduce body weight [11].

L. edodes also contains glycoproteins as well as compounds with antioxidant [12], antitumor [13] and antibiotic activities [14,15]. *L. edodes* has antiviral [16], antihypertensive [17], antihypercholesterolemic [18,19], hypoglycemic [20,21] and antithrombotic activities [17,18]. However, many of the studies mentioned were carried out *in vitro* or with high concentrations of *L. edodes*, which does not correspond with human consumption.

We wished to evaluate the effects of ingestion of *L. edodes* under biochemical, hematologic and oxidative-stress parameters in rats receiving a high-fat diet (HFD).

MATERIALS AND METHODS

Reagents and solutions

Ethyl ether, sulfuric acid, cooper sulfate and potassium, boric acid, hydrochloric acid (HCl), acetic acid, nitric acid, trichloroacetic acid (TCA), ethylic acid, potassium hydroxide (KOH), sodium acetate buffer (SAB), Triton X-100, potassium phosphate buffer (TFK), 5-5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), sodium azide, hydrogen peroxide, exo-β-1,3-glucanase, β-glycosidase, glucose-oxidase/peroxidase, amiloglycosides and invertase, sodium hydroxide (NaOH), malondialdehyde (MDA), thiobarbituric acid (TBA), phosphoric acid (H_3PO_4), sodium dodecyl sulfate (SDS).

Ethical approval of the study protocol

The study protocol was approved by the Commission of Ethics in the Usage of Animals of the University of Sorocaba (approval number 008/2012; São Paulo, Brazil).

Preparation of *L. edodes*

L. edodes (Berk.) Pegler-cultivated strain H600 (Hokken, Shimotsuga-gun, Japan) was provided by the commercial company Yuri Cogumelos (São Paulo, Brazil). Fresh samples of *L. edodes* were sliced and dehydrated in a greenhouse at 38±2°C. Material was ground in a mill to obtain a fine, homogeneous powder and then diluted in water.

To verify humidity, samples (4 g) were dried at 105°C until they reached constant weight. To obtain ashes, 3 g of the sample was carbonized and incinerated at 550°C. For extraction of lipids, ethyl ether was employed for 6 h [22].

Nutritional Composition of *L. edodes*

Proteins were quantified using a nitrogen distiller following the method of Zhou *et al.* [23] with some alterations. This method comprised three phases: digestion, distillation and titration. Digestion was based on oxidation of 70 mg of sample at 390°C with sulfuric acid, cooper sulfate and potassium. In the distiller, the nitrogen in proteins was reduced to ammonium sulfate. Upon contact with boric acid, the ammonium sulfate forms ammonium borate, with release of HCl. Centesimal composition of *L. edodes* was determined by summating the humidity, ashes, lipids, proteins, and carbohydrates [24].

Fibers were quantified following the method of Mccleary *et al.* [25]. Dry defatted samples were digested with glacial acetic acid, nitric acid and trichloroacetic acid with heating for 40 min. Samples were filtered, desiccated, weighed, and washed with boiling

water until pH neutralization. Then, samples were washed (alcohol and ether), dried and incinerated at 550°C until ashes were obtained. The difference between the initial weight of the sample and the weight of the ashes was the quantity of total fibers.

Total glucans were determined using a β-Glucan Assay kit (Yeast & Mushroom; Megazyme, Bray, Eire). Briefly, *L. edodes* (100 mg) and 1.5 mL of 37% HCl were incubated for 45 min at 30°C. Volume was adjusted to 10 mL with deionized water followed by incubation for 2 h. Then, 10 mL of KOH (2 M) was added and sample volume adjusted to 100 mL with SAB (200 mM, pH 5.0). The solution was centrifuged at 1,500 *g* for 10 min at room temperature. The supernatant (0.1 mL) was mixed with 0.1 mL of exo-β-1,3-glucanase and β-glycosidase and incubated for 60 min at 40°C. Then, 1.5 mL of glucose-oxidase/peroxidase was added followed by incubation for 20 min at 40°C. Absorbance was measured at 510 nm against a blank reagent.

For α-glucans, 0.2 mL of KOH (2 M) was added to 100 mg of sample. After 20 min of agitation, 0.2 mL of aminoglycosides and invertase were added, and incubated for 30 min at 40 °C. Tubes were centrifuged at 1,500 *g* 10 min at room temperature. To 0.1 mL of supernatant was added 0.1 mL of SAB and 0.3 mL of enzymatic reagent and incubated for 20 min at 40°C. Absorbance was measured at 510 nm. α-Glucans were subtracted from total glucans for quantification of β-glucans.

Animal experiments

The dose of *L. edodes* (100 mg/kg) was chosen based on a study from our research team [26]. A HFD (60% of lipids) [27] and control diet (10% lipids) was used (Table 1).

Male Wistar rats (45±3 days) were obtained from Anilab (São Paulo, Brazil). They were maintained individually in cages at the Laboratory of Toxicological Research at a controlled temperature (21±2°C), humidity (50±5%) and lighting (12-h light–dark cycle). Standard rat chow and filtered tap water were provided *ad libitum.* Eighteen rats were allocated randomly (random number table generated by computer) into three groups of six: control (standard diet); HFD (60% lipids); HFD + *L. edodes* (100 mg/kg). Administration of *L. edodes* was by oral gavage at <3 mL/kg body weight. Mushroom powder was reconstituted in water every day. Rats were treated for 30 days. Rats were weighed every week. At study end, rats were killed with an overdose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg). Blood was collected and stored at −80°C.

Hematologic parameters

Hematologic parameters were measured using a Sysmex XS 1000i™ Hematology Analyzer (Roche, Basel, Switzerland). Parameters were: white blood cells (WBCs) or leukocytes; red blood cells (RBCs) or erythrocytes; hemoglobin (Hb); hematocrit; mean corpuscular volume; mean corpuscular hemoglobin; mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); platelets.

Biochemical profile

Levels of glucose, triglycerides, cholesterol (total and fractions), fructosamine, and gamma-glutamyl transferase (γ-GT) were evaluated using commercial kits according to manufacturer (Bioclin (Pretoria, South Africa), inVitro (Placentia, CA, USA), Wiener Laboratorios (Buenos Aires, Argentina) instructions. Analyses were undertaken on a spectrophotometer (Lambda 35; PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Hepatic enzymes aspartate (aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)) and renal biomarkers (urea, creatinine) were analyzed on automated equipment (Cobas C111; Roche).

Oxidative stress

Determination of reduced glutathione (GSH) levels was based on quantification of total reduced thiols following the method of Ellman [28]. Briefly, 150 µL of blood maintained in an ice bath was vortex-mixed with 100 µL of 10% Triton X100 (10%) and 100 µL of 30% trichloroacetic acid. The solution was centrifuged at 4,000 *g* for 10 min at 4°C. In the cuvette, 900 µL of trifluoromethyl ketone (TFK; 1 M), 50 µL of the supernatant, and 50 µL of 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (10 mM) were pipetted and formed a yellow complex. Absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer. To calculate the GSH concentration, a calibration curve with predefined concentrations of GSH (0.005, 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 mM) was employed.

Levels of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined based on the oxidation of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) following the method of Paglia and Valentine [29]. Blood was diluted (1:40) in TFK (pH 7.0). Then, 20 µL of the diluted sample was added to 880 µL of a solution containing GSH, glutathione reductase, NADPH, sodic azide and 100 µL of hydrogen peroxide (H_2O_2). GSH-Px level was monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 2 min.

Measurement of catalase levels followed the method of Aebi [30], which is based on H_2O_2 decomposition by catalase at 240 nm. Briefly, blood was diluted (1:60) in TFK 50 mM. An aliquot of 20 µL was mixed to 1910 µL of TFK, and 70 µL of H_2O_2 was added, thereby initiating a reaction that was monitored for 5 min. A constant of variation (k), which is related to Hb, was used to obtain a value for blood activity (k/g Hb).

Malondialdehyde (MDA) is an important product of lipid peroxidation [31]. Plasma aliquots (150 µL) were mixed with 50 µL of NaOH and 50 µL of Milli-Q Water™ (Millipore, Billerica, MA, USA). The mixture was incubated for 20 min at 60°C with agitation. Then, 6% H_3PO_4 (250 µL), 0.8% thiobarbituric acid (TBA; 250 µL) and 100 µL of 10% sodium dodecyl sulfate were added to samples, which were bathed for 1 h at 80°C. MDA reacted with TBA in acidic conditions to form a pink substance, the absorbance of which was read at 532 nm in a spectrophotometer. A calibration curve was used (predefined concentrations of 0.28, 0.56, 1.7, 3.4 and 6.6 µM) to calculate the concentration of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in plasma.

Statistical analyses

Data are the mean ± standard deviation. Results were analyzed using one-way analysis of variance followed by Duncan's test to identify differences among groups. A value of $p<0.05$ was considered significant. Results were analyzed using Statistica v8.0 (Dell, Round Rock, TX, USA) and GraphPad Prism v6.0 (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Nutritional composition of *L. edodes*

Nutritional composition of *L. edodes* was based on dry weight (with the exception of humidity analyses) and is shown in Table 2 (which also shows the nutritional composition of other mushroom types).

Body weight

Rat weights are presented in Figure 1. Besides lipid content, the HFD administered to the two treatment groups caused a significant increase in body weight just in weeks 3 and 4 compared to control ($p=0.03$ and $p=0.043$ in HFD; $p=0.023$ and $p=0.049$ in HFD + *L. edodes*, respectively). On the other hand, oral administration *L. edodes* (100 mg/kg)

for 30 days was not sufficient to reduce body weight compared to HFD group (p=0.68; 0.98; 0.67; 0.81; 0.97 in week 0, 1, 2, 3 and 4, respectively).

Hematologic parameters

Data for hematologic parameters are shown in Table 3. The group receiving a HFD + *L. edodes* displayed a significant increase in the number of WBCs compared with the control group (p = 0.026). The MCHC showed a significant (p=0.041) increase in the HFD group compared with the control group. Values for RBC and platelet counts, as well as those for hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, and mean corpuscular hemoglobin, did not show significant differences among the three groups. Hence, apart from WBC count, a HFD and co-exposure of *L. edodes* did not modify hematologic parameters.

Liver function

Rats receiving the HFD had a significant increase in levels of ALT (p=0.0001; p=0.0002) and AST (p=0.003; p=0.002) compared with the control group and HFD + *L. edodes* group, respectively (Fig. 2A). In animals who received *L. edodes*, the hepatic enzymes were preserved, without differences compared to control (p=0.61 to ALT; p=0.97 to ALT). There were no significant differences in γ-GT levels among groups when compared to control (p=0.53; p=0.09).

Kidney function

Urea levels were increased in the group receiving a HFD in comparison with the control group (p=0.047) (Fig. 2B). There was no significant difference in creatinine levels among the study groups (p=0.68; p=0.72, compared to control). Urinary glucose levels in the group receiving a HFD did not show a significant difference in comparison with the control group (p=0.73). Animals that consumed a HFD + *L. edodes* had reduced urinary glucose levels compared with the control group (p=0.044), suggesting that *L. edodes* has a hypoglycemic action.

Lipid profile

A significant increase in levels of total cholesterol (p=0.027) and triglycerides (p=0.042) were noted in the group receiving the HFD compared with that of the control group. In animals receiving a HFD + *L. edodes*, levels of cholesterol and triglycerides did not show a significant difference compared with those of the control group (p=0.59;

p=0.08, respectively), thereby suggesting a hypocholesterolemic action from *L. edodes* (Fig. 3A). Furthermore, *L. edodes* administration contributed to a reduction in the level of very-low-density lipoprotein (p=0.002 when compared to HFD group) and an increase in those of high-density lipoprotein (HDL) compared to control (p=0.01) and HFD group (p=0.03). These effects could be attributed to the high concentration of fibers and β-glucans in *L. edodes*.

Glycemic profile

The fructosamine concentration (Fig. 3B) was not significantly different among the three groups (p=0.27; 0.73, compared to control). The serum concentration of glucose (Fig. 3C) was reduced significantly in the HFD + *L. edodes* group compared with the HFD group (0.043). These findings suggested a hypoglycemic action arising from β-glucans.

Oxidative stress

The HFD increased TBARS levels significantly compared with those of the control group (p=0.02) and *L. edodes* group (p=0.006) (Fig. 4A). Nevertheless, the *L. edodes* group had decreased TBARS levels similar to those of the control group (p=0.45). No significant differences were observed among the groups with respect to catalase (Fig. 4B) (p>0.38), reduced GSH (Fig. 4C) (p>0.43) or GSH-Px (Fig. 4D) (p>0.11).

DISCUSSION

Our findings for the nutritional composition of *L. edodes* exhibited similarities and differences compared with those from other studies. Differences in the concentrations of macronutrients are dependent upon the location, substrate, weather, crop conditions, phase of growing, and harvest of mushrooms [35]. Díez and Alvarez [36] found a high concentration of fibers (45% in dry weight) in wild mushrooms. Reis *et al.* [33] found lower concentrations of ashes, proteins and carbohydrates, but they used fresh samples. When we compared the findings from the study by Regula and Siwulski [8] with our data, a close similarity was noted.

We found high concentrations of β-glucans that were comparable with those observed by Bak *et al.* [37] (29.7–56.5 %) in 10 crops of *L. edodes*. Brauer and colleagues observed, in extracts and lyophilized samples of *L. edodes*, 5.0% and 5.6% of β-glucans, respectively [38]. Manzi *et al.* [39] found 13.9–66.6% of β-glucans in samples of

Pleurotus ostreatus. Those studies and our study show the wide variation of concentrations of bioactive compounds due to differences in cultivation and species.

Handayani *et al.* [40] evaluated the effects of ingestion of powdered *L. edodes* (7, 20 and 60 g/kg) based on the corporeal weight of rats. Animals received a HFD (50%) during 6 weeks, along with mushrooms. The group receiving the higher dose of *L. edodes* (60 g/kg) gained less corporeal weight in comparison with all other groups. Despite those results, the consumption reported does not match realistic consumption of mushrooms in humans.

WBCs are part of the immune system and are involved in platelet formation. Increases in WBC count can be related to: (i) activation of inflammation from excessive consumption of lipids; and (ii) stimulation of the immune system by *L. edodes* [41,42]. β-Glucans could activate the hematopoietic system.

Harada *et al.* [43] made rats eat extracts of β-glucans from mushrooms to induce leukopenia. They noted improvement in the hematopoietic system, suggesting that this extract could contribute to the increase in production and maturation of thymocytes [43,44], results that were corroborated by our study. β-Glucans could activate the hematopoietic system.

The MCHC was increased significantly in the HFD group compared with the control group. The high concentration of fat could have caused an increase in the level of hemoglobin, causing blood thickening [45]. Tai *et al.* [46] evaluated the hematologic effects of ingestion of four sources of lipids: soy oil (40%), palm oil, vegetable fat and soy oil (10%; control). They found that the MCHC decreased in groups that received vegetable fat and soy oil (40%) in relation to the control. Increases in the viscosity of blood, serum, and plasma in the three study groups were also observed. Hence, the lipid source can influence some hematologic parameters.

Levels of ALT and AST in blood can be increased if the metabolism of the liver is compromised or if the liver is injured. Such increases in transaminase levels are very useful markers for liver function [47,48]. In the present study, a HFD increased ALT levels by 74% compared with the control group. *L. edodes* reduced levels of this enzyme by 63%. A HFD increased AST levels by 20% compared with the control group, and *L. edodes* reduced AST levels by 20%.

Chung *et al.* [49] evaluated exposure to *L. edodes* extract (250 mg/kg) on the hepatic injury induced by consumption of ammonium chlorite and alcohol. After 12 weeks of rats receiving *L. edodes* a significant reduction in levels of ALT and AST were

noted, along with a reduction in inflammation, necrosis, and fatty deposition in liver tissue. The high levels of these two enzymes in blood signify disruption to hepatocyte membranes. Hepatic steatosis (as shown by increased levels of saturated fatty acids) induces liver damage, which results in high levels of AST and ALT in blood [50].

In the present study, the main reason for increases in urea levels is the kidney damage triggered by excessive amounts of lipids, which hinders blood filtration (Fig. 2B). Urea and creatinine are sensitive markers of early damage to the kidneys [51]. *L. edodes* acted to reduce urea levels and protect the kidneys. The renal system has fundamental roles in the regulation of liquids and electrolytes, as well as in elimination of metabolic byproducts, to ensure corporeal homeostasis [52].

To verify the renoprotective properties of *Inonotus obliquus* (dried and fermented), researchers induced diabetes in rats using streptozotocin. Results showed reductions in urea levels in groups eating *I. obliquus* compared with the control group [53], data that corroborate our findings. In another study, a methanolic extract of *Ganoderma lucidum* was evaluated against the nephrotoxicity induced by cisplatin [54]. After treatment with *G. lucidum*, concentrations of creatinine and urea decreased significantly, thereby denoting kidney protection by ingestion of this mushroom. Moreover, Vaidya *et al.* [51] investigated the possible protective effect of powdered *L. edodes* (5%, 10%) against the kidney injuries induced by carbon tetrachloride (CCl_4). *L. edodes* showed significant protection against kidney dysfunction by normalizing serum levels of urea and creatinine.

Fukushima *et al.* [55] detailed hypocholesterolemic effects that were similar to our findings. Upon feeding of isolated fibers of *L. edodes* to rats, the concentration of total cholesterol was reduced from 11% to 25% in comparison with the control group. Similarly, Yoon *et al.* [56] administered 5% *L. edodes* in powder form for 42 days to hypercholesterolemic rats and found reductions in levels of triglycerides and cholesterol, findings that are in accordance with our data. However, the concentration of *L. edodes* used by Yoon and colleagues was very high, and not consistent with ingestion in humans.

Hyperlipidemia is the principal risk factor for atherosclerosis. In excess, low-density lipoprotein (LDL) is deposited in the walls of blood vessels and becomes an important component to platelet injuries. HDL facilitates translocation of cholesterol from peripheral tissue (arterial walls) to be catabolized in the liver [56]. Reduction of LDL levels and inhibition of the activity of 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA reductase could be associated with hypocholesterolemia [18,57]. Yang *et al.* [58] used 5%, 10%

and 20% *L. edodes* (from total ingestion of food) to feed rats with hypercholesterolemia. The hypocholesterolemic effect was proportional to the increase in percentage of *L. edodes* administered. Authors have proposed that such action is due to eritadenine and β-glucans in mushrooms. Viscosity and gel-formation properties of β-glucans facilitate fat excretion to reduce the time cholesterol is present in the organism, and thus diminish its absorption [59].

Mircea *et al.* [20] evaluated the effects of three species of fungi, two edible (*P. ostreatus* and *Agaricus bisporus*) and one parasitic (*Fomes fomentarius*)—extracts and powders—on levels of glucose and cholesterol. The hypoglycemic effect was more pronounced in groups treated with extracts, whereas groups treated with powder had better results for hypocholesterolemia. This hypoglycemic action could be attributed to certain substances that are similar to insulin being present in mushroom extracts, or even by compounds that can increase glucose utilization by blood cells [19,21].

MDA is a secondary product of lipid peroxidation and is used widely as an indicator of damage to cells and tissues. Lipid peroxidation is involved in the oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids [60]. The diet given to rats was rich in lipids, so the increase in levels of total cholesterol and triglyceride was related to the increase in TBARS levels. Conversely, *L. edodes* could decrease lipid peroxidation levels to those seen in the control group, suggesting an antioxidant action of *L. edodes* that prevents oxidation of fatty acids.

Jayakumar *et al.* [60] evaluated the effects of rats exposed to CCl_4 and/or an extract of *P. ostreatus* for 5 days. They noticed a considerable increase in MDA levels in rats exposed only to CCl_4. The group co-exposed to CCl_4 and *P. ostreatus* had a significant reduction in MDA concentrations, suggesting an antioxidant action from *P. ostreatus* that decreased oxidative damage to tissue. In contrast, Kanagasabapathy *et al.* [61] evaluated the effects of rats treated with a HFD and three doses of *Pleurotus sajor-caju*. They observed a significant reduction in lipid peroxidation and an increase in levels of catalase and GPx. Acharya *et al.* [62] evaluated the effects of exposure of an extract of *Macrocybe gigantea* in CCl_4-inducted hepatotoxicity in rats. They noted an increase in lipid peroxidation, and decreases in levels of catalase and GSH, in the group treated with CCl_4. Antioxidant status in the liver was restored upon administration of the extract of *M. gigantean*, which was proposed to be a potent scavenger of free radicals.

CONCLUSIONS

This is the first study to report on the different parameters associated with HFD ingestion and *L. edodes*. The most important finding was the dose of *L. edodes* that is suitable for human consumption. HFD consumption induced alterations in the lipid profile, hepatic function, renal function, and lipid peroxidation. *L. edodes* was shown to be a good nutraceutical against metabolic disorders through its hypocholesterolemic action as well as its ability to increase HDL levels, restore the concentration of urea to normal levels, decrease levels of transaminases, and stimulate the immune system (by increasing the WBC count). *L. edodes* protected against the oxidative damage induced by excessive ingestion of lipids, thereby suggesting an antioxidant effect.

Bioactive properties of *L. edodes* can be attributed to the high concentrations of β-glucans and fibers. Thus, even though *L. edodes* does not aid weight loss, it could be an excellent nutritional source in food supplements (especially in metabolic disorders associated with high consumption of fat).

FUNDING SOURCES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2013/05765-5); Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-01.10.0659.00).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ *et al.* (2013) Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment- A Position Paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. Obesity. 2:8-24. doi:10.1002/oby.20181.

2. Carvalheira JBC, Qiu Y, Chawla A (2013) Blood spotlight on leukocytes and obesity. Am Soc Hematology. 122:3263-3267. doi:10.1182/blood-201304-459446.

3. WHO (2013) World Health Organization, Fact sheet N°311. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Acesso em 29 de março de 2014.

4. Hutcheson R, Rocic P (2012) The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. Experimental J *Diabetes* Res. doi:10.1155/2012/271028.

5. Roupas P, Keogh J, Noakes M *et al*. (2012) The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. J Funct Foods. 4:687-709. doi:10.1016/j.jff.2012.05.003.

6. Israilides C, Kletsas D, Arapoglou D *et al.* (2008) In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. Phytomedicine. 15:512-519. doi: 10.1016/j.phymed.2007.11.029.

7**.** Wani BA, Bodha RH, Wani AH. (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. JMPR. 4:2598-2604. doi:10.5897/JMPR09.565.

8. Regula J, Siwulski M (2007) Dried shiitake (*Lentinulla edodes*) and oyster (*pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. Acta Sci Pol Technol Aliment. 6:135-142.

9. Nile SH, Park W (2014) Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber Contents of Wild Growing Edible Mushrooms. Czech J Food Sci. 32:302–307.

10. Rop O, Mlcek J, Jurikova T (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects nure. Nutr Rev. 67:624-631. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00230.

11. Giavasis L (2014) Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. Curr Opin Chem Biol. 26:162–173. doi:10.1016/j.copbio.2014.01.010.

12. Ferreira ICFR, Barros L, Abreu RMV (2009) Antioxidants in Wild Mushrooms. Curr Med Chem. 16:1543-1560.

13. Hazama S, Watanabe S, Ohashi M *et al*. (2009) Efficacy of Orally Administered Superfine Dispersed Lentinan (β-1,3-Glucan) for the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. Anticancer Res. *29*:2611-2618.

14. Attitalla IH (2011) *Lentinus sp*. RJ-2 Mushroom is Important Source of Natural Antioxidative Polysaccharides. PJBS 14:1070-1071. doi:10.3923/pjbs.2011.1070.1071.

15. Kitzberger CSG, Smânia Jr. A, Pedrosa RC *et al.* (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *J Food* Eng. 80:631–638. doi:10.1016/ j.jfoodeng. 2006.06.013.

16. Rincão VP, Yamamoto KA, Ricardo NMPS *et al*. (2012) Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. Virology 9:37. doi:10.1186/1743-422X-9-37.

17. Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M *et al.* (2010) Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia 81:715-723. doi:10.1016/j.fitote.2010.06.005.

18. Alam N, Yoon KN, Lee TS *et al*. (2011) Hypolipidemic Activities of Dietary *Pleurotus ostreatus* in Hypercholesterolemic Rats. Mycobiology. 39:45-51. doi:10.4489/ MYCO.2011.39.1.045.

19. Zhu M, Nie P, Liang Y, Wang B (2013) Optimizing conditions of polysaccharide extraction from *shiitake* mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolismo. Carbohydr Polym. 95:644-648._doi:10.1016/j. carbpol. 2013.03.035

20. Mircea C, Bild V, Zavastin D (2013) The protective effect of mushrooms in experimentally induced diabetes in Mice. Farmacia 61:268-275.

21. Fortes RC, Recôva VL, Melo AL *et al*. (2008) Effects of dietary supplementation with medicinal fungus in fasting glycemia levels of patients with colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. Nutr Hosp. 23:591-598.

22. Araujo GS, Matos LJBL, Fernandes JO *et al*. (2013) Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. Ultrason Sonochem. 20:95-98. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.027.

23. Zhou N, Li W, Wu Z et al (2015) Sequential extractions: A new way for protein quantification data from peanut allergens. Anal Biochem. 484:31-36. doi:10.1016/j.ab. 2015.05.013.

24. Pinela J, Barros L, Carvalho AM *et al*. (2012) Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum L.)* farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. Food Chem Toxicol. 50:829-834. doi:10.1016/j.fct.2011.11.045.

25. Mccleary BV, Devries JW, Plymouth AN et al (2010) Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study. J AOAC. 93:221-233.

26. Grotto D, Gerenutti M, Souza VCO *et al*. (2015) Deficiency of macro-and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. Toxicology Reports. 2:401–404. doi:10.1016/j.fct.2011.11.045.

27. Fraulob JC *et al*. (2010) A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. J Clin Biochem Nutr. 46:212-223. doi:0.3164/jcbn.09-83.

28. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 82:70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6.

29. Paglia DE, Valentine WN (1967) Study on the quantitative and qualitative caracterization of erythrocyte glutathione peroxide. J Lab Clin Med. 70:158-69.

30. Aebi H (1984) Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105:121-126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.

31. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. Anal Biochem. 95:351-358.

32. Mattila P, Vaananen PS, Konko K *et al*. (2002) Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland. J Agric Food Chem. 50:6419-6422.

33. Reis FS, Barros L, Martins A *et al*. (2012) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. Food Chem Toxicol. 50:191-7. doi:10.1016/j.fct.2011.10.056.

34. Gaitán-Hernández R, Esqueda M. Gutiérrez A *et al.* (2006) Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Appl Microbiol Biot. 71:432–439. doi:10.1007/s00253-005-0241-1.

35. Brauer D, Kimmons TE, Phillips M *et al*. (2011) Starch Concentrations in Log-Grown Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). TOMYCJ. 5:1-7**.** doi:10.2174/1874437001105010001.

36. Diez VA, Alvarez A (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. Food Chem. 75:417-422. doi:10.1016/S0308-8146(01)00229-1.

37. Bak WC, Park JH, Park YA *et al*. (2014) Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. Mycrobiology. 42:301-304. doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.3.301.

38. Brauer D, Kimmons T, Phillips M (2007) Comparison of Two Methods for the Quantitation of 13-Glucans from Shiitake Mushrooms. J *Herbs Spices* Med *Plants.* 13:15-26. doi:10.13005044vl3n03.02.

39. Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food Chem. 73:321–325. doi:10.1016/S0308-8146(00)00304-6.

40. Handayani, D, Chen J, Meyer BJ *et al* (2011) Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. J Obes. 2011:1-8. doi:10.1155/2011/258051.

41. Ellinger VCM, Carlini LT, Moreira RO *et al.* (2006) Relation between insulin resistance and hematological parameters in a brazilian sample. Arq Bras Endocrinol Metabol. 50:114-117. doi.org/10.1590/S0004-27302006000100016.

42. Barazzoni R, Cappellari GG, Semolic A *et al.* (2014) The association between hematological parameters and insulin resistance Is modified by body mass index results from the North-East Italy MoMa population study. PLOS One. 9:101590. doi: 10.1371/ journal.pone.0101590.

43. Harada T, Miura N, Adachi Y *et al*. (2002) Effect of SCG, 1,3-b-D-Glucan from sparassis crispa on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. Biol Pharm Bull. 25:931-939. doi:org/10.1248/bpb.25.931.

44. Pini M. Gove ME, Sennello JA *et al*. (2008) Role and regulation of adipokines during zymosan-induced peritoneal inflammation en mice. Endocrinology. 149:4080-4085. doi.org/10.1210.

45. Hernandéz GN, Dabin C, Gayol del C *et al.* (2002) Haemorheological Variables in a Rat Model of Hypertriglyceridaemic Obesity and Diabetes. Vet Res Commun. 26:625-635.

46. Tai CJ, Chen CH, Chen HH *et al.* (2010) Differential effect of high dietary fat intakes on haemorheological parameters in rat. Br J Nutr. 103:977–983. doi:10.1017/S 0007114509992704.

47. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM *et al*. (2006) Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. Diabetes Metab Res Ver. 22:437–443. doi:10.1002/dmrr.666.

48. Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M *et al*. (2004) Biol Hepatoprotective Effect of Extracts from *Lentinus edodes* Mycelia on Dimethylnitrosamine-Induced Liver Injury. Pharm Bull. 27:1957-1960. doi:org/10.1248/bpb.27.1957.

49. Chung WS, Huawang J, Bose S *et al.* (2015) Hepatoprotective Effect of *Lentinus edodes* Mycelia Fermented Formulation Against Alcoholic Liver Injury in Rats. J Food Biochem. 1-12. doi:10.1111/jfbc.12124.

50. Wang D**,** Wei Y**,** Pagliassotti MJ (2006) Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. Endocrinology 943-951. doi.org/10.1210/en.2005-0570.

51. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T *et al.* (2006) Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. Am J Physiol Renal Physiol. 290:517-529. doi:10.1152/ajprenal.00291.2005.

52. Alam N, Amin R, Khan A *et al.* (2009) Comparative Effects of Oyster Mushrooms on Lipid Profile, Liver and Kidney Function in Hypercholesterolemic Rats. Mycobiology. 37:37-42. doi:10.4489/MYCO.2009.37.1.037.

53. Cha JY, Jun BS, Lee CH *et al.* (2005) Hypoglicemic and antioxidative effects of fermented Chaga Mushroom (*inonotus obliquus*) on streptozotocin-induced diabetic rats. J Life Science. 15:809-818. doi: 10.5352/JLS.2005.15.5.809.

54. Sheena N, Ajith TA, Janardhanan KK (2003) Prevention of nephrotoxicity induced by the anticancer drug cisplatin, using *Ganoderma lucidum*, a medicinal mushroom occurring in South India. Curr Sci. 85:478-482.

55. Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y *et al.* (2001) Cholesterol-Lowering Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) Fiber, Shiitake (*Lentinus edodes*) Fiber, and Enokitake (*Flammulina velutipes*) Fiber in Rats. Exp Biol Med. 226:758-765. doi;0037-9727/01/2268-0000$15.00.

56. Yoon KN, Alam N, Lee JS *et al*. (2011) Antihyperlipidemic Effect of Dietary *Lentinus edodes* on Plasma, Feces and Hepatic Tissues in Hypercholesterolemic Rats. Mycobiology. 39:96-102. doi:10.4489/MYCO.2011.39.2.096.

57. Alam N, Yoon KN, Lee TS *et al.* (2011) Hypolipidemic Activities of Dietary *Pleurotus ostreatus* in Hypercholesterolemic Rats. Mycobiology**.** 39:45-51.

58. Yang H, Hwang I, Kim S *et al.* (2013) *Lentinus edodes* promotes fat removal in hypercholesterolemic mice. Exp Ther Med. 6:1409-1413. doi:10.3892/etm. 2013.1333.

59. Novak M, Vetvicka V. (2008) Beta-Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. J Immunotoxicol. 5:47-57. doi:10.1080/15476910802019045.

60. Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. (2006) Antioxidant activity of the *oyster mushroom*, *Pleurotus ostreatus*, on CCl4-induced liver injury in rats. Food Chem Toxicol. 44:1989–1996.

61. Kanagasabapathy G, Malek NA, Mahmood AA *et al.* (2013) Beta-Glucan-Rich Extract from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer Prevents Obesity and Oxidative Stress in C57BL/6J Mice Fed on a High-Fat Diet. Hindawi. 1-10, ID 185259. doi.org/ 10.1155/2013/185259.

62. Acharya K, Chatterjee S, Biswas G *et al.* (2012) Hepatoprotective effect of a wild edible mushroom on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Int J Pharm Pharm Sci. 4:285-288.

Figure captions

Fig 1 Rats body mass (g) in Control group, high-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg through the weeks of the treatment. Data are expressed as mean ± standard deviation

Fig 2 In A, liver function (ALT - Alanina Transaminase; AST - Aspartato Transaminase; ɣ-GT - Gama Glutamil Transferase). In B, kidney function of rats treated for 30 days with Standard diet (Control), High-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation

Fig 3 In A) Lipid profile (COL - Cholesterol; TRIGL - triglycerides; HDL - High Density Lipoproteins; VLDL - Very Low Density Lipoprotein; LDL - Low Density Lipoproteins). In B and C) Glycemic profile of rats after 30 days receiving Standard diet (Control group), High-fat Diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation

Fig 4 Oxidative stress biomarkers of rats treated for 30 days with Standard diet (Control), High-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation

Table 1 Composition and energy content of the standard diet and high-fat diet, according to Fraulob *et al.* [27]

Components (g/kg)	Standard diet	High-fat diet
Casein	140	190
Cornstarch	620.7	250.7
Sucrose	100	100
Soybean oil	40	40
Lard	-	320
Fiber	50	50
Total vitamins	10	10
Mineral	35	35
L-Cystine	1.8	1.8
Coline	2.5	2.5
Carbohydrates (%)	76	26
Proteins (%)	14	14
Lipids (%)	10	60

Table 2 Nutritional composition of *L. edodes*, based on 100 g of the dry sample (%). Comparison with other studies using the same mushroom

	This study	**Regula; Siwulski [8]**	**Mattila et al. [32]***	**Reis et al. [33]***	**Gaitán-Hernández et al. [34]**
Humidity	90.6 ± 0.1	92.9	91.6	79.8	91.7
Ashes	5.3 ± 0.04	6.7	4.1	6.7	5.4
Lipids	2.9 ± 1.0	2.9	2.6	1.7	2.15
Proteins	18.4 ± 1.2	17.2	15.1	4.4	17.2
Carbohydrates	38.6 ± 2.0	19.9	48.7	87.1	75.3
Fibers	33. ± 0.1	46.2	27.7	-	-
α-glucan	1.01 ± 0,02	-	-	-	-
β- glucan	34.5 ± 0.01	-	-	-	-

*****Results of Matilla *et al.* [32] and Reis e*t al.* [33] were converted on dry base.

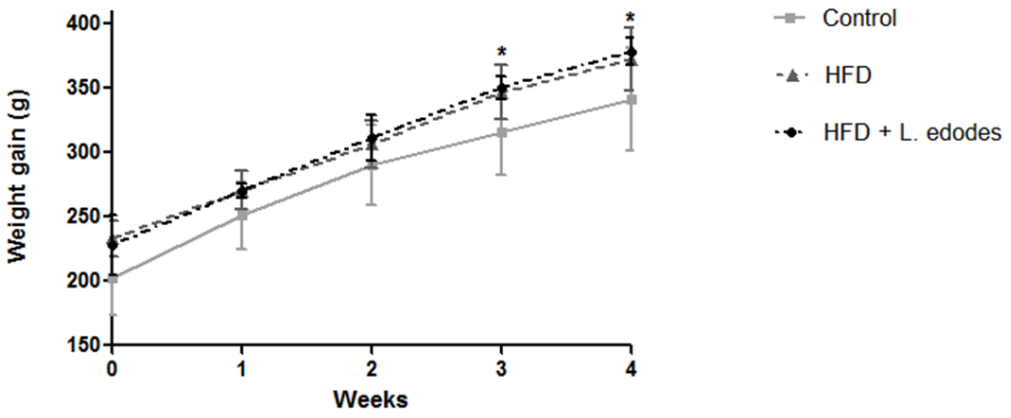
Table 3 Haematological parameters of rats treated 30 days with Standard diet (Control), High-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* (100 mg/kg). Data are expressed as mean ± standard deviation

	Control	**HFD**	**HFD + *L. edodes***	**p-value[#]**
WBC (10^3/µL)	5.66 ± 0.9	6.56 ± 0.5	7.60 ± 2.0*	0.25; 0.026
RBC (10^6/µL)	7.49 ± 0.7	7.35 ± 0.3	7.48 ± 0.5	0.66; 0.98
Hb (g/dL)	14.5 ± 1.2	14.10 ± 0.9	14.3 ± 0.7	0.52; 0.72
HCT (%)	44.9 ± 3.6	43.0 ± 2.8	44.0 ± 1.9	0.27; 0.55
MCV (fL)	60.6 ± 2.3	58.4 ± 2.2	58.9 ± 2.9	0.16; 0.23
MCH (pg)	19.3 ± 0.7	19.2 ± 0.7	19.1 ± 0.9	0.74; 0.67
MCHC (g/dL)	32.2 ± 0.6	32.8 ± 0.2*	32.5 ± 0.5	0.041; 0.26
PLT (10^3/µL)	617 ± 196	656 ± 217	741 ± 107	0.73; 0.3

WBC: *White Blood Cells;* RBC: Red Blood Cells; Hb: *Hemoglobin;* HCT: *Hematocrit;* MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCHC: *Mean corpuscular hemoglobin concentration;* PLT: Platelet

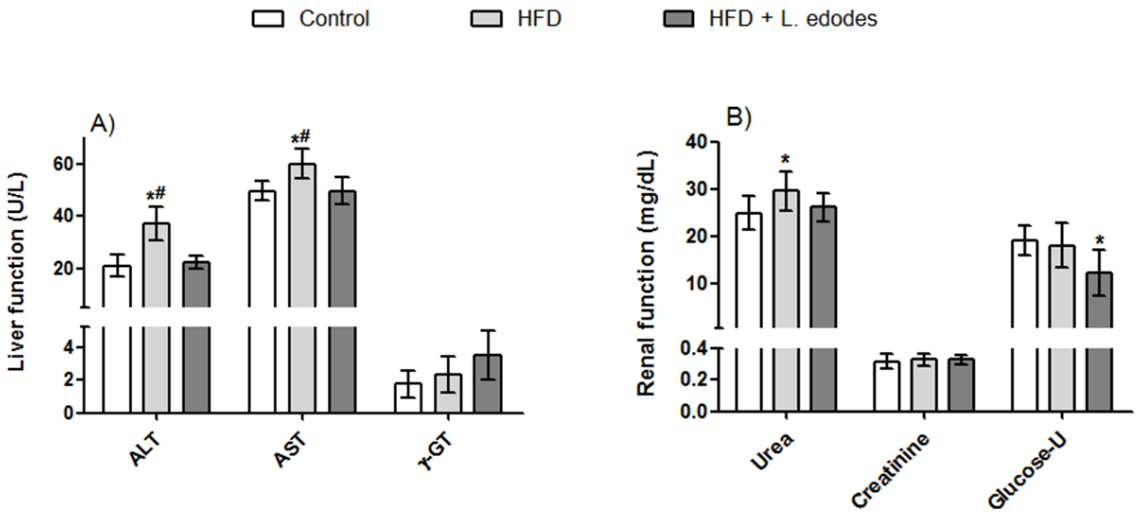
*Statistically different from the control group; [#]p-value of HFD and HFD + *L. edodes* compared to the control, respectively.

Fig 1 Rats body mass (g) in Control group, high-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg through the weeks of the treatment. Data are expressed as mean ± standard deviation.



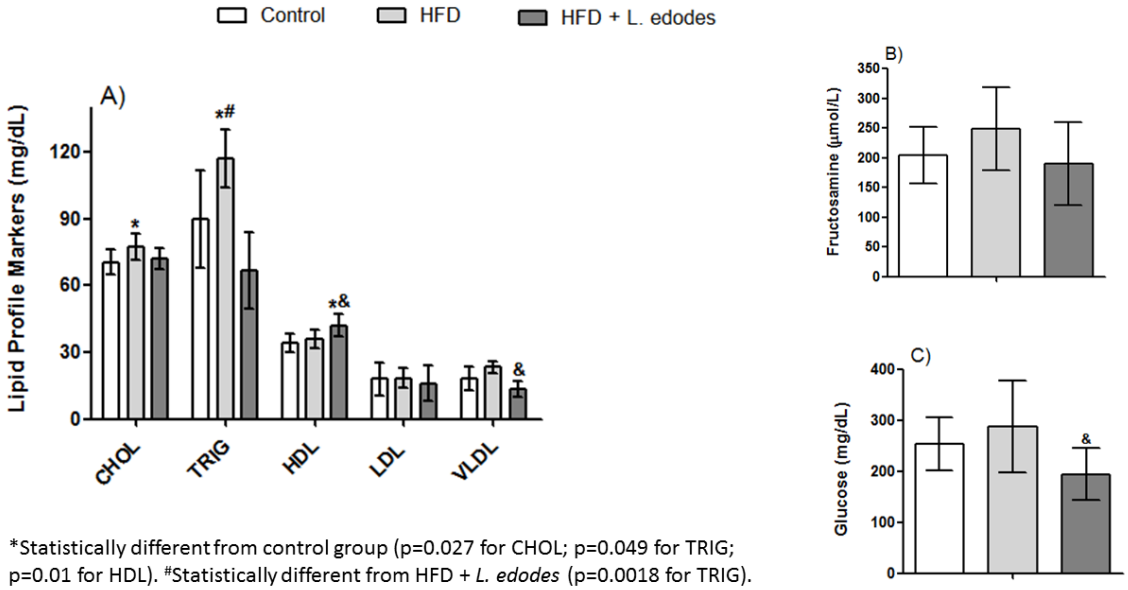
*Statistically different from control group: week 3 p=0.03 in HFD; p=0.023 in HFD + *L. edodes;* week 4 p=0.043 in HFD; p=0.049 in HFD + *L. edodes*

Fig 2 In A, liver function (ALT - Alanina Transaminase; AST - Aspartato Transaminase; ɣ-GT - Gama Glutamil Transferase). In B, kidney function of rats treated for 30 days with Standard diet (Control), High-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation.



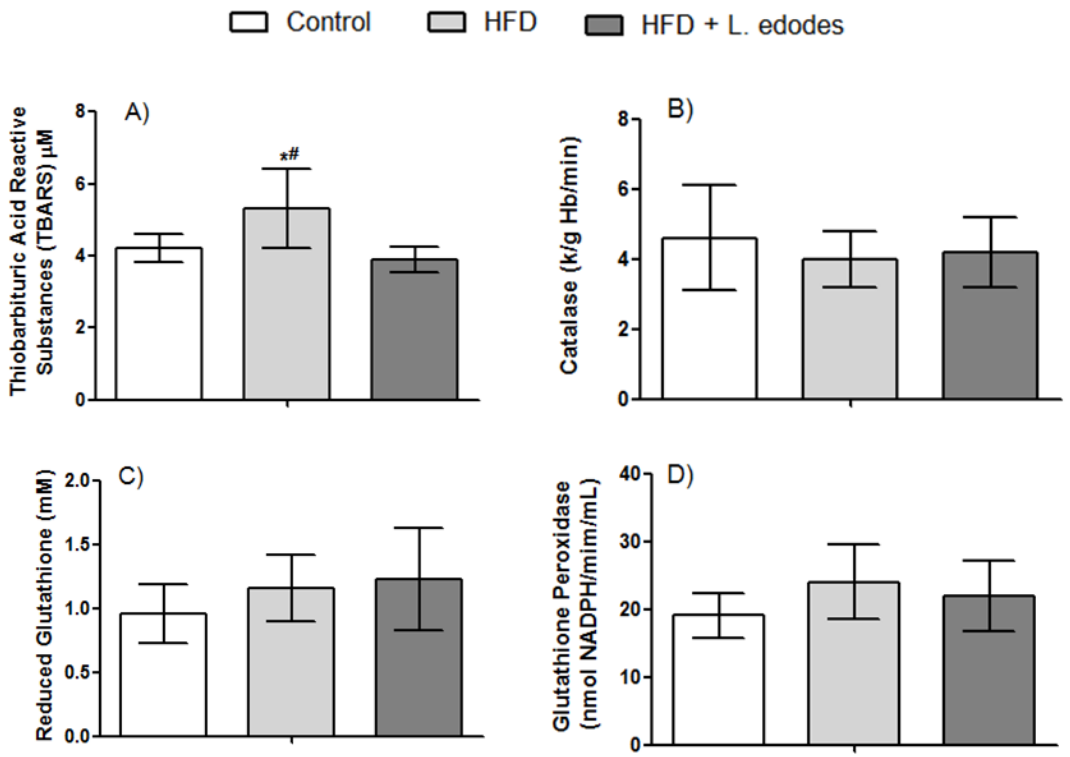
*Statistically different from control group (p=0.0001 for ALT; p=0.003 for AST; p=0.047 for urea; p=0.044 for Glucose-U).
#Statistically different from HFD + *L. edodes* (p=0.0002 for ALT; p=0.002 for AST).

Fig 3 In A) Lipid profile (COL - Cholesterol; TRIGL - triglycerides; HDL - High Density Lipoproteins; VLDL - Very Low Density Lipoprotein; LDL - Low Density Lipoproteins). In B and C) Glycemic profile of rats after 30 days receiving Standard diet (Control group), High-fat Diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation.



*Statistically different from control group (p=0.027 for CHOL; p=0.049 for TRIG; p=0.01 for HDL). #Statistically different from HFD + *L. edodes* (p=0.0018 for TRIG). &Statistically different from HFD (p=0.03 for HDL; p=0.002 for VLDL; p=0.043 for Glucose).

Fig 4 Oxidative stress biomarkers of rats treated for 30 days with Standard diet (Control), High-fat diet (HFD) and HFD + *L. edodes* 100 mg/kg. Data are expressed as mean ± standard deviation.



*Statistically different from control group (p=0.02 for TBARS). #Statistically different from HFD + *L. edodes* (p=0.006 for TBARS).

6 CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO

Este foi um estudo pré-clínico, no qual os resultados mostraram os efeitos benéficos que o cogumelo *L. edodes* tem na prevenção de doenças e principalmente com doses adequadas ao real consumo humano. *O L. edodes* apresentou significativas reduções das desordens metabólicas causadas pelo consumo elevado da dieta hiperlipídica, revertendo principalmente injúrias hepáticas e colesterolêmicas.

O cogumelo foi efetivo nos danos renais induzidos pelo consumo excessivo de lipídeos, com a recuperação e equilíbrio da ureia e na manutenção da concentração da creatinina. No perfil lipídico, o *L. edodes* mostrou-se hipocolesterolêmico, também com ação benéfica aumentou os níveis de HDL. Apresentou ação antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica, portanto, neutralizando os danos oxidativos nas células. Entretanto, o cogumelo não interferiu no peso dos animais e nem na capacidade de saciedade, já que não houve diferença na quantidade de alimento consumido entre grupos.

As propriedades bioativas do cogumelo, como a hipolipidêmica, hipoglicêmica, hepatoprotetora e nefroprotetora podem ser provenientes das β-glucanas e fibras. Desta forma, o *L. edodes* pode ser uma boa indicação como suplemento alimentar.

REFERÊNCIAS

ADA - AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. **Journal of American Dietetic Association**. Bethesda-USA, v.102, p.993-1000, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. Bethesda-USA, v.105, p.121-126, 1984.

ALAM, N. et al. Hypolipidemic Activities of Dietary *Pleurotus ostreatus* in Hypercholesterolemic Rats. **Mycobiology**. Incheon-Korea, v.39, n.1, p.45-51, 2011.

ANDREO, D.; JORGE, N. Capacidade Antioxidante e Estabilidade Oxidativa de *Gengiber officinale.* **Científica Ciências biológicas e da Saúde**. Londrina, v.1, n.13, p. 33-37, 2011.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. Jaraguá do Sul, v.3, n.2, p.54-145, 2004.

ARAÚJO, G. G. et al. Máxima Fase Estável de Lactato em Ratos Obesos de Ambos os Gêneros**. Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Rio Claro, v.15, n.1, p.46-49, 2009.

ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L, JO F. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics sonochemistry.** Fortaleza, v**.**20, p.95-98, 2013.

BADIMON L.; VILAHUR, G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chãos. **Academy of Sciences.** New York, p.18-32, 2012.

BANDELA, P. V.; PRASAD, K. D.; HAVILAH, P. Microalbuminuria in metabolically heathy and unhealthy obese individuals: na early indicator of microvascular endotelial dysfunction. **Journal of Medical Science and Technology**. Coimbatore-India, v.2, n.3, p.135-139, 2013.

BARBIERI, M. et al. New aspects of the insulin resistence syndrome: impact on haematological parameters. **Diabetologia**. Florence, Italy v.44, p.1232-1237, 2001.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation Between 'Lee Index' and Carcass Fat Content in Weanling and Adult Female Rats with Hypothalamic Lesions. **Journal of Endocrinology**. New York, v.40 p.527-528, 1968.

BETT, C. F. e PERONDI, M. A. Análise do Mercado de Cogumelos Comestíveis e Medicinais: Uma Prospecção de Alternativa de Renda para a Agricultura Familiar na Região Sudoeste do Paraná, **Synergismus scyentifica**. Pato Branco, v.6, n.1, 2011.

BONDIA-PONS, I; RYAN, L; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Oxford, v.68, p. 701–711, 2012.

BRASIL. Ministério Saúde. Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n.º 398, de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Brasília-DF, 1999.

CAMPANELLA, L. C. A. et al. Efeito da suplementação de óleo de cártamo sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicídico e antioxidante de ratos wistar induzidos a obesidade. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** Blumenau (SC), v.35, n.1, p.141-147, 2014.

CARDOSO, J. et al. **Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade**. 2010. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro Disciplina. Rio de Janeiro, 2010.

CARVALHEIRA, J. B. C.; Qiu, Y.; Chawla A. Blood spotlight on leukocytes and obesity. **American Society of Hematology**. Washington, v.122, p.3263-3267, 2013.

CHAGNAC, A et al. The Effects of Weight Loss on Renal Function in Patients with Severe Obesity. **Journal American Society Nephrology**. Tel Aviv-Israel, v.14, p.1480–1486, 2003.

CHANG, H. C. et al. Oat prevents obesity and abdominal fat distribution, and improves liver function in humans. **Plant Foods for Human Nutrition**, Taiwan, v.68, p.18–23, 2013.

CHUNG, W. S. et al. Hepatoprotective effect of *Lentinus edodes* mycelia fermented formulation against alcoholic liver injury in rats, **Journal of Food Biochemistry.** Seoul-Korea, p. 1-12, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** Califórnia, v.82, p.70-77, 1959.

FIGUEIREDO, S. M.; DIAS, V. A. R. C.; RIBEIRO, L. D. Fibras alimentares: combinações de alimentos para atingir meta de consumo de fibra solúvel/dia. **e-Scientia**. Ouro Preto, v. 2, n.1, 2009.

FORTES, R. C. et al. Effects of dietary supplementation with medicinal fungus in fasting glycemia levels of patients with colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. **Nutrición Hospitalaria**. Guará-DF, v.23, n.6, p.591-598, 2008.

FRAULOB, J.C. et al. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **Journal Clinical Biochemistry and Nutrition**. Bethesda-USA, v.46, p.212-223, 2010.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDERICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma without the use of the preparative ultra centrifuge. **Clinical Chemistry**. Bethesda- USA, v.18, n.6 p.499-502, 1972.

GIAVASIS L. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**. Karditsa-Greece, v.26, p.162-173, 2014.

GROTTO, D. et al. Deficiency of macro and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. **Toxicology**. Detroit-USA, v.2, p.401-404, 2015.

GUILLAMÓN, E. et al. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, Soria-Spain, v.81, n.7, p.715-723, 2010.

HALLIWELL, B, CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical and Nutrition.** London**,** v**.**57, p.715-724, 1993.

HANDAYANI, D. et al. Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. **Journal of Obesity**. Wollongong, Article ID 258051, p., 2011.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. Palermo, v.20, p.72–77, 2010.

IMPARL-RADOSEVICH, J. et al. Regulation of phosphorylase phosphatase (PTP-1) and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signaling. **Hormone Research.** Lowa, v.50, p.177–182, 1998.

ISRAILIDES C et al. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. **Phytomedicine**. Athens-Greece, v.15, p.512-519, 2008.

JACQUES, A. C. et al. Compostos Bioativos em Pequenas Frutas Cultivadas na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Technology**. Pelotas, v.12, n.2, p.123-127, 2009.

KHAN, A. et al. Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. Beltsville, v.26, p.3215–3218, 2003.

KUMAR M. et al. Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. **Revista Experimental Diabetes Research**. Haryana-Índia, p. 1-14, 2012.

LANDSBERG, L. et al. Obesity-Related Hypertension: Pathogenesis, Cardiovascular Risk, and Treatment- A Position Paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. **Obesity**. Chicago, v.21, n.1, p.8-24, 2013.

LEMOS, F. M. R. Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo Agaricus brasiliensis. 2009. 147f. Dissertação - Programa de Pós

Graduação em Tecnologia de Alimentos – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

LENQUISTE, S.A., et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International,** Toronto-Canadá, v.49, p.153-160, 2012.

MAKI, et al. Whole-grain ready-to-eat oat cereal, as part of a dietary program for weight loss, reduces low-density lipoprotein cholesterol in adults with overweight and obesity more than a dietary program including low-fiber control foods. **Journal of the American Dietetic Association**. Bethesda-USA, v.110, n.2, p.205-214, 2010.

MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry.** Roma-Itália, v.65, n.4, p.477-482, 1999.

MARSICANO, A. P. et al. Néfropatia diabética e insuficiência renal. **Revista do Curso de Enfermagem**. Santa Cruz, v.3, 2015.

MATÉS, J. M. et al. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**. Printed-USA, v.32, n.8, p.595–603, 1999.

MCCLEARY, B. V. et al. Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study. **Journal AOAC International**. Wicklow-Ireland, v.93, n.1, p.221-233, 2010.

MIRCEA, C.; BILD, V.; ZAVASTIN, D. The protective effect of mushrooms in experimentally induced diabetes in Mice. **Farmacia**. Iasi-Romania, v.61, n.2, p.268, 2013.

MOLLER, N. P. et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**. Norway, v.47, n.4, p.171–182, 2008.

MONTEIRO NF et al. **Efeitos metabólicos do extrato aquoso do cogumelo lentinula edodes em ratos induzidos a obesidade, hiperglicemia e dislipidemia**. Anais da XXXIV Semana Médica, X COMA e VII Congresso de Iniciação Científica. Itajubá, MG: Faculdade de Medicina de Itajubá, 2014.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Passo Fundo, v.3, p.109-122, 2006.

MOZAFFARIAN, D. et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. **American Journal of Clinical Nutrition**. Boston, v.79, p.606-612, 2004.

NAVES, L. A. et al. Distúrbios na Secreção e Ação do Hormônio Antidiurético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. Brasilia, v.47, n.4, 2003.

NOVAES M. R. C. G; FORTES R. C. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família *agaricaceae.* **Revista de Nutrição Brasileira**. Brasília, v.4, n.4, p.207-217, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. **Analytical Biochemistry.** Nagoya, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

ORSI V. C. Avaliação das características físicas e Biofarmacotécnicas de comprimidos preparados com Farelo da fécula e farelo da farinha da mandioca,
usando uma máquina de compressão instrumentada. 2011. 115f. Dissertação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- Mestrado. Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2011.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**. Campinas, v.19, n.6, p.741-760, 2006.

PAGLIA, D. E; VALENTINE, W. N. Study on the quantitative and qualitative caracterization of erythrocyte glutathione peroxide. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. Los Angeles**,** v.70, p.158-69, 1967.

PAULI, P. A. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis.** 2010. 73 f. Dissertação de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, 1999.

PINELA J. et al. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum L.)* farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. **Food Chemistry Toxicology**. Bragança, v.50, p.829-834, 2012.

PINI, M. et al Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL-6 KO mice. **Cytokine**. Chicago, v.56, n. 3, p.708–716. 2011.

RINCÃO, V. P. et al. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. **Virology Journal**. Londrina, v.9, n.37, p. 2-6, 2012.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome**. Life Science.** Berkeley, v.84, p.705–712, 2009.

ROCHA, L. P. Benefícios dos probióticos à saúde humana. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso de Nutrição. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. 2012.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects nure. **Nutrition Reviews**. Nitra-Slovak Republic, v.67, n.11, p.624-631, 2009.

SBCBM – SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA, 2014. Disponível em http://www.sbcb.org.br/obesidade.php?menu=0. Acesso em 28 de março de 2014.

SCHINDHELM, R. K. et al. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes Metabolism Research**. Amsterdam, v.22, p.437–443, 2006.

SERQUIZ, A. C. **Efeito sacietogênico de um novo inibidor de tripsina da paçoca de amendoim com aumento plasmático de colecistocinina (CCK).** 2012. 97 f. Dissertação de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal-RN, 2012.

SERRANO, J.; SANCHEZ- GONZÁLEZ, I. Trends in functional foods against obesity: Functional ingredients, technologically modified foods and full diets. **Revista Española de Nutrición Comunitaria**. Lleida-Spain, v.14, n.3, p.193-200, 2008.

SIDDIQUI A. H. et al. Correlation of Waist-to-hip Ratio (WHR) and Oxidative Stress in Patients of Acute Myocardial Infarction (AMI). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. Aligarh-India, v.8, n.1, p.4-7, 2014.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**. St. Paul, v.5, p.1417-1435, 2013.

TAO LX et al. Association of hematological parameters with metabolic syndrome in Beijing adult population: a longitudinal study. **Endocrine**. New York, v. 46, p 485-495, 2013.

TOMASI E. et al., Utilização de serviços de saúde no Brasil: associação com indicadores de excesso de peso e gordura abdominal. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.30, n.7, p.1515-1524, 2014.

WARREN, P. V.; SWANSON, R. V. **Transminases and amnotransferases.** USA 5962283 A. 5 out. 1999.

WISSE, B. E. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**. Seattle, v.15, p.2792–2800, 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, Fact sheet N°311, 2013.
Disponível em http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Acesso em 29 de março de 2014.

YOON, K. N. et al. Antihyperlipidemic Effect of Dietary *Lentinus edodes* on Plasma, Feces and Hepatic Tissues in Hypercholesterolemic Rats. **Mycobiology**. Seoul-Korea, v.39, n.2, p.96-102, 2011.

YUN J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature - a review. **Phytochemistry.** Kyungsan-Korea, v.71, n.14-15, p.1625-1641, 2010.

ZANI, V. T. et al. Intervenção Educativa e Alimentar com Suplemento de Aveia em Mulheres Idosas. **Caderno pedagógico**. Porto Alegre, v.12, n.1, p.184-195, 2015.

ZEKOV'C D. B. et al. Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, p.205–230, 2005.
ZHANG, Y. et al. Edible Mushroom Cultivation for Food Security and Rural Development in China: Bio-Innovation, Technological Dissemination and Marketing. **Sustainability.** Nanjing – China, v.6, p.2961-2973, 2014.

ZHOU, N. et al. Sequential extractions: A new way for protein quantification data from peanut allergens. **Analytical Biochemistry**. Nanchang-China, v.484, p.31-36, 2015.

ZHU, M. et al. Optimizing conditions of polysaccharide extraction from *shiitake* mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolism. **Carbohydrate polymers**. Shanghai-China, v.95, n.2, p.644-648, 2013.

ANEXO A - Carta de Aprovação da Comissão de Ética Animal.

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA–UNISO

PARECER

Protocolo nº 008/2012
Interessado: Denise Grotto
Orientador: NSA
Título do Projeto: Avaliação de parâmetros bioquímicos, antioxidantes e neuroquímicos em ratos expostos ao *Lentinula edodes* (Shiitake), e seu possível uso em distúrbios metabólicos
Título do Experimento: Avaliação de parâmetros bioquímicos, antioxidantes e neuroquímicos em ratos expostos ao *Lentinula edodes* (Shiitake), e seu possível uso em distúrbios metabólicos

Apresentado a Comissão de ética no uso de animais (CEUA) para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

[X] **APROVADO.**

[ ] **APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

[ ] **COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

[ ] **REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

1º Parecer
Com pendência:
Item 7 – Justificar a necessidade do uso de animais para avaliar parâmetros especificados no projeto (sugestão: copiar primeira frase escrita no item 9).
Item 9 – Excluir primeira frase e incluir que não há métodos alternativos para este procedimento.
Item 9.4 – Incluir o delineamento experimental (estatístico) para determinar o número de animais por grupo "n" citado.
Item 12.1 – Justificar a administração intraperitoneal, observando a Resolução CFMV 1000/2012: "* Em todos os casos, para todas as espécies, os barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis devem: - ser precedidos de medicação pré-anestésica, - ser administrados por via intravenosa e apenas na impossibilidade desta, por via intraperitoneal, em dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, pode-se complementar com o cloreto de potássio associado ou não ao bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa."
Item 13 – Abordar apenas procedimentos com animais (Etapa 2 – Experimentos I e II).
Item 14 – Assinar e datar o Termo de Responsabilidade.
O **cronograma** no projeto submetido à Ceua deve estar **relacionado ao uso animal**, isto é, previsão do início e fim dos procedimentos, aquisição dos animais, entre outros.
2º Parecer
APROVADO

Data: 24/04/2013
Assinatura: _____
Nome: Valquíria Miwa Hanai Yoshida
Coordenadora da CEUA-UNISO

ANEXO B – Atestado de sanidade animal.

ANILAB
Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. - EPP
CNPJ.:65.440.612/0001-40
INSC. EST.: 513.020.551.116

Paulínia, 30 de Setembro de 2014.

ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL

Atesto para os devidos fins que os CAMUNDONGOS SWISS e os RATOS WISTAR procedentes deste estabelecimento, CONSTANTES NA NOTA FISCALe 002277 estão em *perfeitas condições de saúde* e *livres de doenças infecto-contagiosas*, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

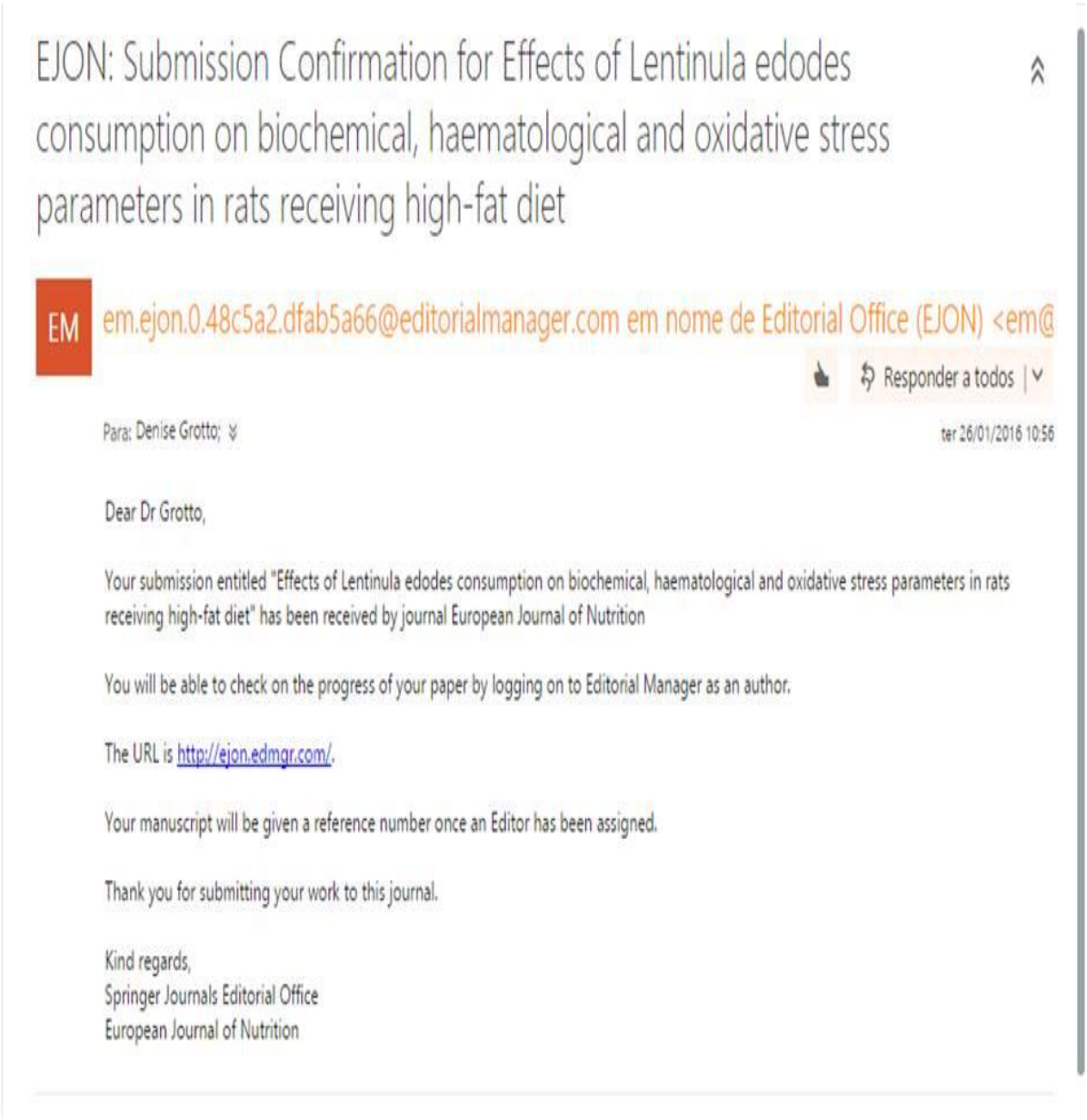
Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas

Atenciosamente,

Devanir Perecini
Médico Veterinário
CRMV-SP 32825

Rua Servidão Quatro, 292 - Fone/Fax (19) 3874-4538 / 9772-1676 - Bairro São Domingos - CEP 13140-000 - Paulínia - SP
email: anilab@anilab.com.br - www.anilab.com.br

ANEXO C – Submissão do artigo à revista European Journal of Nutrition.



EJON: Submission Confirmation for Effects of Lentinula edodes consumption on biochemical, haematological and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet

EM em.ejon.0.48c5a2.dfab5a66@editorialmanager.com em nome de Editorial Office (EJON) <em@

Responder a todos

Para: Denise Grotto;

ter 26/01/2016 10:56

Dear Dr Grotto,

Your submission entitled "Effects of Lentinula edodes consumption on biochemical, haematological and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet" has been received by journal European Journal of Nutrition

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is http://ejon.edmgr.com/.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition

ANEXO D - Guia da Revista “European Journal of Nutrition”.

TYPES OF PAPERS

- Accepted article types: Original Articles, Reviews, Short Communications, Letters to the Editors.
- Declaration of Conflict of Interest is mandatory for all submissions. Please refer to the section "Integrity of research and reporting" in the Instructions for Authors.
- Original Articles must not exceed 25 manuscript pages of max. 32 lines each. Exceptions can be made only with the agreement of the responsible Editor.
- Short Communications should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Preliminary results of highly innovative studies may be submitted as Short Communications.
- Letters to the Editors should not have more than 4 authors, and not contain more than 1000 words and 10 references. Summary and key words are not required. Letters are expected to provide substantive comments on papers published in the EJN. Both the letter and a reply, if appropriate, are published together whenever possible.
- Please submit Original Articles, Reviews, Short Communications electronically via Editorial Manager using the hyperlink “Submit online"
- Please send Letters to the Editor directly to the following e-mail address: eurjnutr@gmail.com

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.
Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.
Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Line numbering:

Please activate the line numbering function for your manuscript.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:
1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.
The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.
For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.
It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.
These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.
The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.
If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

ANEXO E – Participação em Congressos.

VIII SIGOG

VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
VII SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS

8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
7th NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS

Certificado

Certificamos que **SARA ROSICLER VIEIRA SPIM** participou do VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil / VII Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizado na Universidade de Sorocaba, em Sorocaba-SP, Brasil, no período de 18 a 22 de agosto de 2015.

Sorocaba, 22 de Agosto de 2015.

Profa. Dra. Mari Gerenutti
Presidente do VIII SICOG
Coordenadora do Comitê Científico

Profa. Dra. Maria Sylvia do Amaral Gurgel
Vice-Presidente do VIII SICOG
Membro do Comitê Científico

UNISO

Embrapa

FAPESP

II MEETING BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ESTÉTICA

CERTIFICADO

Certificamos que Sara Spim
participou do II Meeting Brasileiro de Nutrição Estética.

Carga horária: 10 horas
Dia: 16 de maio de 2015
Local: São Paulo - SP

São Paulo, 16 de maio de 2015.

Realização
e4 agencia.com

Gustavo Negrini - Diretor
Meeting Brasileiro de
Nutrição Estética

www.nutricaoesteticabrasil.com.br

SIES 2014

Seminário Internacional de Educação Superior

Formação e Conhecimento

Certificado

Certificamos que Sara Rosiclee Vieira Spim participou do Seminário Internacional de Educação Superior: Formação e Conhecimento, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Educação da Universidade de Sorocaba, no período de 26 a 28 de outubro de 2014.

Prof. Dr. José Dias Sobrinho
Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Dr. Wilson Sandano
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Educação

CERTIFICADO

O Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Bandeirantes certifica que

Sara Rosicler Vieira Spim

participou do **"VII Simpósio de Nutrição Clínica: Qualidade de Vida"** realizado no dia 03 de julho de 2015, com carga horária total de 10 (dez) horas.

Dr. Carlos Daniel Magnoni
Diretor do IMeN
Instituto de Metabolismo e Nutrição

Patrícia Ramos
Coordenadora do Serviço de Nutrição
Hospital Bandeirantes

Ana Paula Lopes Melo Pimenta
Coordenadora do Instituto de Ensino e Pesquisa
Hospital Bandeirantes

IEP INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA

X
SEMANA
DA SAÚDE

Saúde e Meio Ambiente:

Os Desafios da Atualidade

Certificado

Certificamos que **Sara Rosicler Vieira Spim** participou da palestra "Desafios e Importância da Terapia Nutricional em Pacientes Oncológicos", realizada no dia 29 de abril de 2015, na Universidade de Sorocaba, com carga horária de 04h.

Sorocaba, 29 de abril de 2015.

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Pró-Reitor Acadêmico da Uniso

UNISO

ANEXO F - Apresentação de Pôsteres em Congressos.

VIII SICOG

VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
VII SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS

8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
7th NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS

Certificado

Certificamos que o trabalho **EFEITO DO SHIITAKE (Lentinula edodes) SOBRE O PERFIL GLICÊMICO DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA**, de autoria de **Fernanda Gomes Leite, Bruna Giovana Correa Chrispim de Oliveira, Sara Rosicler Vieira Spim e Denise Grotto**, foi apresentado em formato de pôster durante o VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil / VII Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizado na Universidade de Sorocaba, em Sorocaba-SP, Brasil, no período de 18 a 22 de agosto de 2015.

Sorocaba, 22 de Agosto de 2015.

Profa. Dra. Marli Cereniti
Presidente do VIII SICOG
Coordenadora do Comitê Científico

Profa. Dra. Maria Sylvia do Amaral Gurgel
Vice-Presidente do VIII SICOG
Membro do Comitê Científico

UNISO Embrapa FAPESP

VIII SICOG

VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
VII SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS

8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
7th NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS

Certificado

Certificamos que o trabalho **EFEITOS DA INGESTÃO DE Lentinula edodes (SHIITAKE) SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM RATOS COM DIETA HIPERCALÓRICA**, de autoria de **Sara Rosicler Vieira Spim, Bruna Giovana Correa Chrispim de Oliveira e Fernanda Gomes Leite e Denise Grotto,** foi apresentado em formato de pôster durante o VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil / VII Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizado na Universidade de Sorocaba, em Sorocaba-SP, Brasil, no período de 18 a 22 de agosto de 2015.

Sorocaba, 22 de Agosto de 2015.

Profa. Dra. Marli Gerenutti
Presidente do VIII SICOG
Coordenadora do Comitê Científico

Profa. Dra. Maria Sylvia do Amaral Gurgel
Vice-Presidente do VIII SICOG
Membro do Comitê Científico

UNISO Embrapa FAPESP

VIII SICOG

VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
VII SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS

8th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
7th NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS

Certificado

Certificamos que o trabalho **REVISÃO CRÍTICA DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA DO Agaricus blazei**, de autoria de **Antonio Ademar Poles Junior, Bianca Hessel Maschio e Sara Rosicler Vieira Spim,** foi apresentado em formato de pôster durante o VIII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil / VII Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizado na Universidade de Sorocaba, em Sorocaba-SP, Brasil, no período de 18 a 22 de agosto de 2015.

Sorocaba, 22 de Agosto de 2015.

Profa. Dra. Marli Gerenutti
Presidente do VIII SICOG
Coordenadora do Comitê Científico

Profa. Dra. Maria Sylvia do Amaral Gurgel
Vice-Presidente do VIII SICOG
Membro do Comitê Científico

UNISO Embrapa FAPESP

REALIZAÇÃO:

Consultoria Nutricional

XI CONGRESSO INTERNACIONAL DE Nutrição Funcional

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **"Efeitos da ingestão de *Lentinula edodes* (shiitake) sobre as funções hepática e renal em ratos com dieta hipercalórica"** recebeu o prêmio de 2º colocado no XI Congresso Internacional de Nutrição Funcional realizado nos dias de 10, 11 e 12 de setembro de 2015, em São Paulo | SP, tendo como autores: SPIM, S.R.V.; PICKLER, T.B.; GROTTO, D.

Dra. Andréia Naves

Dra. Valéria Paschoal

PATROCINADOR OURO

VITAFOR

I Mostra de Atividades Acadêmicas

18º Encontro de Pesquisadores e Iniciação Científica

Certificado

Pelo presente, certificamos que o trabalho intitulado "*NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE E PERFIL LIPÍDICO EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERCALÓRICA E EXPOSTAS AO Lentinula edodes (SHIITAKE)*", de autoria de **BRUNA GIOVANA CORRÊA CHRISPIM DE OLIVEIRA, FERNANDA GOMES LEITE, SARA ROSICLER VIEIRA SPIM**, sob orientação do(a) PROFª. DRª. DENISE GROTTO, foi apresentado no XVIII Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica - EPIC, como parte da I Mostra de Atividades Acadêmicas – MAAC, da Universidade de Sorocaba - Uniso, realizado dia 04 de novembro de 2015.

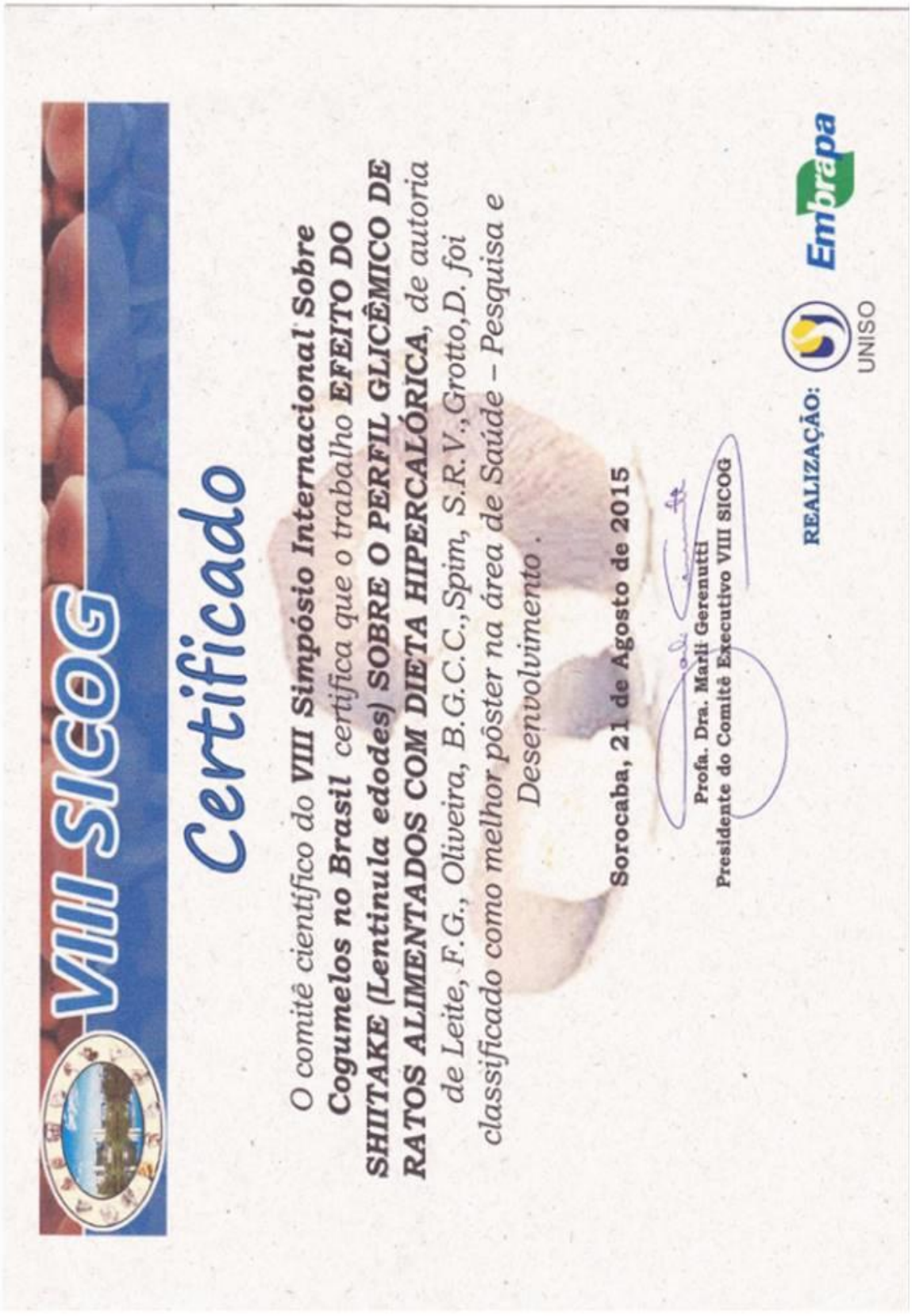
Sorocaba, 04 de novembro de 2015.

Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes
Presidenta da Comissão Organizadora do XVIII Encontro de Pesquisadores e Iniciação Científica - EPIC e da I Mostra de Atividades Acadêmicas - MAAC

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Pró-Reitor Acadêmico da Universidade de Sorocaba - Uniso

UNISO

ANEXO G – Premiações.



REALIZAÇÃO:

Consultoria Nutricional

XI CONGRESSO INTERNACIONAL DE Nutrição Funcional

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **"Efeitos da ingestão de *Lentinula edodes* (shiitake) sobre as funções hepática e renal em ratos com dieta hipercalórica"** recebeu o prêmio de 2º colocado no XI Congresso Internacional de Nutrição Funcional realizado nos dias de 10, 11 e 12 de setembro de 2015, em São Paulo | SP, tendo como autores: SPIM, S.R.V.; PICKLER, T.B.; GROTTO, D.

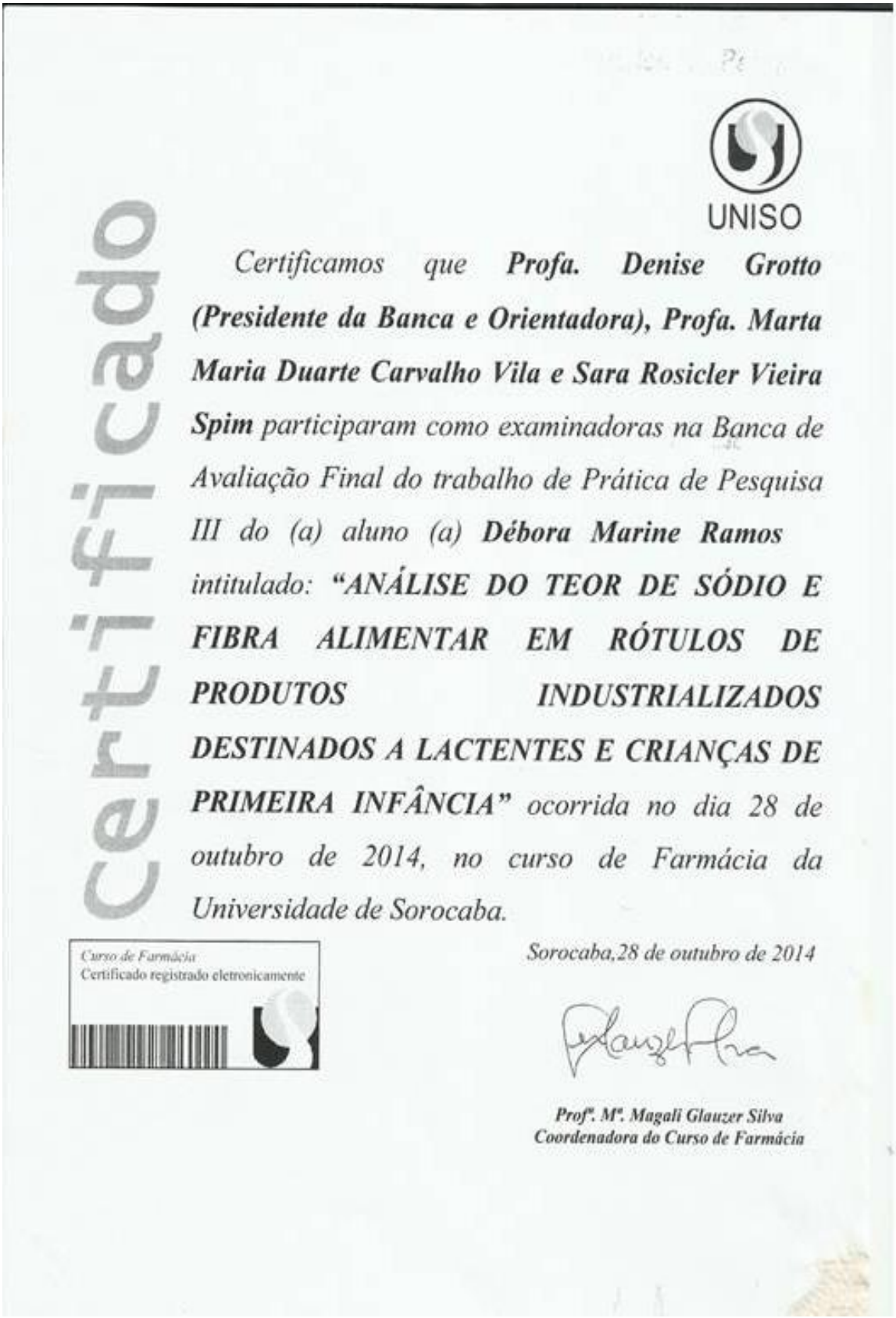
Dra. Andréia Naves

Dra. Valéria Paschoal

PATROCINADOR OURO

VITAFOR

ANEXO H – Participação em Bancas de Trabalho de Conclusão de Curso.



certificado

UNISO

Certificamos que ***Profa. Denise Grotto (Presidente da Banca e Orientadora), Profa. Marta Maria Duarte Carvalho Vila e Sara Rosicler Vieira Spim*** *participaram como examinadoras na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III do (a) aluno (a)* ***Débora Marine Ramos*** *intitulado:* ***"ANÁLISE DO TEOR DE SÓDIO E FIBRA ALIMENTAR EM RÓTULOS DE PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS DESTINADOS A LACTENTES E CRIANÇAS DE PRIMEIRA INFÂNCIA"*** *ocorrida no dia 28 de outubro de 2014, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente

Sorocaba,28 de outubro de 2014

Profª. Mª. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

certificado

UNISO

Certificamos que ***Profa. Marta Maria Duarte Carvalho Vila (Presidente da Banca e Orientadora), Profa. Denise Grotto e Sara Rosicler Vieira Spim*** *participaram como examinadoras na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as)* ***Maria Teresa de Carvalho*** *e* ***Ruchelli Cesar Coan*** *intitulado:* ***"TEOR DE SÓDIO EM ALIMENTOS LIGHT, DIET E CONVENCIONAIS"*** *ocorrida no dia 28 de outubro de 2014, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente

Sorocaba, 28 de outubro de 2014

Profª. Mª. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

ANEXO I – Orientação e monitoramento em laboratório de alunos de Graduação em Nutrição.

UNISO

Certificado

Certifico que Sara Rosicler Vieira Spim , RG 18.598.373-X de acordo com a lei 9.608 de 18/02/98 prestou serviço voluntário de livre e espontânea vontade para realizar atividades de Orientação, monitoramento e acompanhamento de alunas de Graduação do Curso de Nutrição, em análises de compostos fenólicos, inserido nos Laboratórios de Ciências Biológicas e Saúde, Bloco Apoio 2, Universidade de Sorocaba, cumprindo suas atividades especificas de acordo com o Termo de Adesão para Prestação de Serviço Voluntário, no período de 01 de abril de 2014 a 31 de julho de 2014. Carga Horária: 46h.

Valéria de Campos Orsi
Farmacêutica Responsável-Laboratório de Ciências Biológicas e Saúde
CRF-SP 14.550

Sorocaba, 01 de agosto de 2014

UNISO

Certificado

Certifico que Sara Rosicler Vieira Spim , RG 18.598.373-X de acordo com a lei 9.608 de 18/02/98 prestou serviço voluntário de livre e espontânea vontade para realizar atividades de orientação, monitoramento e acompanhamento de alunas de Graduação do Curso de Nutrição, em análises de compostos fenólicos, inserido nos Laboratórios de Ciências Biológicas e Saúde, Bloco Apoio 2, Universidade de Sorocaba, cumprindo suas atividades especificas de acordo com o Termo de Adesão para Prestação de Serviço Voluntário, no período de 04 de agosto de 2014 a 31 de dezembro de 2014. Carga Horária: 54hs.

Valéria de Campos Orsi
Farmacêutica Responsável-Laboratório de Ciências Biológicas e Saúde
CRF-SP 14.550

Sorocaba, 30 de janeiro de 2015.

ANEXO J – Membro da Organização do VIII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil.

ANEXO K – Estágio de docência.

Universidade de Sorocaba

Ofício PROAC nº 057/2015

Sorocaba, 21 de outubro de 2015.

DECLARAÇÃO

A Universidade de Sorocaba declara para os devidos fins a discente **Sara Rosicler Vieira Spim**, CPF 109.859.368-51, RG 18.598.373-X, bolsista do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP/CAPES), realizou estágio docência nesta Instituição, no componente curricular de Farmacologia Básica, nos cursos de Nutrição, Enfermagem e Farmácia, totalizando uma carga horária de 80 horas.

O referido estágio foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Denise Grotto, docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso, e envolveu as seguintes atividades:

a) acompanhamento aulas expositivas (elaboração e apresentação);

b) acompanhamento da elaboração de seminários de estudos dirigidos (seleção de artigos e elaboração de modelo de avaliação);

c) acompanhamento e elaboração de avaliações teóricas;

d) auxílio no atendimento aos alunos nas dúvidas sobre os conteúdos apresentados;

e) Conferência de palestra sobre o tema "Interação Medicamentosa Entre Medicamentos e Alimentos";

Prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr.
Pró-Reitor Acadêmico