

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Isabella Ferreira Camargo**

*Lentinula edodes* no período gestacional: análise de alterações em fêmeas gestantes e no desenvolvimento embrionário fetal.

**Sorocaba/SP**

**2020**

**Isabella Ferreira Camargo**

*Lentinula edodes* no período gestacional: análise de alterações em fêmeas gestantes e no desenvolvimento embriofetal.

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto

**Sorocaba/SP**

**2020**

**Isabella Ferreira Camargo**

*Lentinula edodes* no período gestacional: análise de alterações em fêmeas gestantes e no desenvolvimento embriofetal.

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

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Denise Grotto  
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Raquel de Mendonça Rosa Castro  
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Ana Carolina Rusca Correa Porto  
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Eliana, pois para eles eu não meço esforços e sou eternamente grata a todo seu amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Tenho tanto a agradecer, mas gostaria de iniciar agradecendo primeiramente à Deus, que nunca me desamparou. Proporcionou-me esta oportunidade e me deu todas as condições de poder enfim concluir esta etapa. Tais condições cito abaixo:

Começando pela minha família, meus pais Carlos e Eliana e meu irmão Felipe. Meus pais sempre me apoiaram, acreditaram em mim, me ensinaram a lutar e conquistar meus objetivos e entenderam todo o período que eu precisei ficar ausente e afastada para concluir as etapas do Mestrado. Agradeço à Alice, que hoje considero membro da família, pois cuidou de tudo e todos em casa para que eu pudesse me dedicar ao laboratório e aos estudos.

Depois agradeço a Deus pelo meu companheiro, Douglas de Almeida, que sempre me ajudou, incentivou e me deu forças quando eu achava que não seria mais capaz.

Agradeço então a Deus por sempre, em todos os momentos, colocar pessoas incríveis ao meu redor, começando pela Professora Dra. Marli Gerenutti, que foi quem me convidou e me introduziu no mundo da pesquisa acreditando no meu potencial desde o início.

Agradeço também por colocar no trajeto desta pesquisa a Professora Dra. Denise Grotto que me acolheu, e com sabedoria, paciência e tranquilidade me deu todo o suporte necessário para concluir esta etapa da minha vida.

Depois agradeço à Thaisa Borim Pickler, técnica do laboratório e hoje uma grande amiga, que sempre esteve de prontidão e disposta a me ajudar e me ensinar a entender cada processo e cada equipamento e me ensinou o valor da segurança e organização dentro de um laboratório.

Ao Rubens Paulino e à Giovanna Caroline, alunos de iniciação científica, por todo o trabalho em equipe e dedicação, fora e dentro do laboratório.

E por último e mais importante, agradeço imensamente a Deus por me permitir conhecer e trabalhar com a Erika Caetano, hoje aluna de Doutorado, que esteve comigo desde antes do início da pesquisa até o final, passando por todas as turbulências ao meu lado e me ensinando o valor da amizade e trabalho em equipe. Pudemos construir uma amizade baseada desde os momentos mais divertidos, aos mais difíceis e complicados.

Agradeço então a Deus por me dar a família, o parceiro e a melhor equipe que eu poderia sonhar. Foram pessoas fundamentais para que o projeto fosse concluído. Além da saúde, força e determinação, para conseguir vencer o cansaço, as

dificuldades, os finais de semana e feriados, as noites mal dormidas e imprevistos no meio do caminho para enfim chegarmos à conclusão desta etapa.

Aproveito para agradecer também à UNISO e FAPESP, por proporcionar toda a estrutura, condições financeiras e oferecer tal corpo docente para a realização do trabalho. A empresa Yuri Cogumelos meu agradecimento pela doação das amostras de cogumelos doadas para desenvolvimento da pesquisa.

A todos e a Deus, a minha gratidão!

## RESUMO

**Introdução:** Os cogumelos comestíveis podem ter importantes efeitos sobre a manutenção da saúde ou mesmo no tratamento de diversas doenças. Os cogumelos caracteristicamente contêm muitos compostos bioativos diferentes com atividades biológicas diversas, e algumas espécies podem ser consideradas novos alimentos funcionais. A orientação dietética e de alimentos funcionais para a prevenção e tratamento de diversas patologias na gestação, podem trazer potenciais benefícios à saúde materno-fetal. Entretanto, a segurança da exposição aos cogumelos durante o período gestacional deve ser bem elucidada. **Objetivo:** Avaliar o período gestacional e a segurança materno-fetal de ratas expostas ao *Lentinula edodes*, considerando suas potencialidades funcionais. **Métodos:** Foi realizado um ensaio com ratas saudáveis, alocadas de forma aleatória em três grupos após confirmação da prenhez: (1) grupo controle, administrado com solução salina à 0,9%; (2) exposição materna diária do pó liofilizado do *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia) do 1º ao 19º dia de gestação (antes da implantação do embrião, LeB); (3) exposição materna diária do pó liofilizado do *Lentinula edodes* (100 mg/kg/dia) do 9º ao 19º dia de gestação (após implantação do embrião, LeA). No 20º dia foi realizado cesárea e eutanásia das ratas e fetos. Foram empregadas técnicas de avaliação materna, como análises bioquímicas, hematológicas, pesagem dos órgãos e desempenho reprodutivo. Foram realizadas avaliações embriofetais, como análises morfométricas, ósseas (pelo processo de diafanização) e vitalidade fetal. **Resultados:** O *Lentinula edodes* não interferiu no peso das ratas prenhes, nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, não inferiu efeitos tóxicos nos órgãos, não apresentou interferência na capacidade reprodutiva. Em ambos os grupos tratados com *Lentinula edodes*, houve redução nos triglicerídeos em relação ao grupo controle. O desenvolvimento embrio-fetal não foi alterado em nenhuma análise. **Conclusão:** A ingestão de *Lentinula edodes* durante a gestação em ratas saudáveis sugere ser segura para o feto e para a mãe-concepto na dose de 100 mg/kg/dia.

**Palavras-Chave:** *Lentinula edodes*, Alimentos Funcionais, Ensaio pré-clínico, Shiitake, Toxicologia da reprodução.

## ABSTRACT

**Introduction:** Edible mushrooms can have important effects on maintaining health or even treating various diseases. Mushrooms characteristically contain many different bioactive compounds with diverse biological activities, and some species may be considered novel functional foods. Dietary and functional food guidance for the prevention and treatment of various pathologies in pregnancy may have potential benefits for maternal and fetal health. However, the safety of exposure to mushrooms during pregnancy should be well understood. **Objective:** To evaluate the gestational period and maternal-fetal safety of rats exposed to *Lentinula edodes*, considering their functional potentialities. **Methods:** A trial was conducted with healthy rats, randomly allocated to three groups after pregnancy was confirmed: (1) control group, administered with 0.9% saline solution (C); (2) daily maternal exposure of *Lentinula edodes* lyophilized powder (100 mg/kg/day) from day 1 to day 19 of pregnancy (before embryo implantation, LeB); (3) daily maternal exposure of *Lentinula edodes* lyophilized powder (100 mg/kg/day) from day 9 to day 19 of gestation (after embryo implantation, LeA). On the day 20, cesarean section and euthanasia of rats and fetuses were performed. Maternal assessment techniques were employed, such as biochemical, hematological, organ weighing and reproductive performance. Embryofetal evaluations were performed, such as morphometric, bone analysis (through the process of diaphanization) and fetal vitality. **Results:** *Lentinula edodes* did not affect the weight of pregnant rats, hematological and biochemical parameters, did not infer toxic effects on the organs, did not interfere with reproductive capacity. In both groups treated with *Lentinula edodes*, there was a reduction in triglycerides compared to the control group. Embryo-fetal development was not altered in any analysis. **Conclusion:** Ingestion of *Lentinula edodes* during pregnancy in healthy rats suggests being safe for the fetus and the mother-concept at 100 mg/kg/day.

**Keyword:** *Lentinula edodes*, Functional Foods, Preclinical Trial, Shiitake, Reproduction Toxicology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem do cogumelo <i>Lentinula edodes</i> , conhecido por Shiitake. ....	20
Figura 2 - Fluxograma do delineamento do estudo. ....	28
Figura 3 - Animais ambientados no Biotério. ....	30
Figura 4 - Presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (seta indicativa), comprovando a prenhez. ....	31
Figura 5 - Fluxograma da gestação das ratas. ....	31
Figura 6 – Esquema da divisão dos grupos experimentais. ....	32
Figura 7 - Administração via oral (gavagem). ....	32
Figura 8 - Foto do útero exposto com os fetos após a cesárea. Em A) observa-se um ponto de implantação; em B) um feto; em C) o cordão umbilical. ....	34
Figura 9 - Análise morfométrica dos fetos. A) Medida ântero-posterior de crânio; B) Ântero-posterior de tórax; C) Cauda; D) Crânio-caudal; E) Látero-lateral de tórax; F) Látero-lateral de crânio. ....	36
Figura 10 - Feto eviscerado. A seta indica local das incisões para retirada das vísceras. ....	36
Figura 11 - Fetos após processo de diafanização e coloração para análise óssea. Em A) crânio, cervical e membros superiores; B) região torácica; C) lombar, pelve, membros inferiores e cauda. ....	37
Figure 1 - Body weight evolution of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> . ....	49
Figure 2 - Hepatic (A) and renal profiles (B) of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> . ....	51
Figure 3 - Lipid profile of rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> . ....	52
Figure 4 - Glycemic profile of rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> . ....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química geral do <i>Lentinula edodes</i> por 100g de cogumelo.	21
Table 1 - Hematological parameters of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> .	50
Table 2 - Biochemical parameters of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> .	55
Table 3 - Weight of organs of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> .	56
Table 4 - Reproductive capacity of pregnant rats exposed to <i>Lentinula edodes</i> .	57
Table 5 - Mean $\pm$ SD length (cm) of sections of the head and body and the incidence (%) of morphological anomalies of fetuses whose mothers were exposed to <i>Lentinula edodes</i> .	58

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Porcentagem da Vitalidade Fetal. ....	34
Equação 2 - Porcentagem das Perdas Pós-Implantação. ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA - *American Dietetic Association*

ALT - Alanina aminotransferase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Aspartato aminotransferase

CS – Controle salina

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA - *Food and Drug Administration*

FOSHU - *Foods for Special Health Use*

FUFOSE- *Functional Food Science in Europe*

GGT - Gama - GT

GSH - Glutathiona reduzida

HDL - Lipoproteína de alta densidade

ILSI - *International Life Sciences Institute*

LeA - *Lentinula edodes after*

LeB - *Lentinula edodes before*

LEM - extrato do micélio de *Lentinula edodes*

μM – Milimolar

nm – Nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

RBC – *Red Blood Cells*

UV/VIS - Ultravioleta visível

WBC - *White Blood Cells*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Alimentos Funcionais .....	14
2.2	<i>Lentinula edodes</i> .....	19
2.3	Testes de segurança de alimentos.....	22
2.4	Alimentos Funcionais na gestação e desenvolvimento fetal .....	24
3	OBJETIVOS .....	27
3.1	Objetivo Geral .....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.3	Delineamento do estudo .....	28
3.4	Obtenção do pó liofilizado de cogumelo .....	29
3.5	Animais .....	29
3.6	Acasalamento, prenhez e exposição ao cogumelo.....	30
3.7	Avaliação da capacidade reprodutiva .....	33
3.8	Avaliação hematológica.....	34
3.9	Peso dos órgãos.....	35
3.10	Avaliação bioquímica materna .....	35
3.11	Avaliação de insulina .....	35
3.12	Avaliação embriofetal.....	35
3.13	Análise estatística .....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
6	Referências.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população utilizam medicamentos à base de produtos naturais no alívio de alguma sintomatologia desagradável (ROSA; CÂMARA; BÉRIA et al, 2011).

Os cogumelos têm sido utilizados pela humanidade desde sempre e apreciados não só enquanto alimento, mas também para outros fins, dos quais se destacam a sua utilização como agente terapêutico. Em países como a Coreia, China e Japão os estudos sobre as propriedades medicinais dos cogumelos estão mais consolidados, pois são utilizados em grande escala e apresentam significativa importância na economia. O cogumelo é um alimento de alto valor nutritivo com quantidades de proteínas quase equivalente às da carne e acima de alguns vegetais e frutas, rico em vitaminas e de baixo teor de gorduras e carboidratos (VALVERDE; PÉREZ; LÓPEZ et al, 2015).

Um cogumelo caracteristicamente contém muitos compostos bioativos com atividades biológicas diversas. Apresentam ainda inúmeras vitaminas e minerais essenciais tais como fósforo, magnésio, cobre e selênio (BERNAŚ; JAWORSKA; LISIEWSKA, 2006). Estudos referem-se ao efeito hepatoprotetor (SASIDHARAN et al, 2010; YOSHIOKA et al, 2012), tratamento ou prevenção de doenças crônicas e hipercolesterolemia (CHANDRA et al, 2011), efeito de neutralização de radicais através de compostos fenólicos (ISHIKAWA, KASUYA & VANETTI 2001), efeito imunomodulador pela presença de polissacarídeos e glucanas e efeito antitumoral (TANAKA et al, 2011).

Entre os cogumelos, o shiitake (“shii”, tipo de árvore; “take”, cogumelo em japonês) é um fungo aeróbio decompositor de madeira, cientificamente denominado *Lentinula edodes*, pertencente à classe dos basidiomicetos (CHANG & MILES, 1989). O cultivo de *Lentinula edodes* originou-se na China, sendo introduzido no Japão por intermédio de cultivadores chineses. Posteriormente, o cultivo foi introduzido nos EUA e Europa (ROYSE; SCHISLER; DIEHLE, 1985). O interesse no consumo do *Lentinula edodes* é atribuído às suas propriedades nutricionais e medicinais, e pelo seu apreciável sabor, tornando-se o segundo cogumelo mais consumido no mundo.

Deste fungo estão sendo intensamente estudados a lentiniana e o LEM (extrato do micélio de *Lentinula edodes*). A lentiniana é um polissacarídeo de alta massa molecular, solúvel em água, resistente à temperatura elevada, a ácidos e sensível a álcalis (NEHA et al, 2012). A medicina popular indica que, para humanos, o *Lentinula edodes* é um alimento cujas funções são fortificar e restaurar o organismo. Há alguns anos é recomendado para todas as doenças que envolvam diminuição das funções imunológicas e metabólicas (ANDRADE; MINHONI; ZIED, 2008).

Por outro lado, o uso milenar de cogumelos medicinais mostrou que determinadas espécies podem apresentar substâncias potencialmente perigosas e por essa razão devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Os efeitos mais preocupantes do uso de cogumelos medicinais estão sobre a gestação, e estão relacionados aos efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos, uma vez que, os constituintes destes cogumelos podem atravessar a placenta, gerando danos ao concepto (GERENUTTI et al, 2014). Manifestações da toxicidade durante a gravidez representam um desafio especial para os prestadores de cuidados de saúde, devido ao potencial de uma ameaça à vida imediata ou possíveis implicações ao longo da vida, tanto para a mãe quanto para o feto, incluindo a teratogenicidade, como malformações estruturais, retardo de crescimento, comprometimento funcional e/ou morte do organismo.

Apesar da grande quantidade de literatura científica sobre os efeitos terapêuticos e mesmo tóxicos do cogumelo em questão, poucos são aqueles que abordam a toxicologia reprodutiva. Sendo assim, no presente estudo, investigamos os efeitos e a segurança da ingestão de *Lentinula edodes* sobre a fertilidade, efeitos teratogênicos e exposição pré ou perinatal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Alimentos Funcionais

Alimentação e nutrição são companheiros indispensáveis dos seres humanos desde o início de sua existência. O homem primitivo explorou seus arredores para localizar materiais de origem natural para alimentos e remédios, buscando possuir mais energia, tratar doenças, aliviar dores e atingir vitalidade e longevidade. Por um processo de tentativa e erro, observação e raciocínio empírico e inferência, o homem primitivo fez seleções conscientes de uma variedade de materiais biológicos para melhorar sua saúde, aliviar a dor ou tratar outras doenças físicas e mentais (PUSHPANGADAN et al., 2014).

À medida que os consumidores se tornam mais interessados na vida saudável e a ciência da nutrição foi desenvolvida para obter uma nutrição ideal, vários alimentos funcionais já foram introduzidos no mercado (KWAK & JUKES, 2001). As relações entre alimentação, função fisiológica e doença progrediram nos últimos anos, principalmente na última década. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nutrição é a ingestão de alimentos, considerada em relação às necessidades alimentares do corpo. A boa nutrição é uma dieta adequada e equilibrada, combinada com atividade física regular. A má nutrição pode levar à redução da imunidade, aumento da suscetibilidade a doenças, desenvolvimento físico e mental prejudicado e produtividade reduzida (OMS, 2014).

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Segundo a OMS, aproximadamente 80% da população utilizam medicamentos à base de produtos naturais no alívio de alguma sintomatologia desagradável (OMS, 2014).

#### 2.1.1 Definição

O conceito sobre Alimentos Funcionais emergiu no Japão em 1984, quando pesquisadores estudavam as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação dos sistemas fisiológicos. Porém, em 1991, os japoneses passaram a utilizar o termo FOSHU (*Foods for Special Health Use*), na tentativa de não mesclar a

regulação dos alimentos funcionais com a farmacêutica (BIANCO, 2008, p.50). O termo FOSHU foi utilizado para definir qualquer alimento que exerça um impacto positivo na saúde, performance física ou estado mental de um indivíduo em adição ao seu valor nutritivo.

Após isso, uma variedade de definições sobre Alimentos Funcionais foi descrita na literatura. De uma forma simples, o Ministério da Saúde os classificou como alimentos ou ingredientes que produzem efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas (BRASIL, 2013).

A Portaria nº 398, de responsabilidade do Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária, definiu um regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para a utilização do termo “propriedades funcionais e/ou de saúde” alegadas em rotulagem de alimentos:

[...] ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

[...] ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE DE SAÚDE: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

[...] O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (RDC nº 398, 1999).

Diferente de outras legislações e definições, a RDC nº 398 faz referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco a doenças. Porém, não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

Assim como no Brasil, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos não possui uma definição conclusa para “Alimento Funcional”. Porém, a FDA permite alegações de propriedades funcionais e de saúde na rotulagem dos alimentos, como “redução de risco de doenças”, contanto que contenha evidência objetiva, comprovada publicamente e aceita por especialistas de correlações entre os nutrientes ou alimentos de uma dieta e os efeitos propostos (NITZKE, 2012).

Segundo a definição extraoficial da *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE), coordenada pela *International Life Sciences Institute* (ILSI):

“Esses alimentos são aqueles que possuem efeitos satisfatoriamente demonstrados que afetem uma ou mais funções do organismo, além de suas características nutricionais básicas, de um modo que mantenha ou melhore a saúde e p bem-estar e/ou reduza o risco de uma doença. Esses produtos não podem ser cápsulas ou pílulas e devem fazer parte da dieta usual.” (Ashwell, 2002).

Ainda sobre a definição de Ashwell em 2002, um alimento pode ser considerado "funcional" se for demonstrado satisfatoriamente que afeta de maneira benéfica uma ou mais funções-alvo no corpo, além dos efeitos nutricionais adequados, de maneira que seja relevante para um melhor estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doença. Alimentos funcionais devem permanecer alimentos e devem demonstrar seus efeitos em quantidades que normalmente se espera que sejam consumidas na dieta. Eles não são comprimidos ou cápsulas, mas fazem parte de um padrão alimentar normal.

Baseado nas definições anteriores de Ashwell em 2002, foi descrito de maneira geral, o que pode ser considerado um alimento funcional:

1. Um alimento natural no qual um dos componentes foi aprimorado naturalmente por meio de condições especiais de cultivo;
2. Um alimento ao qual um componente foi adicionado para fornecer benefícios (por exemplo, a adição de bactérias probióticas selecionadas com características comprovadas de benefícios à saúde para melhorar a saúde intestinal);
3. Um alimento do qual um componente foi removido para que o alimento tenha menos efeitos adversos à saúde (por exemplo, a redução de ácidos graxos saturados);
4. Um alimento no qual a natureza de um ou mais componentes foi quimicamente modificada para melhorar a saúde (por exemplo, a proteína hidrolisada nas fórmulas infantis para reduzir a probabilidade de alergenicidade);
5. Um alimento no qual a biodisponibilidade de um ou mais componentes foi aumentada para fornecer maior absorção de um componente benéfico;
6. Ou qualquer combinação das possibilidades anteriores.

Uma variante dessa definição inclui alimentos fortificados e modificados como funcionais, devido a seus efeitos potencialmente benéficos sobre a saúde, quando consumidos como parte de uma dieta variada e em níveis efetivos, segundo a *American Dietetic Association* (ADA) em 2004. Para Rowland e Hoadley (2006), os avanços nos estudos das relações entre saúde e nutrição, a nível molecular e compostos bioativos, conduziram o conceito de alimentos funcionais como nova abordagem no âmbito da saúde e prevenção, visando reduzir o risco de doenças.

Difuso, o termo “alimento funcional” pode compreender também alimentos naturais não-industrializados, como o cogumelo, que podem receber alegações funcionais e de saúde.

Após essas definições, podemos concluir que o termo “Alimento Funcional” foi primeiramente descrito atrelado à cultura alimentar oriental, cuja população sempre considerou a capacidade terapêutica de uma dieta balanceada. Como consequência, as indústrias alimentícias passaram a associar o consumo de seus produtos a alguns efeitos benéficos de saúde em sua rotulagem. Houve então a necessidade desses alimentos em passar por uma análise e aprovação governamental, para poder apresentar essas alegações em seus rótulos. Tais exigências são:

1. O consumo adequado do alimento deve exercer um efeito regulador ou de melhoria de algum processo biológico;
2. O alimento deve ter propriedades capazes de realizar mecanismos de prevenção a uma doença específica;
3. Ser um ingrediente ou alimento convencional (não comprimidos ou cápsulas);
4. Ser consumido como integrante de uma dieta normal.

### **2.1.1 Diferenciação entre “alimentos funcionais” e “nutracêuticos”**

Embora vários termos tenham sido usados com significados semelhantes ao termo “alimentos funcionais”, um dos termos mais usados é “nutracêutico”. Em 1989, a Stephen L. DeFelice, um cientista americano, criou o termo *nutraceutical*, o qual surgiu da junção de *nutrition* e *pharmaceutical*, designando:

Um alimento ou partes de alimentos que forneçam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, suplementos e dietas alimentares a alimentos de designer geneticamente modificados, alimentos funcionais, produtos à base de plantas e alimentos processados, como cereais, sopas e bebidas (KWAK & JUKES, 2001).

Esse conceito guarda bastante similaridade com o de alimento funcional, dado que é focado em alimento e realça o potencial terapêutico de alguns de seus componentes.

No início deste século, houve uma confusão de nomenclaturas e muitos termos começaram a ser utilizados indiscriminadamente, tanto no meio científico, como no mercadológico e inclusive pela população em geral. Termos como “alimentos funcionais”, “nutracêuticos”, “farmaconutrientes” ou “integradores dietéticos” foram utilizados para referir-se a este novo tipo e tendência de alimento. Esta confusão de nomenclatura acontece em todos os níveis, e afeta principalmente os consumidores, que não conseguem entender claramente o significado destes novos produtos. Tal fato possibilita o ingresso de empresas com maior interesse financeiro do que no interesse de oferecimento de produtos que agreguem realmente um maior valor à saúde dos consumidores (NITZKE, 2012).

Nos Estados Unidos, o termo nutracêuticos inclui os suplementos dietéticos (em forma de cápsulas, tônicos, extratos), substitutos de refeições, alimentos funcionais, alimentos orgânicos e naturais e alimentos para praticantes de atividade física (DeFELICE, 2005). Segundo Daliu, Santini e Novellino (2018), nos últimos 10 anos as pesquisas publicadas na literatura sobre nutracêuticos, de origem vegetal e/ou animal, vêm crescendo com uma tendência exponencial positiva concentrando-se mais em seu mecanismo de ação do que na análise química de matrizes alimentares para evidenciar a presença de compostos ativos.

Devido ao aumento da demanda e utilização dos termos citados acima, houve a necessidade de redefinição do termo ‘nutracêutico’. De acordo com esta nova definição proposta, os nutracêuticos são constituídos pelo fitocomplexo, se derivam de um alimento de origem vegetal, ou se derivam de um alimento de origem animal. Em ambos os casos, eles devem ser administrados na forma farmacêutica mais adequada e devem ter um efeito benéfico à saúde, comprovado por dados clínicos (DAHIYA, 2013).

O Canadá é um dos poucos países que faz uma diferenciação legal entre alimentos funcionais e nutracêuticos. De acordo como o Ministério da Saúde canadense, alimento funcional é similar em aparência ou pode ser um alimento convencional, consumido como parte da dieta normal que demonstrou possuir benefícios fisiológicos ou reduzir o risco de doenças crônicas além de suas funções nutricionais básicas. Já o nutracêutico é um produto isolado ou purificado de alimentos que é geralmente vendido na forma medicinal não normalmente associado com alimento, que tenha demonstrado possuir um benefício fisiológico ou prover proteção contra uma doença crônica (NITZKE, 2012).

Diferente dos alimentos convencionais, segundo Zeisel (1999), o nutracêutico é um suplemento dietético, o qual tem o potencial de fornecer uma forma concentrada de um suposto agente bioativo de um alimento. É apresentado em uma matriz não alimentar e usado com o objetivo de melhorar a saúde em dosagens que excedem as que poderiam ser obtidas de alimentos normais.

A fronteira entre nutracêuticos e alimentos funcionais não é tão clara e a maioria dos consumidores e indústrias o utiliza de forma intercambiável. De acordo com Souza (2008), o conceito de alimentos funcionais é mais interessante à indústria de alimentos, enquanto o de nutracêuticos interessa mais às indústrias de suplementos e medicamentos. De um modo geral, os alimentos funcionais são considerados como aqueles destinados a serem consumidos como parte de uma dieta normal, mas contêm componentes biologicamente ativos que têm o potencial de melhorar a saúde ou reduzir o risco de doenças (GUL; SINGH; JABEEN, 2016).

## **2.2 *Lentinula edodes***

O *Lentinula edodes* é o segundo cogumelo comestível mais cultivado no mundo (OEI, 2005), cuja produção cresceu no período de 1986 a 1997 cerca de 400% (CHEN, 2005). Seu cultivo originou-se na China, por volta de 960 d.C., sendo introduzido no Japão por intermédio de cultivadores chineses. Posteriormente, o cultivo foi introduzido nos Estados Unidos e Europa.

Estes cogumelos são amplamente apreciados no Japão por apresentarem sabor agradável e por possuírem propriedades medicinais relacionadas à prevenção de doenças do coração e proporcionarem aumento na resistência contra viroses

(DERMIKI et al., 2013). Nas Américas Central e do Sul, o cultivo comercial vem se desenvolvendo nos últimos 25 anos, especialmente desde 1990. No Brasil, seu cultivo aumentou significativamente devido ao bom retorno econômico, possibilidade de ser cultivado em pequenas áreas e necessidade de baixo investimento inicial (ROSSI, 1999).

O *Lentinula edodes*, popularmente conhecido como Shiitake (Figura 1), corresponde à 25% da produção mundial. Assim, como todo cogumelo comestível, é um alimento completo do ponto de vista nutricional por possuir baixo teor lipídico, alto teor proteico e fonte de vitaminas e minerais (SPIM et al. 2016). Propriedades bioativas de *Lentinula edodes* podem ser sugeridas para altas concentrações de  $\beta$ -glucanas e fibras, entre outras. Assim, apesar de o *Lentinula edodes* não auxiliar na perda de peso, pode ser uma excelente fonte nutricional em suplementos alimentares (especialmente em distúrbios metabólicos associados ao alto consumo de gordura).

**Figura 1** - Imagem do cogumelo *Lentinula edodes*, conhecido por Shiitake.



Fonte: <<http://www.mushroomcouncil.com/varieties/shiitake/>>

Os cogumelos comestíveis, em geral, são considerados boa fonte de proteínas digeríveis, com valores acima de vegetais. Este conteúdo pode variar dependendo da espécie de 10 a 40% em base seca, contendo todos os aminoácidos essenciais, mas podem ser limitantes no conteúdo de aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina. Em termos de quantidade de carboidratos, o Shiitake contém de 67,5 a 78%, sendo eles constituídos de pentoses, hexoses e dissacarídeos. Já a porcentagem de fibras varia de 7,3% a 7,8%. Estas são de fácil digestão e fazem com que o shiitake tenha um baixo valor calórico. Quanto ao conteúdo de lipídeos, os cogumelos contêm porcentagens muito baixas, e os ácidos graxos são predominantemente insaturados (BREENE, 1990).

Nutricionalmente, o *Lentinula edodes* apresenta alto valor nutritivo, com minerais essenciais quantidades significativas de vitaminas como tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina, biotina, ácido ascórbico (vitamina C), ergosterol (precursor da vitamina D), ácido pantotênico (vitamina A), vitaminas E, B6 e B12, e seus precursores (OEI, 2005; CHEN, 2005). Seus corpos de frutificação possuem de 88 a 92% de água, baixo teor de calorias e de sódio, elevado teor de potássio, fósforo e de oligoelementos, incluindo o cobre e o zinco (BISEN et al., 2010) (Tabela1).

**Tabela 1** - Composição química geral do *Lentinula edodes* por 100g de cogumelo.

Calorias	55 kcal
Niacina	1,5 mg
Vitamina B6	0,16 mg
Folacina	20 mg
Vitamina C	0,3 mg
Cobre	0,9 mg
Magnésio	14 mg
Fósforo	29 mg
Potássio	2,18 mg
Zinco	5,5 mg
Sódio	30 mg

Fonte: BISEN et al., 2010.

Os extratos do Shiitake contêm uma variedade de proteínas, além de polissacarídeos e aminoácidos. Desde 1991, evidências indicam que o *Lentinula edodes* possui propriedades antitumorais, antivírus e imunomoduladoras. A  $\beta$ -glucana presente no *Lentinula edodes* é conhecida como lentinan ou lentinana (NEHA et al., 2012). Essa glucana tem estrutura molecular que segue uma ordem, formando um anel, que difere da celulose das plantas, pois apresenta um tipo especial de ligação entre as unidades, e possui ramificações de alto peso molecular (CLEARY; GRAHAN; HUSBAND, 1999).

Estudos *in vivo* e *in vitro* confirmaram que a lentinan, por ser  $\beta$ -glucana, induz a apoptose e a supressão da proliferação de células tumorais (JEFF et al., 2013). A

lentinan não possui apenas efeitos anticancerígenos, possui também potencial medicinal como antiviral, antibacteriano e antifúngico (HATVANI, 2001).

Além da imunoproteção, esta classe de cogumelos produz substâncias efetivas para a redução do colesterol e da pressão sanguínea, além de substâncias com ação antitrombótica e hipoglicêmica (WASSER & WEIS, 1999). No estudo de Spim e colaboradores, em 2016, foram relatados diferentes parâmetros associados à ingestão de uma dieta rica em gordura e *Lentinula edodes*. O cogumelo demonstrou ser um bom nutracêutico contra distúrbios metabólicos por sua ação hipocolesterolêmica, bem como por sua capacidade de aumentar os níveis de HDL, restaurar a concentração de ureia a níveis normais, diminuir os níveis de transaminases e estimular o sistema imunológico.

Além disso, um fator que também tem despertado a atenção para a aplicação do cogumelo shiitake é sua propriedade antioxidante relacionada à presença de compostos fenólicos bioativos (ZHANG et al., 2013). Entretanto, apesar de todas essas propriedades funcionais, ainda não há na literatura estudos avaliando seu consumo seguro na gestação.

### **2.3 Testes de segurança de alimentos**

A partir do consenso sobre “Conceitos Científicos de Alimentos Funcionais na Europa” (ASHWELL, 2002), o foco da ciência funcional dos alimentos não é o produto, mas sim a maneira pela qual nutrientes e componentes alimentares específicos afetam positivamente as respostas biológicas no corpo. Embora muitos produtos alimentícios funcionais estejam no mercado, é mais fácil explicar a lógica científica por trás desses alimentos como um conceito orientado a funções. Dessa maneira, o conceito pode ser universal e não influenciado pelas características locais ou tradições culturais que determinam os produtos em mercados específicos de alimentos.

Com essas exigências e a grande preocupação com a segurança e comprovação prévia de alimentos ou ingredientes com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) forneceu o “Guia para comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes”:

“A comprovação pré-mercado da segurança de uso de determinados alimentos e ingredientes é uma exigência legal, estabelecida pela Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com objetivo de proteger a saúde da população e reduzir os riscos associados ao consumo desses produtos, em resposta às constantes inovações tecnológicas e ao aumento do comércio internacional” (ANVISA, 2013).

De fato, várias áreas importantes da fisiologia humana são relevantes para a ciência funcional dos alimentos, como fisiologia cardiovascular, fisiologia gastrointestinal, desempenho físico, desempenho cognitivo e mental, defesa contra o estresse oxidativo, regulação de processos metabólicos básicos, gestação e desenvolvimento fetal, entre outros.

### **2.2.1. Toxicologia reprodutiva**

A toxicidade reprodutiva refere-se à interferência tóxica ao sistema reprodutor a qualquer espécie de capacidade reprodutiva tanto de machos, quanto de fêmeas, incluindo desenvolvimento pré-natal (NEUBERT & CHAHOUD, 1995). Segundo Oga (2008), toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo.

Segundo o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” da ANVISA (2013), os estudos de toxicidade reprodutiva contemplam três fases, sendo uma delas o desenvolvimento embrio-fetal. Para tal fase seguem as seguintes orientações:

1. Via de Administração: A mesma pretendida para uso humano.
2. Período de Observação: Fêmeas devem ser submetidas à eutanásia e examinadas um dia antes da parição. Todos os fetos devem ser identificados individualmente e examinados quanto à viabilidade e anormalidades no dia da eutanásia.
3. Dosagem: A escolha da dose alta deve ser baseada nos dados de todos os estudos disponíveis (farmacologia, estudos de toxicidade aguda/crônica e toxicocinética).
4. Parâmetros a serem avaliados: Durante o estudo devem ser avaliados sinais clínicos e mortalidade, alteração de peso corpóreo, consumo de

ração, observações relevantes provenientes de outros estudos de toxicidade. Ao final do estudo: necropsia com avaliação macroscópica de todos os adultos, contagem de corpos lúteos, número de implantações que resultaram em fetos vivos e mortos, peso corpóreo individual fetal, anormalidades fetais, avaliação da placenta, preservar órgãos com achados macroscópicos para possíveis avaliações histopatológicas e órgãos correspondentes em quantidade suficiente para comparação (controle). Nos estudos é necessário que os animais tenham idade e peso comparáveis.

## **2.4 Alimentos Funcionais na gestação e desenvolvimento fetal**

A alimentação das mães durante a gravidez e lactação de seus bebês é de grande importância biológica. O curso da gravidez e o parto, bem como a composição do leite materno e o desenvolvimento a curto e longo prazo da criança, são influenciados pela ingestão de nutrientes (BRASIL, 2000).

A alimentação da gestante e os fatores nutricionais durante o desenvolvimento inicial podem afetar a saúde imediata com efeitos a curto prazo no crescimento, composição corporal e funções corporais da criança. Além disso, a alimentação da mãe pode exercer efeitos a longo prazo no concepto. O desenvolvimento de funções e comportamentos neurais em adultos, bem como os riscos gerais de mortalidade, podem ser afetados pela desnutrição precoce (ASHWELL, 2002).

Além de tais complicações para a criança, uma alimentação comprometida pode predispor a mãe a problemas de saúde, como diabetes gestacional. Entre seus efeitos no desfecho da gestação, o diabetes gestacional pode induzir alterações estruturais e funcionais da placenta, alterando a composição dos nutrientes fetais com consequências para o feto em crescimento (DESOYE & SHAFRIR, 1994). Portanto, os desequilíbrios na ingestão nutricional e no estado durante a gravidez podem ter efeitos duradouros tanto nos resultados da saúde materna, como na saúde e no desenvolvimento da prole a longo prazo (ALFARADHI & OZANNE, 2011).

A gravidez pode ser descrita por um modelo de três compartimentos composto por mãe, placenta e feto apresentando seu próprio metabolismo enquanto interagem entre si. Cada um desses compartimentos tem características fisiológicas,

metabólicas e genéticas diferentes, com função de transporte placentário proeminente na determinação do suprimento fetal e na composição do sangue do cordão umbilical. Durante a vida intrauterina, a placenta representa um órgão que interage com o feto com a mãe, sendo essencial para a nutrição antes do nascimento (PARDI & CETIN, 2005).

As influências da nutrição materna na programação epigenética são mais importantes durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce, quando os mecanismos epigenéticos passam por maturação. O rompimento de padrões normais no desenvolvimento específico de genes por perturbações na nutrição materna pode afetar o resultado da gravidez, com implicações de longo prazo. Assim, estudos sobre complicações da gravidez sugerem que o metabolismo alterado de micronutrientes pode contribuir ainda mais para o risco de distúrbios do neurodesenvolvimento em crianças. O ambiente intrauterino adequado é necessário para o crescimento placentário e fetal durante a gravidez. A nutrição materna é um importante fator ambiental intrauterino que afeta o desenvolvimento da unidade fetoplacentária. A nutrição materna adequada desempenha um papel essencial na proteção do embrião contra deficiências, que podem ser inerentes à circulação da mãe, especialmente durante os primeiros estágios da gravidez, quando a placenta ainda não está formada (DHOBALÉ, 2016).

A gravidez e os primeiros meses pós-natais são períodos críticos para o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso, processos para os quais são essenciais suprimentos nutricionais adequados. A dieta precoce parece ter efeitos a longo prazo nas habilidades sensoriais e cognitivas, bem como no comportamento. Segundo Pardi e Cetin (2005), o crescimento fetal é regulado pelo equilíbrio entre a demanda de nutrientes fetais, determinada pelo seu potencial de crescimento genético, e o suprimento materno-placentário. Do ponto de vista nutricional, o feto depende do suprimento materno de nutrientes através da placenta para a circulação umbilical. Os fatores que determinam o suprimento materno-placentário de nutrientes incluem nutrição e metabolismo maternos, gradiente de concentração materno-fetal, fluxo sanguíneo uteroplacentário, tamanho da placenta e suas capacidades de transferência.

São muitos os estudos que comprovam os efeitos benéficos de vários cogumelos comumente utilizados, mas os dados de segurança à base de plantas e

fungos estão muito menos disponíveis do que outros ensaios de drogas. Embora haja dados limitados para indicar se esses agentes terapêuticos são seguros, muitas pessoas, no entanto, consomem várias doses de suplementos de ervas e plantas todos os dias.

A quantidade de gestantes utilizando tratamentos alternativos e uma alimentação diferenciada vêm aumentando exponencialmente, seja porque tais mulheres se sentem confortáveis usando medicações naturais por causa de sua segurança percebida e acesso fácil. Embora muitos produtos naturais apresentem somente leves efeitos adversos em indivíduos saudáveis, os dados relativos à segurança durante a gravidez são muito limitados (LOW DOG, 2009). Além disso, os mecanismos bioquímicos relacionados à nutrição materno-fetal e à saúde da prole não são claramente entendidos (BERTI et al., 2016).

A avaliação dos efeitos da dieta no crescimento infantil requer estudos epidemiológicos e de campo, bem como a avaliação de crescimento específico de células e tecidos. Fatores de crescimento e nutrientes essenciais podem ser úteis como ingredientes em alimentos funcionais. O crescimento, a maturação e a adaptação intestinal, por exemplo, bem como sua função a longo prazo, podem ser influenciados por ingredientes alimentares, como oligossacarídeos, gangliosídeos, glicoproteínas de alto peso molecular, lipases ativadas por sal biliar e pré e probióticos (ASHWELL, 2002).

Manifestações da toxicidade durante a gravidez representam um desafio especial para os prestadores de cuidados de saúde, devido ao potencial de uma ameaça à vida imediata ou possíveis implicações ao longo da vida, tanto para a mãe quanto para o feto. As possíveis complicações incluem a teratogenicidade, como malformações estruturais, retardo de crescimento, comprometimento funcional e/ou morte do organismo, considerando que é impossível separar o metabolismo placentário do metabolismo materno e fetal, pois a placenta está localizada no meio de vários processos metabólicos (GERENUTTI et al, 2008).

Apesar da grande quantidade de estudos científicos sobre os efeitos terapêuticos e tóxicos do *Lentinula edodes*, poucos são aqueles que abordam a toxicologia reprodutiva, ou seja, fertilidade, efeitos teratogênicos e exposição pré ou perinatal.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar, por meio de testes pré-clínicos, o desenvolvimento gestacional, a segurança materno-fetal e os efeitos da administração diária de *Lentinula edodes* em ratos Wistar, considerando suas potencialidades funcionais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

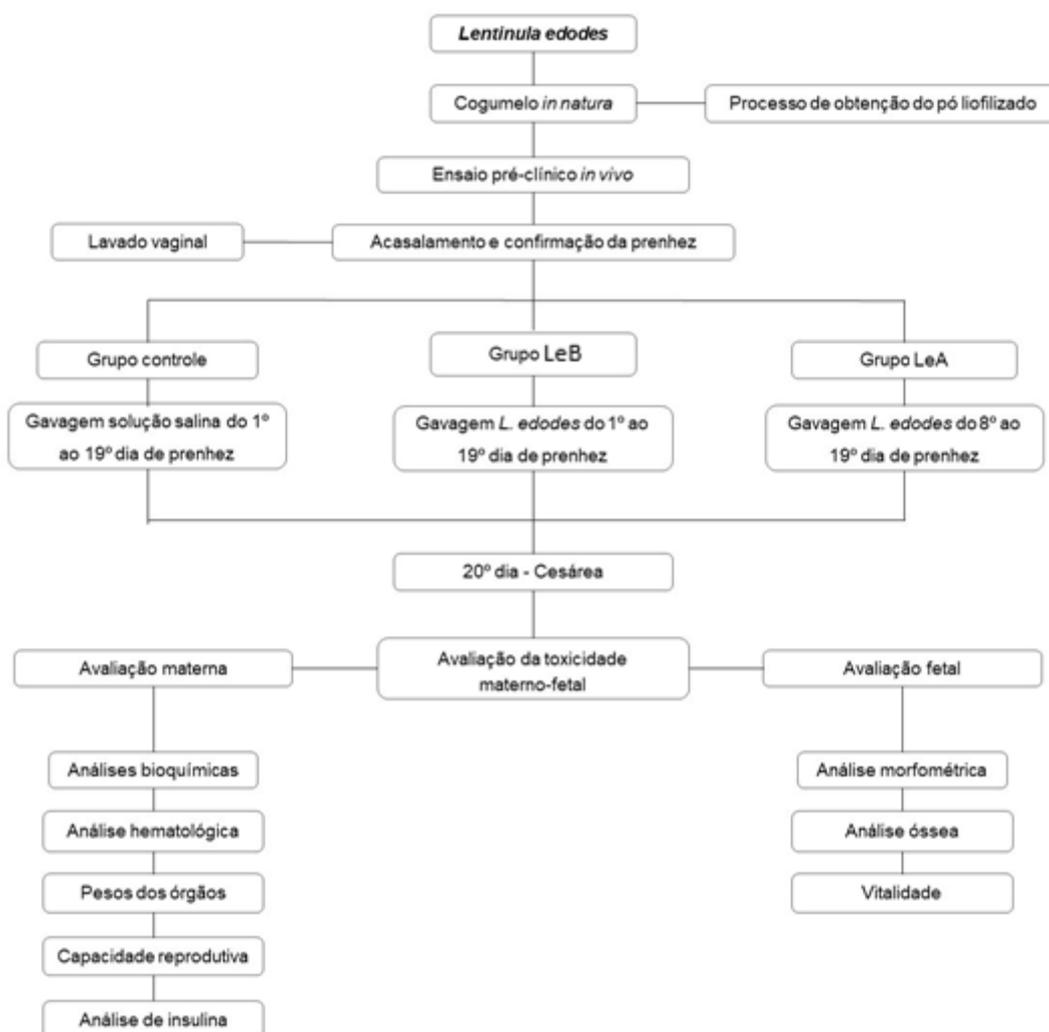
- Avaliar a toxicidade materna durante o período de gestação por meio de análises do ganho de peso, dos parâmetros bioquímicos e dos índices hematimétricos.
- Avaliar a capacidade reprodutiva de ratas, verificando perdas pré e pós-implantação do embrião, a vitalidade e a morfologia fetal.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.3 Delineamento do estudo

Trata-se de um ensaio pré-clínico, experimental com ratos Wistar. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba CEUA/UNISO, Sorocaba-SP, sob o protocolo 089/2016 (Anexo I). Todas as experiências foram realizadas de acordo com a diretriz internacional - ARRIVE (*Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments*). A figura 2 apresenta, esquematicamente, o delineamento do estudo.

**Figura 2** - Fluxograma do delineamento do estudo.



Fonte: elaboração própria

### 3.4 Obtenção do pó liofilizado de cogumelo

O cogumelo foi adquirido comercialmente, da Yuri Cogumelos, em Sorocaba. Amostras de cogumelo *in natura* foram picadas, em tamanhos homogêneos, no mesmo dia da coleta e armazenadas em *biofreezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  (REVCO® ULT-1386-3-D) por um período de aproximadamente 24h. O material congelado foi liofilizado em Liofilizador (Termo Savant, LK-40), até a obtenção de 10% de massa seca, por aproximadamente 48h.

A amostra seca foi moída em moinho de facas e martelo (Marconi®). Logo após, a amostra moída foi tamisada em tamises de malha 50 e malha 60, com a finalidade de obtenção de partículas homogêneas para serem suspensas em água. O pó tamisado foi acondicionado em embalagens plásticas herméticas, mantidas em dessecador para evitar umidade.

### 3.5 Animais

Ratos Wistar, machos e fêmeas, foram adquiridos do Biotério da Universidade de São Paulo – USP (São Paulo, Brasil). Os animais estavam pesando entre 180 a 200g e todos apresentaram atestados de saúde emitido pelo biotério da USP (Anexo II). Os animais foram ambientados no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Pesquisa Toxicológica – Lapetox - UNISO (Figura 3), conforme as normas de bem-estar animal, em gaiolas ventiladas e com forração de maravalha. A temperatura e o ciclo claro/escuro eram controlados automaticamente a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 12h, respectivamente. Os animais receberam água e a ração *ad libitum* durante todo experimento.

**Figura 3** - Animais ambientados no Biotério.



Fonte: elaboração própria

### **3.6 Acasalamento, prenhez e exposição ao cogumelo**

Para o acasalamento, os animais foram alojados em número de seis, 01 macho com 05 fêmeas, por um período noturno de 12 horas. Por meio de observações microscópicas (Microscópio Biológico, Modelo Axio Lab.A1, ZEISS®), a indicativa do primeiro dia da prenhez foi a presença de espermatozoides no esfregaço proveniente do lavado vaginal (Figura 4) (GERENUTTI, DEL FIOL & GROPPPO, 2006). As ratas prenhes foram alojadas em número de dois animais por gaiola após confirmação da prenhez.

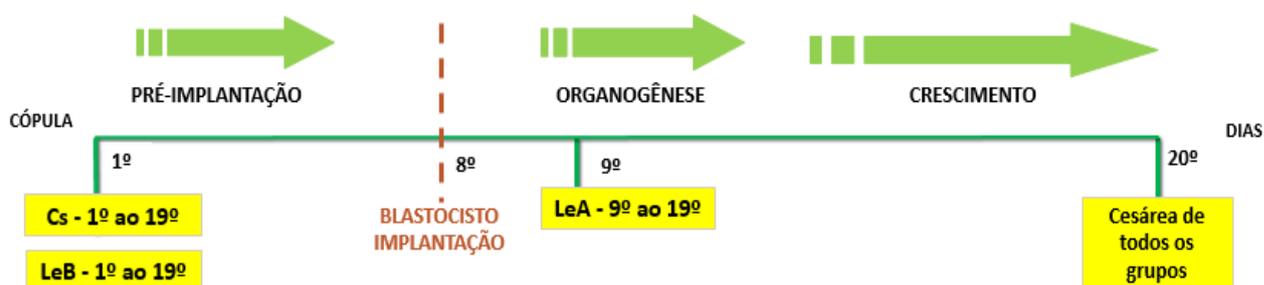
**Figura 4** - Presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (seta indicativa), comprovando a prenhez.



Fonte: elaboração própria.

O estudo foi dividido em três grupos: (I) Grupo controle; (II) Proteção contra perdas pré-implantação; (II) Proteção contra perda pós-implantação. Em todos os grupos foi realizada avaliação materna e embriofetal. Como representado na figura:

**Figura 5** - Fluxograma da gestação das ratas.



Fonte: elaboração própria.

No grupo I, solução salina 0,9% foi administrada do 1º ao 19º dia de prenhez. No grupo II, o pó do *Lentinula edodes* foi ressuspenso em solução salina 0,9% e administrado por via oral do 1º ao 19º dia de prenhez (desde antes da implantação). No grupo III, o pó do *Lentinula edodes* ressuspenso foi administrado por via oral do 9º ao 19º dia de prenhez, após a implantação. Portanto, os grupos foram divididos conforme figura 6.

**Figura 6** – Esquema da divisão dos grupos experimentais.

Grupo I (n = 6)	• Controle (C): recebeu solução salina 0,9% do 1º ao 19º dia
Grupo II (n = 6)	• <i>Lentinula edodes</i> antes (LeB): Recebeu <i>L. edodes</i> 100mg/Kg do 1º ao 19º dia
Grupo III (n = 6)	• <i>Lentinula edodes</i> depois (LeA): Recebeu <i>L. edodes</i> 100mg/Kg do 9º ao 19º dia

Fonte: elaboração própria.

A administração da solução salina e do *Lentinula edodes* ressuspenso foi realizada via gavagem (Figura 7), para garantir a dose de 100 mg/kg/dia e manter o mesmo estímulo e manipulação animal em todos os grupos.

**Figura 7** - Administração via oral (gavagem).



Fonte: elaboração própria.

As doses 100 mg/kg/dia de cogumelo foram definidas com base em estudos prévios (GERENUTTI et al, 2014; GROTTTO et al, 2016). No estudo de Grotto e colaboradores (2016), foram avaliadas três oncentrações de *Lentinula edodes* (100, 400 e 800 mg/kg/dia), e as duas maiores doses mostraram alguma toxicidade. O peso dos animais foi acompanhado diariamente.

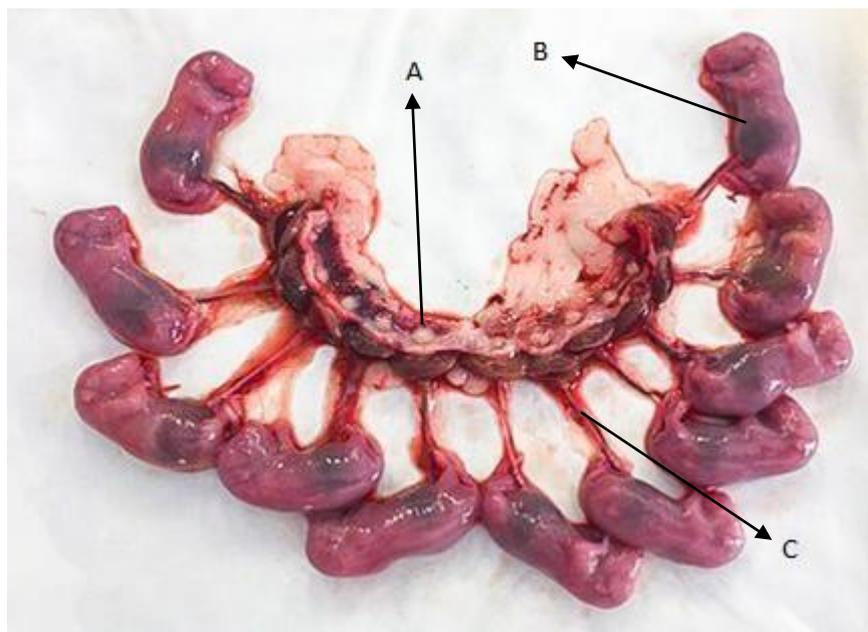
### **3.7 Avaliação da capacidade reprodutiva**

Para a avaliação da capacidade reprodutiva, foram realizadas as cesáreas no vigésimo dia de prenhez. As ratas, com jejum de 8 horas, foram anestesiadas com quetamina (anestésico geral na dose de 100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (relaxante muscular na dose de 6 mg/kg), via intraperitoneal.

Com uma incisão longitudinal na linha alba, foi feita a exposição do útero e dos ovários. O sangue foi coletado por punção venosa hepática em seringa previamente heparinizada, e transferido para dois tubos: 1) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para avaliação dos parâmetros hematológicos; 2) sem o anticoagulante e com gel separador, para análises bioquímicas.

O útero e os ovários foram retirados. Em seguida o útero foi inspecionado quanto ao número de fetos, de implantações e reabsorções visíveis (Figura 8). Os ovários, os fetos e as placentas foram pesados em balança (Ohaus® -AS200S). Após a coleta dos materiais, as ratas foram eutanasiadas por aprofundamento anestésico, seguido de perfuração do diafragma.

**Figura 8** - Foto do útero exposto com os fetos após a cesárea. Em A) observa-se um ponto de implantação; em B) um feto; em C) o cordão umbilical.



Fonte: elaboração própria.

Para avaliar a capacidade reprodutiva das perdas pós-implantação e vitalidade fetal, as seguintes equações foram utilizadas:

**Equação 1 - Porcentagem da Vitalidade Fetal.**

$$\% \text{ Vitalidade fetal} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de total de fetos}} \times 100$$

**Equação 4 - Porcentagem das Perdas Pós-Implantação.**

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

### 3.8 Avaliação hematológica

O equipamento automático Hematologia XS 1000i WAS (Roche®) foi utilizado para a avaliação dos parâmetros hematológicos maternos: hemoglobina (Hb),

hematócrito (HTC), contagem total de leucócitos (*White blood cells* - WBC), contagem total de eritrócitos (*Red blood cells* - RBC) e número de plaquetas (PLT).

### **3.9 Peso dos órgãos**

Os órgãos das fêmeas fígado, baço, rins, adrenais, útero e os ovários foram removidos no procedimento de cesárea e pesados em balança analítica Shimadzu® AUW220D.

### **3.10 Avaliação bioquímica materna**

A avaliação da função hepática das ratas prenhes foi feita pela dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Creatinina e ureia foram quantificadas para avaliar a função renal. Além disso, glicose, triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e cálcio foram analisados. Todos esses marcadores foram quantificados com o auxílio do equipamento automático Cobas C111 (Roche®) e seguiram metodologia específica do fabricante.

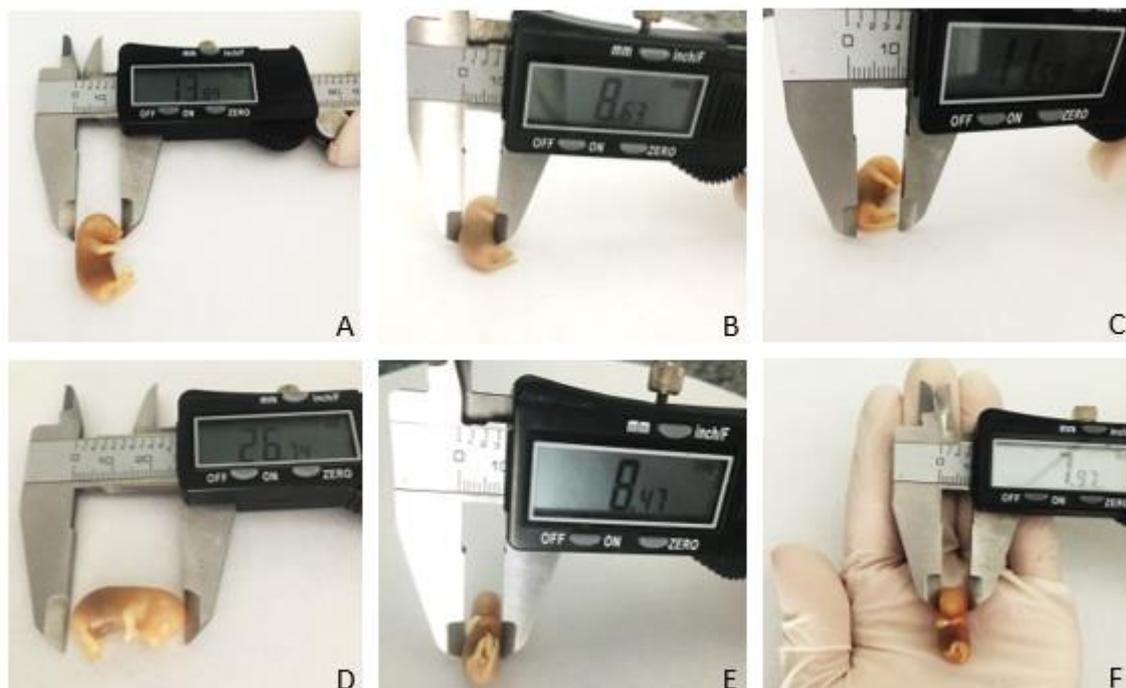
### **3.11 Avaliação de insulina**

A dosagem plasmática de insulina foi realizada por teste Elisa, de fase sólida, baseado no princípio Sanduíche, utilizando-se kit comercial específico para ratos, Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®.

### **3.12 Avaliação embrionfetal**

Os fetos foram pesados em balança analítica Shimadzu® AUW220D. A vitalidade de cada feto foi avaliada e contado os fetos mortos. Após, os fetos foram anestesiados e sacrificados com halotano (saturação de cuba). Os fetos foram analisados por meio de medidas morfométricas externas, através de um paquímetro digital: ântero-posterior do crânio, látero-lateral do crânio, ântero-posterior do tórax, látero-lateral do tórax, crânio-caudal e cauda (Figura 9).

**Figura 9** - Análise morfométrica dos fetos. A) Ântero-posterior de crânio; B) Ântero-posterior de tórax; C) Cauda; D) Crânio-caudal; E) Látero-lateral de tórax; F) Látero-lateral de crânio.



Fonte: Elaboração própria.

Para o estudo ósseo, os procedimentos de evisceração, diafanização e coloração foram realizados, segundo Frizo et al. (2014). Os fetos destinados à análise esquelética permaneceram em vidro com tampa de rosca, por duas semanas, em álcool a 70%. Para a evisceração (Figura 10), foi realizado um corte transversal abaixo das costelas e cortes oblíquos dos lados direito e esquerdo até a região anal, formando um triângulo. Utilizando uma pinça de ponta fina, foram retirados: as vísceras abdominais e pélvicas, o diafragma e as vísceras torácicas.

**Figura 10** - Feto eviscerado. A seta indica local das incisões para retirada das vísceras.

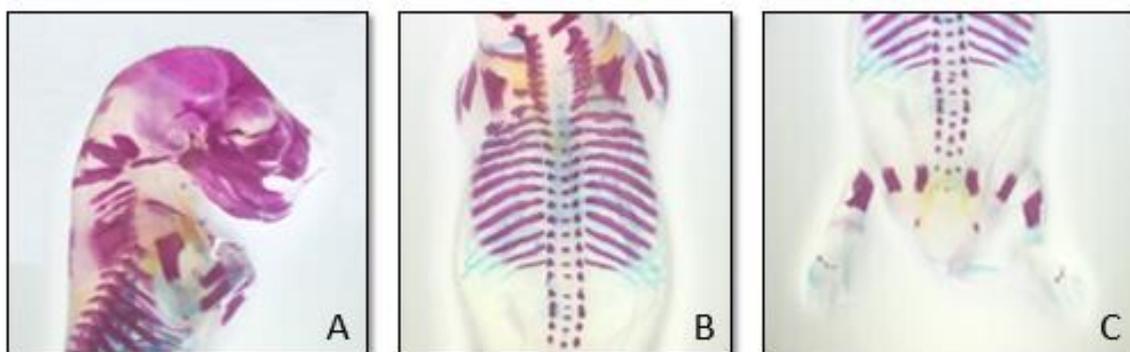


Fonte: Elaboração própria.

Posteriormente à evisceração, os fetos foram submetidos ao processo de diafanização e coloração (YOUNG; PHIPPS; ASTROFF, 2000). Nesse processo, a solução de hidróxido de potássio (KOH) foi utilizada atuando na pele e parte da musculatura. A diafanização foi alcançada com a maceração dos tecidos moles pelo KOH e o clareamento com a mistura de solução clareadora (álcool benzílico, glicerina e etanol absoluto).

A *Alizarin Red S plus* e o *Alcian blue* foram empregados para coloração uma vez que se fixam nos locais em que houve ossificação, e cora os ossos de vermelho e a cartilagem em azul, permitindo a observação do esqueleto (Figura 11). A avaliação foi realizada por observação direta com auxílio de lupa de bancada. Foram contados os pontos de ossificação do osso esterno, presença ou ausência de costelas, vertebrae e ossos, ossificação dos ossos do crânio bem como presença dos ossos da pelve.

**Figura 11** - Fetos após processo de diafanização e coloração para análise óssea. Em A) crânio, cervical e membros superiores; B) região torácica; C) lombar, pelve, membros inferiores e cauda



Fonte: elaboração própria.

### 3.13 Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, e % dos animais (n=6). Teste de homogeneidade foi aplicado e os dados mostraram-se não paramétricos. Assim, os resultados foram analisados por Kruskal-Wallis teste (ANOVA não paramétrica).

O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar diferenças nas perdas pré-implantação e perda pós-implantação, bem como em alguns fetos afetados por anomalias morfológicas e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As seções “Resultados” e “Discussão” encontram-se agrupadas, e apresentam o manuscrito resultante deste trabalho, seguindo as “Orientações para apresentação de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba”.

O artigo está em revisão pela revista *International Journal of Medicinal Mushrooms*, e segue as normas indicadas pela revista.

1 ***Lentinula edodes*: Absence of changes in maternal reproductive**  
2 **performance and embryo-fetal development *in vivo***

3

4 Isabella Ferreira Camargo<sup>1</sup>, Erika Leão Ajala Caetano<sup>1</sup>, Thaisa Borim Pickler<sup>1</sup>,  
5 Marli Gerenutti<sup>1</sup>, Denise Grotto<sup>1\*</sup>

6

7 <sup>1</sup> University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, SP, Brazil.

8

9 **\*Corresponding author:**

10 Denise Grotto

11 Graduate Program in Pharmaceutical Sciences

12 University of Sorocaba,

13 Rodovia Raposo Tavares Km 92.5, CEP. 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil;

14 Tel.: +55 15 2101 7104; Fax: +55 15 2101 7000

15 [denise.grotto@prof.uniso.br](mailto:denise.grotto@prof.uniso.br)

**16 Abstract**

17 The mushroom *Lentinula edodes* has been used as a nutritional complement due  
18 to the presence of antioxidants and fibers. This study evaluated, through reprotox  
19 tests, the consumption of *Lentinula edodes* in pregnant rats, considering it as a  
20 functional food. Pregnant rats were daily exposed to *Lentinula edodes* before  
21 implantation (LeB) - from 1 to 19 days of gestation, and after implantation (LeA)  
22 - from 9 to 19 days of gestation, compared to controls. On the twentieth day of  
23 gestation, cesarean sections were performed. Blood was collected and  
24 hematological parameters (hemoglobin, hematocrit, white and red blood cells  
25 and platelets) were analysed. Moreover, albumin, calcium, creatine kinase,  
26 alkaline phosphatase, transferases, creatinine, urea, triglycerides, cholesterol,  
27 lipase, glucose and insulin were assessed in serum. Organs were collected and  
28 weighed, and the fetuses were analyzed morphologically by body measurements.  
29 The consumption of *Lentinula edodes* reduced triglycerides levels and there  
30 were no changes in maternal weight, biochemical and hematological parameters,  
31 organ weight and reproductive capacity. There were no morphological changes  
32 in the fetuses' body measurements, suggesting possible safety in ingestion of  
33 mushroom. Reprotox tests used to evaluate the daily consumption of *Lentinula*  
34 *edodes* points out potentiality as a functional food, suggesting security during  
35 the gestational period.

36 **KEYWORDS:** Functional food, *Lentinula edodes*, reproduction toxicology,  
37 preclinical trial, shiitake.

38

**39 ABBREVIATIONS:**

40 ALT - Alanine Aminotransferase

- 41 AST - Aspartate aminotransferase
- 42 CEUA - Animal Ethics Committee
- 43 Cl - Corpus luteum number
- 44 EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid
- 45 Ft - Total number of fetuses
- 46 HDL-col - High Density Lipoprotein
- 47 Imp - Number of implantations
- 48 LeA - *Lentinula edodes* after implantation
- 49 LeB - *Lentinula edodes* before implantation
- 50 Lf – Number of live fetuses
- 51 PLT – Platelet
- 52 RBC – Red Blood Cells
- 53 WBC – White Blood Cells

## 54 **Introduction**

55 Foods are responsible for basic nutritional functions, providing all  
56 nutrients needed for the development and growth of living things.<sup>1</sup> Over the  
57 years, the interest in functional foods is growing, not just for basic nutritional  
58 function but rather in the prevention and treatment of different pathologies.<sup>2</sup> The  
59 term functional food emerged in Japan in the 1980s, and since then studies on  
60 the relationship between nutrition and pathologies have intensified.<sup>3</sup>

61 Foods that contain activity-influencing components for physiological or  
62 metabolic effects, especially due to the bioavailability of antioxidants, are  
63 considered a key factor in the biological activity of these foods.<sup>4</sup> Several species  
64 of edible mushrooms have been related to the control and prevention of different  
65 pathologies such as hypertension, diabetes, cholesterol and others.<sup>5-7</sup>

66 There is a great interest in *Lentinula edodes* mushroom not only from the  
67 scientific community but also by the population, once therapeutic properties  
68 have been attributed to this mushroom: antiviral, antibacterial, hypoglycemic,  
69 antihypertensive, antitumor and immunomodulatory. *Lentinula edodes* has high  
70 levels of dietary fiber such as  $\beta$ -glucans and it is rich in bioactive compounds  
71 such as phenolic compounds and tocopherols, which are responsible for its  
72 antioxidant activity.<sup>8-11</sup> Regarding  $\beta$ -glucans, they are soluble fiber important in  
73 reducing cholesterol and glucose absorption by diabetics, as well as modulating  
74 the immune system.<sup>12,13</sup>

75 However, although several studies focus on the therapeutic effects of this  
76 mushroom, little information is available about its consumption during  
77 pregnancy, its possible side effects and toxicity<sup>14</sup>. The objective of this study  
78 was to evaluate the consumption of the edible-medicinal *Lentinula edodes*

79 mushroom regarding its reproductive performance and the embryo-fetal  
80 development of rats.

## 81 **MATERIAL AND METHODS**

### 82 **Ethical Approval of Study Protocol**

83 The study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the  
84 University of Sorocaba CEUA/UNISO Protocol No. 089/2016. All experiments  
85 were performed in accordance with the international directive ARRIVE (Animal  
86 Research: Reporting of *in Vivo* Experiments).<sup>14,15</sup> The reproductive toxicology  
87 program included segment 2 study: Embryophetotoxicity (from implantation to  
88 the end of organogenesis), viability and morphology (external, visceral and  
89 skeletal analysis) of the conceptus before birth.

### 90 **Mushroom preparation**

91 *Lentinula edodes* was supplied by the commercial company Yuki  
92 Mushrooms (São Paulo, Brazil) *in natura*. Mushroom samples were minced in  
93 homogeneous sizes and stored in a biofreezer at -80°C (REVCO® ULT-1386-3-  
94 D) for approximately 24 h. The frozen material was lyophilized in Thermo  
95 Savant Freeze Dryer, LK-40, for approximately 48 hours, until 10% of dry mass  
96 was obtained. The dried sample was ground in a knife mill (Marconi® - MA340  
97 Série 0004201), then sieved in sieves (mesh 50 and mesh 60) in order to obtain  
98 homogeneous particles. The sieved powder was packaged in airtight plastic  
99 containers, kept in a desiccator.

### 100 **Outline of gestational experimentation**

101 Male and female Wistar rats were used, weighing between 180 and  
102 200g. They were obtained with their respective health certificates from the Rat

103 Production Laboratory of the University of São Paulo - USP. The animals were  
104 housed in LAPETOX Animal Experimentation Vivarium, according to animal  
105 welfare standards, in ventilated, acclimatized and shavings-lined cages. The  
106 temperature and the light/dark cycles were automatically controlled at  $22 \pm 2$  °C  
107 and 12h, respectively. The animals received food and water *ad libitum*.

108 For mating, the animals were housed in a number of three (one male with  
109 two females), for a night period of 12 hours. Through microscopic observations  
110 (Biological Microscope, Model Axio Lab.A1, ZEISS®), the indicative of the  
111 first day of pregnancy was the presence of sperm in the smear from the vaginal  
112 wash.<sup>16</sup> The pregnant rats were housed under special conditions, considering  
113 animal welfare, with two animals per cage.

114 A total of 18 pregnant rats were randomly divided into 3 groups: Cs  
115 (control saline; 0.9% saline); LeB (100 mg *L. edodes*/kg/day before fetus  
116 implantation - from day 1 to 19 of the gestational period); LeA (100 mg *L.*  
117 *edodes*/kg/day after fetus implantation - from day 9 to day 19 of the gestational  
118 period). Females received daily, at 10:00, a 0.9% saline solution or *L. edodes* by  
119 oral gavage. The body weight was accompanied by 19 days.

#### 120 **Cesarean section procedure and biological material collection**

121 On the day 20 of gestation, the fasting rats were anesthetized with  
122 ketamine (100 mg/kg general anesthetic) and xylazine hydrochloride (6 mg/kg,  
123 muscle relaxant) intraperitoneally. Cesarean sections were performed with a  
124 longitudinal incision in the alba line to expose the uterus and ovaries. Blood was  
125 collected by hepatic venipuncture in a previously heparinized syringe and  
126 transferred to two tubes: a tube containing anticoagulant ethylenediamine  
127 tetraacetic acid (EDTA) for evaluation of hematological parameters, and a tube

128 without anticoagulant and a separating gel for biochemical analysis. All samples  
129 were kept at -80°C until analysis.

130 Females were euthanized and the liver, spleen, kidneys, suprarenal,  
131 uterus and ovaries were removed and weighted. The uterine cavities were  
132 checked for number of fetuses, implantation and visible resorption. The ovaries  
133 and uterus were weighed and the corpus luteal were counted. After the  
134 embryonic sac rupture, the fetuses were separated from the placentas, weighed  
135 and analyzed by external morphometric measurements.

### 136 **Hematological parameters**

137 The maternal hematological parameters hemoglobin, hematocrit, white  
138 blood cells (WBC), red blood cells (RBC) and platelet number (PLT) were  
139 analyzed in the automatic Hematology XS 1000i WAS, Roche® equipment.

### 140 **Maternal biochemical profile**

141 The liver function of pregnant rats was evaluated by alanine  
142 aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) enzymes.  
143 Creatinine and urea were quantified to assess renal function. In addition, levels  
144 of glucose, triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL-  
145 cholesterol), lipase, albumin, alkaline phosphatase, creatine kinase and calcium  
146 were analyzed. All these markers were quantified with the aid of the Cobas C111  
147 (Roche®) automated equipment. Each marker followed the manufacturer's  
148 specific methodology.

149 Plasma dosage of insulin was performed by a solid phase Elisa test based  
150 on the Sandwich principle using a Rat/Mouse Insulin Elisa Kit - Merck®  
151 commercial mouse-specific kit.

152           **Reproductive performance assessment**

153           Female organs: liver, spleen, kidneys, suprarenal, uterus and ovaries  
154 were removed and weighed on an analytical balance.

155           Uterine cavities were checked for number of fetuses, implantation and  
156 visible resorption. The ovaries were weighed and the corpora lutea were  
157 removed manually with a scalpel and then counted. The fetuses were removed  
158 from gestational sacs, counted, analyzed as for vitality and natality, weighed and  
159 euthanized in halothane chamber. Reproductive performance was assessed by:  
160 (a) pre-implantation loss percentage, (b) post-implantation loss percentage, (c)  
161 offspring vitality percentage, (d) fetus weight, (e) placenta weight, (f) placental  
162 index and (g) ovary weight.

163           The pre-implantation loss rate was calculated using the following  
164 formula method:

$$165 \quad Cl - Imp \times 100 = Cl$$

166           Post-implant loss rate was calculated by the formula:

$$167 \quad Imp - Lf \times 100 = Imp$$

168           The offspring's vitality was determined according to the formula:

$$169 \quad Lf \times 100 = Ft$$

170           In which:

171           Cl is the corpus luteal number;

172           Imp is the number of implants;

173           Lf refers to number of live fetuses;

174           Ft is the total number of fetuses.

175 And the placental index was taken as placental weight/fetal weight.<sup>17,18</sup>

### 176 **Embryofetal Development**

177 Morphological aspects were verified by comparing body measurements  
178 of control fetuses with those exposed to *Lentinula edodes*. The anteroposterior  
179 and lateral-lateral length of the skull, anteroposterior and lateral-lateral of the  
180 thorax, cranial-caudal and tail were measured in cm with the aid of a digital  
181 caliper.

182 For bone study, evisceration, diaphanization and staining procedures  
183 were performed.<sup>19</sup>

### 184 **Statistical analysis**

185 Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation and percentage (%) of  
186 animals. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA).  
187 The chi-square test was used to evaluate differences in preimplantation and  
188 postimplantation loss and vitality, as well as in some fetuses affected by  
189 morphological anomalies. P values  $<0.05$  were considered significant.

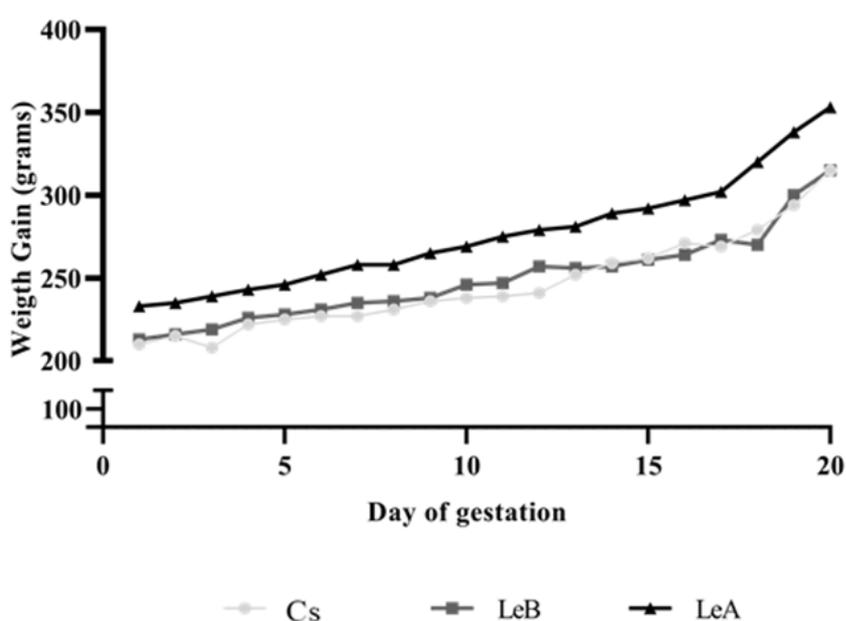
## 190 **RESULTS AND DISCUSSION**

191 In the present study, the safety of the *Lentinula edodes* mushroom was  
192 evaluated in females during pregnancy, before and after fetal implantation. Data  
193 from 2009 suggested about 120,000 babies (1 in 33) are born each year with birth  
194 defects, being the leading cause of death during the first year of life.<sup>20</sup> These  
195 cases may be directly related to the indiscriminate use of alternative products  
196 such as functional and nutraceutical foods.<sup>21</sup>

197 **Weight of pregnant rats**

198 Figure 1 presents the results of body weight of pregnant rats. Despite the  
199 randomized allocation, the group LeA presented from de beginning a larger body  
200 weight, but without significant difference compared to the other groups.

201 **Figure 1** – Body weight evolution of pregnant rats exposed to *Lentinula*  
202 *edodes*.



203

204 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day de *Lentinula*  
205 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
206 after fetus implantation). Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6).

207 The pregnant rats body weight remained stable throughout the period.

208 Only a tendency for weight gain was found in the LeA group in the period from

209 10 to 20 days ( $p = 0.06$ ). The absence of variations in biometrics (initial weight,

210 final weight, weight gain), as reported in the literature,<sup>22</sup> suggests safety in the

211 consumption of this mushroom during pregnancy. As in the study by Won et al,

212 which illustrated the change in body weight during the 10-week experimental

213 period and until the end of the experiment, no significant difference was

214 observed between the simulated groups, suggesting that the mushroom  
215 components had no effect on body weight.<sup>23</sup>

### 216 **Hematological parameters**

217 Table 1 shows the values of WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit and  
218 platelet. The rats that received *Lentinula edodes* before and after implantation  
219 did not present significant alterations in these parameters when compared to the  
220 rats of the control group.

221 **Table 1** - Hematological parameters of pregnant rats exposed to *Lentinula*  
222 *edodes*.

Parameters	Groups		
	Cs	LeB	LeA
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	6.38 ± 0.90	6.10 ± 1.37	5.49 ± 0.98
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	5.93 ± 0.24	6.01 ± 0.76	5.78 ± 0.26
Hemoglobin (g/dL)	11.61 ± 0.53	11.62 ± 1.51	11.52 ± 0.57
Hematocrit (%)	35.28 ± 1.86	35.03 ± 4.08	34.48 ± 1.42
Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)	751.85 ± 191.12	794.80 ± 152.52	700.05 ± 263.37

223 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
224 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
225 after fetus implantation). WBC (White blood Cells), RBC (Red Blood Cells).  
226 Data are presented as mean ± SD (n = 6).

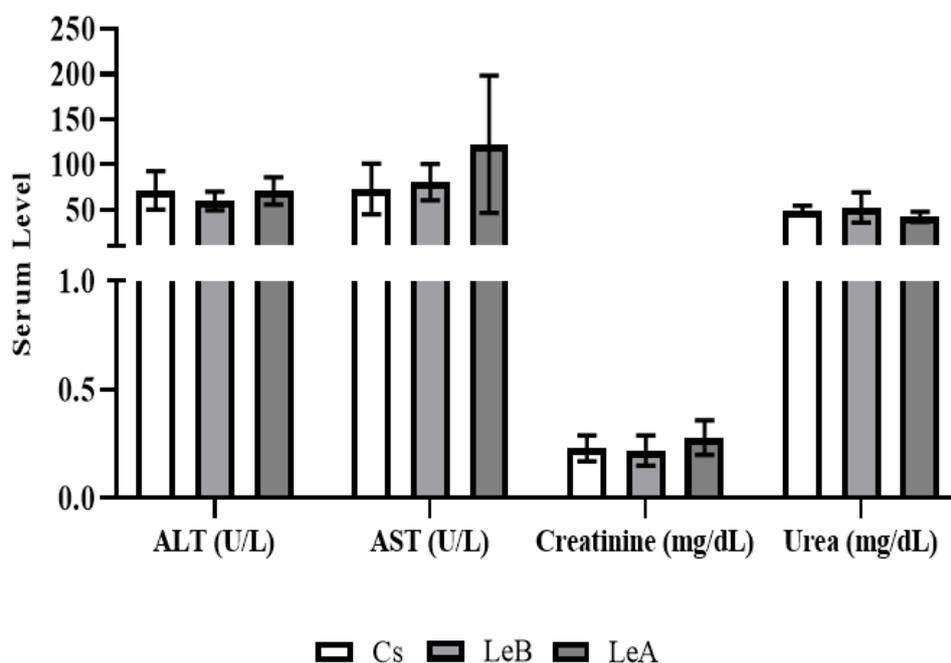
227 According to Lull et al, β-glucans, triterpenes and phenols are important  
228 substances found in medicinal mushrooms responsible for their  
229 immunomodulatory activity, affecting bone marrow cells and inducing  
230 hematopoiesis.<sup>24</sup> However, in healthy pregnant rats exposed to *Lentinula edodes*,  
231 RBC, WBC and platelet levels remained normal, proving the mushroom did not  
232 alter blood cells and platelets. These data are similar to those of Morais et al,

233 who studied the effects of the mushroom *Agaricus sylvaticus* in acute toxicity  
 234 testing in nonpregnant rats, and the results showed that the mushroom has no  
 235 toxic effects on blood cells.<sup>25</sup>

### 236 Biochemical parameters

237 Figure 2 shows the results of ALT, AST, Creatinine and Urea in pregnant  
 238 rats. Results indicate that there was no significant difference in liver and renal  
 239 parameters in rats exposed to *Lentinula edodes* compared to the control group.

240 **Figure 2** – Hepatic (A) and renal profiles (B) of pregnant rats exposed to  
 241 *Lentinula edodes*



242

243 Note: Cs (Control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
 244 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
 245 after fetus implantation). Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate  
 246 aminotransferase (AST). Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6).

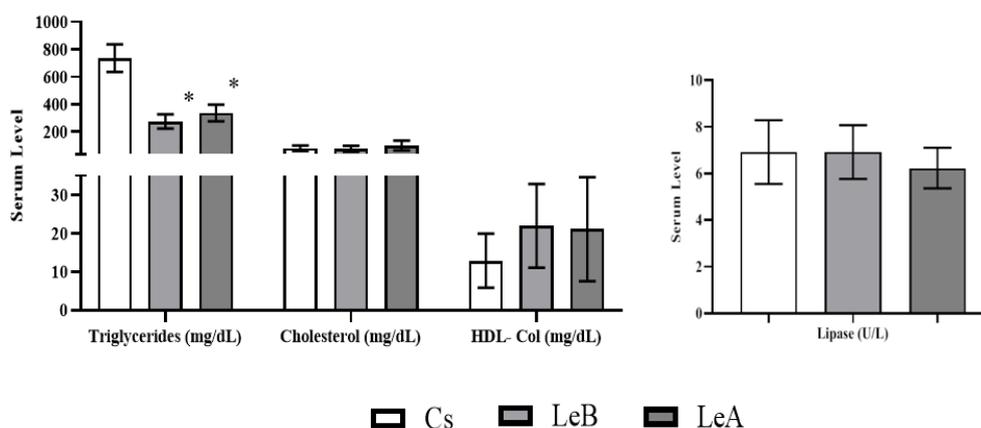
247 The dose and time of *Lentinula edodes* exposure can induce liver  
 248 damage, which can be checked by aminotransferase activity. According to

249 Nieminen, Karja and Mustonen, who evaluated the exposure to different  
 250 mushrooms, the consumption time and the administered dose are associated with  
 251 the appearance of undesirable effects<sup>26</sup>. In our study, however, *Lentinula edodes*  
 252 did not exert any toxicity on liver parameters, ie no hepatotoxic effect was  
 253 observed.

254 In addition to this finding, urea and creatinine levels remained  
 255 unchanged. Spim et al. showed similar data in a study associating *Lentinula*  
 256 *edodes* with a hyperlipidic diet. The authors reported normal creatinine levels.  
 257 Given this, *Lentinula edodes* proves to be safe and does not cause any damage  
 258 to the liver or kidney.<sup>27</sup>

259 Figure 3 presents the results of lipid parameters. There was a significant  
 260 reduction in triglycerides in groups LeB (p=0.021) and LeA (p=0.037) in relation  
 261 to group C. In the other parameters, no significant change was observed in  
 262 groups that received *Lentinula edodes* compared to control group.

263 **Figure 3 - Lipid profile of rats exposed to *Lentinula edodes*.**



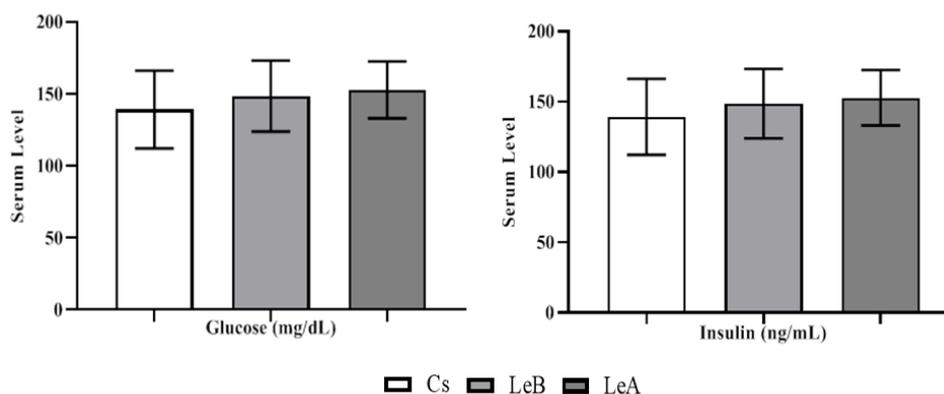
264  
 265 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
 266 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
 267 after fetus implantation). Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6). \*p<0.05 in  
 268 comparison to C group (Kruskal-Wallis test).

269           One of the main risk factors for cardiovascular disease, especially  
270 atherosclerosis, is hypercholesterolemia.<sup>28</sup> According to Magalhaes et al.  
271 increased low-density lipoprotein (LDL-c) levels, increased triglycerides and  
272 lipase, and decreased HDL-c are risk factors for cardiovascular events, the  
273 leading cause of death worldwide.<sup>29</sup> In this study, we observed a reduction in  
274 serum triglyceride levels in the Lea and Led groups when compared to the  
275 control. And a tendency to increase HDL levels (p=0.06). Total cholesterol and  
276 lipase levels did not change compared to control group. These findings are  
277 similar to the studies demonstrating the hypocholesterolemic effects of many  
278 mushroom species: *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei*,  
279 *Grifola frondosa* (Maitake), *Flammulina velutipes* (Enokitake).<sup>30-32</sup>

280           Mushrooms accumulate a variety of secondary metabolites such as  
281 phenolic compounds, terpenes and steroids.<sup>33</sup> Consumption of phenolic  
282 compounds may inhibit intestinal absorption of dietary lipids, leading to a  
283 reduction in triglycerides and an increase in HDL, which would be associated  
284 with the inhibition of pancreatic lipase by these compounds.<sup>34-36</sup> This fact  
285 corroborates our results, as a significant reduction in triglyceride levels was  
286 found in animals that had their diets supplemented with the mushroom. Thus,  
287 the consumption of *Lentinula edodes* in pregnancy, in addition to suggesting  
288 safety, has been shown to have hypocholesterolemic properties.

289           The glycemic profile of pregnant rats is shown in figure 4. No significant  
290 changes were observed in glucose and insulin levels from *Lentinula edodes*  
291 groups compared to controls. It is important to highlight that in this study  
292 normoglycemic pregnant rats were used. Thus, no effect of *Lentinula edodes* on  
293 glucose and insulin levels was observed.

294 **Figure 4** - Glycemic profile of rats exposed to *Lentinula edodes*.



295

296 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
 297 *edodes* before implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes* after  
 298 implantation). Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 6).

299 The literature lists the polysaccharides found in mushrooms, especially  
 300  $\beta$ -glucans, as responsible for various biological functions. Among the properties  
 301 is the ability of mushrooms to maintain or decrease serum glucose levels. A  
 302 study by Kim et al., with the mushroom *Agaricus blazei* showed that both  $\beta$ -  
 303 glucan and oligosaccharides prepared from this fiber had hypoglycemic effects  
 304 in vitro and in vivo in diabetic rats.<sup>37</sup> And in a study by Laurino et al., with the  
 305 *Lentinula edodes* mushroom in diabetic pregnant rats, showed the ability of this  
 306 mushroom to reduce insulin levels in animals receiving *Lentinula edodes*.<sup>38</sup>

307 Others biochemical parameters evaluated in safety/toxicity tests are  
 308 albumin, calcium, creatine kinase and alkaline phosphatase, presented in table 2.  
 309 There was no statistical difference among the groups, showing safety of  
 310 *Lentinula edodes* on all parameters.

311 **Table 2 - Biochemical parameters of pregnant rats exposed to *Lentinula***  
 312 *edodes*.

Parameters	Groups		
	Cs	LeB	LeA
Albumin (g/dL)	3.28 ± 0.51	3.35 ± 0.82	3.37 ± 0.15
Calcium (mg/dL)	2.28 ± 0.29	2.31 ± 0.15	2.46 ± 0.09
Creatine kinase (U/L)	276 ± 59	471 ± 211	746 ± 434
Alkaline phosphatase (mg/dL)	3.28 ± 0.51	3.35 ± 0.82	3.37 ± 0.15

313 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
 314 *edodes* before implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes* after  
 315 implantation). Data are presented as mean ± SD (n = 6).

316 Regarding albumin, calcium and creatine kinase, similar data were  
 317 reported in studies with *Lentinula edodes* at a 20-fold higher dose (2000  
 318 mg/kg/day) in a study of subacute toxicity in nonpregnant rats. The authors  
 319 found no changes in albumin and creatine kinase, and they found an increase in  
 320 calcium in the group receiving the mushroom compared to the control group.  
 321 This increase is related to the dose at which the animals were submitted.<sup>39</sup>  
 322 Alkaline phosphatase is distributed in all tissues, and the increase of this enzyme  
 323 in the blood is indicative of membrane breakage and release of liver cell contents  
 324 due to damage or necrosis.<sup>40</sup> In our study, we found no changes in this parameter  
 325 between groups, corroborating the data found for liver enzymes ALT and AST.

326 **Maternal organ weight and reproductive performance**

327 Table 3 shows the organ weights of pregnant rats. There were no  
328 significant changes in any of the groups.

329 Organ weights were within the normal ranges, with no significant  
330 difference between the experimental and control groups. Similar data were found  
331 by Yoshioka et al. in a toxicity study with *Lentinula edodes* in non-pregnant  
332 Wistar rats, showing dietary *Lentinula edodes* is safe and does not alter organ  
333 weight.<sup>39</sup>

334 **Table 3** - Weight of organs of pregnant rats exposed to *Lentinula edodes*.

Parameters (g)	Groups		
	Cs	LeB	LeA
Spleens	0.80 ± 0.12	0.99 ± 0.25	0.83 ± 0.03
Right kidneys	0.84 ± 0.09	1.00 ± 0.11	0.93 ± 0.06
Left kidneys	0.90 ± 0.05	0.95 ± 0.10	0.87 ± 0.29
Right adrenals	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01
Left adrenals	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.00
Livers	13.29 ± 1.77	13.22 ± 2.33	14.72 ± 0.80
Placenta	0.46 ± 0.04	0.55 ± 0.17	0.45 ± 0.03

335 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
336 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
337 after fetus implantation). Data are presented as mean ± SD (n = 6).

338 As in the study by Morales et al, which analyzed the weight of the organs  
339 after supplementation with eritadenin, extracted from *Lentinula edodes*. Spleen,  
340 liver, kidney and testis/ovary of male and female animals did not obtain  
341 statistical difference in relation to the control group.<sup>41</sup>

342 Reproductive performance data are presented in Table 4. No differences  
 343 were observed regarding fetal vitality, preimplantation losses and  
 344 postimplantation losses comparing control and experimental groups.

345 **Table 4** - Reproductive capacity of pregnant rats exposed to *Lentinula edodes*.

Parameter (%)	Groups		
	Cs	LeB	LeA
Fetal vitality	92.0 ± 7.38	94.6 ± 7.79	97.52 ± 3.50
Preimplantation losses	13.80 ± 21.85	13.2 ± 7.07	*
Postimplantation losses	7.99 ± 7.38	12.5 ± 4.94	2.47 ± 3.50

346 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
 347 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
 348 after fetus implantation). Data are presented as mean ± SD (n = 6). \*The LeA  
 349 group did not have the parameter preimplantation losses, because the mushroom  
 350 was administered after this period.

351 Regarding fetal vitality, there was no difference between the studied  
 352 groups and the control, suggesting that the consumption of the mushroom during  
 353 pregnancy does not alter the reproductive performance of females. These data  
 354 corroborate the literature in studies with *Lentinula edodes* showing that the  
 355 mushroom was able to protect animals from post-implantation losses in diabetic  
 356 rats.<sup>38</sup>

### 357 **Embryofetal Development**

358 Table 5 presents the average length (cm) of fetal head and body sections  
 359 and data regarding skeletal abnormalities. No changes were observed in any of  
 360 the parameters. There were no abnormalities in bone development. The bones  
 361 evaluated were maxillary, frontal, zygomatic, parietal, occipital, manubrium,

362 external centers, xiphoid process, ribs, cervical vertebrae, thoracic, lumbar, iliac  
363 crests, femur, humerus, radius, ulna and metacarpal.

364 **Table 5** - Mean  $\pm$  SD length (cm) of sections of the head and body and the  
365 incidence (%) of morphological anomalies of fetuses whose mothers were  
366 exposed to *Lentinula edodes*

Parameter	Groups		
	Cs	LeB	LeA
<b>External Abnormalities</b>	0	0	0
<b>External Measures</b>			
Cranium latero lateral	0.88 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.01
Cranium caudal	2.9 $\pm$ 0.06	2.9 $\pm$ 0.09	2.6 $\pm$ 0.05
Cranium anteroposterior	1.45 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.03	1.46 $\pm$ 0.04
Thorax anteroposterior	1.10 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.02
Thorax latero lateral	1.05 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.03
Tail	1.33 $\pm$ 0.07	1.27 $\pm$ 0.06	1.31 $\pm$ 0.05

367 Note: Cs (control; saline solution 0.9%), LeB (100 mg/kg/day of *Lentinula*  
368 *edodes* before fetus implantation), LeA (100 mg/kg/day of *Lentinula edodes*  
369 after fetus implantation). Data are presented as mean  $\pm$  SD or percentage.

370 The main changes observed during birth, growth and development can  
371 occur due to mothers' exposure to phytotherapeutic formulations.<sup>42</sup> In our study,  
372 mothers who consumed *Lentinula edodes* daily throughout the gestational period  
373 had puppies with any alterations in embryo-fetal development, since there were  
374 no external and skeletal malformations.

375           **CONCLUSION**

376           The present study suggests conditions for the safe use of *Lentiuunula*  
377 *edodes* during pregnancy: a dose of 100 mg/kg/day, considering healthy rats. As  
378 a reproductive toxicology segment 2 study, none changes in weight,  
379 hematological parameters, biochemical parameters and reproductive  
380 performance were observed in the mother, as well as no alterations in embryo-  
381 fetal development. In addition, *Lentinula edodes* has beneficial effects in  
382 pregnant rats, decreasing triglyceride levels.

383           **Acknowledgment**

384           The authors acknowledge the financial support of the São Paulo State  
385 Research Support Foundation (FAPESP, Process 2015/24566-9).

## REFERENCES

1. Maka DA, Murphy LK. Drug-nutrient interactions: a review. *AACN Clin Issues*. 2000;11(4):580–9.
2. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American heart association nutrition committee. *Circulation*. 2006;114(1):82–96.
3. Michael heasman J mellentin. *The Functional Foods Revolution. Healthy People, Healthy Profits?* 1st ed. Routledge, editor. LONDON; 2001. 334 p.
4. Grajek W, Olejnik A, Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. In: *Acta Biochimica Polonica*. 2005; 52(3):665-71
5. Croccia C, Lopes AJ, Pinto LF, Sabaa-Srur AU, Vaz LC, Trotte MN, Tessarollo B, Silva AC, de Matos HJ, Nunes RA. Royal sun medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* (higher Basidiomycetes) and the attenuation of pulmonary inflammation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Int J Med Mushrooms*. 2013;15(4):345-55.
6. Mori K, Kobayashi C, Tomita T, Inatomi S, Ikeda M. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr Res*. 2008; 28(5):335-42.
7. Yamanaka D, Liu Y, Motoi M, Ohno N. Royal sun medicinal mushroom, *Agaricus brasiliensis* Ka21 (higher Basidiomycetes), as a functional food in humans. *Int J Med Mushrooms*. 2013;15(4):335-43.
8. Niu YC, Liu JC, Zhao XM, Wu XX. A low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* suppresses tumor growth and angiogenesis in vivo. *Oncol Rep*. 2009;

21(1):145-52.

9. Tajima K, Motoi M<sup>2</sup>, Motoi A, Yamanaka D<sup>4</sup>, Ishibashi K, Adachi Y, Ohno N.

Immunoreactivity of the Cold Water Extract of Royal Sun Culinary-Medicinal Mushroom, *Agaricus brasiliensis* Strain KA21 (Agaricomycetes), Assessed by Immunoglobulin Preparations for Intravenous Injection. *Int J Med Mushrooms*. 2017;19(8):745-758.

10. Ishibashi K, Yoshida M, Nakabayashi I, Yoshikawa N, Miura NN, Adachi Y, Ohno N.

Characterization of blood beta-1,3-glucan and anti-beta-glucan antibody in hemodialysis patients using culinary-medicinal Royal Sun Agaricus, *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*. 2011;13(2):101-7.

11. Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira ICFR. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chem*. 2010; 119(4) 1443-1450.

12. Mantovani MS, Bellini MF, Angeli JPF, Oliveira RJ, Silva AF, Ribeiro LR.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2008; 658(3):154-61.

13. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Bernardshaw S, Tryggestad AMA, Grinde B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008; 68(4):363-70

14. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010; 1(2): 94–99..

15. Albus U. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). *Lab Anim*. 2012. ISBN-13: 978-0-309-15400-0.

16. Gerenutti M, Del Fiol FS, Groppo FC. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. *Pharmazie*. 2006; 61(1):79-80.

17. Pickler TB, Lopes KP, Magalhães SA, Krueger CMA, Martins MM, Filho VC, Jozala AF,

- Grotto D, Gerenutti M. Effect of *Libidibia ferrea* bark and seed in maternal reproductive and biochemical outcomes and fetal anomaly in rats. *Birth Defects Res.* 2019; 1;111(13):863-871.
18. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2008;5(1):3–15.
19. Frizo Í, Pickler TB, Grotto D, Gerenutti M. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). *Reprod Toxicol.* 2014; 48(25): 1-25.
20. MacDorman MF, Mathews TJ. The challenge of infant mortality: Have we reached a plateau? *Public Health Rep.* 2009; 20;35(21):2355-2363.
21. Garg RC, Bracken WM, Hoberman AM. Reproductive and Developmental Safety Evaluation of new Pharmaceutical Compounds. In: *Reproductive and Developmental Toxicology.* 2011.
22. David Nd, Mauro Mde O, Gonçalves CA, Pesarini JR, Strapasson RL, Kassuya CA, Stefanello MÉ, Cunha-Laura AL, Monreal AC, Oliveira RJ. *Gochnatia polymorpha* ssp. floccosa: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J Ethnopharmacol.* 2014; 11;154(2):370-9.
23. Won JW, Seong KS, Jang CH, Lee JS, Ko JA, Bae H, Park HJ. Effects of vitamin D2-fortified shiitake mushroom on bioavailability and bone structure. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2019; 83(5):942-951
24. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation.* 2005; (2):63-80.
25. Novaes MRCG, Novaes LCG, Melo AL, Recôva VL. Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun ciênc saúde.* 2007; 18(3):227-236.
26. Nieminen P, Kärjä V, Mustonen AM. Myo- and hepatotoxic effects of cultivated

- mushrooms in mice. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(1):70-4.
27. Spim SRV, de Oliveira BGCC, Leite FG, Gerenutti M, Grotto D. Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. *Eur J Nutr.* 2017; 56(7):2255-2264.
28. Lee SM, Park NS, Jin BR, Kang HS, Jung JH, Park E. Effects of *Paecilomyces tenuipes* cultivated in egg yolk on lipid metabolism in rats on a high fat-cholesterol diet. *J Med Food.* 2006; 9(2):214-22.
29. Magalhães MEC. Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias. *Rev SOCERJ.* 2004; 7(2): 105-111.
30. Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Exp Biol Med.* 2001; 226(8):758-65.
31. Berger A, Rein D, Kratky E, Monnard I, Hajjaj H, Meirim I, Piguet-Welsch C, Hauser J, Mace K, Niederberger P. Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs. *Lipids Health Dis.* 2004; 18(3).
32. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2008. 5(1):3-15.
33. Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chem.* 2007; 101(1):267-273.
34. Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Unno T, Tomoyori H, Goto H, Kawata Y, Imaizumi K, Nozawa A, Kakuda T. Tea Catechins with a Galloyl Moiety Suppress Postprandial Hypertriacylglycerolemia by Delaying Lymphatic Transport of Dietary Fat in Rats. *J Nutr.* 2005; 135(2):155-9.
35. Naissides M, Mamo JCL, James AP, Pal S. The effect of acute red wine polyphenol

consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2004; 177(2):401-8.

36. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Sue A, Yang CS. The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice,. 2008;138(9):1677–83.

37. Kim YW, Kim KH, Choi HJ, Lee DS. Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett*. 2005; 27(7):483-7.

38. Laurino LF, Viroel FJM, Caetano E, Spim S, Pickler TB, Rosa-Castro RM, Vasconcelos EA, Jozala AF, Hataka A, Grotto D, Gerenutti M. *Lentinus edodes* exposure before and after fetus implantation: Materno-fetal development in rats with gestational diabetes mellitus. *Nutrients*. 2019; 9;11(11).

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

40. Fernandes M da S, Iano FG, Rocia V, Yanai MM, Leite A de L, Furlani TA, Buzalaf MAR, Oliveira RC. Alkaline phosphatase activity in plasma and liver of rats submitted to chronic exposure to fluoride. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2011; 54(6).

41. Morales D, Tabernero M, Largo C, Gonzalo P, Pirisa AJ, Soler-Rivas C. Effect of traditional and modern culinary processing, bioaccessibility, biosafety and bioavailability of eritadenine, a hypocholesterolemic compound from edible mushrooms. *Food Funct*. 2018; 9(12), 6360.

42. Schwarz A, Pinto E, Haraguchi M, Oliveira CA De, Bernardi MM, Spinosa HDS. Phytochemical Study of *Solanum lycocarpum* (St . Hil) Unripe Fruit and its Effects on Rat Gestation. 2007;21(11):1025-8.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz as avaliações do *Lentinula edodes* em ratas saudáveis prenhes, cogumelo este considerado um alimento funcional devido as suas várias aplicações na manutenção da saúde e efeitos biológicos benéficos. Tal cogumelo foi administrado via oral na dose de 100 mg/kg/dia, pré e pós-implantação. A partir dos testes pré-clínicos materno-fetais, os resultados indicam que:

- Não houve interferência do *Lentinula edodes* nas análises bioquímicas e hematológicas da gestante. Não houve aumento do peso dos órgãos ou alteração na capacidade reprodutiva.

- O *Lentinula edodes* não promoveu alterações nos parâmetros relacionados a fertilidade das ratas gestantes tratadas pré ou pós-implantação e não apresentou nenhum sinal de toxicidade.

- Nenhum sinal de toxicidade foi observado nos fetos, pois não houve alteração nas análises ósseas, morfométricas ou na vitalidade fetal.

Portanto, tal estudo sugere que o uso de *Lentinula edodes* no período gestacional, na dose estudada, é seguro para a mãe e para os fetos, que nasceram saudáveis e sem qualquer alteração. Porém, novos estudos sobre o tema proposto são necessários.

## 6 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Avaliação nutricional do cogumelo shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] em função da linhagem e do tipo de eucalipto cultivado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28(4): 916-921, 2008.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of the ADA: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**. V. 104, p. 814-826, 2004.
- ALFARADHI, M. Z. and OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Front Gene**. 2: 27, 2011.
- ASHWELL, Margaret. Concepts of functional foods. **International Life Sciences Institute**. 2002, p. 45.
- BERNAŚ, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible Mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.**, 5.1: 5-20. 2006
- BERTI, C.; CETIN, I.; AGOSTINI, C.; DESOYE, G.; DEVLIEGER, R.; EMMETT, P. M. Pregnancy and infants' outcome: Nutritional and metabolic implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56(1), 82–91, 2016.
- BIANCO, André Luiz. A Construção das Alegações de Saúde para Alimentos Funcionais. Brasília: **Embrapa**, 113p, 2008.
- BISEN, P. S., BAGHEL, R. K., SANODIYA, B. S., THAKUR, G. S., & PRASAD, G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. **Current Medicinal Chemistry**, India, v. 17, n. 22, p.2419-2430. 2010
- BRASIL. Ministério Saúde. Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n.º 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília-DF, 1999.
- BRASIL. Ministério Saúde. Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De 26 de fevereiro de 2013. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília-DF, 2013.
- BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n.10, p.883-894, 1990.
- CHANDRA, L.C.; SMITH, B.J.; CLARKE, S.L.; MARLOW, D.; D'OFFAY, J.M; KUVIBIDILA, S.R. Differential effects of shiitake- and white button mushroom-supplemented diets on hepatic steatosis in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3074-3080, 2011.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. Edible mushrooms and their cultivation. **Boca Raton: CRC Press**, 345 p., 1989.
- CHEN, A. W. What is Shiitake? In: *L. edodes* cultivation. **Korea: MushWord**, cap. 1, p. 3-32. 2005.

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.

DALIU, P.; SANTINI, A.; NOVELLINO, E. A decade of nutraceutical patents: where are we now in 2018? **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 2018.

DAHIYA, K. Nutraceuticals and their impact on human health. **J Plant Biochem Physiol**. 2013; 1:e111.

DeFELICE, S. L. The Nutraceutical Health Sector: a point of view. In: HASLER, C. M., ed. Regulation of functional foods and nutraceuticals: a global perspective.

**Oxford: Blackwell Publish**, 2005. p. 201-212

DERMIKI, M.; PHANPHENSOPHON, N.; MOTTRAM, D. S.; METHVEN, L. Contributions of non-volatile and volatile compounds to the umami taste and overall flavour of shiitake mushroom extracts and their application as flavour enhancers in cooked minced meat. **Food Chemistry**, v. 141, p. 77-83, 2013.

DESOYE, G. and SHAFRIR, E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. **Mol Aspects Med**.15: 505-682, 1994.

DHOBALE, M. Neurotrophic Factors and Maternal Nutrition During Pregnancy. **Vitam Horm**. 2017;104:343-366. Epub 2016.

FRIZO Í.; PICKLER T.B.; GROTO D.; GERENUTTI M. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). **Reprod Toxicol**. 48(25): 1-25, 2014.

GERENUTTI, M.; OLIVEIRA, C. C.; MIRANDA, A.C.R.; ROSA-CASTRO, R.M.; DEL FIOL, F.S. Reproductive performance and embryotoxicity of rats exposed to carbamazepine. **Brasilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 509-514, 2008.

GERENUTTI, M.; TRIBUIANI, N.; OLIVEIRA, B. R.; ROSA-CASTRO, R. M.; FRIZO, I.; OSHIMA-FRANCO, Y.; GROTO, D. Safety assessment of the royal sun mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Higher basidiomycetes) intake during rat pregnancy. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, p. 519–528, 2014.

GERENUTTI, M.; DEL FIOL, F.; GROPO, F. C. Reproductive performance of pregnant rats and embryotoxic effects of ciprofloxacin. **Die Pharmazie**, v. 61, n. 1, p. 79-80, 2006.

GROTO, D.; BUENO, D. C.; RAMOS, G. K.; DA COSTA, S. R.; SPIM, S. R.; GERENUTTI, M. Assessment of the Safety of the Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes), in Rats: Biochemical, Hematological, and Antioxidative Parameters. **Int J Med Mushrooms**. 18(10):861-870, 2016.

GUL, K.; SINGH, A. K; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56:16, 2617-2627, 2016.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 71-74, 2001.

ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 206-210, 2001.

JEFF, I.B.; Li S.; Peng, X.; KASSIM, R.M.; LIU, B.; ZHOU, Y. Purification, structural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Fitoterapia**, 84: 338-346, 2013.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact of a current regulatory terminology. **Food Control**, 12. P 109-117, 2001.

LOW DOG T. The use of botanicals during pregnancy and lactation. **Altern Ther Health Med**. 15(1):54-8, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Amamentação e uso de drogas. Brasília, DF, 2000.

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.

NEUBERT D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocr Chemical Environ**, v.3, p. 24-52, 1995.

NITZKE, Julio Alberto. ALIMENTOS FUNCIONAIS – UMA ANÁLISE HISTÓRICA E CONCEITUAL – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Capítulo publicado no livro “**Agronegócio: panorama, perspectivas e influência do mercado de alimentos certificados**”. Curitiba: Appris, p. 11-23. 2012.

OEI, P. Mushroom cultivation. 3rd ed. **The Netherlands: Backhuys Publishers**, 429p. 2005.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PARDI, G. and CETIN, I. Human fetal growth and organ development: 50 years of discoveries. **Am J Obstet Gynecol**. 194: 1088–1099, 2005.

PUSHPANGADAN, P.; GEORGE, V.; SREEDEVI, A. J.; BINCY, A. J.; ANZAR, S.; ASWANY, T.; NINAWA, A. S.; IJINU, T. P. Functional foods and nutraceuticals with special focus on mother and child care. **Annals of Phytomedicine**. 3(1): 4-24, 2014.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

ROSSI, I. H. Suplementação de bagaço de cana para cultivo axênico do cogumelo Shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. Jaboticabal: UNESP, 120 p. Dissertação de Mestrado. 1999

ROWLANDS, J. Craig; HOADLEY, James E. FDA perspectives on health claims for food labels. **Toxicology**, v. 221, p. 35-43, 2006.

ROYSE, D.J.; SCHISLER, L.C.; DIEHLE, D.A. Shiitake mushrooms: consumption, production and cultivation. *Interdisciplinary science reviews*. V.10, p.329-335, 1985.

SASIDHARAN, S.; ARAVINDRAN, S.; LATHA, L. Y.; VIJENTHI, R.; SARAVANAN, D.; AMUTHA S. In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4478-4489, 2010.

SOUZA, Marco Antônio Ferreira. Dos laboratórios aos pontos de venda: uma análise da trajetória dos alimentos funcionais e nutracêuticos e sua repercussão sobre a questão agroalimentar. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. 2008.

SPIIM, S. R. V.; OLIVEIRA, B. G. C. C.; LEITE, F. G.; GERENUTTI, M.; GROTTTO, D. Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. **European Journal of Nutrition**. 2016

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 Scienci**, v. 102, n. 3, p. 516-521, 2011.

VALVERDE, M. E.; PÉREZ, T. H.; LÓPEZ, O. P. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **Int J Microbiol**. vol. 2015, Article ID 376387, p. 14, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**. vol.28, n.3, pp.519-528. ISSN 0100-4042, 2005.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v.19, n.1, p.65-96, 1999.

Young AD, Phipps DE, Astroff AB. Large-scale double-staining of rat fetal skeletons using alizarin red S and alcian blue. **Teratology** 2000; 61, 273-276.

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. **Journal of Natural medicines**, v. 66, n. 1, p. 185-191, 2012.

Zeisel, S. H. Regulation of nutraceuticals. **Science**. 285: 1853–1855, 1999.

ZHANG, Y.; VENKITASAMI, C.; PAN, Z.; WANG, W. Recent developments on umami ingredients of edible mushrooms - A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 33, p.78-92, 2013

## ANEXOS

## Anexo I

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

<b>Protocolo nº</b> 089/2016
<b>Interessado (a):</b> Marli Gerenutti
<b>Orientador (a):</b> Marli Gerenutti
<b>Título do Projeto:</b> Ensaios Pré-Clinicos com os Cogumelos <i>Agaricus blazei</i> , <i>Lentinula edodes</i> e <i>Ganoderma lucidum</i> , visando a redução e danos maternos e fetais causados pelo diabetes gestacional
<b>Título do Experimento:</b> o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

**APROVADO.**

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

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

**REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

--

Nome: Renata de Lima

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 11/08/2016

\* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

## Anexo II



## Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas

Cidade Universitária 'Aramando de Salles Oliveira',  
Av. Professor Lineu Prestes, 1.524 - ICB I  
Butantã, São Paulo, SP - 05508 000  
Telefone (11) 3091-0565 - e-mail: coron@usp.br

### Atestado de Saúde

ATESTADO N° 17/2018

<b>1. INSTITUIÇÃO</b>	
Nome completo Instituto de Ciências Biomédicas - IICB - Universidade de São Paulo <b>Biotério de Produção de Ratos - ICB/USP</b>	
Endereço Completo Av. Professor Lineu Prestes, 1524 — Cidade Universitária — CEP 05508-000	
Cidade São Paulo	Estado São Paulo      Telefone    3091-0889/3091-8491
<b>2. MATERIAL BIOLÓGICO</b>	
Material 54 Ratos Wistar	Células
Cultivo	Finalidade Pesquisa Científica
<b>3. DESTINATÁRIO</b>	
Nome Completo / CPF / Endereço / Estabelecimento Thaís Borim Pickler Laboratório de Pesquisa Toxicológica – Uniso Universidade de Sorocaba Rodovia Raposo Tavares - Vila Artura, Sorocaba - SP, 18023-000	
<b>4. INFORMAÇÕES SANITÁRIAS</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>Os animais foram por mim examinados e não apresentam sintomatologia e/ou sinais patológicos. The animals were examined and have not manifested symptoms and / or pathological signs.</li> <li>Não foram expostos e não foram inoculados com nenhum agente de doenças dos animais domésticos ou das aves domésticas exóticas nos Estados Unidos / have not been exposed to or inoculated with any livestock or poultry disease agents exotic to the USA;</li> <li>Não se originaram de estabelecimentos onde fossem realizados trabalhos com agentes exóticos de doenças que afetam animais domésticos ou aves domésticas / have not originated from a facility where work with exotic disease agents affecting livestock or poultry is conducted;</li> </ol>	
Dr. Alexandre Coroni CRMV-SP                    Nº10.592 Habilitado Defesa Agropecuária Nº 820 – SP Cadastro MAPA        Nº 4842 / 2017 ASSINATURA E CARIMBO	Local e Data São Paulo,    13 de abril de 2018
 <b>ALEXANDRE CORONI</b> CRMV-SP 10592 Médico Veterinário Responsável Técnico	