

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

Ítalo Frizo

**EFEITOS DO COGUMELO *Lentinula edodes* (SHIITAKE) NA EXPOSIÇÃO
MATERNO-FETAL AO METOTREXATO**

SOROCABA/SP
2014

ItaloFrizo

**EFEITOS DO COGUMELO *Lentinula edodes* (SHIITAKE) NA EXPOSIÇÃO
MATERNO-FETAL AO METOTREXATO**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-graduação no Mestrado Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora Prof^a Dr^a Marli Gerenutti

SOROCABA, SP

2014

ItaloFrizo

**EFEITOS DO COGUMELO *Lentinula edodes* (SHIITAKE) NA EXPOSIÇÃO
MATERNO-FETAL AO METOTREXATO**

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

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^aDr^a Marli Gerenutti
Presidente da Banca
Universidade de Sorocaba

Prof^aDr^a Yoko Oshima-Franco
Universidade de Sorocaba

Prof^aDr^a Raquel de Mendonça Rosa-Castro
Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus por me permitir conseguir tornar-se um homem de honra, honesto, vitorioso e vencedor de mais um obstáculo.

Também gostaria de agradecer a minha família e a todos que me apoiaram nos momentos difíceis e de afastamento para realização das atividades para conclusão desta etapa da minha vida.

Gostaria de agradecer e dedicar meu trabalho realizado neste projeto a minha esposa Érica e minha filha Ágata pelas muitas vezes que as deixei só ou me afastei por tempos para executar as tarefas para concretização desta fase.

A minha gratidão eterna ficam as pessoas que foram fundamentais para que o projeto se concluísse: a minha orientadora Prof^aDr^aMarli Gerenutti, Prof^aMsMagali Glauzer Silva, as mestrandas Márcia Rebelo, Sthefany Rodrigues Fernandes Viana e Thaisa Borim Pickler; aos Técnicos do laboratório Valéria, Neia, Márcia e a aluna de iniciação científica Giovana Sabadim, por toda atenção e ajuda a mim concedida, a vocês deixo meus sinceros agradecimentos.

A empresa Yuri Cogumelos meu agradecimento pela doação das amostras de cogumelos doadas para desenvolvimento da pesquisa.

Enfim agradeço a todos e todas que de alguma forma estiveram presentes e puderam me ajudar, fica aqui meu muito obrigado.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. “E a vida é muito bela para ser insignificante.”

—Charles Chaplin

RESUMO

O emprego de cogumelos medicinais, como recurso de prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. A utilização do *Lentinula edodes* vem crescendo significativamente e, em alguns países é utilizado tradicionalmente por suas propriedades terapêuticas. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito protetor do *Lentinula edodes* sobre uma droga imunossupressora (metotrexato) em modelo gestação em ratas. Foram utilizados os seguintes tratamentos: *Lentinula edodes* 0.4g/kg/dia (SI), *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia (SII), metotrexato 0.20 mg/kg/dia (MTX), *Lentinula edodes* 0.4g/kg/dia + metotrexato 0.20 mg/kg/dia (SIMTX), *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato 0.20 mg/kg/dia (SIIMTX). Foram avaliados os parâmetros bioquímicos sanguíneos maternos (ATL, AST, creatinina, ureia e estresse oxidativo) e morfológicos fetais. Os resultados obtidos indicam que a amostra de *Lentinula edodes* utilizada encontrou-se dentro dos parâmetros descritos na literatura para as concentrações de glucanas e de compostos fenólicos. Tanto o *Lentinula edodes* (SI e SII) quanto o MTX, como as associações (SIMTX SIIMTX) não promoveram efeitos de toxicidade materna, entretanto em todos os tratamentos observou-se efeito fetotóxico. O *Lentinula edodes* apresenta um efeito importante sobre a capacidade reprodutiva das ratas durante o período de pré-implantação, sendo que este reverte os efeitos deletérios promovidos pelo MTX nesta fase. Pode-se concluir que a utilização do *Lentinula edodes* como protetor na exposição ao metotrexato deve ser considerada para se evitar abortos espontâneos, entretanto, por apresentar efeitos fetotóxicos, suas doses devem ser bem definidas.

Palavras-chave: Análise
Shiitake. *Lentinula edodes*. Toxicidade.

Bioquímica. Cogumelo

ABSTRACT

The use of medicinal mushrooms as a source of general practice in folk medicine has increased in recent decades. The use of *Lentinulaedodes* has grown significantly and in some countries is traditionally used for its therapeutic properties. This work intended to evaluate the protective effect of *Lentinulaedodes* on the immunosuppressor drug (methotrexate) in pregnancy model in rats. The following treatments were used: *Lentinulaedodes* 0.4 g/kg/day (SI), *Lentinulaedodes* 0.8 g/kg/day (SII) , methotrexate 0.20 mg/kg/day (MTX), *Lentinulaedodes* 0.4g/kg/day + methotrexate 0.20 mg/kg/day (SIMTX), *Lentinulaedodes* 0.8 g/kg/day + methotrexate 0.20 mg/kg/day (SIIMTX). Fetal maternal blood biochemical parameters (ATL, AST, creatinine, urea and oxidative stress) were evaluated and morphological? The results indicate that the sample *Lentinulaedodes* used was within the parameters described in the literature for the concentration of glucans and phenolic compounds. Both *Lentinulaedodes* (SI and SII) and MTX, as associations (SIMTX e SIIMTX) did not cause maternal toxicity effects, however in all treatments were observed fetotoxic effect. The *Lentinulaedodes* has an important effect on the reproductive capacity of female rats during the pre - deployment, and this reverses the deleterious effects promoted by MTX at this stage. It can be concluded that the use of *Lentinulaedodes* as a protective exposure to methotrexate should be considered to prevent miscarriages; however, by presenting fetotoxic effects, their dose should be well defined

Keywords: Biochemistry Analysis. *Shiitake Mushrooms*. Shiitake. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Lentinulaedodes</i> – etapas da produção em bloco de substrato.	18
Figura 2 -	Linhagens de <i>Lentinulaedodes</i> identificadas por código.	31
Figura 3 -	Comprovação da presença de compostos fenólicos amostra de <i>Lentinulaedodes</i> (Método: Folin-Ciocalteu).	34
Figura 4 -	Útero retirado de ratas para avaliação da capacidade reprodutiva.	40
Figura 5 -	Avaliação morfológica externa de fetos fixados em Bodian: medidas realizadas com paquímetro.	41
Figura 6 -	Sequência de cortes de Wilson realizada nos fetos após fixação em Bodian.	42
Figura 7 -	Etapas do processo de diafanização e coloração de fetos para a análise óssea.	43
Figura 8 -	Feto diafanizado para avaliação morfológica óssea.	44
Figura 9 -	Curva analítica do ácido gálico usado para quantificação de compostos fenólicos no <i>Lentinulaedodes</i> .	45
Figura 10 -	Curva da glutathiona reduzida (GSH) utilizada para avaliação de estresse oxidativo em sangue de ratas prenhes.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sinonímias do <i>Lentinulaedodes</i> (1877- 1975).	15
Tabela 2 -	Composição (%) de ácidos graxos do <i>Lentinulaedodes</i> .	19
Tabela 3 -	Ganho de peso (gramas) de ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.	47
Tabela 4 -	A análise dos parâmetros antioxidantes CAT (catalase) e GSH (glutathiona reduzida) em sangue das ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações durante o período de gestação.	49
Tabela 5 -	Análise bioquímica dos parâmetros: transaminase alanina aminotransferase (ALT),transaminase aspartatoaminotransferase (AST), creatinina (CREJ2) e ureia (UREL) realizada em sangue de ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações durante o período de gestação.	51
Tabela 6 -	Desempenho reprodutivo de ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.	54
Tabela 7 -	Avaliação do desenvolvimento do conceito de ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.	56
Tabela 8 -	Medidas morfológicas (cm) externas dos fetos de ratas expostas ao <i>Lentinulaedodes</i> , ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMG	Amiloglicosidase
AST	Aspartatoaminotransferase
CAT	Catalase
CREJ2	Creatinina
DHFR	Dihidrofolatoredutase
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzólico
EAG	Equivalente de ácido gálico
FDA	FoodandDrugAdministration
GLDH	Glutamato desidrogenase
GPH-Px	Glutationaperoxidase
GPH-R	Glutationaredutase
GSH	Glutaciona
GS-SG	Glutationadissulfeto
GSH-T	Glutationatransferase
Hb	Hemoglobina
LDH	Lactato desidrogenase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
MDH	Malatodesidrogenase
MTX	Metotrexato
NK	Natural Killer
ROS	Espécie reativa de oxigênio

SUMARIO

1INTRODUÇÃO	13
1.1 Composição química do <i>Lentinulaedodes</i>	19
1.2 Utilização terapêutica do <i>Lentinulaedodes</i>	20
1.3 Agentes promotores do estresse oxidativo	23
1.4 Exposição materna ao metotrexato e avaliação toxicológica na gestação	25
1.5 JUSTIFICATIVA	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3MATERIALE MÉTODOS	31
3.1 <i>Lentinulaedodes</i>	31
3.2 Obtenção da amostra seca de <i>Lentinulaedodes</i>	31
3.3 Dosagens de glucanas e de compostos fenólicos	32
3.3.1 Determinação de glucanas	32
3.3.2 Determinação de compostos fenólicos	33
3.4 Animais	34
3.4.1 Acasalamento e prenhez	35
3.5 Administração das drogas	35
3.6 Avaliação da toxicidade materna	36
3.6.1 Avaliação bioquímica	36
3.6.1.1 Determinação da glutathione reduzida (GSH)	37
3.6.1.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)	37
3.6.1.3 Determinação da transaminase aspartatoaminotransferase (AST), transaminase alanina aminotransferase (ALT), creatinina e da ureia.	38
3.7 Avaliação da capacidade reprodutiva	39
3.8 Avaliação do desenvolvimento do conceito	40

3.8.1 Avaliação morfológica externa e visceral de fetos	41
3.8.2 Avaliação morfológica óssea de fetos	42
3.9 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Teores de glucanas e de compostos fenólicos no <i>Lentinula edodes</i>	45
4.2 Efeitos da exposição ao <i>Lentinula edodes</i>, ao metotrexato e às associações sobre a toxicidade materna	46
4.2.1 Avaliação do ganho de peso de ratas prenhes	46
4.2.2 Avaliação bioquímica materna	48
4.2.3 Avaliação da capacidade reprodutiva	52
4.3 Efeitos da exposição ao <i>Lentinula edodes</i>, ao metotrexato e às associações sobre o desenvolvimento do concepto	55
4.3.1 Avaliação morfológica externa, visceral e óssea de fetos	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A - Certificado de aprovação em CEUA /Uniso	76
ANEXO B - Descarte dos animais	77
ANEXO C - Atestado de saúde animal	78
ANEXO D - Atividades acadêmico-científicas desenvolvidas pelo aluno	79
ANEXO E - Atividades em estágio docente	82

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cogumelos é realizado há mais de 10 séculos na China e os registros históricos indicam que a primeira espécie cultivada foi *Auriculária auricula*, aproximadamente no ano de 600 d.C, e em seguida *Flamulina velutipes*, cerca de 800 d.C, e a terceira *Lentinula edodes*, por volta de 900 d.C (HERRERA, 2001). Hipócrates foi o primeiro a mencionar o valor medicinal dos cogumelos, em 400 a.C. Na primeira menção sobre os cogumelos, estes foram descritos como alimentos de paladar agradável para se consumir em forma de chá, mas para consumo na forma sólida não apresenta sabor agradável (BEYER, 2003).

No Brasil, nas últimas décadas, o consumo de cogumelos vem crescendo significativamente quando comparado a países Europeus e Asiáticos. Este fato está atribuído à presença de colônias de imigrantes asiáticos espalhadas por todo o país, indicando que estes são os responsáveis pelo cultivo e incorporação do consumo de cogumelos no hábito alimentar dos brasileiros (FIDALGO; GUIMARÃES, 1985).

Os supostos benefícios medicinais e alimentícios dos cogumelos são os responsáveis pelo aumento nacional da procura e da produção, sendo que a produção nacional de cogumelos comestíveis cresce, em média, 15% ao ano (SHIBATA; DEMIATE 2003). A produção mundial também vem aumentando em número exponencial, na última década, estimou-se uma produção de 18 milhões de toneladas, levando a um crescimento econômico na área (FAOSTAT, 2009).

Embora no Brasil exista a insuficiência de dados que demonstrem o real perfil das variedades de cogumelos cultivadas e consumidas, sabe-se que dentre as variedades de cogumelos produzidas se destaca o Shiitake (MATTILA et al., 2000; SALES-CAMPOS et al., 2009). Shiitake (shii, tipo de árvore; take, cogumelo em japonês) é um fungo aeróbio decompositor de madeira, e que decompõe resíduos vegetais intactos que ainda não sofreram prévia decomposição por outros microrganismos (NAPPI; MORETTO, 1998), e cientificamente é denominado *Lentinula edodes* (CHANG; MILES, 1989).

O cogumelo *Lentinula edodes* ocorre naturalmente em florestas da zona temperada e subtropical da Ásia, em países como o Japão, China, Bórneu, Coreia,

Tailândia, Burma, Nova Guiné, além de algumas regiões do Himalaia e Filipinas. Por apresentar características sensoriais excelentes foi denominado “alimento dos deuses” pelos romanos e por suas propriedades terapêuticas e nutricionais, ficou conhecido como “elixir da vida” pelos chineses (NAPPI;MORETTO, 1998).

O cultivo do *Lentinula edodes* se originou na China e logo após, começou a ser produzida no Japão e posteriormente, nos EUA, Europa e América Latina (ROYSE et al., 1985; SABOTA, 1996).

O interesse pela produção, cultivo e consumo do cogumelo *Lentinula edodes* vem aumentando progressivamente tornando-se o terceiro cogumelo mais consumido no mundo (HANDAYANI et al., 2011).

Embora, no Brasil, já existam grandes produtores e importadores de cogumelos, o cultivo normalmente se dá em pequenas propriedades que, na maioria das vezes, utilizam instalações já existentes as quais são adaptadas, apresentando manejo e cultivo rudimentares (BONONI et al., 1995). A região do Alto Tietê (SP) é a maior produtora de cogumelo *Lentinula edodes*, fato atribuído à existência da maior colônia de imigrantes japoneses do Brasil (FRANCO, 2006; VILELA, 2012).

A micologia reconhece cinco filos nos fungos e, os fungos comestíveis são encontrados nos filos Ascomycota e Basidiomycota. No filo Basidiomycota estão classificados os cogumelos comestíveis (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007), sendo que na ordem Agaricales encontra-se o maior número desses cogumelos e os mais conhecidos (URBEN, 2004).

A classificação taxonômica empregada para o cogumelo *Lentinula edodes* segundo Nappi e Moretto (1998) é assim descrita: Reino: Fungi; Divisão: Mycota; Classe: Basidiomycetes; Subclasse: Holobasidiomycetidae; Ordem: Agaricales; Família: Tricholomataceae; Gênero: *Lentinula*; Espécie: *Lentinula edodes*. No último século, o cogumelo *Lentinula edodes* recebeu várias denominações (Tabela 1), e, em 1975 recebeu a denominação utilizada até a data de hoje; entretanto, alguns autores e produtores ainda citam suas sinonímias.

Tabela 1- Sinonímias do *Lentinula edodes* (1877- 1975)

Nomes	Ano
<i>Agaricus edodes</i>	1877
<i>Collybia shiitake</i>	1886
<i>Armillaria edodes</i>	1887
<i>Agaricus russaticeps</i>	1888
<i>Lepiota shiitake</i>	1889
<i>Lentinus tonkinensis</i>	1890
<i>Mastaleucomyces edodes</i>	1891
<i>Pleurotus russaticeps</i>	1891
<i>Cortinellus shiitake</i>	1899
<i>Tricholoma shiitake</i>	1918
<i>Cortinellus</i>	1925
<i>Lentinus shiitake</i>	1936
<i>Cortinellus edodes</i>	1938
<i>Lentinus edodes</i>	1941
<i>Lentinula edodes</i>	1975

FONTE: PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1988.

Segundo Urben (2004) os cogumelos são essencialmente terrestres. Porém existem algumas espécies que crescem em substrato de lignina ou em excremento de herbívoros.

O *Lentinula edodes* é um cogumelo que cresce em substrato de lignina, e pode ser produzido em toras, método tradicional ou pode ser produzido em cultivo intensivo. Embora, tradicionalmente o *Lentinula edodes* seja produzido em cepas de eucalipto, o cultivo axênico em substratos à base de diversos resíduos agrícolas vem ganhando espaço na produção comercial deste cogumelo (EIRA; MINHONI, 1996; SAN ANTONIO, 1981).

No cultivo axênico a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (HIROMOTO, 1991; LEVANON et al., 1993; PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1988). Neste cultivo intensivo são utilizados blocos de serragem suplementada com nutrientes e substratos agrícolas, como por exemplo, farelos de cereais. Estes substratos atuam como fontes

denitrogênio orgânico necessário ao aumento da massa miceliana, interferindo com a produtividade e eficiência biológica do fungo.

A produtividade do fungo depende da sua capacidade de secretar enzimas como as celulasas, hemicelulasas e ligninases, induzindo a liberação de nutrientes para seu crescimento (BUSWELL; CAI; CHANG 1996; MONTINI, 2001; ZHANXI; ZHANHUA, 2001). As trocas gasosas dos substratos, durante o crescimento vegetativo, para a produção destas enzimas são importantes, pois trocas gasosas deficientes durante o crescimento do fungo podem diminuir a velocidade de miceliação em virtude da inibição da atividade enzimática (DONOGHUE; DENISON, 1995 1996).

As seleções adequadas do substrato, da suplementação e da linhagem, garantem melhor resultado na produção. Entretanto, o controle das condições climáticas, o número de orifícios inoculados e os métodos de manejo também são fatores fundamentais que podem interferir no rendimento da produção (ANDRADE, 2003; MINHONI et al., 2005).

Antigamente, o bagaço de cana prensado, devido suas características de compactação fibrosa e areada, era um resíduo muito utilizado na produção e no cultivo de *Lentinula edodes*. No entanto, por ter sido considerado um resíduo final rico em parede celular, de baixo conteúdo de células inteiras, baixa densidade e pobre em proteínas e minerais sempre houve a necessidade de suplementação com nutrientes, de preferência solúveis para estarem prontamente disponíveis para o fungo (BUSWELL; CAI; CHANG 1996; SANTOS, 1990). Sendo assim, a serragem de eucalipto suplementada, vem ganhando espaço na produção axênica do *Lentinula edodes*.

A Figura 1 ilustra o processo de produção axênica do *Lentinula edodes* utilizando na blocagem, a serragem de eucalipto suplementada. Este processo de produção consiste inicialmente na lavagem da serragem para a extração de contaminantes físicos e químicos; mistura de substrato ao material a ser embocado; esterilização dos blocos acondicionados em invólucros apropriados, para posterior inoculação das cepas; inoculação das cepas; armazenamento dos blocos em salas

refrigeradas e com controle de unidade para o desenvolvimento de hifas; retirada dos invólucros de acondicionamento; estoque dos blocos em sala de cultivo e coleta, com temperatura e unidade controladas. A fase após o desenvolvimento das hifas é o momento onde ocorre a comercialização dos blocos inoculados, para o cultivo em pequena e média escala. Em todo este processo, o controle de qualidade microbiológico dos blocos e a manutenção das cepas, são fundamentais para a produção sustentável do *Lentinula edodes*.

Figura 1- *Lentinula edodes* – etapas da produção em bloco de substrato.



Legenda: A) Lavagem e secagem da serragem; (B) inoculação das cepas; (C) blocos inoculados sendo preparado para armazenamento; (D) armazenamento para a produção de hifas; (E) blocos sendo encaixotados para a comercialização; (F) blocos prontos para distribuição; (G)- blocos em processo de início de produção; (H) blocos produzindo para a coleta.

Fonte: Elaboração própria

1.1 Composição química do *Lentinula edodes*

Os cogumelos apresentam em sua constituição estruturas responsáveis pelas execuções de funções importantes para proteção do organismo, especialmente por ser considerado uma importante fonte de proteínas (DIAS et al., 2004; SUGUI et al., 2003). O cogumelo *Lentinula edodes* apresenta em sua composição química, 90% de água, 3-5% de carboidratos, 10-40% de proteína, 2-8% de lipídeos, 44% de fibras, 8-10% de minerais (BREENE 1990; BORCHERS et al., 1999; CHEUNG et al., 2003).

Os teores de lipídeos presentes em cogumelos são extremamente baixos, segundo dados analisados por Chang e Miles (1989) ficam entre os valores 1.1 e 8.3%. No cogumelo *Lentinula edodes* foi encontrado 2.1% de gordura em base seca, foi concluído que 77.7% dos lipídeos eram formados de ácidos graxos insaturados com prevalência para linoléico (LONGVAH; DEOSTHALE 1998). A Tabela 2 indica a composição lipídica do *Lentinula edodes*.

Tabela 2- Composição (%) de ácidos graxos do *Lentinula edodes*.

Ácido mirístico	0.71
Ácido esteárico	1.66
Ácido palmotiléico	1.93
Ácido oleico	6.23
Ácido palmítico	21.94
Ácido linoléico	67.53

Fonte: NAPPI; MORETTI, 1998.

Os minerais presentes no *Lentinula edodes* são o cálcio, potássio, magnésio, fósforo, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco representando de 56 a 70% do total de cinzas. Do conteúdo de minerais mais significativos está o cálcio com 0.05 g/kg, o potássio, 26.7g/kg, o magnésio, 1.55 g/kg e o fósforo com 8.7 g/kg (MATTILA et al., 2001).

Os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B₁, B₂, B₁₂, niacina, biotina e vitamina C e folatos totais. Na Finlândia, em estudos realizados com diversas espécies de cogumelos, Mattila et al (2000) observaram que o

Lentinula edodes foi a espécie que apresentou os mais elevados teores de vitamina C (2.1mg/100g), B12 (0.07µg/100g) e D (0.1 µg/100g).

Entretanto, atualmente, o grande destaque dos valores nutricionais e medicinais dos cogumelos está relacionado ao teor de glucanas, em especial ao teor das β -glucanas. As β -glucanas são açúcares que estão ligados à quitina e proteínas, presentes na parede celular e frutos dos fungos, são polissacarídeos e exopolissacarídeos com função estrutural (MOL et al., 1990). Em β glucanos particulares, como o homo- e hetero-glucanos com $\beta(1 \rightarrow 3)$, $\beta(1 \rightarrow 4)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$ ligações glucosídicas, é suposto serem os responsáveis por algumas das propriedades saudáveis dos cogumelos (LEE et al., 2009; MANZI; PIZZO FERRATO 2000).

A β -glucana presente no *Lentinula edodes* é conhecida como lentinana ou lentinana (NEHA et al., 2012). São estruturas moleculares que seguem uma ordem formando um anel, que diferem da celulose das plantas, pois apresentam um tipo especial de ligação entre as unidades e possuem ramificações de alto peso molecular (CLEARY; GRAHAN; HUSBAND, 1999; SHU; WEM; LIN, 2003). A lentinana é uma β -D-Glucana de alta massa molecular e configuração helicoidal isolada a partir de extrato aquoso do fungo (CHIARA et al., 1969). A fórmula molecular é $(C_6 H_{10} O_5)_n$.

Os cogumelos também apresentam compostos fenólicos que são moléculas constituídas de pelo menos um anel aromático, onde um hidrogênio é substituído por um radical de grupo hidroxila. A maioria é observada na forma de ésteres ou heterosídeos, e não em uma forma isolada na natureza (SIMÕES et al., 2000).

1.2 Utilização terapêutica do *Lentinula edodes*

Cerca de 25% dos fármacos empregados atualmente advêm direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas e fungos. Entretanto, nas últimas décadas, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, em maior proporção, provenientes de pesquisas científicas realizadas na China, na Coreia e no Japão, sendo que a contribuição dos países ocidentais neste período foi bem menor. (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2001).

Segundo Chandra (2011a) os cogumelos exóticos têm sido muito utilizados na medicina chinesa antiga, devido suas propriedades imunomoduladoras no tratamento e/ou na prevenção de doenças crônicas. Nos últimos anos, no Ocidente, em especial, a busca por produtos e alimentos saudáveis, como os cogumelos, vem aumentando e despertando o interesse na medicina preventiva.

Mundialmente os cogumelos têm sido reconhecidos como alimento funcional, e o acúmulo de conhecimentos práticos sobre os cogumelos adequados para consumo e aqueles que são venenosos ou psicotrópicos, garantem em parte, a segurança de seu uso. Em muitas partes do mundo, especialmente na Europa, cogumelos selvagens são regularmente coletados e usados diretamente como alimento principal ou adicionado a sopas, guisados e chás (BRAUER et al., 2002; MINATO; MIZUNO; TERAÍ, 1999; SUGUI et al., 2003).

Em países como a Coreia, China e Japão, nos quais os cogumelos são utilizados em grande escala e apresentam significativa importância na economia, os estudos sobre suas propriedades medicinais estão mais sedimentados. As principais ações farmacológicas avaliadas até o presente momento referem-se: a hepatoproteção relacionada à proteção de hepatócitos pela LM-lignina (ITOH et al., 2010; SASIDHARAN et al., 2010; YOSHIOKA et al., 2012); tratamento ou prevenção de doenças crônicas e hipercolesterolemia (CHANDRA et al., 2011b; LAWRENCE et al., 2011); efeito de eliminação de radicais através de compostos fenólicos como ácido siríngio e ácido vanílico (ISHIKAWA et al., 2001; ITOH et al., 2010); efeito imunomodulador pela presença de polissacarídeos e glucanas (ITOH et al., 2009); efeito antitumoral (TANAKA et al., 2011).

Uma das mais notáveis características dos extratos derivados de cogumelos medicinais é sua habilidade de funcionar como imunoestimulador, ou seja, a constituição fisiológica do mecanismo de defesa do hospedeiro é melhorada pela exposição a componentes que restauram a homeostase e melhoram a resistência para doenças. Entretanto, somente nas últimas três décadas, a tecnologia química tem sido hábil para isolar componentes relevantes e utilizá-los em experimentos controlados para aplicação anticâncer (CHIHARA et al., 1970; HATVANI, 2001; LIU; OOI; CHANG, 1997; SUGUI et al., 2003).

Alguns autores sugerem que o efeito antitumoral atribuído às β -glucanas oriundas de cogumelos, está ligado à fração d-glucano; seu efeito farmacológico difere dos demais tratamentos quimioterápicos, pois as β -glucanas atuam aumentando a atividade das funções imunológicas (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

As β -glucanas são reconhecidas pelo sistema inato, ativando células Natural Killer (NK), macrófagos, células T, promovendo a liberação de citocinas e interleucinas, assim como também produzindo anticorpos (DONG et al., 2002; MIZUNO et al., 1990a).

Certas espécies de cogumelos têm conhecido efeito na diminuição do colesterol quando adicionado na dieta de animais em experimentos. A eritadenine isolada de *Lentinula edodes* mostrou que a sua ação pode ser hipocolesterolêmica devido à depressão da secreção do colesterol do fígado para a corrente sanguínea, entretanto, um mecanismo mais detalhado não foi definido (MANZI; PIZZOFERATTO, 2000; SUGIYAMA; AKACHI; YAMAKAWA, 1995).

O *Lentinula edodes* é usado tradicionalmente para doenças de função imune, alergias, infecção fúngica, gripes, resfriados, doenças cardíacas, hiperlipidemia, sendo o primeiro macro fungo a entrar no domínio da biotecnologia moderna, por apresentar estas possíveis aplicações terapêuticas (BISEN et al., 2010).

Os extratos brutos de *Lentinula edodes* e as β -glucanas, extraídas dos polissacarídeos de *Lentinula edodes* são utilizados no Japão, como medicamentos, desde os anos 80, sendo estas últimas, comercializados pelo nome de Lentinan (MIZUNO et al., 1990^a; WATANABE et al., 2006). No Brasil, a atual legislação não permite a comercialização de extratos de cogumelos (Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº. 14 de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010) e apenas o cogumelo *Agaricus blazei* possui registro como alimento.

O uso milenar de cogumelos medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas espécies podem apresentar substâncias potencialmente perigosas e por essa razão devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos

toxicológicos (VEIGA JÚNIOR et al., 2005). Os efeitos mais preocupantes do uso indiscriminado de cogumelos medicinais sobre a gestação, os quais podem promover efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos, uma vez que, os constituintes destes cogumelos podem atravessar a placenta, gerando danos ao concepto (GERENUTTI; GROTO, 2013).

1.3 Agentes promotores do estresse oxidativo

Nos organismos aeróbios são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS), durante o período de atividade biológica das células. Para que exista a manutenção do equilíbrio do funcionamento do organismo, após esta produção, estas espécies são removidas pelo sistema de defesa. Este sistema de defesa envolve enzimas e moléculas não enzimáticas (FRIDOVICH, 1999; VALKO et al., 2007).

O estresse oxidativo é uma situação onde a produção de espécies reativas de oxigênio é excessiva, levando a um desequilíbrio fisiológico que pode resultar na destruição das defesas antioxidantes, promovendo a inutilização ou a inibição da função normal no organismo (LACHANCE; NAKAT; JEONG, 2001; MACHLIN; BENDICH, 1987). Normalmente, o processo de estresse oxidativo danifica lipídios, proteínas e DNA celulares (FU et al., 1998; RIDNOUR et al., 2005; VALKO et al., 2007).

Os radicais livres presentes no organismo humano são átomos ou moléculas que contenham elétrons desemparelhados em seu orbital, estes apresentam atividade aumentada, pois são quimicamente mais ativos, os radicais derivados de oxigênio são a espécie reativa de oxigênio (ROS) e são, portanto a classe mais importante produzida pelo organismo humano em grandes quantidades (GILBERT, 2000; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). Além de o ROS ser produzido por fatores fisiológicos normais, existem outros co-fatores ambientais como radiação, poluição e tabagismo, que levam também a formação de radicais livres resultando em estresse oxidativo, levando ao aparecimentos de várias doenças (SIZER; WHITNEY, 2003).

O estresse oxidativo deve ser prevenido assegurando que os níveis de antioxidantes e quelantes de radicais livres estejam em níveis adequados (FRIES et al.,1993).

Segundo Clarke (2009) a ação dos antioxidantes no organismo é proteger as células do estresse oxidativo. As moléculas e substâncias que apresentam efeitos antioxidantes podem desacelerar processos de oxidação levando o organismo, agora protegido, a uma maior longevidade. Portanto, é de extrema importância manter o equilíbrio entre o sistema de defesa e os radicais livres.

Para que o sistema fique em homeostase existem duas formas de captação e uso de radicais, uma é advinda de uma dieta rica em alimentos contendo os antioxidantes e outra do próprio organismo, através de um sistema de enzimas celulares, onde suas concentrações são equilibradas por herança genética. Estes sistemas enzimáticos são representados pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPH-Px), glutathione (GSH), e estes são as principais barreiras enzimáticas para a eliminação dos radicais livres (CADENAS,1997; FANG; YANG; WU, 2002; FERREIRA; MATSUBARA, 1997;VALKO et al.,2007).

A GSH é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. Concentrações baixas de GSH têm sido reportadas em algumas doenças, como a AIDS, e está associado ao maior risco de estresse oxidativo e da ocorrência de infecções oportunistas. Este decréscimo do GSH pode refletir o aumento na produção de antioxidantes, num grau que excederia a capacidade de detoxificação do GSH. O oxigênio é um gás indispensável para ciclo vital, mas pode causar danos ao nosso organismo uma vez que promove formação de radicais livres devido ao metabolismo das células (BARROS et. al.,2008; KITZBERGER, 2005).

A GSH apresenta as funções de quelante de radicais livres ($\text{HO}\cdot$, H_2O_2 , $\text{LOO}\cdot$ e $\text{ONOO}\cdot$), quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como co-factor de enzimas antioxidantes como a GSHPx e a GSH-T, entre outras. No processo de neutralização dos radicais livres, a GSH é oxidada com a formação do radical $\text{GS}\cdot$, este é rapidamente reativo com um segundo radical $\text{GS}\cdot$, formando a molécula

glutathione dissulfide (GS-SG), que não é antioxidante. A GS-SG é novamente reduzida a duas GSH pela enzima GPH-R. A GSH é utilizada para regenerar ao seu estado ativo, outras moléculas antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E. A capacidade da GSH para regenerar as moléculas antioxidantes mais importantes está ligada ao estado redox do par Glutathione dissulfide/Glutathione (GS GSSG/GSH) (PASTORE et al., 2003).

A presença de antioxidantes vinda de alimentos em nossa dieta diária assume um importante papel protetor, aliviando os efeitos deletérios dos oxidantes. Os fitoquímicos presentes em diversos produtos naturais são compostos bioativos, que são capazes de reduzir a ação dos oxidantes no organismo, e englobam carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina e licopeno); compostos fenólicos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides), estibenos, cumarinas e taninos; alcalóides; compostos azotados (derivados da clorofila, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados: (isotiocianatos e compostos de enxofre alílicos) (HALL; CUPPETT, 2007).

Várias drogas sintéticas, utilizadas para doenças crônicas, tem demonstrado serem indutoras de estresse oxidativo. Dentre estas drogas, destaca-se o metotrexato, para o qual estão sendo direcionados muitos estudos que possam proteger o organismo de seus efeitos deletérios (ATASHFARAZ; FAROKHI; NAJAFI, 2013; BOZKURT et al.; 2014; IBRAHIM et al., 2013).

1.4 Exposição materna ao metotrexato e avaliação toxicológica na gestação

O metotrexato (MTX) é amplamente utilizado em altas doses para o tratamento de doenças malignas, incluindo leucemia aguda na infância, leucemia linfocítica, osteosarcoma, linfoma, doença de Hodgkin, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão, câncer de mama, psoríase, coriocarcinoma e os tumores trofoblásticos relacionados. Apresenta alguma atividade imunossupressora em baixas doses. O metotrexato é um fármaco que possui as mesmas características do

ácido fólico apresentando efeito de antagonista competitivo, inibindo a síntese de DNA e a reprodução celular (PEREIRA et al., 2014; SEO et al., 2009).

A enzima dihidrofolato redutase (DHFR) é inibida pelo metotrexato, causando acúmulo intracelular de dihidrofolato. Este acúmulo provoca a inibição na síntese de purinas e timidilato. É específico para a fase S da divisão celular, capaz de inibir de forma irreversível a enzima dihidrofolato redutase. Esta inibição impede formação de tetraidrofolato, a partir de dihidrofolato. O tetraidrofolato é cofator necessário à transferência de átomos de carbono, essenciais para a síntese do DNA e do RNA. O metotrexato também age inibindo, de forma parcialmente reversível, a enzima timidilatosintetase, envolvida na proliferação celular (MARQUES, 2008).

O metotrexato (MTX) é um teratogênico potente quando utilizado em doses elevadas para o câncer ou para a interrupção da gravidez ectópica. Um agente teratogênico é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de deficiência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (DICKE, 1989; SMILTHELLS, 1980). O termo teratogenicidade provém do grego teratos, que significa monstro. O sentido original da palavra refere-se a malformações anatômicas macroscópicas, embora atualmente tenha se expandido sua definição para englobar anomalias mais sutis como atraso intra-uterino e distúrbios bioquímicos e psicomotores (LIMA et al., 2001).

A ação de um agente teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores, destacando-se: (1) estágio de desenvolvimento do conceito, (2) relação entre dose e efeito, (3) genótipo materno-fetal, e (4) mecanismo patogênico específico de cada agente (BERNARDI 1991; GERENUTTI; DE SOUZA-SPINOZA; SCHÜLER-FACCINI, 2002).

A exposição a altas doses ao MTX durante a gravidez está associada com a embriopatia do metotrexato, porém, há incerteza sobre o potencial teratogênico em doses reumatológicas, em especial, quando utilizado uma vez por semana, em baixas doses (WEBER-SCHOENDORFER et al., 2014). Com base em relatos de casos humanos de exposição, a embriopatia promovida pelo metotrexato tem sido

descrita com características que incluem déficit de crescimento, microcefalia, hipoplasia dos ossos do crânio, fontanelas amplas, craniossinostose coronal ou lambdoidal, ponte nasal larga, arcadas superciliares rasas, olhos proeminentes, orelhas de implantação baixa, hipoplasia maxilar, epicanto, membros curtos, pé torto congênito, hipodactilia e sindactilia. Esta síndrome pode ser associada com exposições entre 6 e 8 semanas após a concepção e níveis de dosagem de 10 mg/semana (FELDKAMP; CAREY, 1993; HYOUN; OBICAN; SCIALLI, 2012). Weber-Schoendorfer et al (2014), após estudo multicêntrico, sugeriram que o uso pós-concepção de doses reumatológicas de metotrexato (MTX) está associado com um risco aumentado de defeitos congênitos graves e aborto espontâneo e tal evidência não foi encontrada para o uso de pré-concepção.

Embora seu uso possua implicações importantes para o tratamento de doenças reumatológicas, mesmo em baixas doses, a segurança em mulheres em idade reprodutiva ainda é escassa (MARTIN et al., 2014).

Em modelos animais, nas doses correlacionadas à exposição materna em humanos (19.2 mg/kg/dia), o metotrexato promoveu anormalidades que incluem hidrocefalia, microftalmia, palatosquise, micrognatia, displasia vertebral e caudal, focomelia, hemimelia, sindactilia e ectrodactilia (HYOUN; OBICAN; SCIALLI, 2012).

1.5 JUSTIFICATIVA

A exposição a produtos naturais durante o processo de gestação é responsável por cerca de 1% dos problemas que envolvem o feto com relação a malformações. O risco teratológico existe durante todo período gestacional, no entanto é maior na fase de embriogênese, quando ocorrem a diferenciação tecidual e organogênese. (ARAUJO, 1998)

Para que um produto seja recomendável como alimento e/ou medicamento, suas propriedades biológicas devem ser bem conhecidas. Dependendo do material genético que o agente mutagênico atinge, as manifestações das mutações serão diferentes, podendo até ter efeitos deletérios. Quando a mutação ocorre nas células somáticas, há várias consequências, sendo as mais comuns a formação de tumores benignos ou malignos; a morte celular, que pode causar envelhecimento precoce; mal formações e abortos, durante o desenvolvimento embrionário. Entre os testes recomendados pelo US Food and Drug Administration (FDA), destacam-se os relacionados às atividades mutagênicas e antimutagênicas (FDA, 2013).

Os dados relacionados à mutagenicidade do cogumelo *Lentinula edodes*, Shiitake, assim como o da maioria dos cogumelos comestíveis são escassos e alguns resultados de experimentos realizados apresentam atividade mutagênica variável, isto pode ser atribuído a vários fatores, entre eles, a composição química dos cogumelos, que é dependente das variações geográficas, sazonais e intraespecíficas (GRUTER; FRIEDERICH; WURGLER, 1991; STERNER et al., 1982a, 1982b).

Sendo assim, estudos baseados em segurança de suplementos produzidos com cogumelos, em especial ao *Lentinula edodes*, tornam-se cada vez mais importantes (YOSHIOKA; TAMESADA; TOMI, 2010). Estes estudos podem auxiliar tanto o produtor quanto ao registro de um novo alimento, como podem garantir o consumo seguro pela população.

Por outro lado, ao se garantir a segurança da utilização do *Lentinula edodes* durante a gestação, o mesmo poderá ser utilizado com adjuvante na

exposição a agentes supostamente deletérios durante o período crítico do desenvolvimento do conceito, como é o caso do metotrexato (MTX).

2OBJETIVOS

2.1 Objetivogeral

Avaliar a segurança da exposição materna ao *Lentinula edodes* para uma possível prevenção aos efeitos deletérios do metotrexato durante o período de gestação.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração de glucanase de compostos fenólicos no *Lentinula edodes*.
- Comparar a capacidade reprodutiva de ratas expostas ao *Lentinula edodes*(0.4g/k/dia e 0.8g/kg/dia)ao metotrexato (0.20mg/kg/dia) e às associações entre estas drogas(0.4g/k/dia + 0.20 mg/kg/dia; 0.8g/kg/dia + 0.20 mg/kg/dia).
- Avaliar a toxicidade materna durante o período da gestação por meio de análises bioquímicas: transaminase alanina aminotrasnferase (ALT) e transaminase aspartato aminotransferase (AST), creatinina,ureia, glutationala reduzida (GSH) e catalase (CAT).
- Avaliar o desenvolvimento morfológico externo, visceral e ósseo de fetos provenientes de ratas expostas ao *Lentinula edodes* (0.4g/k/dia e 0.8g/kg/dia)ao metotrexato (0.20 mg/kg/dia) e às associações entre estas drogas (0.4g/k/dia + 0.20 mg/kg/dia; 0.8g/kg/dia + 0.20 mg/kg/dia) durante o período de gestação.

3Material e Métodos

3.1 *Lentinula edodes*

As amostras de cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) foram fornecidas pela Empresa Yuri Cogumelos, localizada na cidade de Sorocaba, São Paulo, sendo as mesmas produzidas pela própria empresa. A linhagem utilizada foi de origem japonesa adaptada no Brasil, pela empresa. A Figura 2 mostra a identificação das séries de linhagens considerando suas origens no Japão.

Figura 2- Linhagens de *lentinula edodes* identificadas por código



Fonte: Elaboração própria

3.2 Obtenção da amostra seca de *Lentinula edodes*

As amostras de cogumelo *in natura* foram picadas com faca de inox, em tamanhos homogêneos no mesmo dia da coleta e transporte para a universidade. Foram pesados 5 kg da amostra e colocadas em estufa com circulação de ar (marca Orion® 515) a temperatura de 50°C, por um período de aproximadamente 24h, onde a mesma permaneceu até alcançar concentração de 5 a 15% de massa seca. Após o período foram pesadas as amostras (secas) várias vezes até que a mesma apresentasse o mesmo peso médio por três vezes. O rendimento foi de 445.14g de amostra seca. A amostra seca foi moída (moinho de facas e martelo marca

Marconi®), em seguida tamisada em tamises (malha 50 e malha 60), com a finalidade de obtenção de partículas homogêneas para serem suspendidas em água. O rendimento final foi de 105.30g de amostra seca tamisada (2.106%). O pó tamisado foi acondicionado em embalagens plásticas herméticas mantidas em dessecador.

3.3 Dosagens de glucanas e de compostos fenólicos

Para as dosagens de glucana e compostos fenólicos, foram utilizados 15 g de *Lentinula edodesseco* e tamisado.

3.3.1 Determinação de glucanas

A determinação de glucanas foi realizada em duplicata, pelo método da “Foundation of Japanese Food Analysis Center” (1980) modificado por Prosky et al. (1988). O método analítico é oficial japonês e consiste em hidrólises enzimáticas e químicas.

Duas alíquotas de 1g cada foram depositadas em frasco de Erlenmeyer (500 mL), com 50 mL de tampão fosfato 80 mM (pH 6.0). Logo em sequência, a solução foi tratada com 0.1mL da enzima α -amilase termostável Termamyl (Novo Nordisk®) e incubada por 30 min em banho-maria (60°C); após, inseriu-se 0.1 mL protease neutra bacteriana (Novo Nordisk®), o pH de 7.5 foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH 25 mM), e a solução foi incubada por 30min em banho-maria (60°C); em continuidade, adicionou-se 0.3 mL de amiloglicosidase AMG (Novo Nordisk®), pH de 4.5 foi ajustado com ácido clorídrico (HCl 75mM), e a solução foi incubada em banho-maria por 30min (60°C).

Terminado o tratamento enzimático, 200 mL de solução de álcool etílico a 95% foram adicionados às amostras, os balões volumétricos foram mantidos em banho-maria por 60 min. (60°C), após resfriamento, o excesso de álcool do sobrenadante foi retirado por sucção, até que sobrassem as fibras insolúveis precipitadas no balão; estas fibras precipitadas foram separadas por centrifugação em centrífuga da marca Eppendorf® 5804R (20000g /10 minutos). Os precipitados

desta centrifugação foram lavados com solução de álcool etílico e acetona a 80%, este procedimento foi realizado por 3 vezes. Após evaporação em capela, do álcool etílico e da acetona, ao precipitado foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 72%) e os balões volumétricos foram incubados a temperatura ambiente por 4h, para hidrólise das fibras compostas de glucanas.

Em seguida a este processo de digestão foram acrescentados aos balões 140 mL de água destilada, estes foram incubados em banho-maria em ebulição por 2h. Terminado o período de incubação, o pH foi ajustado para 7.0 com hidróxido de sódio (NaOH 5M), o volume foi completado para 300mL. As duplicatas foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 5B, e a quantidade de glicose foi determinada pelo método enzimático com leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 505 nm, utilizando-se 1.0 mL do composto 4-aminofenazona (0.025mol/L)/fenol (0.055mol/L), na presença de glicose oxidase (1 U/mL) e peroxidase (0.15 U/mL) (Laborlab Ltda).

A concentração de glucanas presente nos cogumelos em base seca foi calculada através da equação matemática:

$$\text{Glucana (g/100g)} = \text{Glicose (g/100g)} \times 0.9$$

Onde: 0.9 = fator de correção

3.3.2 Determinação de compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos foi realizada em triplicata segundo o método descrito por Scalbert et al. (1989) de acordo com as modificações realizadas por Ramirez-Anguiano et al. (2007). Três alíquotas de 1g foram acondicionadas em cubetas de vidro, as quais se adicionou 10 mL metanol 80%, agitando-se em agitador de tubos Vórtex® (2 min.), e deixando-se o solvente em contato com a amostra por 12h. Em seguida, centrifugou-se em centrifuga Empendorr® 5804R (10000 rpm/ 8 minutos), coletou-se 0.5 mL do sobrenadante, e acrescentou-se 2.5 mL de folin-Ciocalteu (10%) com 2 mL de Na_2CO_3 (7.5%) deixando em contato por

30min a T ambiente . O método baseia-se na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, reagente proveniente da mistura de dois ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, onde, na presença de compostos fenólicos observa-se alteração de coloração do amarelo ao azul (Figura 3); durante a reação na presença de fenóis ocorre à formação de complexo de coloração azul (reação redutor) e a intensidade é dada em relação à concentração de grupos hidroxilas extraídas das amostras analisadas(ANGELO; JORGE, 2007; OLIVEIRA et al., 2009).A leitura da absorbância da solução foi realizada em espectrofotômetro (760 nm). O ácido gálico foi utilizado como padrão de referência para dosagens de compostos fenólicos no *Lentinula edodes*, pois apresenta alta qualidade de materialização da medida e melhor incerteza (FIDELIS, 2006).

Figura 3-Comprovação da presença de compostos fenólicos (Método: Folin-Ciocalteu)



Fonte: Elaboração própria

3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 160-180 gramas. Todos os animais foram adquiridos no biotério da Anilab-Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda, possuem laudo de saúde (ANEXO C). Os experimentos foram realizados de acordo com o “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal” (National Research Council, 1996) and “European Community guidelines” (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Todos os procedimentos foram aprovados pela CEUA- UNISO sob protocolo nº 007/2012(ANEXO A). Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação da

Uniso, alojados em gaiolas plásticas medindo 40X60X20, com tampas metálicas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. O peso dos animais foi registrado diariamente.

3.4.1 Acasalamento e prenhez

Para o acasalamento, os animais foram alojados no máximo 02 machos com 05 fêmeas, por um período noturno de 12 horas. Por meio de observações microscópicas, a indicativa do primeiro dia da prenhez foi à presença de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal (DAMASCENO et al., 2008).

3.5 Administração das drogas

As concentrações de *Lentinula edodes* utilizadas para este estudo foram eleitas considerando-se o consumo de cogumelos na China (10 kg/70 kg/ano). Assim, a dose administrada aos ratos foi selecionado com base nas doses de referência (RFD) normalmente calculadas a partir de valores (NOAEL) Nível de efeito adverso não observado, dividindo pela incerteza (10) e os fatores de modificação (10) ($RFD = NOAEL/100$), o que significa exposição de 400 mg/kg/dia. Finalmente, foram propostos doses de 400 e 800 mg / kg de peso corporal do rato. (MENDONÇA, 2005).

Os animais, após a confirmação da prenhez foram alojados em número de dois animais por gaiola e divididos em 06 grupos de seis animais: grupo 1 (grupo controle), grupo SI (0.4 g/kg/dia de *Lentinula edodes*), grupo SII (0.8 g/kg/dia de *Lentinula edodes*), grupo MTX (0.20 mg/kg/dia de metotrexato), grupo SIMTX (0.4 g/kg/dia de *Lentinula edodes* + 0.20 mg/kg/dia de metotrexato), grupo SIIMTX (0.8 g/kg/dia de *Lentinula edodes* + 0.20 mg/kg/dia de metotrexato).

- As concentrações de 0.4 g/kg/dia e 0.8 g/kg/dia de *Lentinula edodes* foram preparadas diariamente, por diluição em água purificada (aparelho MilliQ®, pH 7.0); a administração foi por via oral, com auxílio de agulha de gavagem. A administração diária do *Lentinula edodes* (os

grupos SI, SII, SIMTX e SIIMTX) foi realizada do primeiro ao vigésimo dia de prenhez, sempre às 8:00 horas, por via oral.

- As concentrações de 0.20 mg/kg/dia de metotrexato (lote 12123921C, Pharnostra) foi manipulada em farmácia magistral, em solução com água bidestilada (processo de osmose reversa), acondicionadas em frasco âmbar revestido com alumínio, mantidas em refrigeração, por um período máximo de 15 dias (estabilidade garantida pelo fornecedor após ressuspensão). A administração diária do metotrexato (os grupos MTX, SIMTX, SIIMTX) foi realizada do quarto ao nono dia de prenhez devido ser o período de desenvolvimento celular, sempre às 8:00 horas, por via oral.

3.6 Avaliação da toxicidade materna

No vigésimo primeiro dia de prenhez as ratas foram anestesiadas com quetamina (anestésico geral na dose de 30 mg/kg - intramuscular) e o cloridrato de xilazina (relaxante muscular na dose de 6mg/kg). Para a avaliação da toxicidade materna foram avaliados os parâmetros bioquímicos e parâmetros de capacidade reprodutiva.

3.6.1 Avaliação bioquímica

Para a avaliação bioquímica das ratas prenhes foram analisados os seguintes parâmetros sanguíneos: estresse oxidativo, função renal e função hepática. O volume de sangue coletado por punção venosa (hepática) em seringa previamente heparinizada, foi de 3 a 5 mL. Este sangue foi imediatamente transferido para tubo com anticoagulante EDTA. Deste tubo, uma alíquota de 500 µL foi transferida para tubo tipo Eppendorf®, e armazenada em freezer a -80°C. O restante do sangue foi centrifugado em centrífuga de bancada refrigerada, SORVALL®, Modelo ST 16R (10 min, 4000 rpm), o plasma foi utilizado para análises bioquímicas.

Para os parâmetros de estresse oxidativo foram analisadas as concentrações de glutatona reduzida (GSH), e atividade da enzima catalase no sangue das ratas prenhes; para os parâmetros de função renal foram dosadas a creatinina e a ureia;

para os parâmetros de função hepática foram dosadas as transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As avaliações renais e hepáticas foram realizadas por kits no Equipamento Cobas C111 (Roche®).

3.6.1.1 Determinação da glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da GSH se deu por quantificação dos tióis totais, em leitora de placas, com detecção visível, baseada no método de Ellman (1959). Para isso, 150 µL do sangue ratas prenhez coletos na cesaria, sempre mantido em banho de gelo, foram hemolisados com 100 µL de Triton X-100 a 10% e precipitados com 100 µL de ácido tricloro acético (TCA) a 30%. As amostras foram centrifugadas a 4°C em centrífuga de bancada refrigerada, SORVALL®, Modelo ST 16R (10 min, 4000 rpm), e os sobrenadantes separados. Após, 50 µL de cada sobrenadante foi diluído em 900 µL de tampão fosfatos e reagiram com 50 µL de 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando um complexo amarelo. A leitura foi realizada em seguida em Leitora Automática de Microplacas TECAN®, modelo INFINITE M200 PRO (412 nm). Os resultados estão expressos em mol/mL sangue.

3.6.1.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS utilizando método de Aebi (Aebi, 1984). O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela catalase, ao longo do tempo, monitorado a 240 nm. Para tanto, primeiramente o sangue foi diluído em tampão fosfato de potássio (10 µL de sangue + 590 µL de tampão). Após, uma alíquota de 20 µL deste sangue diluído foi misturado a 1.910 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7.0) e 70 µL de H_2O_2 foi adicionado, dando início à reação. As mudanças na absorbância foram monitoradas por cinco minutos (Espectrofotômetro da marca FEMTO®, modelo 800XI). Uma constante de variação (κ), relacionada com a hemoglobina (Hb), auxilia na expressão dos valores da atividade no sangue (κ /gHb).

A dosagem Hb foi feita pelo Kit Comercial de Hemoglobina Bioclin®, baseado na metodologia da cianometahemoglobina. Em tubo de ensaio foram colocados 1 µL sangue e 2 mL de reagente de cor do kit Bioclin®, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (FEMTO®, modelo 800XI) em comprimento de onda 540 nm; para

cada análise foram preparados, diariamente, em triplicata, os padrões do kit Bioclin®. Os resultados Hb para posterior análise de GSH foram calculados pela fórmula:

$$\text{Hb} = \text{absorbância do teste} / \text{absorbância do padrão} \times 10$$

Onde: 10 = fator de correção

3.6.1.3 Determinação da transaminase aspartato aminotransferase (AST), transaminase alanina aminotransferase (ALT), creatinina e da ureia.

Para as dosagens de transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), creatinina e ureia utilizaram-se o plasma. Todas as dosagens foram realizadas em equipamento automatizado COBAS C111 (Roche®), por meio de kits específicos para este equipamento: ALTL, ASTL, CREJ2 e UREAL (Roche®).

O teste de ALTL (Roche®) tem como princípio a catalisação da reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato. O piruvato formado é reduzido por NADH numa reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e NAD^+ . O ASTL na amostra catalisa a transferência de um grupo amino entre L-aspartato e 2-oxoglutarato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato com NADH na presença de malato desidrogenase (MDH), formando NAD^+ . A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional às atividades catalíticas de ALT e AST, determinada medindo a diminuição da absorbância. Ambos os testes possuem um intervalo de medição de 200-700 U/L e o comprimento de onda utilizado é de 340/378 nm

O teste de creatinina – CREJ2 (Roche®) baseia-se no método de Jaffé, através de um ensaio colorimétrico cinético. Numa solução alcalina a creatinina forma um complexo amarelo-avermelhado com picrato. A taxa de formação do corante é proporcional à concentração de creatinina na amostra. O intervalo de medição do teste é de 0,2-12,4 mg/dL e o comprimento de onda é de 512/583 nm.

O princípio do teste da ureia– UREL (Roche®) é cinético e baseia-se em duas reações. Primeiramente a ureia é hidrolisada pela urease, dando origem a amônia e carbonato. Na segunda reação, o 2-oxoglutarato reage com amônia na presença de glutamato desidrogenase (GLDH) e da coenzima NADH, dando origem a L-glutamato. O NADH é oxidado a NAD, a taxa de diminuição da concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra. O teste possui um intervalo de medição de 3,0-240 mg/dL e utiliza como comprimento de onda 340/409 nm.

O COBAS C111 foi desenvolvido para laboratórios de pequeno porte, possui um rendimento de 60 a 85 testes/hora, apresenta como princípio de medição a fotometria de absorbância, utiliza doze comprimentos de onda e realiza medição monocromática e bicromática.

OCfas (*Calibrator for automated systems*, Roche®) foi utilizado para realizar a calibração dos reagentes; o controle de qualidade para a monitorização da exatidão e precisão dos métodos quantitativos foi realizado empregando-se, antes do início das análises, o reagente *Precinorm U plus*. Os reagentes dos kits foram inseridos no disco refrigerado próprio para reagentes; o segmento de cubetas foi inserido no anel interno; as amostras foram cadastradas no equipamento e o pedido foi definido. Foram colocados 300 uL de plasma no *cup* de amostra e o mesmo foi inserido na área de amostras, que tem capacidade de oito amostras por vez. O equipamento verifica a qualidade da cubeta, pipeta os reagentes e as amostras, incuba e inicia as medições. Os resultados foram calculados pelo equipamento com base nos resultados de medição fotométrica que determinaram a quantidade de absorbância no fluído.

3.7 Avaliação da capacidade reprodutiva

Para a avaliação da capacidade reprodutiva, as ratas foram cesariadas, com uma incisão longitudinal na linha alba para exposição do útero e dos ovários. O útero e os ovários foram retirados. O útero foi inspecionado quanto ao número de fetos, de implantações e reabsorções visíveis (Figura4). Os ovários, os fetos e as placentas

foram pesados. Foi verificada a vitalidade fetal, por meio de um leve estímulo mecânico com a ponta do dedo indicador. Os corpos lúteos foram contados (DAMASCENO et al., 2008).

Figura 4 - Útero retirado de ratas para avaliação da capacidade reprodutiva.



Fonte: Elaboração própria

Os fetos foram sacrificados com halotano (1%) em câmara fechada. A capacidade reprodutiva das fêmeas foi calculada por meio das fórmulas:

$$\text{Porcentagem de Perdas Pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ implantações}}{\text{n}^\circ \text{ corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{Porcentagem de Perdas Pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

3.8 Avaliação do desenvolvimento do conceito

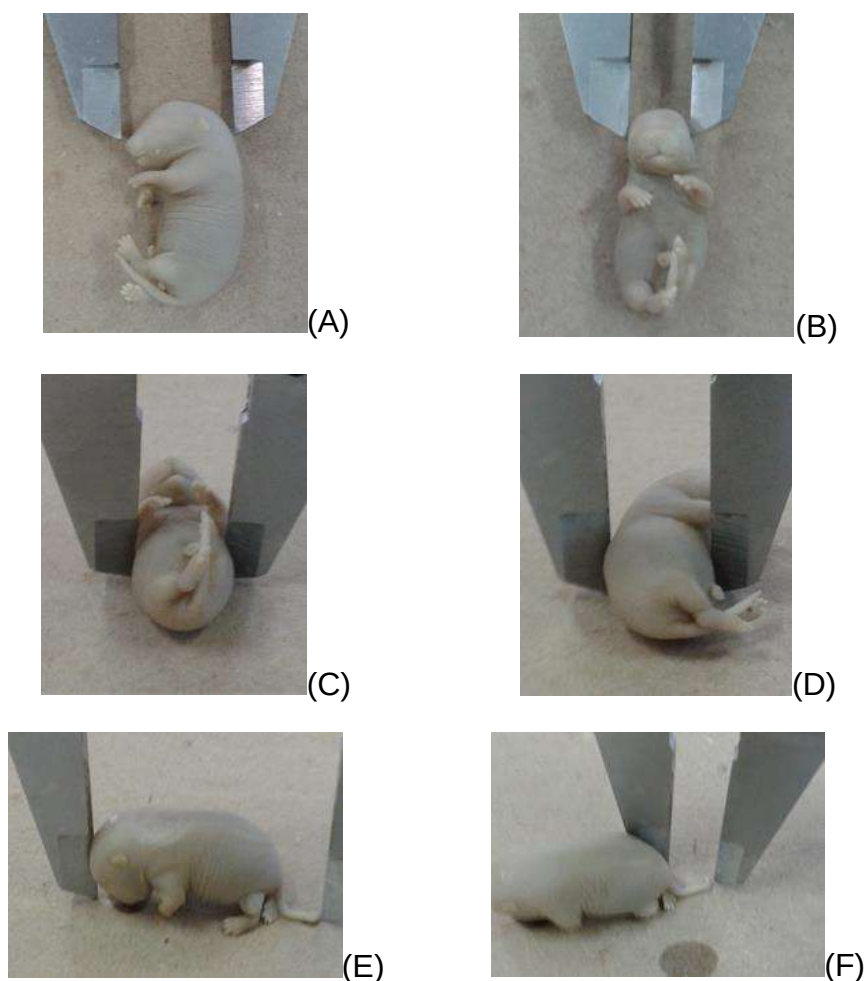
Para as análises desenvolvimento do conceito, todos dos fetos foram analisados segundo os parâmetros: avaliação morfológica externa, avaliação visceral, avaliação morfológica óssea. (GERENUTTI et al.; 2006)

3.8.1 Avaliação morfológica externa e visceral de fetos

Após a pesagem, 50% dos fetos de cada fêmea foram fixados em líquido de Bodian. A solução fixadora de Bodian consiste em 148 mL de água destilada, 50 mL de formaldeído, 50 mL de ácido acético glacial e 752 mL de álcool etílico a 95%. Os fetos foram colocados em vidro com tampa de rosca contendo a solução, e as análises foram realizadas no prazo máximo de 15 dias após a fixação. (DAMASCENO et al., 2008).

As seguintes medidas externas foram determinadas com o auxílio de um paquímetro: antero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, antero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal, cauda (Figura 5).

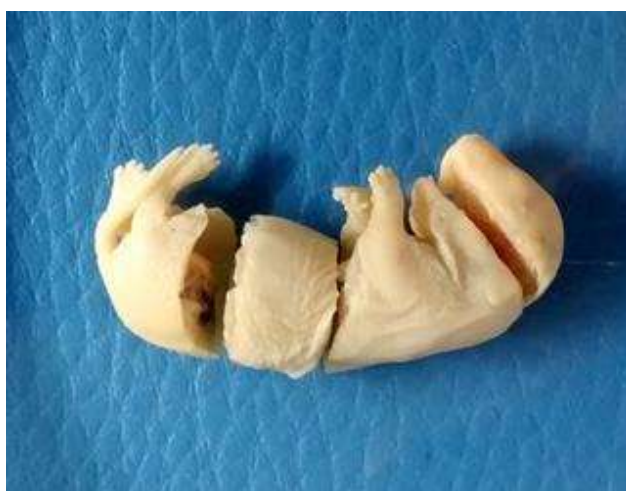
Figura 5- Avaliação morfológica externa de fetos fixados em Bodian: medidas realizadas com paquímetro.



Legenda: (A) Antero-posterior do crânio; (B) latero-lateral do crânio; (C) latero-lateral do tórax; (D) antero-posterior do tórax; (E) crânio-caudal; (F) cauda. Fonte: Elaboração própria

Os fetos destinados às avaliações viscerais foram separados em dois grupos: um grupo foi analisado segundo os cortes de Wilson (Figura 6) e o segundo grupo foi analisado seguindo as técnicas de toracotomia e microsecção. As avaliações viscerais foram realizadas com o auxílio de estereomicroscópio com iluminação direta (Olimpus®), seguindo-se uma sequência padronizada. As informações obtidas foram descritas e armazenadas em protocolo para posterior análise (DAMASCENO et al., 2008).

Figura 6- Sequência de cortes de Wilson realizada nos fetos após fixação em Bodian.



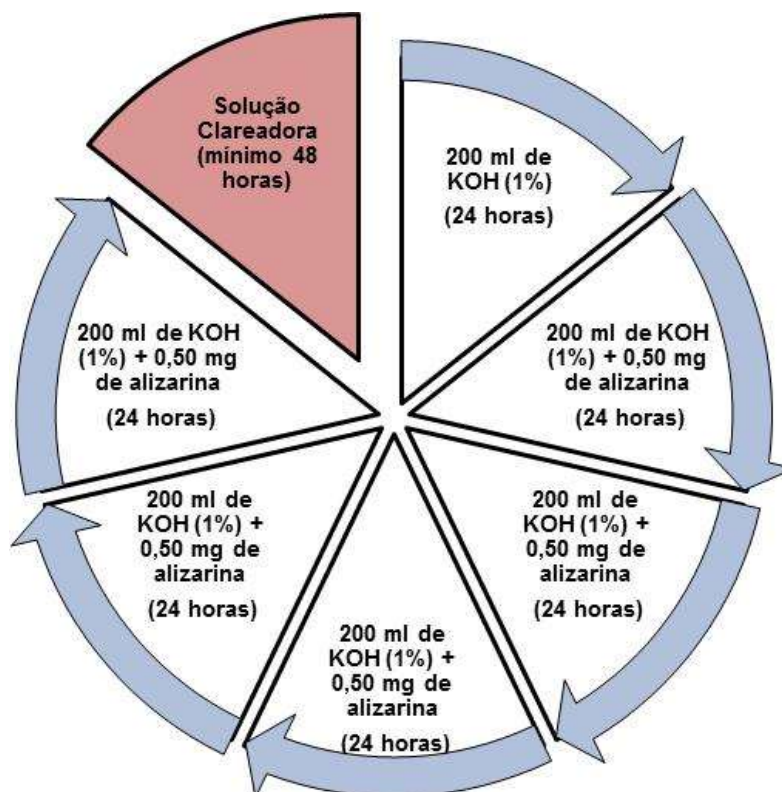
Fonte: Elaboração própria

3.8.2 Avaliação morfológica óssea de fetos.

A avaliação morfológica óssea foi realizada pelo processo de evisceração e diafanização, com observação em estereomicroscópio (Olympus®, 66X) e fonte auxiliar de luz.

Os fetos destinados à análise esquelética permaneceram em solução de acetona pura (Merck®), em vidro com tampa de rosca, por período de 24 horas. Em cada feto foi realizado, um corte transversal abaixo das costelas e cortes oblíquos dos lados direito e esquerdo até a região anal, formando um triângulo. O intestino, as vísceras abdominais, o diafragma e as vísceras torácicas foram retirados com o auxílio de pinça de ponta fina. Após a evisceração, os fetos foram submetidos ao processo sequencial diafanização e coloração com alizarina red-S (Figura 7).

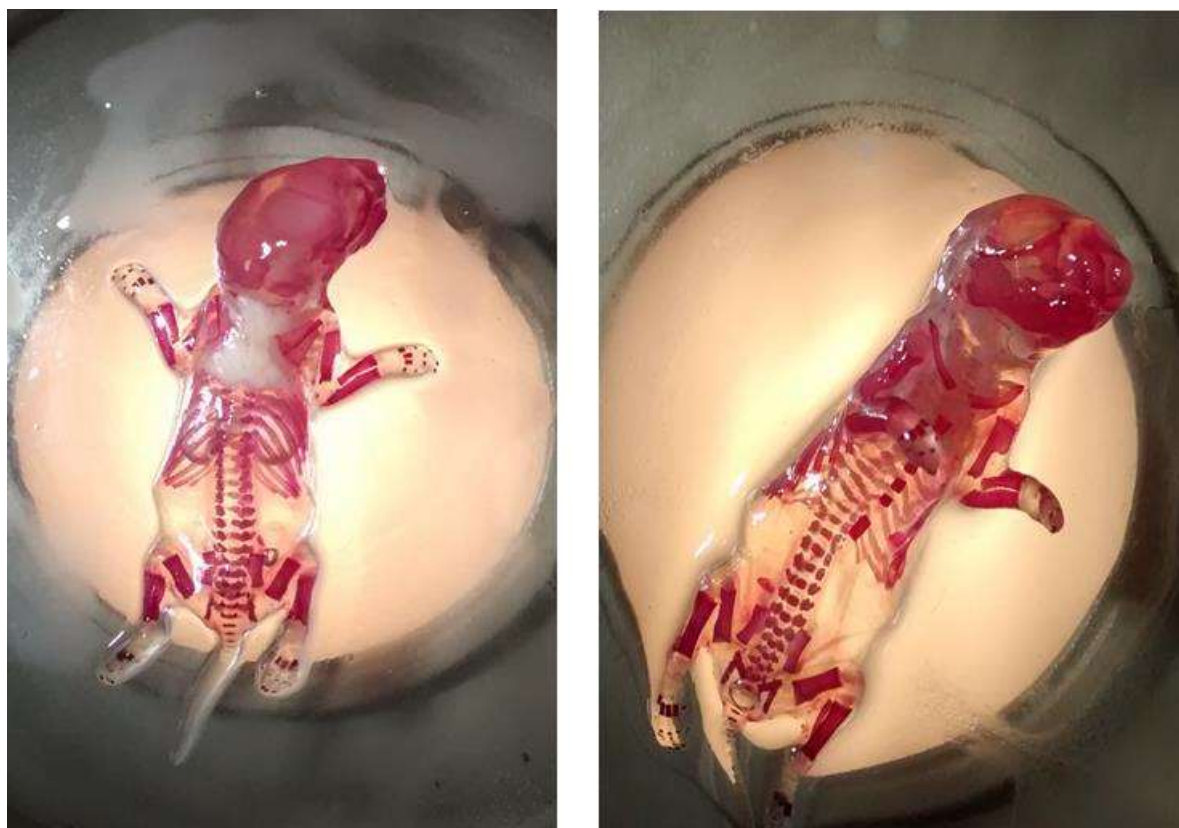
Figura 7-Etapas do processo de diafanização e coloração de fetos para a análise óssea.



Fonte: Elaboração própria

A diafanização é alcançada com a maceração dos tecidos moles (pele e musculatura) pelo hidróxido de potássio (KOH) a 1% em água destilada; o clareamento foi realizado com a solução clareadora, constituída por uma parte de álcool benzílico, duas partes de glicerina e duas partes de etanol absoluto. A alizarina red-S foi empregada para visualizar o esqueleto (Figura 8), pois se fixa nos locais em que houve deposição de cálcio, corando os ossos de vermelho (DAMASCENO et al., 2008). O esqueleto foi examinado sistematicamente, da cabeça à cauda.

Figura 8- Feto diafanizado para avaliação morfológica óssea.



Vista Dorsal

Vista Frontal

Fonte: Elaboração própria

3.9 Análise Estatística

Para a análise dos resultados foi utilizado o nível de significância entre 1 e 5%. O teste de Bartlett foi usado para avaliar a homocedasticidade (erros devem ter variância constante, representado por valores de F) dos dados; a análise de variância Anova para dados paramétricos, seguida do teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas em todos os experimentos realizados. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparações não paramétricas, em porcentagens. Para as análises foi utilizado o programa GraphPad InStat.

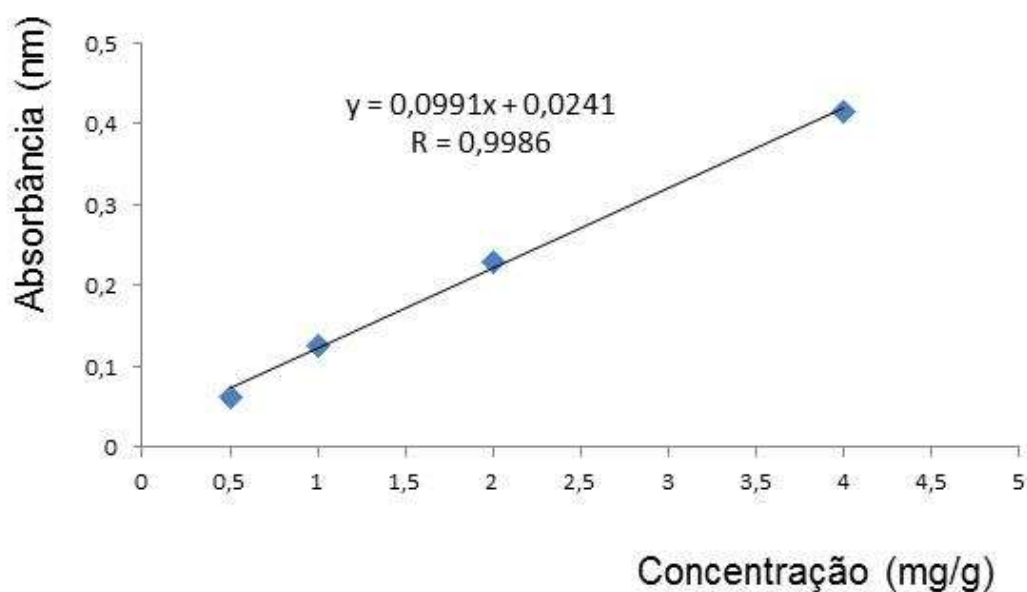
4 RESULTADOS

4.1 Teores de glucanas e de compostos fenólicos no *Lentinula edodes*

O *Lentinula edodes* analisado apresentou nas amostras estudadas 0.53 g glucanas/ 100g de glicose de cogumelo seco.

A curva analítica (Figura9) foi construída nas concentrações entre 0.5 a5 mg de ácido gálico por g de amostra seca, seguindo a metodologia adaptada da Farmacopeia Portuguesa(2002). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/grama de amostra em base seca.

Figura 9- Curva analítica do ácido gálico usado para quantificação de compostos fenólicos no *Lentinula edodes*.



A concentração de compostos fenólicos na amostra de *Lentinula edodes* foi de 2.4mg/g.

4.2 Efeitos da exposição ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações sobre toxicidade materna.

4.2.1 Avaliação do ganho de peso de ratas prenhes

O ganho de peso dos animais foi considerado em dias intercalados (1-3 dias de gestação: $F = 1.656$, $p \geq 0.05$; 4-6 dias de gestação: $F = 2.984$, $p \leq 0.05$; 7-9 dias de gestação: $F = 9.144$, $p \leq 0.0001$; 10-12 dias de gestação: $F = 37.555$, $p \leq 0.0001$; 13-15 dias de gestação: $F = 5.721$, $p \leq 0.05$; 16-18 dias de gestação: $F = 33.393$, $p \leq 0.0001$; 19-21 dias de gestação: $F = 55.683$, $p \leq 0.0001$). Os resultados (Tabela 3) obtidos indicam que o *Lentinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia possui uma tendência em promover um aumento no ganho de peso quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). O metotrexato, conforme o esperado promoveu uma redução do ganho de peso, tanto quando comparado ao grupo controle quanto aos grupos que receberam o *Lentinula edodes* (0.4 e 0.8 g/kg/dia). Por outro lado pode-se observar que no grupo onde houve a associação entre metotrexato e *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, esta redução do ganho de peso persistiu. Entretanto, quando da associação entre metotrexato e *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, inicialmente observa-se que ocorre uma reversão da redução do ganho de peso comparada ao grupo exposto ao metotrexato, e esta reversão estende-se até o 12º dia de gestação; após este período, esta associação entre metotrexato e *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia torna-se altamente prejudicial ao ganho de peso das gestantes reduzindo este parâmetro.

Tabela 3- Ganho de peso (gramas) de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.

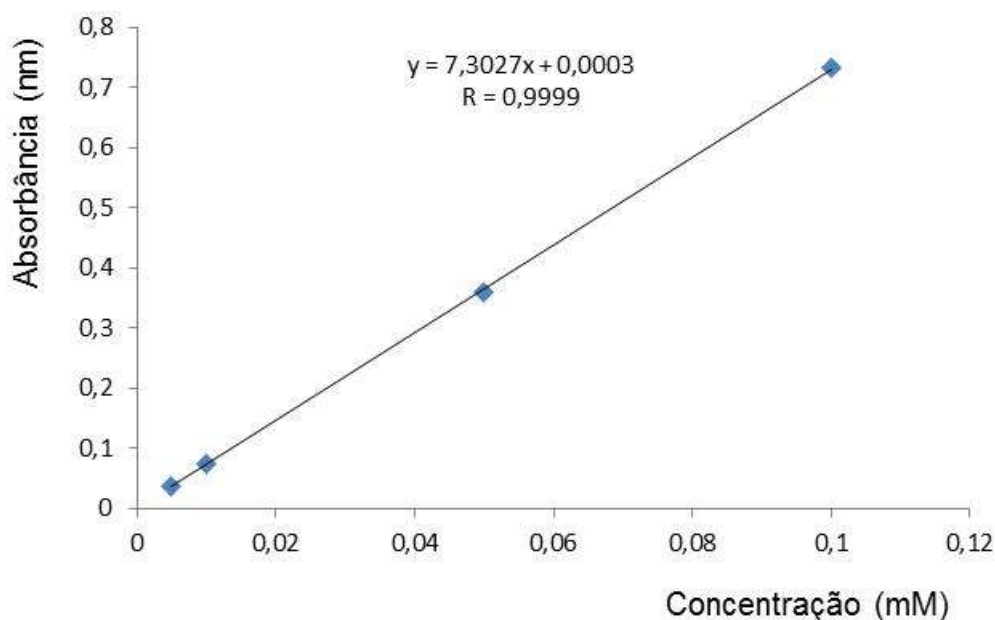
Dias de gestação	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
1-3	7.66±2.65	7.83±2.60	10.00±3.84	9.00±3.63	11.80±3.40	10.83± 1.47
4-6	9.00± 1.54	8.33± 2.87	7.66± 2.73	9.00±1.63	3.20± 2.77 ^{*c}	7.33± 1.26
7-9	9.33±1.82	9.33± 1.96	10.83± 2.35	5.50±1.39 ^{*ab}	5.80±1.16 ^{*ab}	7.33± 1.44
10-12	8.16± 1.15	10.83± 1.48 [*]	10.83± 1.06 [*]	5.33±1.43 ^{*ab}	2.00± 1.77 ^{*abc}	9.33± 1.34 ^{cd}
13-15	9.33± 1.33	10.33±1.88	7.50±1.81	10.00± 2.50	8.60 ±1.88	5.50± 1.46 ^{*ac}
16-18	10.50±2.46	19.33± 2.09 [*]	18.00±2.94 [*]	9.500± 2.43 ^{ab}	9.20±2.90 ^{ab}	4.16± 1.62 ^{*abcd}
19-21	21.66±4.45	24.66±3.15	19.50± 2.29 ^a	10.83± 2.17 ^{*ab}	10.80± 2.96 ^{*ab}	1.33± 0.80 ^{*abcd}

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0,4 g/kg/dia, (SII) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato. *Comparação do grupo controle ($p \leq 0.05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX

4.2.2 Avaliação bioquímica materna

Para a avaliação da concentração de GSH foi construída a curva analítica nas concentrações entre 0.005 mM e 0.1 mM de glutathiona reduzida, seguindo também a metodologia de Ellman (1959). Esta curva de calibração da GSH está representada na Figura 10.

Figura 10-Curva da glutathiona reduzida (GSH) utilizada para avaliação de estresse oxidativo em sangue de ratas prenhes.



As determinações da GSH e da CAT no sangue das ratas prenhes estão indicadas na Tabela 4. Com relação à atividade da CAT, não foi observada diferença entre todos os grupos analisados ($F = 0.8904$, $p \geq 0.05$). Por outro lado, com relação à concentração de GSH, uma diminuição no seu nível foi observada somente no grupo que recebeu a maior concentração de *Lentinula edodes* (0.8 g/kg/dia). Nos grupos que receberam metotrexato e no grupo que recebeu a associação entre metotrexato e *Lentinula edodes* (0.8 g/kg/dia) a concentração de GSH se elevou quando comparada ao grupo controle; todos os grupos expostos ao metotrexato, associado ao *Lentinula edodes* ou não associado, tiveram um aumento de GSH quando comparados aos grupos que receberam apenas o *Lentinula edodes* ($F = 36.449$, $p \leq 0.0001$).

Tabela 4-A análise dos parâmetros antioxidantes CAT (catalase) e GSH (glutathiona reduzida) em sangue das ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações duranteo período de gestação.

Análise	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
CAT (k/gHb)	86.97±24.36	92.69±23.40	81.54± 26.22	71.48±16.39	82.60±37.05	63.76±31.90
GSH (μmol/mL)	0.37± 0.06	0.21± 0.04 ^{cd}	0.17± 0.06 ^{*cd}	0.72±0.10 ^{*abd}	0.44± 0.13 ^{abc}	0.57± 0.09 ^{*ab}

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII)*Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes*0.8 g/kg/dia + metotrexato. *Comparação do grupo controle (p≤ 0.05, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX

A Tabela 5 apresenta as dosagens bioquímicas da AST, da ALT, da creatinina, e da ureia de ratas do 21º dia de gestação. Os resultados obtidos indicam que houve uma redução dos níveis de ASTL para todos os animais dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle ($F= 6.894$, $p \leq 0.001$). Entretanto, as dosagens de ALT apresentaram redução apenas nos grupos expostos ao metotrexato e nos grupos onde houve a associação entre o metotrexato com *Lentinula edodes* (doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia), quando comparados ao grupo controle e aos grupos expostos somente ao *Lentinula edodes* ($F= 14.765$, $p \leq 0.0001$).

As dosagens de creatinina mostraram-se reduzidas apenas nos grupos expostos ao *Lentinula edodes* na dose de 0.8 g/kg/dia e associação entre metotrexato e *Lentinula edodes* na dose de 0.4 g/kg/dia quando ao grupo controle ($F= 2.860$, $p \leq 0.05$). Por outro lado, as dosagens de ureia encontram-se reduzidas para todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle ($F= 4.319$, $p \leq 0.001$).

Tabela 5-Análise bioquímica dos parâmetros:transaminase alanina aminotrasnferase (ALT),transaminase aspartato aminotransferase (AST), creatinina (CREJ2) e ureia(UREL) realizadaem sangue de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associaçõesdurante o período de gestação.

Testes	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
ASTL(U/L)	105.93± 19.46	78.31± 13.56*	64.30± 12.25*	68.70± 14.42*	68.06± 14.94*	74.23± 7.93*
ALT (U/L)	69.87 ± 2.84	68.93 ± 2,05	68.53 ± 3.88	58.98 ± 3.53 ^{*ab}	59.06 ± 3.74 ^{*ab}	63.13 ± 2.83 ^{*a}
CREJ2 (mg/dL)	0.32 ± 0.04	0.27 ± 0.09	0.22 ± 0.07*	0.26 ± 0.03	0.22 ± 0.03*	0.24 ± 0.04
UREL (mg/dL)	57.70± 2.25	45.18± 6.65*	47.75± 6.0*	45.21± 4.9*	47.73± 5.53*	46.46± 6.84*

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII)*Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes*0.8 g/kg /dia + metotrexato. *Comparação do grupo controle ($p \leq 0.05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX

4.2.3 Avaliação da capacidade reprodutiva

O desempenho reprodutivo de ratas foi avaliado pela porcentagem de perdas pré e pós-implantação; o quadro 1 mostra os parâmetros utilizados para o cálculo das perdas.

Quadro 1- Parâmetros utilizados para o cálculo de perdas pré-implantação e perdas pós-implantação de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações durante o período de gestação,

Parâmetros	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
Corpos lúteos	65	68	72	86	58	80
Implantações	60	66	69	69	51	75
Fetos	60	65	55	25	23	3

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato.

A Tabela 6 mostra os efeitos da exposição ao *Lentinula edodes* e ao metotrexato, isoladamente ou em associação sobre a porcentagem de perdas pré e pós-implantação.

Os resultados encontrados mostram que *Letinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia reduziu as perdas pré-implantação quando comparadas ao grupo controle. O metotrexato aumentou as perdas pré-implantação quando comparado aos grupos controle e *Lentinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia; entretanto, na associação do metotrexato ao *Lentinula edodes* (0.4 g/kg/dia) observa-se uma redução desta perda, porém esta ainda permaneceu maior quando comparada ao grupo controle e aos grupos expostos apenas ao *Lentinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia. Por outro lado, na associação do metotrexato ao *Lentinula edodes* (0.8 g/kg/dia) observa-se uma redução desta perda promovida pelo metotrexato ou na associação com *Lentinula edodes* (0.4 g/kg/dia). Porém as perdas causadas neste

grupo, embora não difiram das do grupo controle, são maiores do que as perdas de ratas expostas ao *Lentinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia.

Quanto às perdas pós-implantação, o metotrexato conforme o esperado promoveu um aumento deste parâmetro, porém em associação com o *Lentinula edodes* na dose de 0.4 g/kg/dia, apresentou uma redução neste parâmetro. Por outro lado, na associação metotrexato com *Lentinula edodes* na dose de 0.8 g/kg/dia, ocorreu um aumento acentuado desta perda. Observa-se ainda, que o *Lentinula edodes* na dose de 0.8 g/kg/dia, também promoveu aumento de perdas pós-implantação quando comparado ao grupo controle.

Tabela 6- Desempenho reprodutivo de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.

Porcentagem	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
Perdas pré-implantação	7.69	2.94*	4.16*	19.76* ^{ab}	12.06* ^{ab}	6.25 ^{abcd}
Perdas pós-Implantação	0	1.51	20.28* ^a	63.76* ^{ab}	54.90* ^{ab}	96* ^{ab}

Nota; Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato.*Comparação do grupo Controle ($p \leq 0.05$, Teste do Qui-quadrado); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX.

4.3 Efeitos da exposição ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato às associações sobre o desenvolvimento do concepto

A Tabela 7 mostra que houve uma redução de peso de fetos e para todos os grupos quando comparados ao grupo controle ($F= 85.231$, $p \leq 0.0001$). Este efeito foi mais expressivo quando o *Lentinula edodes* nas doses de 0.4 e 0.8 g/kg/dia está associado ao metotrexato. O peso da placenta somente encontra-se reduzido quando da associação do *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia ao metotrexato ($F= 3.461$, $p \leq 0.001$). Por outro lado, não foi observado redução na vitalidade fetal, pois todos os fetos formados encontravam-se vivos.

Tabela 7- Avaliação do desenvolvimento do conceito de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.

Parâmetros	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
Vitalidade fetal (%)	100	100	100	100	100	100
Peso dos fetos (g)	5.75±0,59	4.57±0.68*	3.97±0.42 ^{*a}	4.18±0.52 ^{*a}	3.77±0.44 ^{*a}	2.64± 0.26 ^{*abcd}
Peso da placenta (g)	0.82± 0.11	0.81±0.12	0.88±0.18	0.85±0.14	0.82±0.20	0.54±0.04 ^{*abcd}

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato. *Comparação do grupo controle ($p \leq 0.05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX

4.3.1 Avaliação morfológica externa, visceral e óssea de fetos.

Nas avaliações externas observou-se que em todos os grupos os fetos não apresentaram sindactilia, hipodactilia, focomelia, alterações abdominais, alteração na fixação de olhos, alteração de palato. Também não foram observados alterações nas estruturas ósseas. Entretanto, dos parâmetros viscerais avaliados, no grupo exposto o metotrexato, observou-se que 12% dos fetos (3 em 25 fetos) apresentou hidrocefalia.

A Tabela 8 mostra as medidas utilizadas para a avaliação morfológica externa de fetos. Os resultados obtidos indicam que houve uma redução de todos os parâmetros avaliados, tanto para os grupos expostos ao *Lentinula edodes* quando administrado isoladamente como administrado em associação ao metotrexato (latero lateral do crânio $F= 16.757$, $p \leq 0.0001$; antero posterior do crânio: $F= 10.518$, $p \leq 0.0001$; Latero lateral do tórax: $F= 12.761$, $p \leq 0.0001$; antero posterior do tórax: $F= 26.032$, $p \leq 0.0001$; crânio caudal; $F= 31.090$, $p \leq 0.0001$; cauda: $F= 19.055$, $p \leq 0.0001$). A associação da dose de 0.8 g/kg/dia de *Lentinula edodes* ao metotrexato promoveu as maiores reduções nas medidas.

Tabela 8- Medidas morfológicas (cm) externas dos fetos de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e às associações, durante o período de gestação.

Medidas	Grupos					
	Controle	SI	SII	MTX	SIMTX	SIIMTX
Latero lateral do crânio	0.78±0.10	0.68±0.06*	0.64±0.05*	0.61±0.05*	0.68±0.06*	0.59±0*
Antero posterior do crânio	1.36±0.22	1.20±0.08*	1.16±0.04*	1.10±0.06*	1.38±0.24*	0.98±0.02* ^{abc}
Latero lateral do tórax	1.01±0.19	0.87±0.10*	0.78±0.08*	0.80±0.08*	0.86±0.09*	0.58±0.05* ^{ad}
Antero posterior do tórax	0.99±0.70	0.89±0.08*	0.78±0.07*	0.82±0.07*	0.85±0.09*	0.62±0.02* ^{abcd}
Crânio caudal	5.64± 0.70*	4.98±0.33*	4.46±0.21* ^a	4.48±0.34* ^a	4.61±0.26*	3.36±0.23* ^{abcd}
Cauda	1.34±0.29	1.07± 0.10*	0.94±0.09*	0.94±0.11*	1.14±0.09* ^b	0.75±0.05* ^d

Nota: Grupos controle (solução salina), (SI) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, (SII) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia, (MTX) metotrexato, (SIMTX) *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia + metotrexato e (SIIMTX) *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia + metotrexato. *Comparação do grupo controle ($p \leq 0.05$, ANOVA, Teste de Tuckey-Kramer múltiplas comparações); (a) comparação ao grupo SI, (b) comparação ao grupo SII, (c) comparação ao grupo MTX, (d) comparação com SIMTX

5 DISCUSSÃO

Este estudo fundamenta-se na premissa de que o *Lentinula edodes* pode atuar como um agente antioxidante, reduzindo os efeitos deletérios dos peróxidos sobre os tecidos. Neste sentido, o metotrexato, fármaco imunossupressor, promotor do aumento das atividades de espécies reativas ao oxigênio, foi utilizado para avaliar os benefícios do potencial protetor e antioxidante do *Lentinula edodes* sobre a gestação (STAJIĆ et al., 2013).

Os cogumelos apresentam numerosos compostos com atividade antioxidante: como vitaminas, polissacarídeos, peptídeos, proteínas, ácidos orgânicos, carotenóides e compostos fenólicos (BORS; SARAN 1987). E embora existam numerosos antioxidantes sintéticos que podem melhorar a capacidade do sistema de defesa, a preferência ainda é dada aos antioxidantes naturais, devido aos efeitos tóxicos e mutagênicos que estes antioxidantes sintéticos podem promover (STAJIĆ et al. 2013). Neste sentido, ressalta-se a importância das dosagem de compostos fenólicos no *Lentinula edodes*. O valor encontrado (2.4 mg de ácido gálico/g base seca) está próximo ao dos estudos realizados por Pauli e Sylos (2010). Por lado, Reis et al. (2012) ao extrair compostos fenólicos a partir do micélio do *Lentinula edodes*, obtiveram uma dosagem de 12.53 mg/g de ácido gálico no extrato. Estas diferenças de dosagem de compostos fenólicos podem estar diretamente relacionadas ao substrato utilizado no cultivo axênico.

Os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades anti-oxidantes e dentre estes, os flavonoides se destacam por esta atividade (DORMAN et al., 2003). Entretanto, há evidências de que as atividades biológicas de flavonóides podem desempenhar um papel duplo em mutagênese e carcinogênese. Podendo atuar como antimutagenicos / promutagenicos e antioxidantes / pró-oxidantes, o que é em grande parte dependente dos níveis de consumo e as condições fisiológicas do organismo (SKIBOLA; SMITH, 2000).

A amostra de *Lentinula edodes* utilizada neste estudo também apresentou valores de água e glucanas dentro dos valores preconizados na literatura. O

rendimento seco do *Lentinula edodes* foi de 10%, o que indica que este cogumelo apresenta em torno de 90% de sua composição, em água, e conforme Mattila et al (2000), isto é o indicativo de seu importante valor nutricional.

O resultado da dosagem de glucanas realizados na amostra de *lentinula edodes* foi 0.53 g/100g de glicose. Os resultados encontrados apresentam-se dentro faixa de glucanas obtida para as diversas espécies de cogumelos foi de 0.21g a 0.53g/100g de glicose, realizado em metodologia similar a empregada neste estudo por Manzi e Pizzoferrato (2000).

A redução do ganho de peso de gestante é um fator importante na avaliação da toxicidade materna, a qual deve estar associada às alterações bioquímicas maternas para a inferência sobre a toxicidade de um agente externo (GERENUTTI; DEL FIOLE; GORPO, 2006); os resultados obtidos neste estudo mostraram que o *Lentinula edodes* promove um aumento do ganho de peso quando administrado isoladamente. Entretanto, nos animais expostos ao metotrexato e nas associações pode-se observar uma redução no ganho de peso.

Os ensaios *in vivo* com o *Lentinula edodes*, indicam que este cogumelo não induz toxicidade materna, quando observados os parâmetros para toxicidade renal e hepática. As dosagens de ALT e AST nos animais dos grupos experimentais foram inferiores as do grupo controle. O aumento da atividade da ALT e AST é uma indicativa de lesões hepáticas, induzidas por agentes exógenos, estudos randomizados realizados com o metotrexato em humanos, portadores de artrite reumatoide e hepatite C, indicam que a exposição a este fármaco, não promoveu alteração nos níveis de AST e ALT (IANNONE et al., 2014).

Somado a isto, também se observou uma redução dos níveis sanguíneos de creatinina nos grupos SII (0.8 g/kg/dia) e SIMTX (0.4 g/kg/dia) em relação ao grupo controle. Com relação à ureia apresentou redução dos níveis em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Teores sanguíneos de ureia e creatinina aumentados podem estar diretamente relacionados ao teor de proteínas da dieta e serem indicativo de estado patológico renal (RENNÓ et al., 2000). Os resultados de avaliação hepática e renal indicam que as mães não apresentaram

efeitos de toxicidade à exposição ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato e nem mesmo às associações empregadas.

As CAT são enzimas que funcionam como canal de limpeza promovendo detoxificação do metabolismo celular normal decompondo H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) em H_2O (água) e O_2 (oxigênio) (BREUSEGEM, 2001). As dosagens sanguíneas de CAT em ratas prenhes indicam que nem o *Lentinula edodes*, nem o MTX ou as associações, promoveram alterações significativas em relação ao grupo controle.

As análises de GSH nas gestantes indicam que o *Lentinula edodes* na concentração de 0.4 g/kg/dia não apresentou diferença do controle, e que o *Lentinula edodes* na concentração de 0.8 g/kg/dia diminuiu o GSH, mostrando que em concentrações elevadas um composto com potencial antioxidante pode se tornar um pró-oxidante (SKIBOLA; SMITH, 2000).

Dorman et al. (2003) afirmam que um aumento dos níveis de exposição aos compostos fenólicos, quer através da dieta ou por suplementação, pode, potencialmente, sobrecarregar o sistema que conduz à formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, estes autores, ressaltam que em períodos onde existe um aumento do desenvolvimento celular, como na gestação, a exposição em doses excessivas de substâncias que contenham compostos fenólicos pode promover uma maior sensibilidade celular aos efeitos deletérios do agente pró-oxidante.

Os resultados obtidos, ou seja, o aumento da concentração de GSH confirma a ação oxidante do MTX. Por outro lado, esta atividade oxidante do MTX parece ter sido inibida quando da associação com *Lentinula edodes* (0.4 g/kg/dia), onde observa-se uma redução da GSH. Entretanto, na associação MTX e *Lentinula edodes* (0.8 g/kg/dia) esta ação oxidante permanece.

Segundo Lucchi et al (2005) pacientes expostos aos agentes que promovem aumento do nível de estresse, apresentam aumento da atividade GSH, isso parece indicar a existência de um mecanismo de adaptação do organismo em virtude do

aumento dessa atividade. Isto parece justificar o aumento ocorrido nos grupos MTX, SIMTX, SIIMTX, onde apresentaram um aumento significativo de GSH em relação ao grupo controle.

Segundo Weber-Schoendorfer et al (2014) o uso pós-concepção de doses reumatológicas de metotrexato está associado ao risco aumentado de defeitos congênitos graves e aborto espontâneo. Em nossos resultados a exposição do metotrexato (MTX), corrobora esta informação, uma vez que o metotrexato (MTX) promoveu uma significativa perda pré-implantação e uma acentuada perda pós-implantação. Entretanto, a perda pré-implantação apresenta-se reduzida quando da associação do metotrexato ao *Lentinula edodes*; e este efeito parece ser dose dependente, reforçando a capacidade de proteção do *Lentinula edodes* sobre os efeitos tóxicos do metotrexato, uma vez que as ratas foram expostas ao *Lentinula edodes* desde o primeiro dia gestação. As ratas expostas à associação do metotrexato com *Lentinula edodes* 0.8 g/kg/dia tiveram suas perdas pré-implantação inferiores à associação do metotrexato com *Lentinula edodes* 0.4 g/kg/dia, e foram semelhantes aos do grupo controle.

Por outro lado, as perdas pós-implantações foram mais acentuadas nas associações entre o metotrexato e *Lentinula edodes*, indicando que neste período de implantação do blastocisto e quando o endoderma começa a se diferenciar, e cada órgão tem seu período crítico de desenvolvimento, as estruturas estão mais sensíveis à ação de substâncias teratogênicas (KANJANAPOTHI, 1981). Atualmente, as substâncias promotoras de radicais livres, com indução de estresse oxidativo tem sido alvo de pesquisas que envolvem o desenvolvimento do conceito (AYE; KEELAN, 2013; KHERA; VANDERLELIE; PERKINS, 2013).

A exposição materna, nas diversas fases do desenvolvimento do conceito, ao *Lentinula edodes*, ao metotrexato (MTX) e às associações, indica, devido à redução de peso dos fetos bem como a redução em todos os parâmetros morfométricos, efeitos de fetotoxicidade. Entretanto, grupo MTX foi observado efeito teratogênico, corroborando aos achados de HYOUN; OBICAN; SCIALLI (2012).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amostra de *Lentinula edodes* utilizada encontrou-se dentro dos parâmetros descritos na literatura para as concentrações de glucanas e de compostos fenólicos.

Tanto o *Lentinula edodes* (0.4 g/kg/dia, 0.8 g/kg/dia) quanto o metotrexato (0.20 mg/kg/dia), como as associações (0.4 g/kg/dia de *Lentinula edodes* + 0.20 mg/kg/dia de metotrexato; 0.8 g/kg/dia de *Lentinula edodes* + 0.20 mg/kg/dia de metotrexato) não promoveram efeitos de toxicidade materna, entretanto em todos os tratamentos observou-se efeito fetotóxico.

Lentinula edodes apresenta um efeito importante sobre a capacidade reprodutiva das ratas durante o período de pré-implantação, sendo que este reverte os efeitos deletérios promovidos pelo metotrexato nesta fase.

A utilização *Lentinula edodes* como protetor na exposição ao metotrexato deve ser considerada para se evitar abortos espontâneos, entretanto as doses devem ser melhor definidas, para que não ocorram efeitos deletérios nos conceptos.

7conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho o *Lentinula edodes* por promover efeitos fetotóxicos durante todo o período de gestação, sugere-se suspender o uso durante este período.

REFERÊNCIAS

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782- 787.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105:121-126.
- Angelo P M, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2007;(vol. 66):1-9.
- Andrade MCN. Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake (*Lentinula edodes*) em toros de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2003.
- Araujo RC. Estudo toxicológico das drogas. Correlação clinicopatologia. In: SILVA P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998;(.20):131-50
- Atashfaraz E, Farokhi F, Najafi G. Protective effect of ethyl pyruvate on epididymal sperm characteristics, oxidative stress and testosterone level in methotrexate treated mice. *J Reprod Infertil*. 2013;14(4):190-6.
- Aye IL, Keelan JA. Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. *Chem Biol Interact*. 2013 Apr 25;203(2):456-66. doi: 10.1016/j.cbi.2013.03.007. Epub 2013 Mar 20.
- Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food. Chem. Toxicol* 2008;(46): 2742-2747.
- Beyer DM. Basic Procedures for *Agaricus* Mushroom Growing. 2003. Disponível <<http://pubs.cas.psu.edu>>. Acesso em 30 abr de 2013.
- Bisen PS, Baghel RK, Sanodiya BS, Thakur GS, Prasad GBKS. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Current Medicinal Chemistry* 2010;(17): 2419-2430.
- Bononi VLR, Capelari M, Maziero R, Trufem SFB. Cultivo de cogumelos comestíveis *Lentinus edodes*. São Paulo: Cone 1995; 95-104.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. DOU Nº 63, 5 de abril de 2010b. Disponível em: <www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/RDC%2014_2010>. Acesso em: 30 jun. 2013.
- Brauer M, Hoek G, Van VP, Meliefste K, Fischer PH, Wijga A. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1092–1098.

Breene WM. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *J Food Project* 1990; 53:883-94.

Breusegem FV. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science, Shannon* 2001;(161)3:405-414.

Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. Mushroom, tumors, and immunity. *PSEBM* 1999; 4:281-93.

Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic Res Commun* 1987; 2:289-94

Bozkurt M, Em S, Oktayoglu P, Turkcu G, Yuksel H, Sarıyıldız MA, Caglayan M, Batmaz I, Nas K, Bozkurt Y, Kuyumcu M. Carvacrol prevents methotrexate-induced renal oxidative injury and renal damage in rats. *Clin Invest Med.* 2014; 1;37(1):19.

Buswell JA, Cai YJ, Chang ST. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. In: international conference on mushroom biology and mushroom products ,University Park.Proceedings. University Park : Pennsylvania State University, 1996; 113-122.

Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; 6:391-7.

Chandra L, Alexander H, Traoré D, Lucas EA, Clarke SL, Smith BJ, Lightfoot SA, Kuvibidila S. White button and shiitake mushrooms reduce the incidence and severity of collagen-induced arthritis in dilute brown non-agouti mice. *J Nutr* 2011a; 141(1):131-6 a.

Chandra LC, Smith BJ, Clarke SL, Marlow D, d'offay JM, Kuvibidila SR. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Food Chem Toxicol*, 2011b; 49(12):3074-80.

Chang ST, Miles PG. Edible mushrooms and their cultivation. Boca Raton: CRC Press, 1989: 345.

Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 2003; 81: 249–255.

Chiara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka W. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinula edodes*. *Nature*, 1969;(v.222):687-688.

Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Arai Y, Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. (an Edible Mushroom), *Cancer Research Japan* 1970; 30: 2776-2781.

Clarke J. Mushrooms, The New Superfood. Ano 2009 Disponível em <http://www.mushroomuk.Com/health_professionals/mushroom-superfood.pdf>. Acesso disponível em 10 de Set. de 2012.

Cleary JA, Graham GE, Husband AJ. The effect of molecular weight and 1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3) -D-glucan. *Immunology and Cell Biology* 1999;77: 395-403.

Damasceno DC, Kempinas WDG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, Paumgartten F J R. *Anomalias Congênitas: Estudos Experimentais*. Belo Horizonte: Coopmed, 2008; 102.

Dias ES, Abe C, Schwan RF. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Sci Agric*. 2004; 61(5):545-9.

Dicke JM. Teratology: principles and practice. *Medical Clinics of North America* 1989; 73:567-582

Dong Q, Yao J, Yang X, Fang J. Structural characterization of water-soluble D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research* 2002; 337:1417-1421

Donoghue JD, Denison WC. Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. *Mycologia*, New York 1995;(v. 87) 239- 244.

Donoghue JD, Denison WC. Commercial production of shiitake (*Lentinula edodes*) using whole log chip of *Quercus*, *Lithocarpus*, and *Acer*. In: international conference on mushroom biology and mushroom products. University Park. Proceedings... University Park : Pennsylvania State University, 1996;. 265-275.

Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington 2003; 51(16): 4563-4569.

Eira AF, Minhoni MTA. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. Botucatu : Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1996; 96 .

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959; 82:70-77.

Faostat. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Ano 2009. Disponível em <<http://faostat.fao.org>> . Acesso em 24 de setembro de 2012.

FDA (US Food and Drug Administration). Redbook 2000 – Toxicological principles for the safety of food ingredients. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 25 out. 2013.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-9.

Farmacopeia Portuguesa. 7 ed. Lisboa: Infarmed, 2002;(v. 1 e 2): 2792 p.

Feldkamp M, Carey JC. Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. *Teratology* 1993; 47:533–539.

Ferreira LA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 1997;43: 61-8.

Fidalgo O, Guimarães S. A situação do cogumelocomestível no Brasil e no exterior. In: *Encontronacional de cogumelos comestíveis*. Anais, São Paulo, 1985;7-23.

FIDELIS G C. As características desejadas para um padrão de calibração. *R Metrologia e Qualidade* 2006; 5:5.

Foundation of Japanese food analysis center, No 398040072-001 52-1, Yoyogi-Machi, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan. 1980.

Franco L. No reino dos cogumelos. *Revista Globo Rural* 2006;(253):56- 64.

Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893:13-8.

Fries JF, Koop CE, Beadle CE, Cooper PP, England MJ, Greaves RF. Reducing health care costs by reducing the need and demand for medical services. The Health Project Consortium. *N Engl J Med* 1993; 329:321-5.

Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 1998; 333 (3):519-25.

Gerenutti M, De Souza-Spinosa H, Bernardi MM. Algumas considerações sobre toxicologia do desenvolvimento. *Comum Cientif Med Vet Zootec* 1991; 15:27-29.

Gerenutti M, Del Fiol FS, Gorpo FC. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. *Die Phramazie* 2006; 61: 79-80.

Gerenutti M, Grotto D. Avaliação biológica in vitro e in vivo da segurança de cogumelos medicinais. *Proceedings of the 7TH International Sympisium on Mushroom in Brazil*. Embrapa, Manaus, 2013. 283-291.

Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:1-14.

Gruter A, Friederich U, Würgler FE. The mutagenicity of edible mushroom in a histidineindependent bacterial test system. *Food and Chemical Toxicology*, 1991;(v.29, n.3):159-165.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*2000; 899:136-47.

Hall CA, Cuppett SL. Structure-activities of natural antioxidants. In: Aruoma OI, Cuppett SL, editors. *Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts*. AOCS Press 1997; 2-29.

Handayani D, Chen J, Meyer BJ, Huang XF. Dietary Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*) Prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of Obesity* Volume 2011 ;(Article ID 258051): 8..

Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001; 17:71-74.

Herrera OM. Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei*: um enfoque de cadeia produtiva. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agronômicas. *Tese de Doutorado*2001.

Hiromoto BT. Comparative analysis of shiitake culture systems. In: *International congress on the science and cultivation of edible fungi dublin. Proceedings...* Dublin :Balkema 1991;(v. 2): 489-496p.

Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR. Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94(4):187–207

Iannone F, La Montagna G, Bagnato G, Gremese E, Giardina A, Lapadula G. Safety of etanercept and methotrexate in patients with rheumatoid arthritis and hepatitis C virus infection: a multicenter randomized clinical trial. *J Rheumatol*. 2014;41(2):286-92.

Ibrahim MA, El-Sheikh AA, Khalaf HM, Abdelrahman AM. Protective effect of peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)- α and - γ ligands against methotrexate-induced nephrotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014; 13. [Epub ahead of print]

Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MCD. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid médium, *Brazilian Journal of Microbiology*2001;(n°32): 206-210.

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, KOBAYASHI M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*2009; 32(7):1215-9.

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*2010; 33(6):983-7.

Kanjanapothi D. Post coital anti-fertility effect of *Mentha arvensis*. *Contraception* 1981; 24: 559-568.

Khera A, Vanderlelie JJ, Perkins AV. Selenium supplementation protects trophoblast cells from mitochondrial oxidative stress. *Placenta*. 2013; 34(7):594-8. doi: 10.1016/j.placenta.2013.04.010. Epub 2013 May 6.

Kitzberger CSG. Obtenção de Extrato de Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) com CO₂ a Alta Pressão. Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2005.

Lachance PA, Nakat Z, Jeong WS. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 2001; 17:8358.

Lawrance C. Chandra L, Brenda J. Smith, Stephen L. Clarke, Denver Marlow, Jean M. D'Offay, Solo R. Kuvibidila. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Original Research Article Food and Chemical Toxicology* 2011; (V.49)12:3074-3080

Lee HH, Lee JS, Cho JY, Cho JY, Kim YE, Hong EK. Structural characteristics of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes*. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19(5):455-6.

Levanon D, Rothschild N, Danai O, Masaphy S. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. *Bioresource Technology*, Oxford 1993; (v. 45): 63-64.

Lima LM, de Souza SD, Menezes CMS, Castro P, Verli H, Fraga CAM, Rodrigues CR, de Moraes VLG, Barreiro E J. 24^a *Reunião Anual da SBQ*, Poços de Caldas, MG, 2001.

Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science* 1997; (vol. 60, nº 10): 763-771.

Longvah P, Deosthale YG. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food chemistry* 1998 (v. 63, n. 3): 331-334.

Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, Perrone S, Stipo L, Olmeda F, Caruso F, Tomasi A, Albertazzi A. International Center for Artificial Organs and Transplantation. Erythrocyte Susceptibility to Oxidative Stress in Chronic Renal Failure Patients Under Different Substitutive Treatments. *Artificial Organs* Blackwell Publishing 2005; 29(1):67-72.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441-5.

Manzi P, Pizzoferrato L. - Food Chemistry, – Elsevier. B-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 2000; 68: 315–318.

Marques AS. Metotrexato na psoríase. In: Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso brasileiro de psoríase e guias de tratamento 2008;61-6.

Martín MC, Barbero P, Groisman B, Aguirre MA, Koren G. Methotrexate Embryopathy After Exposure to Low Weekly Doses in Early Pregnancy. *Reprod Toxicol* 2014; 43: 26–29

Mattila P, Suonpaa K, Piironen V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* 2000; 16: (7/8) 694-696 p.

Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vahterist, L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001; 49: 2343-2348.

Mendonça M, Kasuya MC, Cadorin A, Vieira AJ. *Agaricus blazei* cultivation for a living in Brazil. In: Mushroom grower's handbook 2, Shiitake cultivation, Korea: Seul; 2005; 208–18.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:95-108.

Minato K, Mizuno M, Terai H. Autolysis of lentinan, an antitumor polysaccharide, during storage of *Lentinus edodes*, shiitake mushroom. *J. Agr. Food Chem* 1999; 47: 1530-1532.

Minhoni MA. Cultivo de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – (Shiitake). 2. ed. Botucatu: FEPAF, 2005; 72.

Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura k, Sumiya T. Studies on the host-mediated anti-tumor polysaccharides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agric. Biol. Chem., Japão* 1990; 54:2889-2896b.

Mizuno T, Hagiwar AT, Nakamura T, Ito H, Shimura k, Sumiya T, Asakura A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from. “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agricultural Biological Chemistry* 1990; 54 (11) : 2889-2896a.

Mol PC, Vermeulen C A, Wessels J G. Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on unique wall structure. *Mycological Research* 1990; 94:480-488.

Montini RMC. Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade do cultivo axênico de Shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler Tese

(Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2001; 113-122

NappiBP, Moretto E. Valor nutricional de corpos de frutificação e biomassas dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-fuclae*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

Neha J, Indu S, Shristi B, Bharat P. Incredible shiitake mushroom. Asian Journal of Pharmacy and Life Science ISSN 2231 – 4423, 2012;(Vol. 2):1.

Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Quim. Nova 2009; 32: (3) 689-702.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin Chim Acta 2003; 333:19-39.

Pauli PA, SylosCM. Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. 2010.

Pereira FA, Costa MV, Santos CMM, Pinto CHF, Silva R G. Evaluation of the effects of methotrexate released from polymeric implants in solid Ehrlich tumor. Biomed Pharmacother. 2014 Jan 27.pii: S0753-3322(14)00015-8. doi: 10.1016/j.biopha.2013.12.012. [Epub ahead of print

Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, Devries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food-products – Interlaboratory study. Journal of Association of Official Analytical Chemistry 1988;(v.71)5:1017-1023 p.

Przybylowicz P, Donoghue J. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroomcultivation. Dubuque : Kendall/Hunt, 1988; 217.

Ramírez-Anguiano AC, Santoyo S, Reglero G, Soler-Rivas C. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. J. Sci Food Agric 2007; 87: 2272-2278 .

Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biologia Vegetal. 7°.ed. Coord. Trad. J.E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira IC. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. Food Chem Toxicol. 2012; 50(5):1201-7.

Rennó LN, Valadares RFD, Valadares Filho SC, Leão MI, Silva JFC, Cecon PR, Gonçalves LC, Dias HLC, Linhares RS. Concentração Plasmática de Ureia e

Excreções de Ureia e Creatinina em Novilho. RevBrasZootec 2000; 29(4):1235-1243.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:13147-52.

Royse DJ, Schisler LC, Diehle DA. Shiitake mushrooms: consumption, production and cultivation. Interdisciplinary Science Reviews 1985;10:329-335.

Sabota C. Strain of shiitake mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] and wood species affect the yield of shiitake mushrooms. HortTechnology 1996;6:388-393.

Sales-Campos C, Oliveira LA, Araujo LM, Varejão MJC, Andrade MCN. Composição mineral de uma linhagem de *Pleurotus ostreatus* cultivada em resíduos madeireiros e agroindustriais da região Amazônica. Ciênc. Tecnol. Aliment 2009; 29: (4) 868.

San Antonio JP. Cultivation of the shiitake mushroom. HortScience 1981;16:151-156p.

Santos FAP. O bagaço de cana-de-açúcar tratado sob pressão de vapor como alternativa para a alimentação de bovinos na entressafra das pastagens. Campinas Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1990; 203.

Sasidharan S, Aravindran S, Latha LY, Vijenthil R, Saravanan D, Amutha S. In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. Molecules 2010;15(6):4478-89.

Seo DH, Jeong YI, Kim DG, Jang MJ, Jang MK, Nah JW. Methotrexate-incorporated polymeric nanoparticles of methoxy poly (ethylene glycol)-grafted chitosan. Colloids Surf B Bio interfaces 2009; 69(2): 157–163

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. Universidades/UFRGS/Ed. da UFSC 2000.

Scalbert A, Monties B, Janin G. Tannins in Woods: Comparison of different estimation methods. J. Agric. Food Chem 1989; 37: 5.

Sizer FS, Whitney EN. Nutrição: conceitos e controvérsias. São Paulo: Manole, 2003; 800.

Shibata CKR, Demiate IM. Cultivation and chemical analysis of the sun mushroom (*agaricus blazei murrii*). Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa 2003; 9(2): 21-32.

Schüler-Faccini L. Avaliação de teratógenos na população brasileira. Ciência & Saúde Coletiva 2002;7(1):65-71.

Shu CH, Wen BJ, Lin KJ. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- release capability of macrophage cell line RAW 264.7. *Biotechnology Letters* 2003;25: 2061-2064.

Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):375-83.

Smithells RW. The challenges of teratology. *Teratology* 1980; 22: 77-85.

Sterner O. Mutagens in larger fungi. I. 48 species screened for mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research* 1982a; 101(4), 269-281.

Sterner O. Mutagens in larger fungi. II. The mutagenicity of commercial pickled *Lactarius necator* in the Salmonella assay. *Mutation Research* 1982b;4:233-237..

Stajić M, Vukojević J, Knežević A, Laušević SD, Milovanović I. Antioxidant protective effects of mushroom metabolites. *Curr Top Med Chem*. 2013; 13(21):2660-76.

Sugui MM, Alves de Lima PL, Delmanto RD, da Eira AF, Salvadori DM F, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food and Chemical Toxicology* 2003 ;(1):555-560p.

Suguiyama K, Akachi T, Yamakawa A. Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats, *Nutritional Biochemistry* 1985;6:80-87.

Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Tamesada M, Harashima N, Harada M. Oral ingestion of *Lentinula edodes* mycelia extract inhibits B16 melanoma growth via mitigation of regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cancer Sci* 2011; 102(3): 516-21.

Urban AF. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2. Ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84..

Veiga Júnior VF, PINTO AC, MACIEL MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 2005; 28(n.3): 519-28.

Vilela PS. Cogumelos: Mercado e comercialização. Ano 2012 Disponível em <www.faemg.org.br>. Acesso em 19 de setembro de 2012.

Watanabe A, Kobayashi M, Hayashi S, Kodama D, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Tamesada M, Yagi K. Protection against D-galactosamine-induced acute liver injury by oral administration of extracts from *Lentinus edodes* mycelia. *Biol Pharm Bull* 2006;29(8):1651-4.

Weber-Schoendorfer C, Chambers C, Wacker E, Beghin D, Bernard N; on behalf of the network of French pharmacovigilance centers, Shechtman S, Johnson D, Cuppers-Maarschalkerweerd B, Pistelli A, Clementi M, Winterfeld U, Eleftheriou G, Pupco A, Kao K, Malm H, Elefant E, Koren G, Vial T, Ornoy A, Meister R, Schaefer C. Pregnancy outcome after rheumatologic methotrexate (MTX) treatment prior to or during early pregnancy: A prospective multicenter cohort study. *Arthritis Rheumatol* 2014 Jan 27. doi: 10.1002/art.38368. [Epub ahead of print]

Yoshioka Y, Tamesada M, Tomi H. A repeated dose 28-day oral toxicity study of extract from cultured *Lentinula edodes* mycelia in Wistar rat. *J Toxicol Sci* 2010 ;35(5):785-91.

Yoshioka Y, Kojima H, Tamura A, Tsuji K, Tamesada M, Yagi K, Murakami N. Low-molecular-weight lignin-rich fraction in the extract of cultured *Lentinula edodes* mycelia attenuates carbon tetrachloride-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *J Nat Med* 2012;66(1):185-91.

Yunes RA, Cechinel-filho V. In: *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental.*, Chapecó 2001; 18-44.

Zhanxi L, Zhanhua L. *Juncao technology*. China: China Agricultural Sciencetech Press, 2001

Anexo A – CERTIFICADO DE Aprovação em CEUA-Uniso



UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "Avaliação toxicológica in vivo do extrato hidroalcoólico do cogumelo Lentinulus edodes (Shiitake)" (protocolo **007/2012**), de autoria de **Marli Gerenutti e Ítalo Frizo**, foi aprovado na data de 27/02/2013 pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Sorocaba - Uniso, uma vez que se encontra de acordo com os princípios éticos na Experimentação animal adotados por esta Universidade.

This is to certify that the work titled "Avaliação toxicológica in vivo do extrato hidroalcoólico do cogumelo Lentinulus edodes (Shiitake)" (protocolo **007/2012**), de autoria de **Marli Gerenutti e Ítalo Frizo** that was approved on 16/10/2013 by the Animal Research Ethic Commission from "Universidade de Sorocaba-Uniso", is in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by this University.

Sorocaba, 27 de novembro de 2013.

Renata de Lima
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animal

Roseli Rocha Carvalho
Secretária do CEUA-Uniso

Anexo B – Descarte de animais.



Universidade de Sorocaba

Laboratórios de Saúde e Biológicas

Declaração

Sorocaba, 08 de junho de 2011

Ref. Protocolo para descartes de animais de laboratório de pesquisa

Os descartes de animais de laboratórios após o sacrifício, que ocorre normalmente durante o experimento e no qual não são inoculados agentes patogênicos, são acondicionados em sacos leitosos (descarte de materiais biológicos secos) e armazenados em freezer. A coleta e destinação dos mesmos são realizadas pela Prefeitura de Sorocaba através de empresa especializada contratada.

Valéria de Campos Orsi

Farmacêutica Responsável – Laboratórios de Ciências Biológicas e Saúde - UNISO

Paulínia, 30/08/2013.

ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL

Atesto para os devidos fins que os RATOS WISTAR procedentes deste estabelecimento, constantes na nota fiscal 001696 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,



RONAN DE ALMEIDA LENTE Médico Veterinário Habilitado Nº. 332 CRMV-SP Nº. 6381
--



VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL
 VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MUSHROOMS IN BRAZIL
VI SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS
 VI NATIONAL SYMPOSIUM ON EDIBLE MUSHROOMS



VII SICOG

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **Preparação de extrato e amostra seca de *Lentinula edodes* (*Shiitake*) para determinação de fenol e dosagem de beta glucana**, de autoria de **Italo Frizo, Marli Gerenutti**, foi apresentado no VII Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil e VI Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis, realizados em Manaus, no Hotel Tropical, no período de 12 a 15 de outubro de 2013.

Manaus, 15 de outubro de 2013

Ceci Sales-Campos
 Presidente do VII SICOG





*Certifico que **Ítalo Frizo** esteve no dia 06 de dezembro de 2013, ministrando palestra sob o tema **“DENATURAÇÃO ENZIMÁTICA”**, aos alunos do Curso de Farmácia da Uniso. A palestra foi realizada na dentro do componente **Práticas Integradas em Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica**, ministrado pela **Profa. Dra. Marli Gerenutti**.*

Sorocaba, 06 de dezembro de 2013.

Prof.ª M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia





*Certifico que **Ítalo Frizo** esteve no dia 13 de novembro de 2013, ministrando palestra sob o tema **“TESTE DE SOLUBILIDADE DE LÍPIDES, REAÇÃO DE SAPONIFICAÇÃO E PESQUISA DE INSATURAÇÃO”**, aos alunos do Curso de Farmácia da Uniso. A palestra foi realizada na dentro do componente **Práticas Integradas em Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica**, ministrado pela **Profa. Dra. Marli Gerenutti**.*

Sorocaba, 13 de novembro de 2013.



Prof. M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia

Anexo E - ATIVIDADES EM ESTÁGIO DOCENTE



*Certificamos que, **Márcia Araújo Rebelo, Ítalo Frizo e Prof^a. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora)** participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) **Julio Cesar Vieira e Karina Piatto Lopes** intitulado: “**ESTUDO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO DE PSIDIUM GUAJAVA LINN DURANTE A GESTAÇÃO EM MODELO ANIMAL**” ocorrida no dia 21 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*

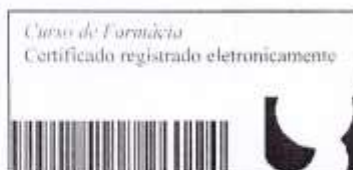


Sorocaba, 21 de novembro de 2013.

*Prof^a. M^a. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia*



*Certificamos que, **Márcia Araújo Rebelo, Ítalo Frizo e Profª. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora)** participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) **Andressa Camila Bispo e Flávia Nepomuceno Queiroz** intitulado: **“INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE PSIDIUM GUAJAVA LINN EM HIDROGEL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA”** ocorrida no dia 21 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.*



Sorocaba, 21 de novembro de 2013.

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



UNISO

Certificamos que, Márcia Araújo Rebelo, Ítalo Frizo e Prof^ª. Marli Gerenutti (Presidente da banca e Orientadora) participaram como examinadores na Banca de Avaliação Final do trabalho de Prática de Pesquisa III dos (as) alunos (as) Maria Lúcia de Oliveira e Stefani Alves Magalhães intitulado: “EFEITO FARMACOLÓGICO DA CAESALPINIA FERREA MARTIUS NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR IN VITRO INDUZIDO PELO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU” ocorrida no dia 21 de novembro de 2013, no curso de Farmácia da Universidade de Sorocaba.

Curso de Farmácia
Certificado registrado eletronicamente



Sorocaba, 21 de novembro de 2013.

*Prof.ª M. Magali Glauzer Silva
Coordenadora do Curso de Farmácia*

