

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

Sara Rosicler Vieira Spim

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BARRAS ALIMENTÍCIAS COM
***Lentinula edodes* (SHIITAKE) E SEUS EFEITOS EM INDIVÍDUOS COM**
COLESTEROL LIMÍTROFE POR MEIO DE ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Sorocaba/SP

2019

Sara Rosicler Vieira Spim

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BARRAS ALIMENTÍCIAS COM
Lentinula edodes (SHIITAKE) E SEUS EFEITOS EM INDIVÍDUOS COM
COLESTEROL LIMÍTROFE POR MEIO DE ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Denise Grotto

**Sorocaba/SP
2019**

Ficha Catalográfica

Spim, Sara Rosicler Vieira.

S738d Desenvolvimento e avaliação de barras alimentícias com *Lentinula edodes* (Shiitake) e seus efeitos em indivíduos com colesterol limítrofe por meio de ensaio clínico randomizado / Sara Rosicler Vieira Spim. - Sorocaba, 2019.
122p.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

Sara Rosicler Vieira Spim

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BARRAS ALIMENTÍCIAS COM
Lentinula edodes (SHIITAKE) E SEUS EFEITOS EM INDIVÍDUOS COM
COLESTEROL LIMÍTROFE POR MEIO DE ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

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

Aprovada em: 25/09/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. André Moreni Lopes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Campinas

Prof.^a Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Hugo Pasin Neto
Universidade de Sorocaba

Prof.^a Dra. Mariana Battaglin Villas Boas Alvaro
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Adilson Spim, meu filho N  kolas e nora Annayan, e aos meus pais José Alves (in memorian) e Josefina Vieira (in memorian).

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por iluminar o meu caminho e me conceder a oportunidade de alcançar meu objetivo e realizar meus sonhos. Grata pela saúde, perseverança e alegria, pois sei que a graça de Deus se faz presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Josefina e José (Juca), que me ensinaram e educaram no amor, na ética e honestidade. Me ensinaram a conquistar tudo com meu trabalho e dignidade.

Gratidão por colocar pessoas iluminadas no meu caminho.

Ao meu esposo Adilson Spim que me acompanhou em todos os momentos, nas vibrações por cada resultado alcançado e nos momentos mais difíceis, quando vinham as lágrimas, porque nem tudo saía como planejávamos.

Grata ao meu filho Nick e minha nora Annayan, por compreender que nem sempre podia estar presente.

À minha orientadora Denise Grotto, pelos ensinamentos, por confiar em meu trabalho, por dividir comigo seu conhecimento e me desafiar a todo o momento. Agradeço imensamente à Deus por tê-la colocado em meu caminho.

Agradecimento especial aos voluntários do estudo clínico, foram fundamentais para justificar esta Tese.

Aos amigos que fiz neste período, as equipes que trabalharam e torceram comigo; Ana Holtz, Nathália, Fernanda, Rafaela, Bruna, Eliana, Alekison, Néia, Márcia, Henrique, Valéria Orsi e Thaisa. À todas as meninas de Nutrição e de Fisioterapia que me ajudaram na produção de oito mil barrinhas.

Aos professores Angela Jozala e Marcus Tolentino, Miriam, Paula, Ivonete, Irineu e toda equipe de enfermagem pelo apoio nos três encontros do estudo clínico.

Aos professores do Programa de Ciências Farmacêuticas sob a Coordenação da Prof. Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi, por todo aprendizado nas reuniões, onde participava como representante discente.

Minha gratidão aos parceiros que contribuíram com a pesquisa, Yuri Cogumelos com doação de 110 Kg de Shiitake, Laboratório Cefar Diagnóstica Ltda com fornecimento de cepas de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*, J.P. Pereira Ltda pela doação de ingredientes como aveia, açúcares, quinoa, Chia, linhaça, amendoim, ameixa seca para a produção das barras e a Universidade de Sorocaba com a bolsa de estudo de Doutorado.

A persistência é o caminho do êxito.
(Charles Chaplin)

RESUMO

O Shiitake (*Lentinula edodes*) é um alimento nutricionalmente completo, com alto teor de proteínas, vitaminas, minerais e compostos bioativos, como as glucanas. Este cogumelo tem reduzido os níveis de colesterol e triglicerídeos em animais. Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver barras alimentícias (doce e salgada) com Shiitake; avaliar suas características nutricionais, sensoriais e microbiológicas, e avaliar os níveis de colesterol após consumo dessas barras por meio de estudo clínico de Fase II, randomizado, duplo-cego. Para a produção das barras, diferentes ingredientes foram misturados até que quatro formulações finais foram escolhidas. O teste sensorial foi realizado para as 4 formulações, utilizando escala hedônica de 9 pontos para textura, aroma, sabor e aparência; e escala de 5 pontos para intenção de compra. A barra selecionada na preferência dos indivíduos foi analisada quanto à composição centesimal, quantificação de elementos químicos, de glucanas, compostos fenólicos. Por fim, a análise microbiológica foi utilizada para verificação da qualidade e tempo de vida de prateleira, por até 180 dias. No estudo clínico, 68 indivíduos foram randomizados em 2 grupos: I - barra alimentícia com Shiitake (n = 32). II - barra alimentícia sem Shiitake (n = 36). A coleta de sangue foi realizada aos 0, 30 e 60 dias pós-consumo das barras, seguida de análises bioquímicas (triglicerídeos, colesterol total, LDL, HDL e glicose) e de estresse oxidativo (glutathione, catalase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A barra doce 1 apresentou maior aprovação na análise sensorial e intenção de compra. O Shiitake adicionado às barras possui alta concentração de cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco, manganês, compostos fenólicos e glucanas. As barras alimentícias mantiveram as características nutricionais do Shiitake nas concentrações de proteínas, fibras, glucanas e fenóis. As barras não desenvolveram microrganismos contaminantes por até 180 dias e seguiram os padrões estabelecidos pela ANVISA. No estudo clínico, 70% dos indivíduos completaram a participação. Os níveis de triglicerídeos mostraram redução após 30 e 60 dias de consumo no grupo intervenção comparado ao grupo controle. O Shiitake contribuiu para o aumento da glutathione e redução da peroxidação lipídica. Assim, as barras com Shiitake resultaram em um alimento nutritivo, com características sensoriais agradáveis. O Shiitake demonstrou ação benéfica e melhora no estado antioxidante dos indivíduos. Este alimento que pode ser considerado adjuvante na prevenção das dislipidemias, se atrelado a uma dieta saudável para potencializar os efeitos benéficos do Shiitake.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*. Hipercolesterolemia. Nutracêuticos. Estudo clínico.

ABSTRACT

Shiitake (*Lentinula edodes*) is considered a nutritionally complete food, high in protein, vitamins, minerals and bioactive compounds such as glucans. This mushroom has reduced cholesterol and triglyceride levels in animals. Thus, the objectives of this study were to develop sweet and salted Shiitake food bars, evaluate their nutritional, sensory and microbiological characteristics, and assess the cholesterol levels after the consumption of these bars by individuals through a phase II clinical study, randomized and double-blind. To produce the bars, different ingredients were mixed until four final formulations were chosen. Sensory testing was performed for the four formulations using a 9-point hedonic scale for texture, aroma, flavour and appearance and a 5-point purchase intention scale. The bar selected in the preference of individuals was analyzed for centesimal composition, quantification of chemical elements, glucans, phenolic compounds and, finally, microbiological analysis was used to verify the quality and shelf life for up to 180 days. In the clinical study, 68 individuals were randomized into 2 groups: I - Shiitake food bar (n = 32). II - Food bar without Shiitake (n = 36). Blood collection was performed at 0, 30 and 60 days after bars consumption, followed by biochemical analyzes (triglycerides, total cholesterol, LDL, HDL and glucose) and oxidative stress (glutathione, catalase and thiobarbituric acid reactive substances). Sweet bar 1 showed greater approval in sensory analysis and purchase intention. Shiitake added to bars has a high concentration of calcium, iron, phosphorus, potassium, zinc, manganese, phenolic compounds and glucans. Food bars maintained their characteristics in protein, fiber, glucan and phenol concentrations. The bars do not develop contaminating microorganisms for up to 180 days and follow the standards set by ANVISA. In the clinical study, 70% of individuals completed participation in the biochemical results, triglyceride levels showed reduction after 30 and 60 days of consumption in the Shiitake group compared to the control group. Shiitake contributed to increased glutathione and reduced lipid peroxidation, improving antioxidant status in the individuals. Thus, the Shiitake bars is a nutritious food with sensory characteristics. The Shiitake bar showed beneficial action and improved the redox status. This food that can be considered adjuvant in the prevention of dyslipidemias, if linked to a healthy diet to enhance the beneficial effects of Shiitake.

Keywords: *Lentinula edodes*. Hypercholesterolemia. Nutraceuticals. Clinical study.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Adenosina trifosfato)
BD	Barra doce
BS	Barra salgada
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CAT	Catalase
CCL₄	<i>Carbon tetrachloride</i> (Tetracloroeto de carbono)
CRN	Conselho Regional de Nutrição
CYP7A1	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase or cytochrome P450 7A1
DH	Dieta hiperlipídica
DRI	<i>Dietary Reference Intake</i>
DTNB	<i>5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid</i> (5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ED-XRF	<i>Energy Dispersive X-ray Fluorescence</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIAF	<i>Fasting-induced adipose factor</i> (Fator Adiposo Induzido pelo Jejum)
GAE	<i>Galic Acid Equivalent</i> (Equivalente de ácido gálico)
GSH	<i>Glutathione reduced</i> (Glutathione reduzida)
GSH-Px	<i>Glutathione peroxidase</i> (Glutathione peroxidase)
HACCP	<i>Hazard Analysis System and Critical Control Points</i>
HCL	<i>Hydrochloric acid</i> (Ácido clorídrico)
HEp-2	<i>Human epithelial carcinoma cells</i>
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HDP	<i>Host defense peptides</i> (Peptídeos da Defesa do Hospedeiro)
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase</i>
H₂O₂	<i>Hydrogen peroxide</i> (Peróxido de hidrogênio)
H₃PO₄	<i>Phosphoric acid</i> (Ácido fosfórico)

IFN	<i>Interferon</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i> (Imunoglobulina A)
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
IMC	Índice de Massa Corporal
JHCI	<i>Joint Health Claims Initiative</i> (Iniciativa Conjunta para Alegações de Saúde)
KOH	Hidróxido de potássio
LAFINAU	Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
MDA	<i>Malondialdehyde</i> (Malondialdeído)
mM	Milimolar
MYP	<i>Mannitol-Egg YolkPolymyxin</i> (Agar Manitol Gema de Ovo Polimixina)
NADP	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	<i>Nuclear Factor – kB</i> (Fator nuclear- kB)
NK	<i>Natural Killer</i>
ON	Óxido Nítrico
PCA	<i>Plate Count Agar</i> (Agar de Contagem em Placa)
PCR	Proteína C reativa
PDA	<i>Potato Batata Dextrose</i> (Agar Batata Dextrose)
QA	<i>Quercus acutíssima</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA_m	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico mensageiro)
SA	Substrato Axênico
SaB	<i>Salted Bar</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> (Superóxido Dismutase)
Stat 3	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i> (Estreptozotocina)
SwB	<i>Sweet Cereal Bars</i>
TAS	Tampão Acetato de Sódio

TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (Ácido Tiobarbitúrico)
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Ácido Tricloroacético)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFK	Tampão Fosfato de Potássio
TG	Triglicerídeos
Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultravioleta
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Alimentos Funcionais	18
2.2 Cogumelos comestíveis	20
2.3 Cogumelo <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake).....	21
2.4 Substâncias bioativas dos cogumelos.....	26
2.4.1 β -glucanas	26
2.4.2 Lentiniana	27
2.4.3 Quitosana.....	27
2.4.4 Compostos Fenólicos	29
2.5 Dislipidemias	30
2.6 Estudos clínicos.....	31
2.7 Barras de cereais	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Obtenção e Processamento do Shiitake	37
5.2 Concentração dos elementos químicos	37
5.3 Seleção da concentração de Shiitake para as barras.....	38
5.4 Formulação de barras de cereais doce e salgada	38
5.5 Análise Sensorial e Intenção de Compra	39
5.6 Composição centesimal do Shiitake e da barra de cereal	40
5.7 Determinação de Glucanas do Shiitake e da barra de cereal escolhida	41
5.8 Determinação de Compostos Fenólicos Totais do Shiitake e da barra de cereal	41
5.9 Análise microbiológica	42
5.10 Tempo de vida de prateleira	42
5.11 Estudo Clínico de Fase II	43
5.11.1 Delineamento do estudo	43
5.11.2 Participantes	43
5.11.3 Critérios de elegibilidade	43
5.11.4 Critérios de inclusão	43
5.12 Ensaio Clínico	44
5.13 Análises bioquímicas.....	45
5.14 Análises de estresse oxidativo	46
5.15 Análise estatística	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1 Capítulo I (Anexo B)	48
6.1 Capítulo II (Anexo C)	70
APPENDIX 1 – Differences between the intermediate and final times with the baseline	83
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85

APÊNDICE A - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
APÊNDICE B - TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA	98
APÊNDICE C - MATERIAL PARA DIVULGAÇÃO E RECRUTAMENTO	100
APÊNDICE D - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
APÊNDICE E - PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS	105
APÊNDICE F – PALESTRAS MINISTRADAS.....	107
APÊNDICE G - MEMBRO DE COMISSÃO ORGANIZADORA DE EVENTOS E COLABORADORA EM PESQUISA	108
APÊNDICE H – PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)	109
APÊNDICE I – CÁLCULO DE DIFERENÇAS	111
ANEXO A – DEPÓSITO DA PATENTE.....	112
ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO I – FOOD CHEMISTRY	115
ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO II – EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION	116
ANEXO D - APROVAÇÃO DO CEP – ESTUDO I – PLATAFORMA BRASIL.....	117
ANEXO E - APROVAÇÃO DO CEP – ESTUDO II - PLATAFORMA BRASIL.....	120

1 APRESENTAÇÃO

Esta Tese foi dividida em dois capítulos, conforme os principais objetivos do trabalho, e cada capítulo representa um artigo. O primeiro capítulo contempla o desenvolvimento das barras alimentícias funcionais com Shiitake e suas caracterizações como: análise sensorial e intenção de compra, composição nutricional, glucanas, fenóis totais, contagem de microrganismos totais e tempo de vida em prateleira. O segundo capítulo contempla um ensaio randomizado, duplo cego, com voluntários limítrofes em colesterol, que ingeriram barras alimentícias por sessenta dias, seguindo-se de análises bioquímicas para investigar a ação do Shiitake nos níveis de dislipidemias e estresse oxidativo dos mesmos.

Assim, as seções iniciais de Revisão da Literatura, Justificativa, Objetivos e Materiais e Métodos estão mantidas. As seções de Resultados e Discussão estão trazidas como capítulos e apresentadas no formato de artigo científico, seguindo as “Orientações para apresentação de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba”.

O processo de desenvolvimento de barras alimentícias com Shiitake como um alimento novo no mercado, foi submetido à Comissão Especial de Docentes da Universidade de Sorocaba, e aprovada por meio da Portaria nº. 19/2016 para o depósito da patente BR 10 2017 025575 1 em 28/11/2017 (Anexo A) com o título “Processos de Obtenção de Barras Nutracêuticas de Cogumelo e Cereais para Redução de Colesterol e Produtos Obtidos”.

Dos artigos constantes nesta Tese, o Capítulo I foi submetido à revista *Food Chemistry* (Anexo B) e o capítulo II (Anexo C) será submetido à revista *European Journal of Nutrition* e encontram-se no formato definido pelas revistas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentos Funcionais

A ciência que estuda os alimentos tem ganhado força em resposta às mudanças relacionada aos cuidados com a saúde nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. À medida que os custos nessa área e a expectativa média de vida aumentam, o público tem procurado alternativas mais saudáveis e criativas. O “alimento funcional”, com maior evidência nas últimas décadas, tem contribuído para prevenção de doenças crônicas, e está se tornando dominante por intermédio da ciência e da política, desde a sua concepção em 1984 (MARTIROSYAN; SINGH, 2015).

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

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

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

Os componentes funcionais dos alimentos atuam simultaneamente em locais-alvo diferentes ou idênticos, com benefícios fisiológicos e promoção do bem-estar (ABUJAH et al., 2015), incluindo redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, inflamação, diabetes tipo II e outras doenças crônicas degenerativas, diminuição do colesterol e de glicemia, neutralização de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, etc (LOBO et al., 2010). Pensava-se que ingredientes funcionais como carboidratos não-amiláceos, fibras alimentares solúveis e insolúveis, antioxidantes (polifenóis, carotenoides, tocoferóis, tocotrienóis, fitoesteróis, isoflavonas, compostos organossulfurados, fitoestrógenos) estariam presentes apenas em alimentos vegetais (grãos integrais, frutas e vegetais) (PAZ et al., 2015). Entretanto, probióticos, prebióticos, ácido linolênico conjugado, ácidos graxos ômega-3, 6 e 9 e peptídeos bioativos provaram que os componentes funcionais

estão igualmente disponíveis em produtos de origem animal, como leite, produtos lácteos fermentados e peixes (SILVA et al., 2016).

A população está mais consciente dos benefícios das alternativas terapêuticas inovadoras com o uso de compostos naturais na prevenção de várias doenças e manutenção da saúde. Entre os alimentos naturais estudados estão os cogumelos, considerados alimentos de excelência por suas substâncias bioativas. No entanto, a maioria dos cogumelos são consumidos principalmente na sua forma natural ou na forma de suplementos dietéticos. Novos produtos adicionados de cogumelos ainda não estão disponibilizados comercialmente e, apesar do interesse nestes produtos terem crescido ao longo dos anos em países ocidentais, os produtos de cogumelos não são tão comuns como na Ásia e a legislação precisa ser implementada para permitir o aumento em seu consumo (REIS et al., 2017).

Devido à presença dos metabólitos secundários, os cogumelos podem ser também utilizados no desenvolvimento de novos fármacos e na medicina complementar como fonte de suplementos para populações desnutridas. Os compostos que eles contêm foram classificados como *Host Defense Potentiators* (HDP) (Potenciadores da Defesa do Hospedeiro), com ação de melhora do sistema imunológico. Essa é uma das razões pelas quais eles são usados como adjunto nos tratamentos de câncer no Japão e na China, devido aos polissacarídeos com propriedades antitumorais e imuno-moduladoras a partir do micélio de vários cogumelos medicinais (*Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Inonotus obliquus* e *Flammulina velutipes*). Outras pesquisas com esses recursos naturais e genéticos dos cogumelos medicinais estão sendo aprimorados por meio da genômica, proteômica e metabolômica para desenvolver novos produtos voltados à saúde (PRASAD et al., 2015).

2.2 Cogumelos comestíveis

Há a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, e visando a proteção à saúde da população, a ANVISA aprovou o termo “cogumelo comestível” por meio da RDC nº 272, de 22 de setembro 2005, como:

é o produto obtido de espécie(s) de fungo(s) comestível(is), tradicionalmente utilizada(s) como alimento. Pode ser dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, submetido a processo de secagem e ou defumação e ou cocção e ou salga e ou fermentação ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos (BRASIL, 2005).

Há alguns séculos, os cogumelos têm sido utilizados pela população do mundo todo, não apenas como fonte de alimento, mas também como recursos medicinais. Eles são bastante explorados na medicina tradicional no Oriente e nas civilizações ocidentais (BLACKWELL, 2011). Os cogumelos constituem 16.000 espécies em todo o mundo, com mais de 2.000 deles comprovadamente seguros. Dentre esses cogumelos, 1.000 são comestíveis, enquanto outros tipos têm sido utilizados como fonte de biocombustível, em formulações medicinais, como bioquímicos e outros fins (GLAMOCLIJIA; SOKOVIC, 2017).

Entre os diferentes tipos de cogumelos comestíveis e medicinais, destacam-se os *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* e *Auricularia auricular*, *Ganoderma lucidum* e *Poria cocos*. A China foi documentada como o país mais antigo no cultivo de cogumelos em todo o mundo, seguida pelo Japão, Estados Unidos, Itália, Polônia, Grécia, Egito e México que apreciam os cogumelos como iguarias culinárias funcionais e até como medicamentos (FEENEY et al., 2014). No Brasil o cogumelo chegou pelas mãos dos imigrantes japoneses. O mercado de cogumelos é promissor e cresce em nível nacional, porém, ainda é muito influenciado por questões culturais da alimentação (LIN et al., 2013).

Mesmo com toda essa diversidade em espécies de cogumelos no mundo, somente 25 tipos são cultivados comercialmente, e são apreciados tanto pelas suas características culinárias como também pelas propriedades preventivas e curativas (VALVERDE et al., 2015; RAHI; MALIK, 2016).

Algumas substâncias bioativas presentes nos cogumelos, têm os tornado alimentos dietéticos de boa qualidade, completos e adequados, que devem ser consumidos em função da sua riqueza em polissacarídeos, terpenóides, polifenóis e

outros ingredientes funcionais com supremacia nutricional (PHAN et al., 2019). Por suas diversas funções medicinais - antioxidantes, antiaterosclerótico, antitumorais, antivirais, antimicrobianos - os cogumelos destacam-se como alimento nutracêutico (GARGANO, et al., 2017).

As moléculas biologicamente ativas dos cogumelos reforçam seu papel no incremento do sistema imunológico, diminuindo e prevenindo os riscos de câncer, protegendo o sistema nervoso dos danos causados pelo envelhecimento. Além disso, os efeitos prebióticos encontrados nas fibras dos cogumelos atraem a atenção de pesquisadores no mundo todo (MA et al., 2018).

2.3 Cogumelo *Lentinula edodes* (Shiitake)

O Shiitake é um cogumelo *Basidiomycota*; é o segundo mais cultivado no mundo, correspondendo a 25% da produção mundial, e assim como todo cogumelo comestível, é um alimento completo do ponto de vista nutricional por possuir baixo teor lipídico, alto teor proteico, fonte de vitaminas, minerais e fibras (ULZIJARGAL; MAU, 2011; NILE; PARK, 2014).

O Shiitake possui propriedades medicinais e é utilizado como um adjuvante na medicina tradicional. Os primeiros registros do seu cultivo, datam à dinastia Song (960-1127) na China. Os japoneses adotaram a técnica chinesa de cultivo de Shiitake, tornando-se assim seu principal produtor (MUSZYŃSKA et al., 2017). O Shiitake apresenta conteúdo proteico próximo ao encontrado em alimentos de origem animal. Em sua formação são encontrados todos os 9 aminoácidos essenciais: lisina, metionina, triptofano, treonina, valina, leucina, isoleucina, histidina e fenilalanina (KRITTALAK et al., 2018).

O Shiitake tem despertado o interesse dos pesquisadores devido ao seu conteúdo de compostos terapêuticos no mundo todo. Em 1972 foi descoberta substâncias com efeitos antiaterosclerótico, sendo as mais importantes, eritadenina (ácido 2, 3-di-hidroxi-4-butírico) e estatina-lovastatina. (MUSZYŃSKA et al., 2017). Os polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos tem ação na prevenção ou como coadjuvante no tratamento de doenças crônicas graves, como câncer e doenças cardiovasculares (PINYA et al., 2019; MUSZYŃSKA et al., 2017; ROP et al., 2009; FINIMUNDY et al., 2014; XU et al., 2016). Esse cogumelo, se ingerido regularmente, fortalece o sistema imunológico, preservando a capacidade do organismo em combater agentes patogênicos (DAI et al., 2015; GLAMOCLIIJA; SOKOVIC, 2017).

Os extratos aquoso e metanólico do Shiitake foram capazes de inibir *in vivo* a replicação de herpes e poliovírus. Os polissacarídeos presentes nos extratos podem ser considerados como uma fonte de substâncias antivirais (RINCÃO et al., 2012). Na dose correta, pode-se fazer uso dos cogumelos para ação imunomoduladora (ISRAILIDES et al., 2008), hipocolesterolêmica (ALAM et al., 2011; ZHU et al., 2013; SPIM et al., 2017), hipoglicêmica (MIRCEA et al., 2013; RAHMAN; CHOUDHURY, 2012) e outras propriedades promotoras de saúde (GIAVASIS, 2014).

A presença de compostos fenólicos nos cogumelos pode sofrer influência pela forma como é cultivado. O Shiitake é tradicionalmente produzido em toras de madeira, mas essa prática foi substituída pelo cultivo em blocos/substratos axênicos (SA) (Figura 1). Esses substratos são feitos de diferentes resíduos agrícolas como sabugo de milho ou de cana, resíduos de café, folhas de palmeira e palhas de cereais e são armazenados em sacolas plásticas.

Figura 1 – Bloco de cultivo de cogumelo Shiitake



Fonte: Elaboração própria

Para comparar as características químicas e nutricionais do Shiitake, seus cultivares foram divididos em toras de carvalho (*Quercus acutissima*) (QA) e em SA com: 40% de serragem, 43% de serragem de eucalipto, 12% de farelo de trigo, 4% de germe de milho e 1% de calcário. Os meios de cultura foram analisados quanto à densidade, umidade, cinzas, extrativos, lignina (solúvel e insolúvel) e holocelulose antes da inoculação do Shiitake, bem como, após a segunda colheita consecutiva dos

cogumelos. Os cogumelos cultivados em SA apresentaram maior teor de proteína, macrominerais e lipídeos, quando comparados com cogumelos cultivados em QA (BACH et al., 2018). Os resultados mostraram que a composição do meio de cultura pode influenciar a composição nutricional do Shiitake.

Quando se trata de substratos para cultivo, diferentes materiais orgânicos (farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de milho e farinha de soja) foram utilizados para enriquecer o substrato dos blocos de Shiitake aumentando a produtividade e a qualidade do cogumelo em relação as propriedades nutricionais. A quantidade de nutrientes no substrato é reduzida durante o período de crescimento e desenvolvimento do micélio. Para compensar essa perda, os pesquisadores prepararam um composto de água com nutrientes para imersão dos blocos de Shiitake. Para o preparo dos blocos, utilizou-se farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho e farinha de soja, misturando-os, e a cada 1,5 Kg dessa mistura acrescentou-se 15 litros de água. A mistura foi fervida por aproximadamente 2h. Após, o líquido filtrado foi diluído em 20 litros de água. Os blocos foram embebidos nesse líquido por um período de 12 horas. (RANJBAR et al., 2017).

Os estipes (caule) do Shiitake são os principais subprodutos durante o processamento de cogumelos, em sua grande maioria são descartadas. Com o objetivo de aproveitamento integral do Shiitake, foi investigado os principais nutrientes, minerais, aminoácidos livres, compostos não voláteis e voláteis nos estipes e píleo (chapéu) do cogumelo Shiitake. Os resultados mostraram concentrações 82,9 g/Kg de fibras nos estipes, superiores aos píleos com 25,7 g/Kg. Nos estipes, também foram encontrados 439,6 g/Kg de carboidratos, semelhante à concentração encontrada nos píleos. Os autores encontraram 370,1 mg/Kg de cálcio nos estipes, significativamente maior do que no píleo (174,0 mg/Kg). Assim, os estipes não devem ser subestimados ou descartados diretamente e podem ser reaproveitados na produção de alimentos funcionais como biscoitos ou chips (LI et al., 2018).

O teor e a composição das fibras alimentares nos cogumelos comestíveis variam de acordo ao estágio morfológico, o corpo dos frutos, o micélio etc. Alguns cogumelos apresentam maiores concentrações de fibras, como; *Grifola frondosa* com 10%, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* com 8%, e *Volvariella volvacea* 11,9%. Essas fibras podem ser subdivididas em solúvel e insolúvel baseada em propriedades físicas, químicas e funcionais. Algumas hemiceluloses, pectinas, gomas e frutanos do tipo inulina são fibras solúveis. As fibras insolúveis não podem formar géis devido à

sua insolubilidade na água e a fermentação é limitada. Eles consistem em lignina, celulose e algumas hemiceluloses (GHOSH, 2016).

Estudos relataram efeitos anti-obesidade dos cogumelos com suplementação de uma combinação de cinco tipos de cogumelos: *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* e *Pleurotus eryngii* quanto ao acúmulo de gordura visceral e microbiota intestinal em camundongos tratados por quatro semanas. Os resultados mostraram que a ingestão de cogumelos, devido ao teor de fibra alimentar, aumentaram algumas bactérias intestinais, produtoras de ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico, promovendo a lipólise em 21% da gordura visceral comparado ao grupo controle e 37% comparado ao grupo com dieta hiperlipídica, mostrando que a ingestão de cogumelos é uma estratégia eficaz na prevenção da obesidade (SHIMIZU et al., 2018).

A ação do Shiitake nas concentrações 1%, 4% e 10% sobre o perfil lipídico e antioxidante foi analisada em ratos, por quatro meses. O consumo da dieta reduziu peso corporal, e as concentrações séricas lipídicas em até 55% no grupo que consumiu 10% de Shiitake, comparado ao grupo controle, bem como reduziu o estado pró-oxidativo (YU et al., 2016).

Vetvicka e Vetvickova (2014) investigaram *in vivo* o papel das glucanas na estimulação de reações imunológicas que poderiam ser promovidas pelos cogumelos *Grifola frondosa* e *Lentinula edodes*. Avaliaram a fagocitose, a atividade das células Natural Killer (NK), a secreção de Interleucina 6, Interleucina 12, Interferon- γ , bem como a proteína C-reativa. Após administração oral por 14 dias do composto (61,5 μ g de glucana/*Grifola frondosa* e 820 μ g de glucana/*Lentinula edodes* ao dia) apresentaram maior potência na reação de defesa em ratos fêmeas, comparado aos grupos que ingeriram somente o extrato *Grifola frondosa* ou *Lentinula edodes* isoladamente.

O Shiitake também contém substâncias como o ácido copálico, a adenosina, o carvacrol e o eritritol, que mostraram ser responsáveis pela atividade antimicrobiana desse cogumelo na saúde bucal. A substância eritritol 1,2 e 3,4-butanotetrol com 70-80% de doçura da sacarose impediram aderência de microrganismos ao esmalte dos dentes. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, comumente encontrados em meio as salivas, sugere que este açúcar não é utilizado pelas bactérias para a síntese de glucanas. Como não é usado por essas bactérias, e nem é metabolizado para produzir o subproduto do ácido láctico, não causa a

desmineralização do esmalte. Desta forma foram verificados efeitos benéficos do Shiitake na ação anticariogênica, na prevenção do câncer de boca e na redução da gengivite (AVINASH et al., 2016).

O uso terapêutico do Shiitake na prevenção ou redução da aterosclerose e estresse oxidativo mostrou inibição da peroxidação lipídica de 67,1%, inibição da oxidação da LDL *Low Density Lipoproteins* (lipoproteína de baixa densidade) pela ação do α -tocoferol e redução da atividade da 3-hidroxi 3-metil glutaril co-enzima A redutase (HMG Co-A Redutase) de 44,3%. Dentre as substâncias encontradas nesse cogumelo com ações benéficas estão: α -tocoferol (vitamina E), ácido oleico, ácido linoleico, ergosterol e ácido butílico foram capazes de conferir defesa antioxidante e agente antiaterosclerótico (RAHMAN et al., 2018).

Finimundy et al. (2018) investigaram os efeitos quimiopreventivos de extrato de Shiitake em células humanas de carcinoma epitelial da HEp-2 e fibroblastos saudáveis de pulmão MRC-5, identificando vias proliferativas e apoptóticas. A inibição da proliferação celular foi mais acentuada em HEp-2 do que nas células MRC-5. O tratamento com Shiitake induziu o surgimento de células na fase inicial de maneira dependente da concentração, aumentando os níveis de expressão de TNF- α e TNF- β , e promovendo a apoptose pela ativação da caspase-8. Seus resultados sugerem que os polissacarídeos e compostos fenólicos induzem a citotoxicidade seletiva direta e efeitos antiproliferativos de maneira dose-dependente, possibilitando sua utilização como agente anticâncer.

Os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Hypsizygus tessulatus* foram analisados quanto a concentração de fenóis, como antioxidante e atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana mostrou resultado considerável contra as bactérias e fungos em uma zona de inibição de 7 mm a 20 mm mesmo em concentrações baixas, variando de 1mg/ml a 9mg/ml. O Shiitake apresentou melhor atividade antimicrobiana. Os fenóis totais encontrados nos extratos variaram de 3,2 a 10,7 mg GAE/mL. A concentração de flavonoides variou de 2,5 a 4,8 mg/mL (CHOWDHURY et al., 2015).

A apigenina, quercetina e luteolina têm efeitos antioxidantes que protegem as células β pancreáticas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), ajudando a manter a secreção de insulina em resposta a ingestão de glicose. Além disso, a lovastatina, um composto encontrado nos

cogumelos inibe a HMG-CoA redutase no fígado (GUNDE-CIMERMAN et al. 1993), reduzindo assim a síntese do colesterol (ALAM et al., 2009; LIN et al., 2013).

Entretanto, estudos clínicos de longo prazo, randomizados, duplo-cegos, controlados com placebo, incluindo estudos populacionais bem dimensionados, ainda são necessários para assim investigar os mecanismos exatos de ação de cada cogumelo nos diversos tipos de patogênese (WASSER, 2017).

2.4 Substâncias bioativas dos cogumelos

Muitos compostos são encontrados nos cogumelos, tais como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas, xilanas e galactanas, substâncias que tem tornado os cogumelos alimentos prebióticos e funcionais (JAYACHANDRAN et al., 2017).

2.4.1 β -glucanas

São polissacarídeos complexos compostos por moléculas de glicose, sendo componentes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais. Por serem fibras solúveis e insolúveis, as β -glucanas, uma vez no estômago e no intestino delgado, aumentam a viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a atividade de certas enzimas digestivas, influenciando diretamente na digestão e absorção dos nutrientes. Ainda no intestino, permite a redução na absorção de glicose, na produção de mediadores inflamatórios pelas bactérias patogênicas e no ciclo entero-hepático, induz o uso de colesterol circulante para produção de sais biliares (GRUNDY et al., 2017).

As β -glucanas são componentes da parede celular dos fungos e potente estimulador do sistema imunológico em humanos (BACH et al., 2017). Quando são derivadas de cogumelos, são compostas por ligações β (1-3), β (1-4) e β (1-6) responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde, pois ligam-se a linfócitos ou proteínas específicas, que ativam os macrófagos, células Natural Killer e outras células efectoras. A ativação dessas células resulta em um aumento da produção e liberação de anticorpos, interleucinas e interferon (BAK et al., 2014).

As β -glucanas também podem atuar no metabolismo lipídico, reduzindo níveis de colesterol total (BISEN et al., 2010; GIAVASIS, 2014; SPIM, et al., 2017). Xu et al. (2016) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que β -glucana de Shiitake (5 mg/Kg, 10 mg/kg

e 20 mg/Kg), com exposição por 10 dias, apresentaram efeitos significativos antitumorais, pela ativação de respostas imunes na inibição da proliferação de células tumorais e angiogênese *in vivo*. A β -glucana promoveu a apoptose das células por meio de caspase-3 via proliferação celular, inibido possivelmente pela p53 e p21 (genes supressores de tumor). Além disso, a β -glucana inibiu o Stat 3 (responsável pela proliferação de células tumorais) conduzindo possivelmente uma supressão.

2.4.2 Lentiniana

Das substâncias presentes no cogumelo Shiitake, a lentiniana (também denominada como lentinan) é um polissacarídeo de alto peso molecular, solúvel em água, resistente a ácidos e temperaturas elevadas. Estima-se que o mecanismo de ação do lentiniana seja por estimulação dos macrófagos, que aumentam a produção de interleucina-1, substância esta, que age combatendo os tumores. Alguns cogumelos têm efeitos anticancerígenos, possivelmente por ação dos polissacarídeos, principalmente a lentiniana. Além disso, a lentiniana também estimula a proliferação de linfócitos T, aumentando a secreção de interleucina-2 (INA et al., 2016).

O efeito anticâncer de lentiniana foi relatado pela primeira vez por Chihara e colaboradores (1970). Células de câncer de Sarcoma 180 foram transplantadas em camundongos e a lentiniana mostrou inibir o crescimento das células cancerígenas. E em tratamento pré-operatório com humanos, a substância mostrou redução significativa do número de colônias de metástase pulmonar. O principal fator de sua ação anticancerígena é a atividade imunoestimulante contra o câncer (sem ou em combinação com a quimioterapia). A lentiniana pode restaurar ou aumentar a sensibilidade das células hospedeiras a diferentes moléculas, como interleucinas, hormônios etc. Também estimula as respostas do sistema imune envolvidas com as células T e células B (ZHANG et al., 2016).

2.4.3 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural derivado da desacetilação da quitina. A quitina é o elemento estrutural de exoesqueleto de insetos, crustáceos e paredes celulares de fungos. É o segundo polissacarídeo natural mais abundante após a celulose. A complexidade da estrutura da quitina, a dificuldade na sua extração e a

insolubilidade em solução aquosa limitaram a pesquisa sobre esse polímero até a década de 1980 (CHANDY; SHARMA, 1990).

Passado mais de três décadas, várias pesquisas foram publicadas sobre a quitosana e seus derivados para aplicações em tecidos, liberação de fármacos, cicatrização de feridas, tratamento de água, efeitos antitumorais e antimicrobianos (AHMED; ALJAEID, 2016). A quitosana utilizada em tecidos, são degradadas sem causar qualquer reação inflamatória ou produzir quaisquer produtos finais tóxicos quando os novos tecidos são formados. Eles são porosos na natureza para a difusão de gases, nutrientes e resíduos metabólicos para as células semeadas, juntamente com o aumento da área de superfície para ligação, migração e diferenciação celular. Eles podem ser moldados facilmente em forma e volume anatômicos; são biocompatíveis com os fluidos biológicos e tecidos (CHEUNG; CHAN, 2015).

A quitosana demonstrou atividade antitumoral em termos de agente terapêutico e como veículo de droga. Como agente terapêutico, tem sido sugerido que a atividade antitumoral está relacionada à sua capacidade de induzir produção de citocinas por meio do aumento da proliferação de células T (GIBOT et al., 2015). Como transportador de um fármaco, a quitosana e seus derivados melhoram a absorção do fármaco, estabilizam o direcionamento e liberação das substâncias no organismo (HUDSON; MARGARITIS, 2014; AHMED; ALJAEID, 2016).

O uso de produtos derivados da quitosana para tratamento de feridas, como curativos, embora tenha um custo elevado, são eficientes na recuperação, cicatrização e demanda menor tempo nos cuidados dos profissionais de saúde. A quitosana, como adsorvente, tem mostrado alguns pontos positivos, como a compatibilidade com o meio ambiente, a versatilidade, a biodegradabilidade e a alta capacidade de adsorção e seletividade (ZHANG et al., 2015).

A quitosana também é aplicada na prevenção ou adjuvante nos tratamentos das dislipidemias. Possui alta densidade de cargas positivas, se incorporando aos lipídeos como uma “esponja” (SHAHIDI et al., 1999). Em um ambiente ácido como o estômago, a quitosana se fixa nas gorduras durante a digestão, e em ambiente básico do intestino, a esponja de gordura é solidificada e eliminada pelas fezes. Desta forma, a quitosana pode adsorver de quatro a cinco vezes o seu peso em gordura (JIN et al., 2017).

A fibra dietética presente na quitosana contribuiu para a redução na absorção de lipídeos no fígado *in vivo*, devido à sua capacidade de se ligar aos ácidos graxos.

A quitosana reduziu a secreção de adipocitocinas no soro, neutralizou alguns distúrbios inflamatórios e metabólicos e reduziu o colesterol e triglicerídeos. A redução da trigliceridemia observada após o tratamento com quitosana pode ser o resultado da menor expressão de FIAF (*Fasting Induced Adipose Factor*) observada no tecido adiposo visceral. A redução nos níveis de IL-6, resistina e leptina foram relacionados ao menor desenvolvimento de células adiposas (NEYRINCK et al., 2009).

2.4.4 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários sintetizados por plantas durante seu desenvolvimento em resposta a condições de estresse, tais como radiação solar, ferimentos, entre outros (HELENO et al., 2015). São substâncias amplamente distribuídas na natureza com pigmentos que dão a aparência colorida aos alimentos, normalmente derivado de reações de defesa das plantas no meio ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios. Os compostos fenólicos possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; GIADA, 2013).

Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis, contribuindo para o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa do produto. Estão presentes nos alimentos vegetais com alto teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, podemos destacar os vegetais de folhas verdes escuras e coloridas, além de cacau, soja e frutas (GIADA, 2013), e em várias espécies de cogumelos silvestres (YAHIA et al., 2017).

Os compostos fenólicos passaram a ter grande relevância para as indústrias alimentícias, por suas propriedades funcionais, atuando como boas moléculas antioxidantes, retardadores de envelhecimento e prevenção de doenças degenerativas. Devido ao perfil dos consumidores que tem mudado nas últimas décadas, com preferência por produtos mais naturais, passando a exigir alimentos que contenham substâncias benéficas à saúde, com baixo teor de açúcar e qualidade sensorial (SAUCEDO-POMPA et al., 2018).

2.5 Dislipidemias

O colesterol é um álcool policíclico de cadeia longa, usualmente considerado um esteroide. É encontrado nas membranas celulares, e a maior parte do colesterol é sintetizada pelo fígado e transportado no plasma na forma de lipoproteínas. Segundo a ANVISA, na dislipidemia há alteração dos níveis séricos dos lipídeos. As alterações do perfil lipídico podem incluir colesterol total alto, triglicerídeos (TG) alto, colesterol HDL *High Density Lipoproteins* (lipoproteína de alta densidade) baixo e níveis elevados de colesterol LDL *Low Density Lipoproteins* (lipoproteína de baixa densidade). Em consequência, a dislipidemia é considerada como um dos principais determinantes da ocorrência de doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares, dentre elas, a aterosclerose (espessamento e perda da elasticidade das paredes das artérias), infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica do coração (diminuição da irrigação sanguínea no coração) e AVC (derrame). De acordo com o tipo de alteração dos níveis séricos de lipídeos, a dislipidemia é classificada como: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e níveis baixos em HDL (FALUDI et al., 2017).

Os níveis elevados de LDL desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão endotelial. Em geral, as lesões iniciais, denominadas estrias gordurosas, caracterizam-se por acúmulo de colesterol em macrófagos, tornando a placa lipídica vulnerável a complicações. A formação da placa aterosclerótica inicia-se por diversos fatores de risco, como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo (JAWZALI et al., 2019).

De acordo com Ference et al. (2012), o depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração destas lipoproteínas no plasma. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a intimidade da parede arterial.

Os macrófagos repletos de lípidos são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Uma vez ativados, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica por meio da secreção de citocinas, que

amplificam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais (FALUDI et al., 2017).

Por outro lado, níveis aumentados de HDL equilibram o efeito deletério de LDL na parede vascular. Existem estratégias de sucesso para abordar esta questão, como o aumento da ingestão das lipoproteínas HDL para aumentar a proteção vascular, prevenindo eventualmente doenças coronarianas. Outras intervenções para regularizar a hipercolesterolemia vão desde tratamento farmacológico ou mudanças no estilo de vida com alimentação equilibrada e adição de alimentos funcionais na rotina diária (BADIMON; VILAHUR, 2012).

Os principais mecanismos envolvidos nos efeitos hipocolesterolêmicos de alimentos funcionais como os cogumelos comestíveis são i) os ácidos graxos dos cogumelos contribuem para reduzir o colesterol sérico; ii) a fibra alimentar pode interferir na concentração de lipídeos pela formação de géis viscosos a partir de fibra solúvel, contribuindo na não absorção do colesterol e triglicerol; iii) aumento na excreção fecal de ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta, o que inibe a incorporação do acetato (substrato para a síntese de esteróis e ácidos graxos) aos lipídios séricos; iv) presença de substâncias como eritadenina (lentinacina), β -glucanas, que têm mostrado efeito hipocolesterolêmico (MARTEL et al., 2017; GUILLAMÓN et al., 2010).

2.6 Estudos clínicos

Os estudos clínicos são divididos em fases I, II, III e IV. Eles são utilizados em testes e desenvolvimento de novas drogas ou substâncias bioativas para aprovação da ANVISA, e desta forma, ser liberado no mercado para aquisição e consumo. Ensaio clínico ou testes clínicos de novos medicamentos devem ser sancionados pelo Ministério da Saúde a fim de fornecer dados suficientes sobre sua toxicidade, propriedades farmacológicas e sua eficácia. A fase pré-clínica é composto por testes em animais para verificar sua potência e toxicidade previamente aos testes em humanos. Exige-se aprovação dos comitês de ética (ZHOU et al., 2005).

A fase I é a primeira etapa de testes em seres humanos, onde será exposta um medicamento ou substância testada em um pequeno grupo de pessoas saudáveis, para explorar a aceitação geral, avaliar sua segurança, determinar uma faixa de dosagem segura e identificar possíveis efeitos adversos. A Fase II envolve um grupo maior de indivíduos no teste, preferencialmente com a doença a ser estudada, a fim

de uma melhor indicação de segurança e eficácia sobre um medicamento ou nova substância. Os ensaios na fase III é realizada com um número maior de pacientes (centenas a milhares) para fornecer dados mais efetivos em tratamentos, como também os efeitos adversos, informações que permitirão que o medicamento ou substância seja usado com segurança; geralmente é multicêntrico e não envolve indivíduos saudáveis. Finalmente, na fase IV, os estudos são executados após o medicamento ou produto estar disponível comercialmente (ABRANTES-METZ et al., 2004).

Se tratando de cogumelos, vários ensaios clínicos de fase I, II e III foram publicados para melhor compreensão dos benefícios dos polissacarídeos na melhora das respostas imunes inatas e mediadas por células, com atividades antitumorais em humanos (KANG et al., 2013; SHIMIZU et al., 2009; TWARDOWSKI et al., 2015; YOSHIMURA et al., 2005; WESA et al., 2015).

A quimioterapia para o câncer de mama baseada na antraciclina afeta adversamente a qualidade de vida e a função imunológica de pacientes. Pensando em adjuvantes que possam melhorar essas deficiências, foi conduzido um estudo duplo-cego e randomizado para avaliar a eficácia do extrato de Shiitake como nutracêutico em 47 pacientes com câncer de mama. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em grupo exposto (12 comprimidos com 150 mg extrato/dia) e grupo placebo. A avaliação dos parâmetros imunológicos mostrou um aumento de células T reguladoras para células CD4+ no sangue periférico, mostrou inibição no grupo exposto em comparação ao grupo placebo. O Shiitake administrado por 22 dias, juntamente com quimioterapias baseada em antraciclina, foi útil para manter a qualidade de vida e a função imunológica dos pacientes (NAGASHIMA et al., 2017).

Com o objetivo de analisar também o sistema imunológico, Dai et al. (2015) conduziram um estudo com cinquenta e duas pessoas saudáveis, com idade entre 21 e 41 anos, por quatro semanas, consumindo 5 ou 10 g de cogumelos Shiitake seco ao dia. Os resultados mostraram aumento da proliferação das células T gama delta e natural killer T (NKT). Ambas demonstraram maior capacidade de expressar receptores de ativação, sugerindo que o consumo dos cogumelos melhora a função efetora das células. O aumento do anticorpo Imunoglobulina A (IgA) promoveu uma melhora no microbioma intestinal. As alterações observadas nas citocinas e nos níveis séricos de proteína C reativa (PCR) sugerem uma condição anti-inflamatória comparada àquelas que existiam antes do consumo do Shiitake.

Em estudo de intervenção com indivíduos dislipidêmicos, Schneider et al. (2011) avaliaram a redução do colesterol por meio de dieta contendo cogumelo *P. ostreatus*. Vinte indivíduos foram randomizados para tomar uma porção de sopa contendo 30 g do cogumelo seco ou sopa de tomate como placebo, durante 21 dias. Os resultados mostraram redução de 8,4% no colesterol total e 23% nos níveis de triglicerídeos. Os efeitos benéficos do *P. ostreatus* sobre os parâmetros lipídicos no soro sanguíneo podem estar relacionados à presença de ácido linoleico, ergosterol e derivados de ergosta que mostraram boa atividade na absorção de radical de oxigênio. Entretanto, ainda não existem estudos clínicos com barras de Shiitake aplicado em dislipidemia ou desregulações metabólicas.

2.7 Barras de cereais

É importante mesclar os avanços no conhecimento biológico dos cogumelos com os da tecnologia química para promover novas descobertas com base na utilização de resíduos lignocelulósicos que são abundantemente disponíveis em áreas rurais e urbanas. Isso também pode promover para a população, um impacto global positivo na qualidade nutricional a longo prazo, refletindo também na assistência médica, na conservação e regeneração ambiental e nas mudanças econômicas e sociais com a inserção dos cogumelos medicinais (CHANG; WASSER, 2018).

Dentre alguns produtos no mercado, o consumo de barras de cereais aumentou nos últimos anos por proporcionar uma forma rápida, prática e nutritiva de alimento. As barras alimentícias com alta densidade energética e rica em nutrientes foram desenvolvidas pensando no seu uso em desastres ambientais, operações militares e outras circunstâncias que se fizessem necessárias. Esses alimentos deveriam ser duráveis e prontos para consumo, relativamente baixo peso e volume. Eram características importantes na época para fornecer praticidade e todos os nutrientes (SHEIBANI et al., 2018).

Como a procura e o consumo por alimentos nutritivos, com caráter funcional têm crescido muito, e cada vez mais a população tem buscado melhorar a alimentação diária, tem havido um aumento também no incremento e desenvolvimento de novos produtos para o consumo e benéficos para a saúde (HADI et al., 2018).

Nesse contexto, aparecem as barras de cereais, produtos com boa aceitação no mercado e cuja demanda tem crescido constantemente, pois já fazem parte da dieta de várias pessoas. Considerado um alimento prático, seguro, nutritivo e que

possui campo para ser incrementado com uma vasta opção de nutrientes misturados a seus ingredientes. O trabalho com desenvolvimento de barras de cereais é de importância significativa, pois se trata de uma alternativa a mais para o oferecimento de um lanche rápido, saudável e que pode ser consumido a qualquer hora do dia, incluso no cardápio de preferências de muitos consumidores (WAGH et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

O Shiitake é um alimento completo nutricionalmente e sua utilização na biotecnologia e na prevenção ou tratamento de doenças crônicas graves, especialmente nas dislipidemias, tem crescido nas últimas décadas. No projeto de mestrado da doutoranda foi demonstrado que o Shiitake, em concentrações condizentes com a ingestão real, reduziu os níveis de colesterol total e triglicerídeos em animais. Entretanto, não foi encontrado estudos com o uso do Shiitake no tratamento de dislipidemias em humanos.

Assim, surgiu o interesse em avaliar os efeitos do Shiitake em pacientes com hipercolesterolemia limítrofe, com ausência de tratamento medicamentoso para que não houvesse prejuízo e interferências na saúde dos indivíduos, partindo-se para um estudo clínico.

Com isso em vista, o presente trabalho foi conduzido com a proposta de desenvolver uma barra de cereal contendo Shiitake, por ser de fácil consumo, que pudesse ser ingerido diariamente pela população, e assim auxiliar na melhoria da qualidade de vida de pacientes dislipidêmicos. No mercado existem barras com vários ingredientes como cereais, sementes, noz e frutas desidratadas (HADI et al., 2018), mas ainda não existem barras com cogumelos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar barra alimentícia doce e salgada com adição de Shiitake e avaliar os efeitos do seu consumo sobre os níveis de colesterol e estresse oxidativo em indivíduos limítrofes por meio de ensaio clínico randomizado.

4.2 Objetivos específicos

Capítulo I

- Quantificar os elementos químicos presentes no Shiitake;
- Caracterizar a barra de cereal selecionada na análise sensorial e intenção de compra;
- Determinar a composição centesimal;
- Quantificar a concentração de β -Glucanas e compostos fenólicos totais do Shiitake e da barra selecionada;
- Determinar a durabilidade da barra de cereal, estimando o tempo de vida de prateleira, por meio de análise microbiológica.

Capítulo II

- Recrutar indivíduos com colesterol limítrofes, e conduzir três encontros: tempo zero (início do estudo), trinta dias e sessenta dias após o início do consumo das barras;
- Realizar a avaliação nutricional dos indivíduos, bem como coleta de sangue;
- Avaliar os marcadores bioquímicos triglicerídeos, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e glicose das amostras de sangue das três coletas.
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo glutatona reduzida, catalase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) das amostras nas três coletas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo conta com três abordagens metodológicas: 1) Estudo experimental com materiais e medidas (compreende a formulação e produção das barras alimentícias); 2) Estudo experimental envolvendo humanos (compreende a análise sensorial e intenção de compra) e 3) Estudo Clínico de Fase II (compreende a exposição dos indivíduos às barras de cereais contendo ou não o Shiitake).

5.1 Obtenção e Processamento do Shiitake

Os cogumelos Shiitake foram fornecidos pela Empresa Yuri Cogumelos localizada em Sorocaba (São Paulo - Brasil) entre maio e outubro de 2018 seguindo com total controle de qualidade para manter as mesmas características nutricionais neste período. Empresa especializada na produção de composto axênico (serragem suplementada com nutrientes e submetidos à esterilização total) para Shiitake. A produção dos cogumelos é climatizada, com temperatura, oxigenação, luminosidade e umidade controladas. Esse processo de cultivo permite que os cogumelos sejam produzidos durante todo o ano, com o mínimo de oscilação na produtividade. Os blocos são certificados pelo IBD (Instituto Biodinâmico), o que garante que são produtos orgânicos, totalmente livres de agrotóxicos e produzidos dentro do conceito de sustentabilidade ambiental e social.

Os cogumelos *in natura* foram secos à 50 ± 2 °C e picados em multiprocessador de alimentos. Os cogumelos processados foram embalados à vácuo e armazenados em local seco e arejado, protegido da luz, até o momento da utilização na formulação das barras alimentícias.

E para utilização na caracterização, o Shiitake após desidratado e picado, também foi homogeneizado para garantir representatividade nas análises subsequentes.

5.2 Concentração dos elementos químicos

As análises dos elementos químicos do Shiitake foram realizadas no Laboratório de Física Nuclear Aplicada da Uniso (LAFINAU), utilizando Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (ED-XRF, *Energy Dispersive X-ray Fluorescence*). A fluorescência de Raio-X por dispersão de energia é uma técnica

analítica nuclear, utilizada para análise de amostras sólidas, dispensando a necessidade de tratamento químico prévio da amostra (NASCIMENTO FILHO, 1999).

5.3 Seleção da concentração de Shiitake para as barras

Grotto e colaboradores, em 2015, conduziram um estudo avaliando diferentes concentrações de Shiitake (100, 400 e 800 mg/kg/dia) para se determinar o grau de toxicidade em animais. A concentração de Shiitake de 100 mg/Kg/dia demonstrou ser segura e antioxidante. Em estudo posterior, esta dose foi capaz de diminuir níveis de colesterol total e triglicerídeos, e aumentar os níveis de HDL em ratos recebendo dieta hiperlipídica (SPIM et al., 2017).

Para que a barra de cereal com Shiitake apresentasse semelhança da barra placebo, foi adicionado 14% de Shiitake desidratado, ou seja, 3,5 g de Shiitake nas barras com peso médio de 25 g. Desta forma, considerando um indivíduo de 70 Kg, a ingestão diária de Shiitake seco foi recomendado na quantidade de 7 g. assim, um indivíduo de 70 Kg receberia duas barras ao dia.

5.4 Formulação de barras de cereais doce e salgada

Depois de muito testes, duas formulações de barras alimentícias doces e duas de barras salgadas foram produzidas para fins comparativos no teste de aceitabilidade. As formulações das barras de cereais doce foram semelhantes a composição de Conto et al. (2015) e Paula et al. (2013). A confecção foi realizada no Laboratório da Cozinha Experimental de Alimentos da Uniso. Os ingredientes utilizados nas formulações doces testadas para análise sensorial foram: Shiitake, aveia, ameixa, castanha do pará, linhaça, quinoa, gengibre, amendoim, chia, açúcar cristal e mascavo, glicose de milho, óleo de côco, glicerina e lecitina de soja em diferentes concentrações.

Para a aderência das barras alimentícias, os ingredientes ligantes açúcar mascavo e cristal, a glicose de milho, lecitina, glicerina e óleo de côco foram aquecidos sob agitação, à temperatura média de 115 °C, até alcançar teor de Grau Brix° 85-89. O Shiitake passou por cozimento prévio com açúcar mascavo e água por 45 min, finalizando no desidratador à 50 °C para que mantivesse de 10 a 15% de umidade. Somente após este processo, o Shiitake era adicionado à mistura final das barras juntamente com os demais ingredientes, foram homogeneizados, moldados em fôrma

de aço inoxidável e cortadas (BASTOS et al., 2014). As barras após cortadas, se apresentassem teor de umidade maior que 15%, eram levadas ao forno à 70 °C por aproximadamente 5h para finalizar a secagem. Após redução da temperatura, as barras com massa de 25 ± 1 g foram acondicionados individualmente em embalagem plástica de polipropileno, a vácuo (PADMASHREE et al., 2012).

Para a elaboração das barras alimentícias salgadas, os agentes ligantes (farinha de trigo branca e integral, goma xantana, lecitina), os condimentos (salsa, manjerição, manjerona, cebolinha) e sal foram dissolvidos em água e cozidos sob agitação à temperatura média de 115 °C por 20min (HADDAD, 2013). O Shiitake foi cozido com sal e desidratado até ficar com 10 a 15% de umidade. Após, os demais ingredientes como a aveia, castanha do pará, quinoa, gergelim, tomate seco, amendoim, queijo parmesão e linhaça foram acrescentados e homogeneizados em diferentes concentrações para testes (FERREIRA et al., 2015). A mistura passou por enformagem em forma de aço inoxidável e cortada em barras retangulares de 25 ± 1 g. As barras foram colocadas em estufa para secagem, à 70 °C, com circulação de ar, por 5h. Após resfriamento, elas foram acondicionadas individualmente em embalagem plástica de polipropileno, à vácuo. Todos os processos foram executados seguindo os cuidados da RDC nº 216 (BRASIL, 2004), e RDC nº 263 (BRASIL, 2005) que determina um limite máximo de 15% em umidade para manutenção da qualidade e garantir a vida útil do produto.

5.5 Análise Sensorial e Intenção de Compra

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Sorocaba com o parecer nº 2.016.736 (Anexo D). Duas formulações doces e duas formulações salgadas das barras alimentícias foram avaliadas por 82 provadores não-treinados (PAGAMUNICI et al., 2014), entre alunos e funcionários da Universidade de Sorocaba – Sorocaba/SP de ambos os gêneros.

Cada julgador recebeu duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – (Apêndice A) (MOURA et al., 2013). Os voluntários participaram com total liberdade para expressar desconforto ou insatisfação. A análise sensorial foi realizada mantendo o anonimato dos participantes e a confidencialidade dos resultados (PAGAMUNICI et al. 2014). As amostras foram fornecidas individualmente acompanhadas de água, junto ao formulário de avaliação (MUNHOZ et al., 2014).

Os testes foram realizados no Laboratório de Avaliação Sensorial da Cozinha Experimental de Alimentos da Universidade de Sorocaba, composta por área isolada para o preparo de amostras, área com 7 cabines individuais de avaliação sensorial equipadas com abertura para entrega das amostras, e iluminação apropriada.

As barras alimentícias foram analisadas quanto à textura, aroma, sabor e aparência por meio do teste sensorial afetivo de aceitabilidade. Para isso, foi utilizada a escala hedônica de 9 pontos, com os termos: gostei extremamente “9”, gostei muito “8”, gostei moderadamente “7”, gostei ligeiramente “6”, indiferente “5”, desgostei ligeiramente “4”, desgostei moderadamente “3”, desgostei muito “2” e desgostei extremamente “1”. Valores de 6 a 9 foram considerados margem de aceitação. Para a intenção de compra, a escala hedônica foi de 5 pontos: certamente compraria “5”, possivelmente compraria “4”, talvez comprasse “3”, possivelmente não compraria “2” e certamente não compraria “1” (Apêndice B) (COVINO et al., 2015).

A barra de cereal que obtivesse a melhor avaliação sensorial e maior intenção de compra seria utilizada para os demais testes, a partir daqui.

5.6 Composição centesimal do Shiitake e da barra de cereal

Para o teste da umidade, 3 g de amostras trituradas e homogeneizadas de Shiitake e da barra de cereal contendo Shiitake foram secas a 105 °C até peso constante. Para determinar as cinzas, 3 g de amostras foram carbonizados e incinerados em Mufla (Quimis Enila) a 550 °C. Para a extração dos lipídios, foi utilizado solvente éter etílico e o extrator de Soxhlet, por 6h (ARAÚJO et al., 2013).

As proteínas foram quantificadas utilizando o método micro Kjeldahl Te-036/1 (ZHOU et al., 2015) com algumas alterações, que consistiu em três fases: digestão, destilação e a titulação. A digestão foi baseada na oxidação de 70 mg da amostra à 380 °C com ácido sulfúrico, sulfato de cobre e potássio. No destilador, o nitrogênio da proteína foi reduzido em sulfato de amônia. Em contato com ácido bórico, o sulfato de amônia formou borato de amônia, titulado com ácido clorídrico.

A composição centesimal do cogumelo foi determinada somando as porcentagens de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, e subtraindo de 100%; a diferença foi a porcentagem de carboidratos (PINELA et al., 2012).

A quantificação de fibras seguiu a metodologia de McCleary et al. (2010). Após a amostra seca e sem a presença de lipídeos, esta passou por digestão com ácido acético glacial, ácido nítrico, ácido tricloroacético e areia diatomácea em aquecimento.

A amostra foi filtrada, lavada com água fervente, seguida por álcool e éter. Posteriormente, a amostra foi seca e pesada, em seguida incinerada a 550 °C até sobrar cinzas. A diferença entre o peso inicial da amostra e o peso das cinzas é o resultado das fibras totais.

5.7 Determinação de Glucanas do Shiitake e da barra de cereal escolhida

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

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

5.8 Determinação de Compostos Fenólicos Totais do Shiitake e da barra de cereal

Para a determinação dos compostos fenólicos foram pesados 2 g das amostras de Shiitake e da barra de cereal, em triplicata, transferidos para balões volumétricos com metanol à 80%. Os balões foram agitados a cada dez minutos, por uma hora, para a extração dos fenóis. As soluções foram filtradas e centrifugadas a 3000 rpm, por 30 min, para obtenção do sobrenadante. Para a quantificação dos compostos fenólicos, 2 mL do sobrenadante foram transferidos para um balão de 25 mL, 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado e o volume foi completado com carbonato de

sódio 20%, nessa ordem, e permaneceram em repouso por 30 min até a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. O espectrofotômetro foi zerado (branco) com carbonato de sódio. O valor de compostos fenólicos foi calculado por meio do ajuste da curva de calibração de ácido gálico nas concentrações: 12,5; 25,0; 37,5; 50,0; 62,5; 75 e 100 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g de amostra de acordo a 7ª edição da Farmacopeia Portuguesa (2002).

5.9 Análise microbiológica

As análises microbiológicas neste trabalho foram adaptadas dos procedimentos descritos por Regnier et al. (2017) e Laca et al. (2006). Para isso, 25 g da barra triturada foi diluída em 100 mL de solução salina (0,9%), e seguidas de diluições seriadas 1:10. As soluções foram inoculadas em placas de petri, com o meio de cultura específico. A inoculação das amostras foi executada sob condições assépticas (FABER; YUYAMA, 2015; LAVERMICOCCA et al., 2005). Após o período de incubação à 37 °C por 24h para bactérias e 25 °C, até 7 dias, para bolores e leveduras, foi realizada a contagem das colônias manualmente, sendo expressas em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

Os meios de cultura utilizados foram *Plate Count Agar* (PCA) para contagem total de microrganismos; e para bolores e leveduras foi utilizado o *Agar Batata Dextrose* (PDA) contendo 1% de antibiótico. Os meios de cultura seletivos utilizados foram o *Agar MacConkey* para Gram-negativa (*Escherichia coli*), o meio *Mannitol-Egg YolkPolymyxin Agar* (MYP) para o *Bacillus cereus*, o meio *Agar Salt Manitol* para o *Staphylococcus aureus* e *Agar Bismuto Sulfito* para presença de *Salmonella* sp (FERREIRA et al., 2015).

A referência para os níveis máximos de aceitação dos microrganismos por grama do produto neste estudo, seguiu o padrão estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (FAO, 1980).

5.10 Tempo de vida de prateleira

As barras alimentícias foram avaliadas após; 24h, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias, expostas as temperaturas de 25 °C e 37 °C. A vida útil das barras com Shiitake foi acompanhada pela cinética de crescimento de microrganismos, bolores e leveduras totais e algumas cepas específicas (TERAMURA et al., 2015).

5.11 Estudo Clínico de Fase II

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos na Universidade de Sorocaba com o Parecer nº 2.824.297 (Anexo E) e em conformidades com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional da Saúde (BRASIL, 2012).

5.11.1 Delineamento do estudo

O estudo foi um ensaio clínico prospectivo de fase II, randomizado, duplo cego, com início em setembro de 2018 e término em dezembro de 2018.

5.11.2 Participantes

Para o recrutamento, a pesquisa foi divulgada no site da Universidade de Sorocaba, em mídias sociais, e foram distribuídos *folders* (Apêndice C) pelo campus Cidade Universitária “Prof. Aldo Vannucchi”, contendo uma breve explicação sobre a pesquisa, critério de inclusão e exclusão, e contato da pesquisadora.

5.11.3 Critérios de elegibilidade

Foram recrutados indivíduos com idade entre 20 e 65 anos, de ambos os sexos, que apresentassem pelo menos um dos seguintes marcadores bioquímicos no nível limítrofe (colesterol total de 180 a 239 mg/dL; LDL de 130 a 159 mg/dL; triglicerídeos de 150 a 200 mg/dL) diagnosticado por meio de exames bioquímicos com datas recentes ao dia do recrutamento, que não estivessem em tratamento medicamentoso, (para evitar qualquer viés confundidor na pesquisa). Antes de se inscreverem no estudo clínico, os indivíduos receberam orientações pormenorizadas dos procedimentos aos quais seriam submetidos.

5.11.4 Critérios de inclusão

Responderam ao questionário de recrutamento 165 pessoas. Foram excluídos da primeira triagem, indivíduos com doenças como câncer, doenças cardíacas, neurodegenerativas, diabéticos e outras que pudessem interferir no estudo. Os indivíduos também não puderam fazer uso, nesse período, de suplementos com flavonoides, antioxidantes, drogas imunossupressoras e antibióticos. Os indivíduos

não puderam fazer doação de sangue trinta dias antes e durante o estudo. As mulheres gestantes, lactantes ou em reposição hormonal não puderam participar.

Assim, o estudo iniciou com 68 indivíduos. No primeiro encontro, após assinarem o TCLE (Apêndice D), os indivíduos foram submetidos à avaliação nutricional e anamnese, que consistiu na medição do Índice de Massa Corporal (IMC - Kg/m²), pesagem, recrutamento dos dados pessoais dos indivíduos, como doenças prévias, atividades físicas etc; análise dos exames laboratoriais recentes; recordatório de 24h de hábitos alimentares e frequência alimentar, sob a responsabilidade da Nutricionista Sara Rosicler Vieira Spim (CRN 42208). Todas as atividades com os indivíduos foram realizadas na sala de Enfermagem na Cidade Universitária “Prof. Aldo Vannucchi” – Uniso, sob a responsabilidade da pesquisadora principal e com os cuidados das enfermeiras Miriam Sanches do Nascimento Silveira e Paula Monticelli Bertoni.

5.12 Ensaio Clínico

Os indivíduos foram alocados aleatoriamente com auxílio de tabela de números aleatórios (programa Excel) em 2 grupos: I – Barra alimentícia doce sem Shiitake (n = 32). II – Barra alimentícia doce com Shiitake (n = 36). Para garantir a ingestão diária de Shiitake preconizada anteriormente (100 mg/Kg/dia), cada participante teve seu peso aferido para determinar a quantidade de barras consumidas ao dia. A sequência de alocação aleatória e atribuição dos indivíduos à intervenção, foi conduzida por um pesquisador externo do grupo de pesquisa.

Os indivíduos foram instruídos quanto à alocação cega, à frequência na ingestão das barras, e os horários no consumo da mesma, ficou a critério de cada um. Foram orientados a não alterar seu padrão alimentar, nível de atividade física ou uso de contraceptivos orais durante o estudo, para que se possa identificar somente os efeitos do Shiitake adicionado à dieta de cada indivíduo do grupo exposto (KERCKHOFFS et al., 2003). Além disso, um grupo (via Whatsapp) foi criado com o objetivo de tornar a comunicação mais célere, permitindo aos participantes deste grupo de estudo trocar informações, bem como, tirar dúvidas.

Todas as punções foram executadas no mesmo local e período. A coleta aconteceu após jejum de doze horas. Alguns cuidados da equipe de enfermagem, na coleta de sangue dos indivíduos do estudo, segundo a SBPC (2010) foram:

- 1- Lavagem das mãos e colocação de luvas estéreis a cada indivíduo;

- 2- Antissepsia do local da coleta com algodão umedecido em álcool a 70%, para realizar a punção;
- 3- Coleta de aproximadamente 10 mL de sangue;
- 4- Descarte de agulhas e seringas em caixas apropriadas, para serem recolhidas por órgãos competentes;
- 5- Transferência do sangue para um tubo de ensaio sem anticoagulante e outra parte com anticoagulante (EDTA).
- 6- Armazenado do sangue, pós-coleta, em caixas térmicas com gelo, até encaminhamento do material ao Laboratório de Pesquisa Toxicológica da Universidade de Sorocaba (Lapetox), para posterior análises.

Cada indivíduo recebeu, conforme alocação feita por tabela de números aleatórios duplo-cego, uma sacola sem identificação, contendo as barras alimentícias embaladas individualmente à vácuo, para um período de 30 dias. A pessoa responsável pela entrega das sacolas não tinha ligação com o estudo e os indivíduos que recebiam as sacolas também não sabiam qual o tipo de barra estavam recebendo.

Após um mês, todos os indivíduos voltaram à Universidade de Sorocaba para novas avaliações nutricionais, recebimento de mais barras alimentícias e coleta de sangue. Ao final de sessenta dias, os indivíduos retornaram para a última coleta de sangue e avaliação nutricional final na participação do estudo clínico.

5.13 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose em jejum, foram utilizados kits comerciais seguindo as especificações do fabricante, em equipamento automatizado (COBAS C111 Roche®), conforme metodologias abaixo.

Para o procedimento de ésteres de colesterol foram utilizados 10 µL de amostra e 1,0 mL do reagente enzimático em temperatura de 37 °C por 10 min, que por meio da enzima lipoproteína lipase se transformou em colesterol livre. A reação subsequente envolveu a oxidação de colesterol livre em colesterol-3-ona e H₂O₂, pela enzima colesterol oxidase. E com a ação da peroxidase no fenol com 4-aminoantipirina formou uma coloração cereja, proporcional à concentração de colesterol.

Para a determinação da Lipoproteína de alta densidade (HDL), o soro foi tratado com ácido fosfotungstato e cloreto de magnésio. Assim, a Lipoproteína de

baixa densidade (LDL), após a centrifugação por 2 min a 10.000 rpm, se separou, precipitando da fração HDL, que permaneceu no sobrenadante. A cor foi proporcional à concentração de colesterol na amostra. O LDL foi calculado subtraindo a concentração do colesterol HDL do colesterol total (FRIEDEWALD et al., 1972).

Os triglicerídeos do soro foram hidrolisados a glicerol e ácido graxos livres, pela lipoproteína lipase, na presença de adenosina trifosfato (ATP) e glicerol quinase. O glicerol foi fosforilado à glicerol-3-fosfato, que foi oxidado a acetona dihidrogênio fosfato e H_2O_2 pela enzima glicerol fosfato oxidase. O H_2O_2 , 4-aminoantipirina e p-clorofenol sofreram o mesmo processo de reação reportado acima, pela peroxidase, em banho-maria 37 °C por 10 min, até formação de coloração vermelha.

Para o teste de glicemia, a glicose-6-fosfato desidrogenase oxidou a glicose-6-fosfato na presença de NADP em gluconato-6-fosfato. Nenhum outro hidrato de carbono foi oxidado. A taxa de formação de NADPH durante a reação foi diretamente proporcional à concentração de glicose, sendo determinada fotometricamente.

5.14 Análises de estresse oxidativo

A determinação da glutathiona reduzida (GSH) foi por quantificação dos tióis totais reduzidos, baseado no método de Ellman (1959). Para isso, 150 μL do sangue, foram submetidos ao vórtice com 100 μL de Triton X-100 a 10% e 100 μL de TCA a 30%, em seguida foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm. Na cubeta foi pipetado 900 μL de TFK 1M, 50 μL do sobrenadante, e 50 μL de DTNB 10 mM, que reagiu formando um complexo amarelo. A leitura foi feita a 412 nm em espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração foi utilizada uma curva de calibração com concentrações pré-definidas de GSH (0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 mM).

Para avaliar a atividade da enzima catalase, foi utilizado o método de Aebi (1984), fundamentando-se na decomposição do H_2O_2 pela catalase, monitorado a 240 nm. Para tanto, o sangue foi diluído 60 vezes em TFK 50 mM. Uma alíquota de 20 μL foi misturada a 1910 μL de mesmo TFK, e 70 μL de H_2O_2 foram adicionados, dando início à reação monitoradas por três minutos. Uma constante de variação (κ) por minuto expressou a atividade da enzima.

A metodologia de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada como biomarcador da peroxidação lipídica, de acordo com estudo de Ohkawa et al. (1979). Alíquotas de plasma (150 μL) foram misturadas a 50 μL de NaOH e 50 μL de água ultrapura Milli-Q (Direct 8, Millipore®) e incubadas a 60 °C por trinta min,

com agitação. Foram acrescentadas às amostras 250 µL de H₃PO₄ 6%, 250 µL de TBA 0,8% e 100 µL de SDS 10% e levado ao banho 80 °C por 1h. O MDA reagiu com o TBA em meio ácido formando um composto rosa, e lido em espectrofotômetro a 532 nm. Para o cálculo da concentração de TBARS em plasma foi utilizado uma curva de calibração de malondialdeído, principal substância reativa ao TBARS, com concentrações pré-definidas (0,28; 0,56; 1,7; 3,4; 6,6 µM).

5.15 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão. Para análise sensorial e intenção de compra foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) e os gráficos foram produzidos no GraphPad Prism® 6.

No estudo clínico, os indivíduos foram estratificados quanto à sexo, faixa etária, IMC, ingestão de álcool, atividade física e fumantes. As diferenças entre os dois grupos foram feitas pelos testes Qui-Quadrado e Exato de Fisher, e teste *T-Student*.

As descrições dos dados bioquímicos e de estresse oxidativo foram expressos como média ± desvio padrão. Para investigar as diferenças bioquímicas entre os grupos nos tempos T0, T30 e T60, Análise de Variância (ANOVA) com mensurações repetidas foi aplicada. Todos os resultados de parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo foram normalizados para escala logarítmica. Após normalização, a análise estatística foi feita considerando as diferenças entre os tempos intermediário e final com o basal. Os dados foram analisados com o auxílio do software Stata® 14.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Capítulo I (Anexo B)

NUTRITIONAL, SENSORY, FLAVOR AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF A NOVEL MUSHROOM CEREAL BAR

SPIM, S.R.V.¹; CASTANHO, N.R.C.M.¹; PISTILA, A.M.H.¹; JOZALA, A.F.²; OLIVEIRA JÚNIOR, J.M.³; YOSHIDA, V.M.H.³; GROTTTO, D.¹.

¹LAPETOX – Laboratory of Toxicological Research, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

²LaMInFE – Laboratory of Industrial Microbiology and Fermentation Process, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

³LAFINAU - Laboratory of Applied Nuclear
University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil

*Corresponding author

denise.grotto@prof.uniso.br

Phone: +55 1521017147

Fax: +55 15 21017000

Address: University of Sorocaba

Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5

18023-000, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Lentinula edodes (Shiitake) is the second most cultivated edible mushroom in the world. It has low lipid contents, high protein and is source of vitamins and minerals. This study developed and evaluated sweet and salted cereal bars containing Shiitake were developed with a focus on biotechnology and the development of a new product on the market with functional allegation. Sensory test and purchase intention were accomplished, centesimal composition, glucans, total phenols, microbiological analysis for up to 180 days, at 25 °C and 37 °C. The sweet bar 1 showed better preference sensory analysis and buying intention. Shiitake used showed high concentrations of calcium, iron, phosphorus, potassium, zinc, manganese, phenolic compounds and glucans. The analyzed bar maintained the nutritional characteristics of Shiitake. That Bars analyzed did not develop microorganisms to 180 days. The bars with Shiitake are an easy marketing alternative due to their stability, good acceptance, as well as flexibility to add other functional ingredients beneficial to health, such as Shiitake.

Keywords: *Lentinula edodes*. Food bars. Nutraceuticals. Nutritional composition.

INTRODUCTION

There are thousands of species of mushrooms in the world; however, about 25 kinds are cultivated with culinary characteristics and medicinal properties (Valverde, Pérez, López, 2015, Rahi, Malik, 2016). Among them is the *Lentinula edodes* (popularly known as Shiitake). Shiitake is the second most cultivated edible mushroom in the world, accounting for 25% of world production, and like any edible mushroom, Shiitake is a complete nutritional food because it has low lipid content, high protein content, a source of vitamins, minerals and fibers (Ulziijargal, Mau; 2011, Nile, Park, 2014).

According to Dietary Reference Intake (DRI, 2005), dietary fiber helps in the prevention and supportive treatment of heart disease, with a recommendation of 20 to 38 g of daily fiber intake. The impact of Shiitake fibers on rat health was assessed by Anwar, Suchodolski, Muhammad, Ullah, Hussain, Shabbir, et al. (2019). Since intestinal microbiome can be modulated by diet, that authors evaluated Wistar rats submitted to a control diet, a hypercholesterolemic diet and a hypercholesterolemic diet with 5% Shiitake. Triglycerides, total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) concentrations were lower and high density lipoprotein (HDL) concentrations were higher after Shiitake supplementation. Intestinal microbiome of Shiitake supplemented group presented greater species richness, characterized by the abundance of *Clostridium* and *Bacteroides spp.*

Shiitake presents a variety of bioactive compounds with great therapeutic application, such as polysaccharides, glycoproteins and phenolic compounds. According to Rincão, Yamamoto, Ricardo, Soares, Meirelles, Nozawa, et al. (2012), aqueous and methanolic extracts, and polysaccharide isolated from Shiitake, were able to inhibit the replication of herpes virus and polio type 1 in vitro. In the appropriate dose, the mushroom presents immunomodulatory action (Dai, Stanilka, Rowe, Esteves, Nieves, Spaiser, et al. 2015), anticancer (Pinya, Ferriol, Tejada, Sureda, 2019), antiviral (Rincão, Yamamoto, Ricardo, Soares, Meirelles, Nozawa, et al., 2012), hypoglycemic (Mircea, Bild, Zavastin, 2013; Spim, Oliveira, Leite, Gerenutti, Grotto, 2017) and other health promoting properties (Gargano, Griensven, Isikhuemhen, Lindequist, Venturella, Zervakis, 2017).

β -glucans present in Shiitake can also act on lipid metabolism, reducing total cholesterol levels (Rahman, Abdullah, Aminudin, 2018; Zhu, Nie, Liang, Wang, 2013; Sima, Vannucci, Vetvicka, 2018; Giavasis, 2014; Spim, Oliveira, Leite, Gerenutti, Grotto, 2017). The polysaccharides can be considered whole foods. They can be used as prebiotics, especially by regulating the intestinal microbiota and the health of the individual.

Based on their nutritional complexity, mushrooms can be used for the development of functional foods. Food bars, for example, are an easily alternative for marketed due to their stability (Hadi, Norouzy, Tehrani, Nematy, Hadi, 2018), easy to transport, low-cost of production and good acceptance (Nadeem, Rehman, Anjum, Murtaza, Din, 2012), besides the flexibility of other functional ingredients to be added to the bar. The use of Shiitake in biotechnology and in the prevention or treatment of chronic diseases, especially hypercholesterolemia that has grown in recent decades. Accordingly, the present study proposes to develop cereal bars containing Shiitake, to characterize them and to evaluate them as to their acceptance.

MATERIAL AND METHODS

Acquisition and processing of Shiitake

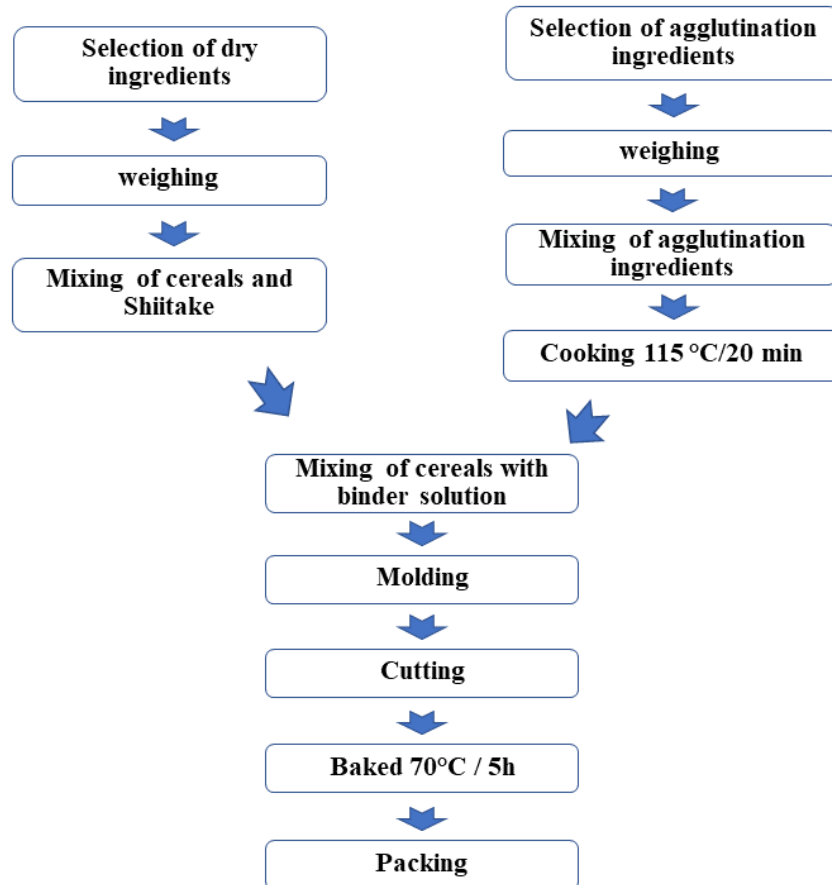
Shiitake mushrooms *in natura* were provided by Yuri Cogumelos Company located in Sorocaba (São Paulo State, Brazil). The mushrooms were purchased from May to October 2018. Mushrooms were dehydrated at 50 ± 2 °C and shredded in multiprocessor food (Philco®). Afterwards, they were stored in a dry and airy place, protected from light, until the time of making the cereal bars.

Development of cereal bars supplemented with Shiitake

Two formulations of sweet cereal bars (SwB) and two salted bar (SaB) formulations were designed for comparative purposes in the acceptability test. The Shiitake concentration used to a 25 g bars was 3.5 g. This concentration was based on a dose of 100 mg/Kg/day, which demonstrated hypocholesterolemic and hypoglycemic effects in rats (Spim, Oliveira, Leite, Gerenutti, Grotto, 2017) and showed no toxicity (Grotto, Gerenutti, Souza, Barbosa, 2015). The dose of 100 mg/Kg/day corresponds to 7 g of Shiitake for a 70 Kg individual. Considering a weight of 25 g per bars, we chose to put 3.5 g of Shiitake per bar, assuming that to obtain the beneficial effects mentioned above, the individual would have to eat two bars.

The basic ingredients used in SwB bars were oats, quinoa, chia, prune, flaxseed, and chestnut, peanut and sugars, similar to Conto, De Souza, Veeck, Ponce, Schmiele, (2015), but in several different ratios. In the same way, the general ingredients used in making SaB were oats, quinoa, rice flakes, flaxseed and sesame seeds, dried tomatoes, peanut butter, parmesan cheese and condiments parsley, garlic, onion, oregano, thyme, bay leaf, pepper and salt, similar to Bampi, Backes, Cansian, Matos, Ansolin, Poletto (2016), but it was tested different proportions of them. The general process of producing the food bars is shown in Figure 1.

Fig1. Flowchart of the production process of cereal bars with Shiitake.



For the adhesion of the ingredients, the binder elements were heated under stirring at 115 ± 3 °C until reaching Brix Grade 85-89. The remaining ingredients were added to the hot syrup and homogenized according to the methodology of Botabara-Yap, Solano, Estrada (2018) for SwB and according to Ferreira, Santos, Moro, Basto (2015) to the SaB. The mixture was molded in a bar molds of 25 ± 1 g. After cooling, cereal bars were packed in a polypropylene plastic vacuum package similar to the market (Padmashree, Sharma, Srihari, Bawa, 2012).

Sensory Analysis and Purchase Intention

Two sweet cereal bar formulations and two Shiitake salty bar formulations were defined, firstly because of the technological innovation, and it is also an alternative to please another part of the population that prefers salted nutritious foods.

After defining the formulations of cereal bars supplemented with Shiitake, bars were evaluated by 82 untrained tasters, of both genders, after the study be approved by the Ethics

Committee of the University of Sorocaba (approval number 2.016.736). Each consumer received two copies of the Free and Informed Consent Form (Garcia, Reis, Serpa, Viegas, Ferreira, Almeida et al., 2013) and they participated with complete freedom to express discomfort or dissatisfaction (WHO, 2016).

The sensory analysis was performed maintaining the anonymity of the participants and the confidentiality of the results (Pagamunici, Souza, Gohara, Souza, Gomes, Matsushita, 2014). Samples from the four formulations were supplied individually, with water (Munhoz, Guimarães, Nozaki, Argandoña, Hiane, Macedo, 2014). The test was carried out at the Laboratory of Sensorial Evaluation of Experimental Food Cooking (University of Sorocaba).

The bars were analyzed for texture, aroma, taste and appearance by the affective sensorial acceptance test. For a quantification of the results, a hedonistic scale of 9 points was used, with the terms: I liked extremely "9", I liked it very much "8", I liked it moderately "7", I liked it slightly "6", indifferent "5", slightly displeased "4", moderately disliked "3", I disliked "2" and greatly disliked "1", where 6 to 9 were considered acceptance range. And hedonic 5-point scale for purchase intent: would certainly buy "5", possibly buy "4", maybe buy "3", possibly would not buy "2" and certainly would not buy "1" (Covino, Monteiro, Scapim, Marque, Benossi, Monteiro, 2015).

Centesimal composition

The centesimal composition characterizes the macronutrients of foods. Thus, the centesimal compositions, of the Shiitake mushroom *in natura*, crushed and homogenized and the Shiitake bar selected in sensory analysis were quantified by the sum of percentages of humidity, ashes, lipids, proteins and by 100% difference, the carbohydrate contents (Wu, Li, Yang, Tong, Chen, 2015).

For the humidity test, 3 g of crushed samples were dried at 105 °C to constant weight. To determine the ashes, 3 g were charred and incinerated in Mufla (Quimis Enila) at 550 °C. For the lipids extraction, ethyl ether solvent and the Soxhlet extractor were used for 6 hours (Araujo, Matos, Fernandes, Cartaxo, Gonçalves, Fernandes, Fariasa, 2013).

Proteins were quantified using the micro Kjeldahl method Te-036/1 according, Wu, Li, Yang, Tong, Chen (2015), with some changes, which consisted of three phases: digestion, distillation and titration. The digestion was based on the oxidation of 70 mg of the sample at 380 °C with sulfuric acid, copper sulfate and potassium. In the distiller the protein nitrogen was reduced in ammonium sulfate. Upon contact with boric acid, the ammonium sulfate formed ammonium borate, titrated with hydrochloric acid. The centesimal composition of the

mushroom was determined by adding the percentages of moisture, ashes, lipids, proteins and subtracting of 100%, the difference was the percentage of carbohydrates (Pinela, Barros, Carvalho, Ferreira, 2012).

The fibers were quantified using the McCleary, Devries, Rader, Cohen, Prosky, Mugford, Champ, Okuma (2010). The dry and non-lipid sample was digested with glacial acetic acid, nitric acid, trichloroacetic acid and diatomaceous sand on heating. The sample was filtered, washed with boiling water, with alcohol and ether. Subsequently, the sample was dried and weighed, incinerated at 550 °C, until ashes remained. The difference between the initial weight of the sample and the ash weight represents the total fibers.

Concentration of chemical elements

The analyzes of the chemical elements of the Shiitake were carried out in the Laboratory of Applied Nuclear Physics of Uniso (LAFINAU), using the technique by Energy Dispersive X-ray Fluorescence (ED-XRF). ED-XRF is a nuclear analytical technique used for analysis of solid samples to determine the concentration of several elements, so that it is not necessary to use a previous chemical treatment (Nascimento Filho, 1999).

Determination of Glucans

Determination of total glucans was carried out using a commercial Yeast & Mushroom - Megazyme[®] kit. For this purpose, 100 mg of sample and 1.5 mL of 37% HCl were incubated for 45 min at 30 °C. The volume was then adjusted to 10 mL with deionized water and incubated for an additional 2 hours. After, 10 mL of 2M KOH were added and the contents completed to 100 mL with 200 mM TAS pH 5.0 and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. The supernatant (0.1 mL) was mixed to 0.1 mL of the exo- β -1,3-glucanase and β -glycosidase solution and incubated at 40 °C for 60 min. After, 1.5 mL of glucose oxidase / peroxidase were added and incubated for an additional 20 min at 40 °C. The absorbance was read at 510 nm.

For α -glucans, 2 mL of 2M KOH was added to 100 mg of the sample. After 20 min of stirring, 0.2 mL of amyloglucosidase and invertase were added, incubated at 40 °C for 30 min. The tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min. To a volume of 0.1 mL of the supernatant was added 0.1 mL of TAS and 3.0 mL of enzyme reagent and incubated for 20 min at 40 °C. The absorbance was measured at 510 nm in a spectrophotometer (Lambda 35, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). For quantification of β -glucan, α -glucan was subtracted from total glucan. All analyzes were performed in triplicate.

Determination of Total Phenolic

Phenolic compounds were determined weighing 2 g of the dry sample in triplicate, transferred to volumetric flasks with methanol 80%. The flasks were shaken every ten minutes for one hour, after being filtered and centrifuged at 3000 rpm for 30 min to obtain the supernatant. The supernatant (2 mL) was transferred to a 25 mL flask, where 1 mL Folin-Ciocalteu reagent was also added, and the volume was quenched with 20% sodium carbonate. The reading was made in a spectrophotometer at 760 nm. A calibration curve of gallic acid was made at concentrations 12.5; 25.0; 37.5; 50.0; 62.5; 75 and 100 µg/mL. The results were expressed as mg gallic acid equivalent (EAG)/g sample (Gaitán-Hernández, Zavaleta, Aquino-Bolaños, 2017; Lapornik, Prosek, Wondra, 2005).

Shelf Life

The shelf life of Shiitake bar was accompanied by growth kinetics of bacteria, molds and yeasts at times 1, 7, 15, 30, 60, 90 and 180 days, under two different temperatures 25 °C and 37 °C. The results were collected by microbial evaluation, meeting the specifications of the *Codex Alimentarius* (FAO, 1980) and Brazilian Food Microbiological Standards (Brasil, 2001).

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey, statistical significance set at $p < 0.05$. The graphs were produced in GraphPad Prism® 6.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of cereal bars

About ten sweet and salty cereal bars supplemented with shiitake were tested until the four most suitable formulations (two sweet and two salted) were produced. Pilot tests were performed with different concentrations of binder ingredients, starting from 40% to a concentration of 52% sugars. Thus, a concentration of 42% of binder solution was defined, which presented satisfactory consistency, appearance, flavor and aroma in the two sweet bars recipes. The ingredients used in the SwB are presented in Table 1.

Table 1 - Ingredients used in 25 g Sweet cereal Bars (SwB).

Ingredients	SwB 1		SwB 2	
	%	g	%	g
Dry Shiitake	14	3.50	14	3.50
Flakes oat	12	3.0	12	3.0
Brown sugar	8.3	2.10	8.3	2.10
White sugar	30	7.50	30	7.50
Dry plum	9	2.25	9	2.25
Brazil nut	7	1.75	7	1.75
Flaxseed	3.2	0.80	3.2	0.80
Glucose	1.6	0.4	1.6	0.4
Soy lecithin	0.4	0.10	0.4	0.10
Quinoa grains	3.5	0.86	3.5	0.86
Crystallized ginger	-	-	8	2.0
Peanut	8	2.0	-	-
Chia seed	2	0.5	2	0.5
Food glycerin	0.5	0.12	0.5	0.12
Coconut oil	0.5	0.12	0.5	0.12
Total	100	25	100	25

For the salted bars a concentration of 2.6% in wheat flour, soy lecithin, condiments and xanthan gum was defined for the binder solution. The ingredients used to make SaB are presented in Table 2.

Table 2 - Ingredients used in 25 g Salted cereal Bars (SaB).

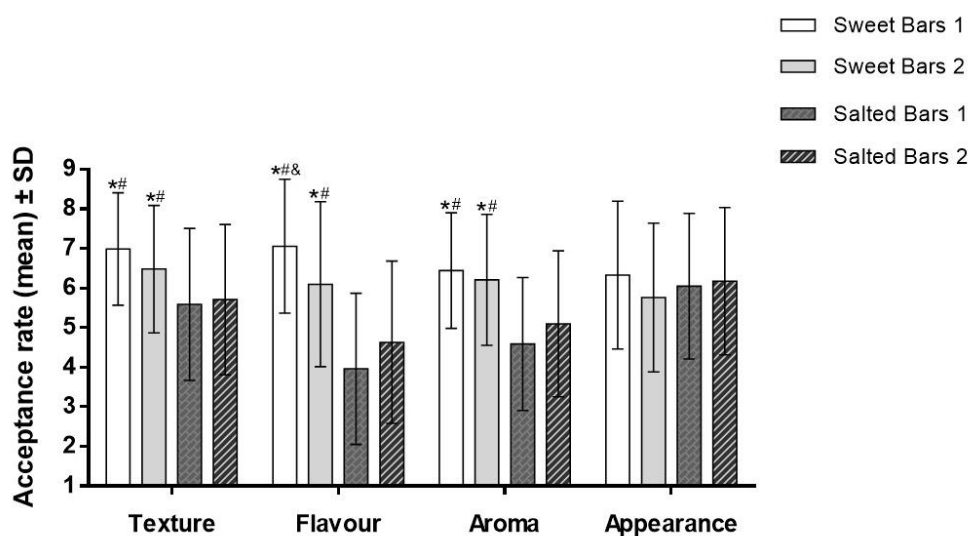
Ingredients	SaB 1		SaB 2	
	%	g	%	g
Dry Shiitake	14	3.5	14	3.5
Flakes oat	12	3	12	3
Brazil nut	12	3	12	3
Quinoa grains	10	2.5	10	2.5
Sesame seed	10	2.5	10	2.5
Flaxseed	9	2.25	8	2
Dried tomato	8	2	8	2
Peanut	14	3.5	0	0
Peanut butter	3	0.75	3	0.75
Parmesan cheese	0	0	15	3.75
White flour	3	0.75	3	0.75
Whole wheat	3	0.75	3	0.75
Xanthan gum	1	0.25	1	0.25
Soy lecithin	0.6	0.15	0.6	0.15
Spice	0.4	0.1	0.4	0.1
Total	100	25	100	25

Comparing to another study, Marques, Corrêa, Alves, Simão, Pinheiro, Ramos (2015) designed food bars aiming the reuse of seeds and bagasse from acerola juice production. Different combinations of the by-product were developed with oats, resulting in two formulations with high nutritional value, good iron concentration, low energetic value and high fiber content. Six formulations of food bars containing date, whey protein (3, 6 e 9%) and isolated vetch protein (2, 4 and 6%) were also developed with the objective of reutilization (Nadeem, Rehman, Anjum, Murtaza, Din et al., 2012). After testing the fourteen combinations, they defined that protein concentration, texture and flavor were improved by the incorporation of 6.5% whey protein concentrate and 4.4% vetch protein isolates in the date bar, without affecting the sensorial characteristic.

Sensory analysis and purchase

One of the main tests performed in this study was the sensorial analysis, which evaluates the tastes and preferences of the consumers, as well as the acceptance of a new products in the market. Through sensory analysis, it was possible to evaluate the cereal bars formulations for texture, flavor, aroma and appearance. The results of the sensorial analysis are presented in Figure 2.

Fig2. Sensory analysis of sweet bars 1 and sweet 2, and bars salt 1 and salt 2 in texture, flavor, aroma and appearance. Average in hedonic scale of 9 points. $\pm$



SD: Standard Deviation

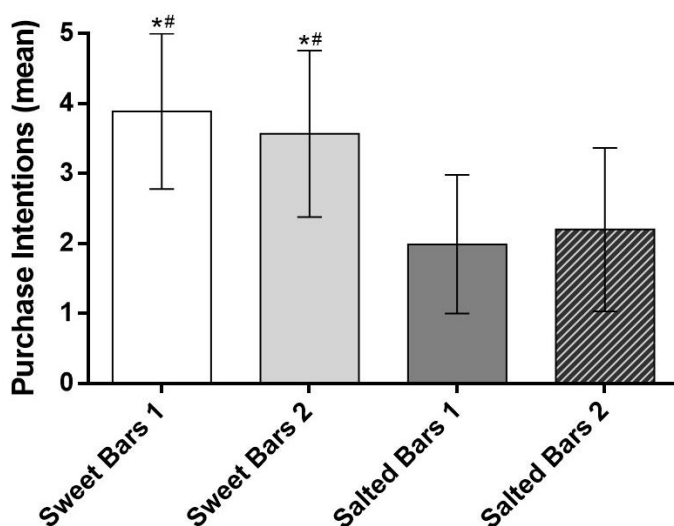
*Statistically different from Salted Bars 1 and 2; #Statistically different from Salted Bars 1 and 2; &Statistically different from Sweet Bars 2, Salted Bars 1 and 2;

SwB 1 was statistically different of SaB 1 in texture (25.0%), flavor (78.3%) and aroma (40.3%), and different of SaB 2 in texture (22.4%), flavor (52.5%) and aroma (26.3%). SwB 2 presented statistical difference in texture, flavor and in aroma compared to SaB 1 and SaB2 formulations. In appearance all bars did not present statistical difference. In general, SwB had a greater acceptance in relation to SaB. Both SwB 1 and 2 were approved by consumers. However, SwB 1 presented a better result in texture (difference of 7.87%), in flavor (15.7%), in aroma (3.7%) and in appearance (9.9%) compared to SwB 2.

The salted bar, although not approved by most volunteers, is a good alternative to be explored in the market, it is not the habit of the population. Is a differentiated product and can serve a larger number of individuals.

The buying intention research is presented in Figure 3. SwB 1 and 2 presented preference of the volunteers who participated in the sensorial analysis. SwB 1 presented 70% of the preference with "possibly would buy" and "certainly would buy", while SwB 2 presented 56% of the preference. On the other hand, both SaB 1 and 2 did not have good acceptability, and the intent-to-buy scales were "certainly not to buy" and "possibly would not buy".

Fig3. Intention to purchase sweet bars 1 and 2, and salted bars 1 and 2, containing Shiitake. Average hedonic scale of 5 points.



*Statistically different from Salted Bars 1 and 2; #Statistically different from Salted Bars 1 and 2.

Therefore, to the other analyzes (centesimal composition, microbiological, glucans), only the SwB 1 supplemented with Shiitake was used.

In a comparative study, cereal bars containing fruits from Amazonia (açaí, cupuaçu, muruci and taperebá) with tapioca flour and chestnut from Pará were evaluated. The acceptance

rate of the bars with açaí was greater than 70% for the attributes appearance, color, texture and overall evaluation, but was lower for flavor. Bars with cupuaçu and muruci obtained significantly high scores on attributes of sensory acceptance, indicating potentially good for the market (Prazeres, Domingues, Campos, Carvalho, 2017).

In another study, cookies containing Shiitake were produced and analyzed sensorially (Toan; Thu, 2018). Wheat flour was replaced with Shiitake mushroom flour, at concentrations of 5, 10 and 15%. The authors achieved a significant increase in the concentration of fibers and proteins in the cookie with shiitake flour compared to biscuit made only with wheat flour. The 9-point hedonic scale was also used to assess consumer acceptance, and the cookie with 5% Shiitake was the one that most pleased the study participants.

Composition Centesimal, glucans and total phenolic compounds

The results of the centesimal composition are shown in Table 3.

Table 3 - Centesimal composition of Shiitake *in natura* and SwB 1.

	Shiitake	SwB 1
Humidity (%)	90.3 ± 0.3	14.5 ± 0.2
Ashes (%)	0.6 ± 0.01	1.5 ± 0.1
Lipids (%)	0.4 ± 0.2	14.1 ± 4.0
Proteins (%)	2.3 ± 0.2	11.3 ± 0.2
Carbohydrates (%)	5.8 ± 0.4	62.0 ± 4.1
Fibers (%)	10.0 ± 2.0	5.5 ± 1.5
α – glucans (%)	0.3 ± 0.002	16.5 ± 0.009
β – glucans (%)	26.5 ± 0.005	15.9 ± 0.011
Total Phenolic Compounds *	176.6 ± 28.8	82.5 ± 4.8

*Data expressed as gallic acid equivalent (mg GAE/g) dry sample.

SwB 1 supplemented with Shiitake had 14.5% humidity, concentration within the limit established by the national commission on food standards (BRASIL, 1978), which concerns products containing cereals. SwB 1 also had a concentration of 14.1% in lipids, possibly due to the presence of Brazilian nut and peanut. Pagamunici, Souza, Gohara, Souza, Gomes, Matsushita (2014) developed gluten- free cereal bars of amaranth and flaxseed, and they found 9.1% of humidity, 7.1% of proteins and 7.9% of lipids, differences presented according to the used ingredients.

Carbohydrate concentration in SwB 1 was 62% due to its composition in sugars, 5.5% fibers and 32,4% glucans, being the macronutrient of greater concentration in the product. In

the study of Silva, Marques, Simão, Corrêa, Pinheiro, Silva, (2014), cereal bars were developed with 12.5% of pumpkin seed meal with oats. The bars presented 11.5% humidity, 63.3% carbohydrates, 12% protein, 5.5% lipids and 6.2% insoluble fibers, differing from this study only in the lipid concentration. With high concentrations in Shiitake bars, fibers and glucans can be effective, because they have a mechanism of action that promotes a physiological rebalance in cholesterol levels (Sima, Vannucci, Vetvicka, 2018).

Protein concentration in SwB 1 was 11.29% due to the protein concentration present in Shiitake. khaskheli AA, khaskheli SG, Liu, Sheikh, Wang, Homaida, (2018) had already found 12.1% of proteins in Shiitake; these differences can be influenced by the substrate where the mushroom is cultivated, climate, temperature and other care in mushrooms cultivation (Siwulski, Rzymiski, Budka, Kalač, Budzyńska, Dawidowicz1 et al., 2019; Hernández, Zavaleta, Bolaños, 2017). Bach, Helm, Lima, Bellettini, Haminiuk (2018) evaluated the composition of Shiitake mushrooms cultivated in oak log and axenic substrate (eucalyptus sawdust, wheat bran, corn germ and limestone) and found 14.5% of protein in Shiitake produced in oak and 18% in Shiitake produced in the substrate axenic.

In relation to glucans, the percentage of α -glucan in Shiitake *in natura* was lower than in SwB 1 supplemented with Shiitake. It is possible that the percentage was higher in the bar due to the presence of oats (Grundy, Quint, Rieder, Ballance, Dreiss, Butterworth, Ellis, 2017). Concerning β -glucan, SwB 1 did not maintain the same concentrations of β -glucan as Shiitake *in natura*, but 16,0% is considered a high concentration. In relation to Shiitake, the concentration found was similar to that found in a previous study of our research group (34.5%) (Spim, Oliveira, Leite, Gerenutti, Grotto, 2017) and of Kolundžić, Radović, Tačić, Nikolić, Kundaković (2018) study (34,0%). Bak, Park, Park, Ka, (2014) evaluated the stems and mycelia of ten Shiitake mushroom cultivars for β -glucan and found a variation of $20.0 \pm 1.7\%$ to $44.2 \pm 0.13\%$ in the mycelia and $29.7 \pm 1.4\%$ a $56.5 \pm 4.7\%$ in stems.

In addition to glucans, phenolic compounds were also highlighted in mushroom *in natura*. Secondary plant metabolites such as phenolic acids, simple phenols, flavonoids, coumarins, tannins, lignins, tocopherols, are synthesized during their development and in response to stress conditions such as UV radiation, infection, injury. Many of these substances have beneficial effects, such as the antioxidant effect (Giada, 2013).

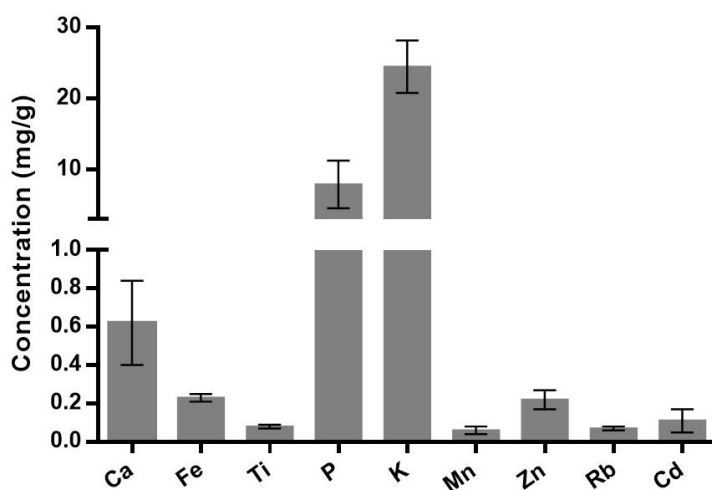
Comparatively, total phenols were evaluated in seventeen species of Mexican mushrooms, mostly edible. The authors found a variation of 30.3 to 307.0 GAE/100 g in phenols in the mushroom samples on dry basis (Yahia, Orozco, Pérez, 2017). Also in Mexico, two commercial lines of Shiitakes (IE-245 and IE-256) were cultivated in two types of

lignocellulosic residues as substrates: oak wood chips (control), sorghum stubble and sugarcane bagasse. The highest concentrations of phenolic compounds were found in the control strain IE-256 (6.5 mg GAE/g) and sorghum substrates (5.9 mg GAE/g) (5.9 mg GAE/g) (Hernández, Zavaleta, Bolaños, 2017). Another study found 10.7 mg GAE/g phenolics in Shiitake mushroom extract (Chowdhury, Kubra, Ahmed, 2015).

Concentration of chemical elements

The concentrations of the chemical elements are presented in Figure 4. Potassium (K) and phosphorus (P) were the highest concentrations found (24.5 and 7.9 mg/g, respectively). K and P are considered macroelements. The other elements were found in the order of $\mu\text{g/g}$, that is, microelements.

Fig4. Analyzes of chemical elements of Shiitake by Energy Dispersive X-ray Fluorescence (n=3).



Kolundžić, Radović, Tačić, Nikolić, Kundaković (2018) analyzed a macro and microelements composition of three mushroom species, including Shiitake. The most abundant elements were calcium (Ca), K and P, followed by lithium (Li), selenium (Se) and zinc (Zn). On the other hand, some toxic elements lead (Pb), arsenic (As) and cadmium (Cd) were detected by them at higher levels than allowed. In this study cadmium was 0.1 mg/Kg, when allowed by Anvisa (BRASIL, 2013) up to 0.2 mg/Kg.

These differences in concentrations occur due to the variation in the chemical composition of substrates, and it may interfere both in the nutritional yield and in the levels of toxic elements in mushrooms. The findings of Siwulski, Rzymiski, Budka, Kalač, Budzyńska, Dawidowicz et al. (2019) corroborated these results, highlighting the need for care with the

substrates used in the mushrooms cultivation with the purpose of protecting and guaranteeing the safety of consumers.

In Shiitake from China, K and P concentrations were similar to this study (27.3 and 8.9 mg/g respectively), while Ca (174.0 mg/Kg), iron (Fe) (36.3 mg/Kg), Zn (72.2 mg/Kg) and manganese (Mn) (1209.5 mg/Kg) presented values significantly lower (Li, Wang, Liu, Tian, Wei, Xu, 2018).

Shelf life by microbiological control

Our study showed an initial count of microorganisms (bacteria, molds and yeasts) at 9×10 CFU/g, for both temperatures 25 °C and 37 °C. After 180 days, the total count of microorganisms, at 37 °C, was 7×10 CFU/g. All the results were lower than the maximum limit allowed by National Health Surveillance Agency (ANVISA), evidencing the quality of raw materials, sanitary control in the preparation of bars, and different temperatures. Microbial food safety is an essential component of food quality, it is the combination of positive characteristics in the degree of acceptability of the product to the consumer (Nerín, Aznar, Carrizo, 2016).

The bars can be stored at room temperature or high temperature. Measurement of ingredients, humidity, type of packaging, environmental conditions, among other characteristics, determining the fastest or slowest deterioration of a food, extending the validity of food bar samples on average by up to 9 months (Yadav, Bhatnagar, 2015; Padmashree, Sharma, Srihari, Bawa, 2018).

When the samples were exposed in a selective culture media analysis, few units (minor than 10^2 CFU/g) of *S. aureus* and *B. cereus* were found. There was no growth for *E. coli* and *Salmonella* sp. Our results were within the limits described on European Union Commission Recommendation (CE N° 1441/2007) and ANVISA; and the cereal bars can be safely consumed (Table 4).

Table 4 – Analysis of the shelf life of the sweet food bar with Shiitake in a selective culture media

Counting of microorganisms in Sweet bar 1 supplemented with Shiitake								
Samples	<i>E. coli</i> (CFU)		<i>S. aureus</i> (CFU)		<i>B. cereus</i> (CFU)		<i>Salmonella</i> sp (CFU)	
	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C
7 days	0	0	2x10	2x10	0	0	0	0
180 days	0	0	2x10	0	1x10	1x10	0	0
ANVISA	5x10 ³ /g		10 ³ /g		5x10 ² /g		0	
EUR	≤10 ²		≤10 ⁴		≤10 ⁵		0	

ANVISA: Brazilian Health Regulatory Agency; EUR: European Union Recommendation.
CFU: Colony Forming Unit.

In a comparative study, breakfast cereals with flakes of barley, oats, rye and wheat were evaluated for bacterial count, packed in three different materials. Total bacterial count and shelf life were evaluated for up to six months. The initial count was 5.5 x 10 CFU/g for all samples. A slight decline in bacterial counts was observed after 1 month of storage and indicated stable storage quality at the time studied (Kince, Galoburda, Klava, Tomsone, Senhofa, Straumite, Kerch, Kronberga, Sturite, 2017).

Comparatively, according to Lobato, Pereira, Lazaretti, Barbosa, Carreira, Mandarino, Grossmann, (2011) a cereal bar rich in isoflavones and soy protein was also developed to control dyslipidemia. The shelf life of the product was tested for 6 months, and there were no significant changes in the microbiological parameters in coliforms, *S. aureus*, *B. cereus* and *Salmonella* sp., presenting less than 10 colonies of microorganisms in each sample. Cookies and food bars were produced with solid fruit and vegetable residues, and microbiological stability was tested, as well as shelf life for 0, 30 and 90 days. The authors observed the samples met the standard established by Brazilian rules, except for the two bars of salted cereals that, after 30 days, showed growth of molds and yeasts. The presence of molds and yeasts is attributed to the high humidity content found in the samples Ferreira, Santos, Moro, Basto, 2015).

According to Nerín, Aznar, Carrizo (2016), food contamination may occur in various points in the production process. Some contaminants may already be present in the raw materials, but others may be incorporated into the raw materials during transportation, storage, preheating, disinfection, cleaning and sterilization. Contamination may also occur in cleaning the working environment, in the packaging used and in the handling. These facts highlight the importance of conducting chemical and microbiological analyzes during food processing, ensuring safety for consumers.

To develop or manipulate any food, a constant improvement of sanitary control action is necessary, aiming the population's health protection and regulation of microbiological standards for food. Therefore, microbiological criteria and standards for food should be obeyed, applying whenever possible the Hazard Analysis System and Critical Control Points (HACCP) and the microbiological quality of food products (BRASIL, 2001). Some microorganisms are highly adherent to the grain and cannot be removed by simply washing in liquid medium, however they can be reduced by removing the surface of the grain using an abrasive grinder. This microbial load reduction is even more important in the case of fungi, as they can potentially produce mycotoxins (Laca, Mousia, Díaz, Webb, Pandiellaa, 2006).

Conclusion

Sweet and salty cereal bars containing Shiitake were developed with a focus on biotechnology and the development of a new product on the market with functional allegation. The result was satisfactory, and two sweet bars pleased the volunteers, with approval in the sensory analysis and purchase intention. Sweet bar 1 (SwB 1) formulation obtained the highest score in the preference of volunteers. Shiitake used in SwB 1 showed high concentrations in calcium, iron, phosphorus, potassium, zinc, manganese, phenolic compounds and glucans. The bars maintained these characteristics, mainly in the concentrations of proteins, fibers, glucans and phenols. SwB 1 showed to be safe for up to 180 days of shelf life at a temperature of 25 °C and 37 °C. Cereal bars are considered good alternative on snack, easy to market due to their stability, well accepted by the consumer, and the flexibility to be added other health-beneficial ingredients such as Shiitake.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Valéria de Campos Orsi and Thaisa Borim Pickler for technical support, Laboratório Cefar Diagnóstica Ltda with supply of strains of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* and the University of Sorocaba with the scholarship.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Anwar, H., Suchodolski, J.S., Muhammad, B., Ullah, I., Hussain, G., Shabbir, M.Z., Mustafa, I., Sohaile, M.U. (2019). Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (agaricomycetes), supplementation alters gut microbiome and corrects dyslipidemia in rats. *Internacional Jorناول of Medicinal Mushrooms*; 21(1):79–88.
- Araujo, G.S., Matos, L.J.B.L. Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J.M., Gonçalves, L.R.B., Fernandes, F.A.N., Farias, W.R.L. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry*, Fortaleza, 20:95-98.
- Bach, F., Helm, C.V., Lima, E.A., Bellettini, M.B., Haminiuk, C.W.I. (2018). Influence of cultivation methods on the chemical and nutritional characteristics of *Lentinula edodes*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(12).
- Bak, W.C., Park, J.H., Park, Y.A., Ka, K.H. (2014) Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. *Mycobiology*, 42(3):301-304.
- Bampi, G.B., Backes, G.T., Cansian, R.L., Matos, F.E., Ansolin, I.M.A., Poletto, B.C., Corezzolla, L.R., Trindade, C.F.S. (2016). Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. *Food Bioprocess Technol.* 9:1422–1428.
- Botabara-Yap, M.J., Solano, R., Estrada, M. (2018). Effect of Lifestyle Intervention Program on the Health Status of Hypertensive Adults in Kuala Lumpur. *Journal of Health Sciences*. 1(1) ISSN 2599-5456.
- Brasil (1978). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de março de 1978. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil (2001). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 10.
- Brasil (2013). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília.
- Chowdhury, M.M.H., Kubra, K., Ahmed, S.R. (2015) Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(8).
- Conto, L.C.D., Souza, J., Veeck, A.P.L., Ponce, G.H.S.F., Schmieles, M. (2015). Sensory Properties Evaluation of Pine Nut (*Araucaria angustifolia*) Cereal Bars Using Response Surface Methodology. *Chemical Engineering Transactions*. v.44.
- Covino, R.; Monteiro, A.R.G.; Scapim, M.R.S. Marque, D. R.; Benossi, L.; Monteiro, C. C. F. (2015) Manufacturing cereal bars with high nutritional value through experimental design. *Acta Scientiarum. Technology*, Maringá, v.37, n.1, p.149-154.

Dai, X., Stanilka, J.M., Rowe, C., Esteves E.A., Nieves Jr C., Spaiser, S.J., Christman, M.C., Langkamp-Henken, B., Percival, S.S. et al. (2015). Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushrooms Daily Improves Human Immunity: A Randomized Dietary Intervention in Healthy Young Adults. *Journal of the American College of Nutrition*; 34(6):478-87.

DRI – Dietary Reference Intake. Report-Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). (2005). Baltimore: National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board.

FAO. (1980) *Codex Alimentarius Commission*. General Principles for the Establishment and Application of Microbiological Criteria for Foods. Appendix II in Report of the 17 TH Session of the Committee on Food Hygiene. Rome: Food and Agriculture Organization.

Ferreira, M.S.L., Santos, M.C.P., Moro, T.M.A., Basto, G.J. (2015). Formulation and characterization of functional foods based on fruit and vegetable residue flour. *J Food Sci Technol*. 52(2):822–830.

Nascimento Filho, V.F. (1999) Limits of Detection of a Total Reflection X-ray Fluorescence, System with Double Reflection Module. *Biological Trace Element Research*, 71(1):423–430.

Garcia, A., Reis, C., Serpa, J., Viegas, J., Ferreira, M., Almeida, S. et al. (2018). Physical-sensory evaluation of a cereal bar with quinoa: a preliminary study. *Biomed Biopharm Res*, 15(1):25-36.

Gargano, M.L., Griensven, L.J.L.D., Isikhuemhen, O.S., Lindequist, U., Venturella, G., Zervakis, S.P.W.G.I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*:151(3): 548-65.

Giada, M.L.R. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Intechopen*, 4:87-112.

Giavasis, L. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*. 26:162-173.

Grotto, D., Gerenutti M., Souza V.C.O., Barbosa, F. Jr. (2015). Deficiency of macro and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. *Toxicology*. 2:401-404.

Grundy, M.M.L., Quint, J., Rieder, A., Balance, S., Dreiss, C.A., Butterworth, P.J., Ellis, P.R. (2017). Impact of Hydrothermal and Mechanical Processing on Dissolution Kinetics and Rheology of Oat Glucan. *Carbohydrate Polymers*. 166:387–397.

Hadi, V., Norouzy, A., Tehrani, M.M., Nematy, M., Hadi, S. (2018). Properties of Compact Food Bars: A Review Study. *Journal of Nutrition Fasting and Health*, 6(3):125-131. DOI: 10.22038/JNFH.2018.

Hernández, R.G., Zavaleta, M.A.B., Bolaños. (2017). Productivity, Physicochemical Changes, and Antioxidant Activity of Shiitake Culinary-Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (agaricomycetes) Cultivated on Lignocellulosic Residues. *Int. J. Med. Mushrooms*. 19(11):1041–1052.

International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans. (2016) Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS). Fourth Edition. Geneva, 2016.

Kince, T., Galoburda, R., Klava, D., Tomsone, L., Senhofa, S., Straumite, E., Kerch, G., Kronberga, A., Sturite, L. (2017). Breakfast cereals with germinated cereal flakes: changes in selected physical, microbiological, and sensory characteristics during storage. *European Food Research and Technology*. 243(9):1497–1506.

Khaskheli, A.A., khaskheli, S.G., Liu, Y., Sheikh, S.A., Wang, Y., Homaida, M.A., Soomro, A.H., Bo, D.X., Dars, A.G., Lakho, J.A., Hu, S., Huang, W. (2018). Characterization and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from three edible mushrooms. *Journal of medicinal plant research*, 12(12):133-138.

Kolundžić, M., Radović, J., Tačić, A., Nikolić, V., Kundaković, T. (2018). Elemental composition and nutritional value of three edible mushrooms from serbia. *Zastita Materijala*. 59(1):45-50.

Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., Pandiellaa, S.S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*. 72:332–338.

Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. (2005). Comparison of Extracts Prepared from Plant By-products Using Different Solvents and Extraction. *Time Journal of Food Engineering*. 71:214–222.

Li, S., Wang, A., Liu, L., Tian, G., Wei, S., Xu, F. (2018). Evaluation of nutritional values of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) stipes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12:2012-2019.

Lobato, L.P., Pereira, A.E.I.C.P., Lazaretti, M.M., Barbosa, D.S., Carreira, C.M., Mandarino, J.M.G., Grossmann, M.V.E. (2011). Snack Bars with High Soy Protein and Isoflavone Content for use in Diets. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1–10.

Marques, T.R., Corrêa, A.D., Alves, A.P.C., Simão, A.A., Pinheiro, A.C.M., Ramos, V.O. (2015). Cereal bars enriched with antioxidant substances and rich in fiber, prepared with flours of acerola residues. *J Food Sci Technol*. 52(8):5084–5092.

Mccleary, B.V., Devries, J.W., Rader, J.I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D.C., Champ, M., Okuma, K. (2010). Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 93:221-233.

Mircea, C., Bild, V., Zavastin, D. (2013). The protective effect of mushrooms in experimentally induced diabetes in Mice. *Farmacia*; 61(2):268.

Munhoz, C.L., Guimarães, R.C.A., Nozaki, V.T., Argandoña, E.J.S., Hiane, P.A., Macedo, M.L.R. (2014). Preparation of a cereal bar containing bocaiuva: physical, nutritional, microbiological and sensory evaluation. *Acta Scientiarum Technology*. 36(3):553-560.

Nadeem, M., Rehman, S., Anjum, F.M., Murtaza, M.A., Din, G.M. (2012). Development, Characterization, and Optimization of Protein Level in Date Bars Using Response Surface Methodology. *The Scientific World Journal*. ID 518702:10.

Nerín, C., Aznar, M., Carrizo, D. (2016). Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*. 48:63-68.

Nile, S.H., Park, W. (2014). Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber Contents of Wild Growing Edible Mushrooms. *Czech Journal of Food Sciences*; 32(3):302-7. Seoul- Korea.

Padmashree, A., Sharma, G.K., Srihari, K.A., Bawa, A.S. (2012). Development of shelf stable protein rich composite cereal bar. *Food Science and Technology*, Mysore-India, 49(3):335-341.

Pagamunici, L.M., Souza, A.H.P., Gohara, A.K., Souza, N.E., Gomes, S.T.M., Matsushita, M. (2014). Development, Characterization and Chemometric Analysis of a gluten-free Food Bar Containing Whole Flour From a new cultivar of Amaranth. *Ciência e Agrotecnologia*, 38(3):270-277.

Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4):829-834.

Pinya, S., Ferriol, P., Tejada, S., Sureda, A. (2019). Chapter 5.3 - Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), Shiitake (*Lentinula edodes*), Maitake (*Grifola frondosa*). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*; 517-26.

Prazeres, I.C., Domingues, A.F.N., Campos, A.P.R., Carvalho, A.V. (2017). Elaboration and Characterization of Snack Bars Made with Ingredients From the Amazon. *Acta Amazonica*. 47(2):103–110.

Rahi, D.K., Malik, D. (2016). Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance. *Journal of Mycology*; 2016:18. Índia. Doi.org/10.1155/2016/7654123. ID7654123.

Rahman, M.A., Abdullah, N., Aminudin, N. (2018). *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom): an assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25:1515–1523.

Rincão, V.P., Yamamoto, K.A., Ricardo, N.M.P.S., Soares, S.A., Meirelles, L.D.P. Nozawa, C., Linhares, R.E.C. et al. (2012). Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, 9(37):2-6.

Silva, J.S., Marques, T.R., Simão, A.A., Corrêa, A.D., Pinheiro, A.C.M., Silva, R.L. (2014). Development and chemical and sensory characterization of pumpkin seed flour-based cereal bars. *Food Science and Technology*, 34(2):346-352.

Sima, P., Vannucci, L., Vetvicka, V. (2018). β -glucans and cholesterol (Review) *International Journal of Molecular Medicine*; 41(4):1799-808.

- Siwulski, M., Rzymiski, P., Budka, A., Kalač, P., Budzyńska, S., Dawidowicz, L., et al. (2019). The effect of different substrates on the growth of six cultivated mushroom species and composition of macro and trace elements in their fruiting bodies. *European Food Research and Technology*, 245:419–431.
- Spim, S.R.V., Oliveira, B.G.C.C., Leite, F.G., Gerenutti, M., Grotto, D. (2017). Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. *European Journal of Nutrition*; 56:2255-64.
- Toan, N.V., Thu, L.N.M. (2018). Preparation and Improved Quality Production of Flour and the Made Biscuits from Shitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *Clinical Journal of Nutrition and Dietetics*. 1(1): -9.
- Ulziijargal, E., Mau, J.L. (2001). Nutrient Compositions of Culinary-Medicinal Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*; 13(4):343-9.
- Valverde, M.E., Pérez, T.H., López, O.P. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015:1-14.
- Who (1999). Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. <http://www.fao.org/3/y1579e/y1579e05.htm>. Access in 26 jan. 2019.
- Yadav, L., Bhatnagar, V. (2016). Formulation, Quality Evaluation and Shelf-life of Value Added Cereal Bar by incorporation of Defatted Soy Flour Intl. *J. Food. Ferment. Technol.* 6(2): 251-259.
- Yahia, E.M., Orozco, F.G., Pérez, M.A.M. (2017). Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. *Food Chemistry*. 226:14–22.
- Zhou, N., Li, W., , Z., Li, X., Yang, A., Tong, P.M., Chen, H. (2015). Sequential extractions: A new way for protein quantification data from peanut allergens. *Analytical Biochemistry*. 484:31-36.
- Zhu, M., Nie, P., Liang, Y.M., Wang, B. (2013). Optimizing conditions of polysaccharide extraction from Shiitake mushroom using response surface methodology and its regulating lipid metabolism. *Carbohydrate polymers*. 95(2):644-648.

6.1 Capítulo II (Anexo C)

Effects of *Lentinula edodes* bar on lipid and antioxidant profiles in borderline high cholesterol individuals: A double blind randomized clinical trial

Sara Rosicler Vieira Spim¹; Ana Maria Holtz Pistila¹; Thaisa Borim Pickler¹; Marcus Tolentino Silva¹; Denise Grotto¹.

¹University of Sorocaba, Sorocaba, São Paulo, Brazil

*Corresponding author

Denise Grotto

denise.grotto@prof.uniso.br

Phone: +55 1521017147

Fax: +55 15 21017000

Address: University of Sorocaba

Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5

18023-000, Sorocaba, São Paulo, Brasil.

ORCID number:

Sara Rosicler Vieira Spim - 0000-0001-8999-3552

Marcus Tolentino Silva - 0000-0002-7186-9075

Denise Grotto - 0000-0002-8782-0436

Acknowledgments

The authors thank Miriam Sanches do Nascimento Silveira and Paula Monticelli Bertoni for contributing to blood collection, Valéria de Campos Orsi for technical support, Yuri Cogumelos Company with providing of 110 Kg of Shiitake, J.P. Pereira Ltda for the donation of ingredients for the production of bars (oats, sugars, quinoa, chia, peanut, dry plum) and the University of Sorocaba for the scholarship.

ABSTRACT

Purpose

Lentinula edodes (Shiitake) is a mushroom with low lipid content, rich in protein, fiber, minerals, vitamins, antioxidant compounds and β -glucans. Change in people's routine has stimulated the development of value-added products. So, we assessed the effects of Shiitake bars on cholesterolemia and oxidative stress levels in borderline high cholesterol individuals, through a randomized, double-blind and placebo-controlled study.

Methods

Individuals with borderline high cholesterol, LDL or triglycerides were recruited through online questionnaire. Individuals (n = 68) were randomly allocated in two groups: Group I – Placebo (n = 32); Group II – Intervention (n = 36). Blood samples were collected at 0, 30 and 60 days, and all individuals received an unidentified opaque envelope containing the bars. Biochemical analyzes (triglycerides, total cholesterol, LDL, HDL, glucose) and oxidative stress biomarkers (GSH, catalase and TBARS) were performed in blood, by blinding researchers.

Results

In the placebo group 25 individuals completed the study and in Intervention group were 22 individuals. Triglycerides in Intervention group showed 10% reduction after 60 days consuming Shiitake bars ($p=0.0352$). In oxidative stress biomarkers, Shiitake increased the main endogenous antioxidant (GSH) and reduced the lipid peroxidation. Exposure to Shiitake triggered dermatitis in 10% of individuals sensitive to Lentinan.

Conclusion

Shiitake bars are nutritious food and a functional health food alternative. This food that can be considered adjuvant in the prevention of dyslipidemias and improves the redox status.

Keywords: *Lentinula edodes*. Nutraceuticals. Clinical study. Cholesterol.

INTRODUCTION

The use of mushroom as a source of nutrients or therapeutic action is ancient. The cultivation of edible mushrooms is growing and becoming a promising activity because it is a food with high protein concentration, rich in essential amino acids, low lipid content, high fiber, excellent amount of minerals and vitamins [1]. In the medicinal area, evidences show the positive role of mushrooms, particularly its bioactive compounds β -glucan, chitosan and phenols. These compounds have cholesterol lowering action, and potential to reduce some outcomes of atherosclerosis development [2], such as oxidative stress, inflammation, hyperlipidemia, platelet aggregation and thrombus formation. The antioxidant action, anti-inflammatory and cholesterol reducer are beneficial effects that can be achieved from the mushrooms or their isolated bioactive compounds consumption [3].

Among the various types of mushrooms stand out *Lentinula edodes* (popularly known as Shiitake), the second edible mushroom in the world. Shiitake contains β -glucan, an important polysaccharide with hypolipidemic effect [4].

Although widely studied *in vitro* and *in vivo*, the mushrooms are still few explored in human intervention studies. Among the few studies found, a clinical trial administered Shiitake to 52 individuals for four weeks. Authors noticed a 60% increase in T lymphocyte proliferation and twice in natural killer-T cells, besides an increase in IgA, contributing to intestinal immunity [5]. In addition to the few human studies, the criteria for classifying mushrooms as supplements or medicines are not yet defined.

Changes on people's routine have stimulated the development of value-added products, beneficial to health, not only for practicality but for the purpose of nutrition [6]. Adding flaxseed to cereal bars, for example, is possible to increase the dietary fiber, minerals and omega 3 concentrations in the product. Therefore, the bars can be an alternative to increase the functional food intake, helping to reduce the occurrence of various non communicable diseases [7].

In previous study published by our group [8], the dose of 100 mg/Kg/day of Shiitake was administered *in vivo* and it was able to reduce total cholesterol and triglyceride levels and increase High Density Lipoproteins (HDL) level in rats receiving hyperlipidic diet. Therefore, this study is a pioneering research, and it analyzed the effects of Shiitake ingestion by supplemented bars on borderline cholesterol and oxidative stress in humans through a phase II, double-blind randomized trial.

METHODS

Trial design

A prospective Phase II, simple randomized, double blind and placebo-controlled trial was conducted from September to December 2018. The study accomplished at University of Sorocaba (UNISO), São Paulo State, Brazil. The study was approved by Human Research Ethics Committee from University of Sorocaba (protocol number 2.824.297), in accordance with Resolution 466/2012 of the National Health Council [9] and Research Ethics Review Committee (ERC) [10].

Eligibility Criteria

The disclosure of the clinical study began in May with the formation of a team of collaborators. The research was disseminated in the university through folders distributed across all campuses with approximately 6,500 students and 450 professors. The recruitment was also posted on the UNISO website. Printed material was

prepared for distribution so that students or family members could participate. The material containing explanations about the inclusion and exclusion criteria was disclosed in social networks and spotlighted borderline dyslipidemic individuals living in Sorocaba and the frontier region.

Interested individuals answered an online questionnaire with multiple choice questions related to the inclusion and exclusion criteria, which defined the candidate's eligibility. A total of 165 individuals completed the Google online survey.

Inclusion Criteria

Individuals aged from 20 to 65 years old, of both gender, who had at least one of the following biochemical markers at the borderline high level (total cholesterol 180 to 239 mg/dL; Low Density Lipoprotein (LDL) 130 to 159 mg/dL; triglycerides (TG) of 150 to 200 mg/dL), were recruited. Biochemical exams with dates recent to the day of recruitment were evaluated. Moreover, individuals must be tolerant to bars ingredients and to Shiitake and they must be availability to attend the date and time of blood collection.

Exclusion Criteria

Some of the individuals had diseases such as cancer, heart disease, neurodegenerative disease, diabetes, among others. These diseases could be confounders of the study and some recruited people had to be excluded. Pregnant, lactating or hormone replacement women could not participate either.

Individuals were instructed to maintain their eating habits and patterns, physical activity level or oral contraceptive use during the study [11]. Thus, only the Shiitake effects added to the diet would be assessed.

Study Interventions.

The ingredients of the bars are presented in Table 1. Shiitake bar formulation was approved in the sensory analysis in a previous study from our working group. Shiitake concentration of 100 mg/Kg/day showed to be safe in a study conducted with different Shiitake concentrations intake (100, 400 and 800 mg/Kg/day) [12].

Table 1 – Ingredients used in the formulation sweet cereal bars in 25g.

Ingredients	Shiitake Bar		Placebo Bar	
	%	g	%	g
Dry Shiitake	14.0	3.50	-	-
Flakes oat	12.0	3.00	23.2	5.80
Brown sugar	8.3	2.10	13.6	3.40
White sugar	30.0	7.50	20.0	5.00
Dry plum	9.0	2.25	10.8	2.70
Brazil nut	7.0	1.75	8.0	2.00
Flaxseed	3.2	0.80	3.4	0.86
Glucose	1.6	0.40	1.6	0.40
Soy lecithin	0.4	0.10	0.4	0.10
Quinoa grains	3.5	0.87	4.8	1.20
Peanut	8.0	2.00	10.0	2.50
Chia seed	2.0	0.50	3.2	0.80
Food glycerin	0.5	0.12	0.5	0.12
Coconut oil	0.5	0.12	0.5	0.12
Total	100	25.00	100	25.00

Outcomes

The primary outcomes of the study were total cholesterol, TG, LDL or HDL levels. The secondary outcomes included blood glucose, Body Mass Index (BMI) and the oxidative stress biomarkers reduced glutathione (GSH), catalase enzyme and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Sample size

A total of 165 individuals completed the online questionnaire between May and September 2018. They were eligible to participate in this study and they had some borderline dyslipidemia. From this number, individuals who did not meet the inclusion criteria were excluded.

Randomization

The individuals (68) were randomly allocated (using a table of random numbers) into 2 groups: I – Placebo group (n = 32) and II – Intervention group (n = 36). Each participant had their body mass weighted to determine the number of bars consumed per day.

After nutritional assessment and blood collection, the individuals received an unidentified opaque and sealed, containing bars individually vacuum packed. The bars lasted for 30 days. The intervention and placebo bars were similar in texture, flavor, aroma and appearance.

After one month (T30), all individuals returned to the UNISO for new nutritional assessments. They received more bars and had their blood collected with the same double-blind care. At the end of sixty days (T60), subjects returned for the last blood collection and final nutritional assessment.

Blinding

The randomization was carried out by a person unrelated to the research, using a table of random numbers. The participants were renamed by the blinded collaborator to the sequentially numbered from 1 to 68. The numbers were placed in sealed and opaque envelopes.

After the groups were defined, the distribution of the intervention and placebo bars were done by two blinded researchers, through sealed and opaque envelopes. The patients were also blinded since they received unidentified opaque bag containing the bars. The bars with or without Shiitake had the same size, appearance, aroma and taste.

The nurse responsible for blood collection was a person unrelated to the research, also blinded. The data collector did not have access to the identification of participants. The number system from 1 to 68 was maintained until the end of the study.

Biochemical Analysis

Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, TG and glucose were analyzed by commercial kits, in the automated equipment COBAS C111 (Roche®) according to the manufacturer's specifications.

For cholesterol, 10 µL of sample and 1.0 mL of enzyme reagent were mixed at 37 °C for 10 min for total transformation into free cholesterol, by lipoprotein lipase. The reaction involved the oxidation of free cholesterol to cholesterol-3-one and hydrogen peroxide (H₂O₂) by the cholesterol oxidase. And with the action of peroxidase a cherry chromogen was formed. The color was proportional to the concentration of cholesterol.

For the determination of HDL, the serum was treated with phosphotungstate acid and magnesium chloride. So, the LDL was precipitated out from the fraction after centrifugation for 2 min at 10.000 rpm. HDL, which remained in the supernatant, was performed according to the cholesterol methodology. LDL was calculated by subtracting HDL cholesterol from total cholesterol [13].

Serum triglycerides were hydrolyzed to glycerol and free fatty acid by lipoprotein lipase. In the presence of adenosine triphosphate (ATP) and glycerol kinase, glycerol-3-phosphate was phosphorylated and oxidized to acetone dihydrogen phosphate and H_2O_2 by the glycerol phosphate oxidase. H_2O_2 , 4-aminoantipyrine and p-chlorophenol underwent the same reaction process reported above by peroxidase in a 37 °C water bath for 10 minutes until formation of red color.

For the blood glucose test, glucose-6-phosphate dehydrogenase oxidized glucose-6-phosphate in the presence of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) in gluconate-6-phosphate. No other carbohydrates have been oxidized. The rate of NADPH formation during the reaction was directly proportional to the glucose concentration, being determined photometrically.

Oxidative Stress Analysis

The determination of GSH was made by quantification of reduced total thiols based on the Ellman method [14]. For this, 150 μ L of the blood was vortexed with 100 μ L 10% Triton X-100 and 100 μ L 30% Trichloroacetic acid (TCA). Then, the sample was centrifuged for 10 min at 4000 rpm. In the cuvette 900 μ L of 1M of potassium phosphate buffer (PPB), 50 μ L of supernatant, and 50 μ L of 10 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid (DTNB) were pipetted, which reacted to form a yellow complex. The reading was taken at 412 nm in a spectrophotometer.

To evaluate the activity of the catalase enzyme, the method of Aebi [15] was used, based on the decomposition of H_2O_2 by catalase, monitored at 240 nm. For this, the blood was diluted 60 times in 50 mM PPB. An aliquot of 20 μ L was mixed to 1910 μ L of the same PPB, and 70 μ L of H_2O_2 was added, initiating the monitored reaction for three minutes. A constant of variation (κ) per minute helped in the expression of catalase enzyme (κ/min).

TBARS were used as a biomarker of lipid peroxidation, according to Ohkawa et al. [16]. Plasma aliquots (150 μ L) were mixed with 50 μ L sodium hydroxide and 50 μ L Milli-Q ultrapure water (Direct 8, Millipore®) and incubated at 60 °C for 30 minutes with shaking. 250 μ L of 6% phosphoric acid, 250 μ L of 0.8% thiobarbituric acid (TBA) and 100 μ L of 10% sodium dodecyl sulfate were added to the samples and taken to the 80 °C bath for one hour. Lipid peroxides reacted with TBA in acidic medium to form a pink compound and read in a spectrophotometer at 532 nm.

Statistical Analysis

Individuals data were stratified by gender, age, BMI, alcohol intake, physical activity and smoking. The differences between Shiitake and placebo groups were analyzed by the Chi-square test, Exact of Fisher test and Student's t-test.

Descriptions of all biochemical and oxidative stress parameters were expressed as mean $\pm$ standard deviation. To investigate the differences in biochemical parameters between the groups, Analysis of Variance (ANOVA) with repeated measurements was applied. All results of biochemical parameters and oxidative stress were normalized to logarithmic scale. After normalization, statistical analysis was performed considering the

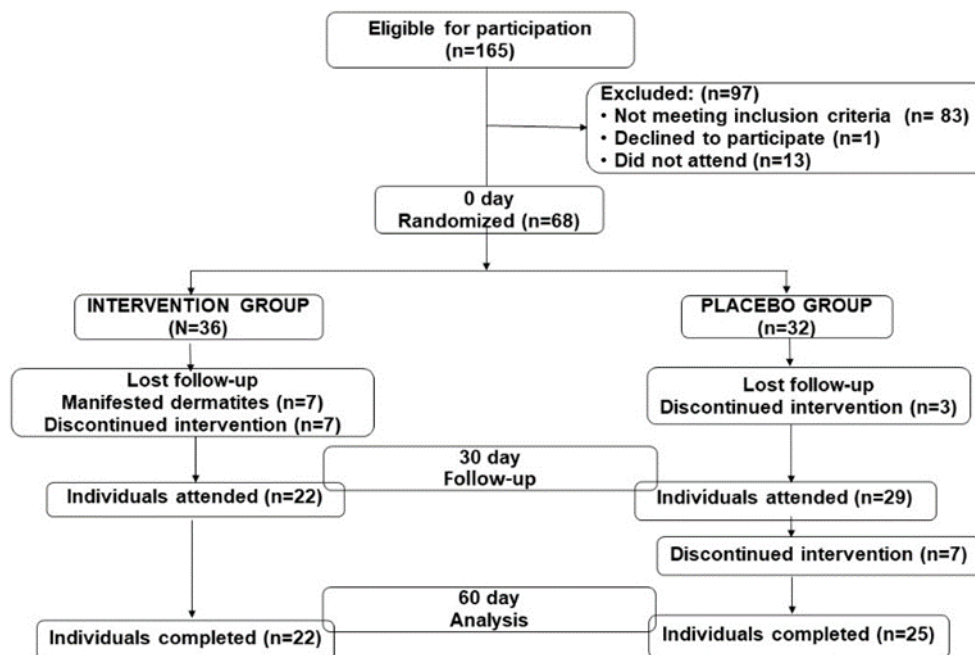
differences among the intermediate and final times with the baseline. $P < 0.05$ was accepted as statistically significant. Data were analyzed using Stata® 14.2 software, College Station, Texas, USA.

RESULTS

Participant flow and recruitment

A total of 165 participants were firstly eligible for participation (Fig1). However, absence on the dates for blood collection, allergic to any of the components of the bars, medical treatment or refusing the blood collection were responsible for 97 individuals' exclusion.

Fig1- Flow diagrams of participants of the study randomized controlled trial.



The study officially started with 68 individuals, who signed the informed term of consent. In the first (Time 0 – T0), in the second (Time 30 days – T30) and in the third (Time 60 days – T60) meetings, the subjects were submitted to nutritional assessment and anamnesis, 24-hour recall of eating habits and eating frequency.

At T30, 51 individuals attended for blood collection and sequence testing and at T60, 47 (70%) individuals attended and completed the study. Reported allergy 10% of patients.

In the first month, the individuals consumed the bars according to the clinical trial protocol. Thirty days later, some individuals reported they stopped eating the bars as often as necessary, due to forgetfulness, feeling sick, thus reducing adherence to the study. Apparently, prolonged treatment period may decrease adherence of clinical studies, and this instability may compromise exposure outcomes.

Baseline data

Among the recruited individuals, the participants age range was 20 to 62 years. The general characteristics of the participants are summarized in Table 2.

Table 2. Baseline participants characteristics collected on the day of the initial interview.

Characteristics	All groups	Placebo groups	Intervention groups	p-value
n (%)	68 (100)	32 (47.1)	36 (52.9)	0.255
Male - n (%)	15 (22.1)	9 (28.1)	6 (16.7)	
Female - n (%)	53 (77.9)	23 (71.9)	30 (83.3)	
Age (mean $\pm$ SD) years	40 $\pm$ 11	38 $\pm$ 11	42 $\pm$ 12	0.131
BMI (mean $\pm$ SD)	26.9 $\pm$ 4.4	27.5 $\pm$ 4.4	26.4 $\pm$ 4.4	0.288
Alcohol (drinks)				0.457
Yes (n, %)	33 (48.5)	14 (43.8)	19 (52.8)	
No (n, %)	35 (51.5)	18 (56.3)	17 (47.2)	
Physical activity				0.239
Yes (n, %)	31 (45.6)	17 (53.1)	14 (38.9)	
No (n, %)	37 (54.6)	15 (46.9)	22 (61.1)	
Smoker - n (%)				0.410
Yes (n, %)	6 (8.8)	4 (5.9)	2 (2.9)	
No (n, %)	62 (91.2)	64 (94.1)	66 (97.1)	

BMI: Body mass index.

No statistical difference was found ($p>0.05$) comparing placebo and intervention groups.

Biochemical and redox status results

The results of biochemical analyzes and oxidative stress of the individuals are presented in Table 3. Overall, at T30, total cholesterol tended to decrease in placebo group (decreased by 6.2%) compared to intervention group.

Table 3 – Mean and standard deviation of biochemical markers and oxidative stress of participants at T0, T30 and T60 days.

Variable	Placebo Group			Intervention Group			ANOVA
	T0 Baseline	T30 days	T60 days	T0 baseline	T30 days	T60 days	P-value
Total Cholesterol (mg/dL)	222.8 (33.1)	215.0 (27.5)	226.7 (41.3)	228.2 (45.4)	229.2 (42.3)	229.6 (38.2)	0.5976
LDL (mg/dL)	144.6 (34.5)	137.9 (25.6)	139.4 (37.4)	137.6 (44.4)	146.3 (37.3)	145.0 (33.7)	0.3041
HDL (mg/dL)	50.1 (14.2)	46.3 (12.3)	45.8 (14.5)	54.9 (16.5)	50.3 (13.6)	52.5 (14.1)	0.4335
Triglycerides (mg/dL)	144.5 (70.2)	153.9 (85.3)	207.7 (202.7)	178.9 (170.1)	163.1 (74.3)	160.7 (94.7)	0.0352*
Glucose (mg/dL)	85.8 (9.0)	85.7 (10.9)	84.5 (8.9)	82.9 (11.0)	84.8 (9.2)	84.5 (8.9)	0.4993
Catalase (k/min)	3.5 (1.1)	3.7 (1.7)	3.7 (1.6)	3.1 (0.8)	3.3 (1.3)	3.7 (2.0)	0.8284
GSH (mM)	0.4 (0.1)	0.4 (0.2)	0.6 (0.2)	0.4 (0.2)	0.6 (0.3)	0.5 (0.2)	0.0058*
TBARS (μ M)	13.9 (2.3)	12.9 (1.6)	14.7 (2.0)	14.6 (2.1)	14.8 (5.6)	13.9 (2.9)	0.0384*

The mean of TG levels in intervention group were 178.9 mg/dL at T0, decreased by 8.8% (163.1 mg/dL) after 30 days and decreased by 10.2% (160.7 mg/dL) after 60 days. The intervention group when compared to the placebo group, when calculating the difference between intermediate and basal, final and basal time, presented statistical difference ($p=0.0352$) in TG concentration.

HDL cholesterol showed a slight increase in intervention group (52.5 mg/dL) in 14.6% compared to placebo group (45.8 mg/dL) after 60 days of bars consumption. Thus, despite not lowering total cholesterol, Shiitake tended to increase HDL. LDL cholesterol levels showed no significant differences between the placebo and intervention groups at the three times evaluated. Blood glucose results were very homogeneous, with similar levels between placebo and intervention groups.

GSH increased significantly after bars ingestion in intervention group ($p=0.0058$) compared to placebo group. The results of TBARS showed statistical difference ($p=0.0384$) in intervention group compared to placebo group, showing a reduction in lipid peroxidation. There was no difference in catalase levels over time. The values considering the differences among the intermediate and final times with the baseline are showed in Appendix I.

DISCUSSION

Main Findings

Considered a pioneer, this trial investigated the effects of the consumption of Shiitake supplemental cereal bars for 60 days on cholesterol, triglyceride and oxidative stress levels in humans. The study showed an efficacy in the intervention group in reducing triglycerides and increasing antioxidant status through Shiitake added to cereal bars. The TG decreased by 10% after 60 days of exposure. In oxidative stress biomarkers, Shiitake showed beneficial action increasing in until 50% the most important antioxidant - GSH - and reducing the lipid peroxidation in the cells. Regardless of time-consuming, changes in eating habits or physical activity, these results were satisfactory and significant for TG, GSH and TBARS.

Literature and our working group have shown the safety and efficacy of Shiitake as a functional food *in vivo* in reducing total cholesterol, triglycerides and oxidative stress [8, 12, 17]. Now a clinical study was conducted to investigate whether Shiitake presents the same effect in human. Individuals with borderline high dyslipidemia were selected since they still do not take drug treatment. So, there was no harm to patients in this study, and no interference of the drugs in the results.

Results and confrontation with literature

In an *in vivo* study conducted previously by our research team, Shiitake showed good concentrations of fiber, β -glucans and proteins. Moreover, the mushroom showed beneficial action by reducing total cholesterol, TG, increasing in HDL cholesterol, reversing liver and kidney damage and boosting the immune system with increased leukocytes. Shiitake presented antioxidant action in rats against excessive lipid consumption [8].

Hypocholesterolemic effects of mushrooms were also presented *in vitro* and *in vivo*. Anwar et al. [17] explored the effects of *Lentinula edodes* on rat hypercholesterolemia through the intestinal microbiome. Rats supplemented with 5% of the mushroom showed reduction of triglycerides, total cholesterol, LDL and increase of HDL. Rahman et al. [18] reported *Lentinula edodes* as antioxidant, reducing oxidation of LDL. α -tocopherol (vitamin E), oleic acid, linoleic acid, ergosterol and butyric acid are biocomponents found in mushrooms that act as anti-atherosclerotic agent.

Eryadenin extracted from Shiitake has been shown to reduce total cholesterol levels in hyperlipid diet treated rats. The animals were treated with erytadenin (5%, 10% or 20%) extracted from *L. edodes* for 4 weeks. The results showed cholesterol-lowering action possibly achieved by the substance erytadenin through changes in hepatic metabolism regulating lipids [19].

In a cohort study, Boucher et al. [20] analyzed for five years eating habits and physical activity related to adiposity and dyslipidemia. Their findings underscore the importance of lifestyle modification and health promotion for reducing cardiometabolic risk. The results pointed to the necessity of simultaneously the reduction of fat consumption, the increase of fruits and vegetables intake and physical activity practice. There are factors such as exercise, diet, age, gender, obesity, stress, smoking, and medications that can affect metabolic, endocrine, oxidation, and other biochemical diagnoses through blood testing [21].

Cardiometabolic disease risk, excess abdominal fat and high cholesterol levels can be reduced by a healthier lifestyle. Beekman et al. [22] conducted an intervention with 164 adults (mean age 63 years, BMI 23-35) for 13 weeks at 12.5% calorie restriction, associated with 12.5% increase in energy expenditure. They showed lifestyle intervention reduced abdominal fat (-2.6%) and this reduction was associated with decreased glycerol and increased HDL. Despite the promising result and the criteria used by the researchers to reduce caloric intake and increase physical activity, they reported they were unable to quantitatively analyze caloric intake and increased physical activity or combination of both that would justify the positive contributions in metabolic biomarker levels and abdominal fat.

Shiitake, the primary source of ergothioneine, can modulate levels of hydrogen peroxide, nitric oxide and cytokines, and contribute to skeletal muscle regeneration after intense exercise. For this, in study randomized, double blind, 14 individuals ingested 0,7 mg of Shiitake, twice a day for 10 days, before two exercise sessions for 92 min each. Shiitake showed antioxidant and anti-inflammatory activity in the exposed group compared to the placebo group, by regulating nitric oxide concentration and redox thiol state [23].

Antioxidant effects of polysaccharide residues and Shiitake enzymatic polysaccharide residues were investigated *in vivo* against lipopolysaccharide-induced sepsis of gram-negative bacteria. The results demonstrated more intense inhibition of oxidative stress in the group exposed to Shiitake enzymatic polysaccharide residues. Histological analyzes also indicated the significant effect of organ recovery [24].

Strengths and limitations

No reports about clinical trials using Shiitake in cereal bars were found in the literature. Thus, we reported the first human intervention study in borderline high dyslipidemia with Shiitake bar ingestion. The sample number used can be pointed as a positive resource of this assay. Some implications for clinical practice and research were observed, such as variation in eating habits, physical activity and forgetfulness in eating bars during the intervention period.

In the first month, the individuals consumed the bars according to the clinical trial guidance. Thirty days later, some individuals reported they stopped eating bars, due to forgetfulness, feeling sick, thus reducing adherence to the study. Apparently, prolonged treatment period may decrease adherence of clinical studies, and this instability may compromise exposure outcomes. Despite the positive findings, they did not corroborate the results of the same research group conducted with rats [8]. *In vivo* studies are more controlled compared to human studies.

In a prospective cohort study with dyslipidemics patients, Kokkinos et al. [25] evaluated the separate and combined effects of statin treatment and physical activity on mortality risk in dyslipidemics, between 1986 and 2011. The participants, (n = 10,043), were divided into four fitness categories, eight categories based on physical fitness and statin treatment. Mortality risk decreased in statin patients with higher physical fitness. The

combination of statin treatment and increased physical activity resulted in a substantially lower mortality risk, compared to the other groups. This fact reinforces the importance of physical activity parallel to any pharmacological or dietary care in dyslipidemia. Although this study did not use Shiitake, we realize the importance of associating more interventions together to achieve more promising results.

Due to the low number of randomized controlled trials in humans, evidence of cardiometabolic effects should be assessed case by case. Some factors such as eating habits, lifestyle and nutritional status appear not to have been considered in some studies [26].

The nutraceuticals cannot replace hypolipidemic therapy, but they may contribute to reducing the risk of cardiovascular disease. Considering the influence of some nutraceuticals on different lipid parameters, especially atherogenic dyslipidemia; metabolic syndrome; low to moderate hypercholesterolemia and in all patients with statin-associated side effects, the action of nutraceuticals may be clinically relevant, long-term maintenance may be associated with a reduction risk of cardiovascular disease. Combinations of hypolipidemic nutraceuticals have been shown significant improvement in the effectiveness of standard pharmacological treatments, resulting in an improvement in quality of life [27].

An important consideration that needs to be reported here was the dermatitis manifested at the beginning of the clinical trial, in seven individuals (10%). The dermatitis presented characteristics similar those found by Poppe et al. [28], with erythematous papules. This dermatitis is associated with the Shiitake mushroom when it is eaten raw or undercooked. These cases have a higher incidence in eastern countries due to their eating habits. Second Stephany et al. [29], lentinan polysaccharide is heat inactivated. Thus, after dermatitis manifestations, the Shiitake used in the cereal bars production, went through a longer cooking time to avoid the appearance of other dermatitis. Cooking did not change the cereal bar taste and kept the bioactive substances.

CONCLUSION

Among the biochemical markers, TG showed a significant reduction after 60 days in the intervention group. Shiitake present in bars showed positive effect with significant increase of GSH levels after thirty days of consumption. This mushroom also showed a reduction in TBARS, with antioxidant action on cellular lipid peroxidation. Bars supplemented with Shiitake are a functional food alternative, well-accepted by the population, durable and ready to eat, besides being beneficial to health. Thus, the consumption of bars with Shiitake may contribute as an adjuvant in clinical practice of dyslipidemias and should be linked to a healthy diet and physical activity to enhance the effects of this mushroom.

Conflict of interest

The authors declare they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Singh J, Sindhu SC, Sindhu A (2016) Development and evaluation of value added pickle from dehydrated Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Int. J. Food Sci. Nutr. 1: 24-26.
2. Zhang JJ, Li Y, Zhou T. et al (2016) Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. Molecules. 21(7): 938.

3. Amirullah NA, Abidina NZ, Abdullah N (2018) The potential applications of mushrooms against some facets of atherosclerosis: A review. *Food Res Int.* 105: 517-536.
4. Handayani D, Chen J, Meyer BJ, Huang XF (2011) Dietary Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) prevents Fat Deposition and Lowers Triglyceride in Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Obes.* Doi:10.1155/2011/258051.
5. Dai X, Stanilka JM, Rowe CA. et al (2015) Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) mushrooms daily improves human immunity: A randomized dietary intervention in healthy young adults. *J Am Coll Nutr.* 34(6): 478-487.
6. Wagh VD, Deore BR (2015) Ready to use therapeutic food (RUTF): An overview. *Adv Health Sci Educ.* 2(1): 1-15.
7. Paula NS, Natal DI, Ferreira HA et al (2013) Characterization of cereal bars enriched with dietary fiber and omega 3. *Rev Chil Nutr.* 40(3): 269-273.
8. Spim SRV, Oliveira BGCC, Leite FG et al (2017) Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. *Eur J Nutr.* 56: 2255-2264.
9. BRASIL (2012) Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos.
10. WHO (2016) International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans <<https://www.who.int/ethics/review-committee/en/>>. Access in August 08th 2018.
11. Kerckhoffs DAJM, Hornstra G, Mensink RP (2003) Cholesterol-lowering effect of β -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β -glucan is incorporated into bread and cookies. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 221-227.
12. Grotto D, Gerenutti M, Souza VCO, Barbosa F Jr (2015) Deficiency of macro and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. *Toxicology.* 2:401-404.
13. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS (1972) Estimation of the concentration of low density lipoprotein in plasma without the use of the preparative ultra centrifuge. *Clin Chem.* 18(6): 499-502.
14. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82: 70-77.
15. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. *Analyt Biochem.* 95: 351-358.
17. Anwar, AH, Suchodolski JS, Ullah MI et al (2019) Shiitake Culinary Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* (agaricomycetes), Supplementation Alters Gut Microbiome and Corrects Dyslipidemia in Rats. *Int. J. Medic. Mushrooms.* 21(1): 79-88.
18. Rahman MA, Abdullah N, Aminudin N (2018) *Lentinula edodes* (Shiitake mushroom): An assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. *Saudi J. Biol. Sci.* 25: 1515-1523.
19. Yang H, Hwang I, Kim S, Hong E, Jeung E (2013) *Lentinus edodes* promotes fat removal in hypercholesterolemic mice. *Exp Ther Med.* 6: 1409-1413.
20. Boucher AB, Adesanya OEA, Owei IMBBS, Gilles AKMS, Ebenibo SMBBS, Wan JMPH et al (2015) Dietary habits and leisure-time physical activity in relation to adiposity, dyslipidemia, and incident dysglycemia in the pathobiology of prediabetes in a Biracial Cohort Study. *Metabolism.* 64(9): 1060–1067.
21. Oliveira GL, Salvagno, GL, Giuseppe Lippi G, Gelati M, Montagnana M, Danese E, Picheth G, Guidi GC (2012) Influence of a Regular, Standardized Meal on Clinical Chemistry Analytes. *Clin Chem.* 32:250-256.
22. Beekman M, Schutte BAM, Akker EB et al (2019) Lifestyle-intervention-induced reduction of abdominal fat is reflected by a decreased circulating glycerol level and an increased HDL diameter. *bioRxiv.* doi.org/10.1101/718023

23. Zembron-Lacny A, Gajewski M, Naczek M, Siatkowski I (2013) Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*) extract on antioxidant and inflammatory response to prolonged eccentric exercise. *J. Physiol Pharmacol.* 64(2): 249-254.
24. Ren Z, Liu W, Song X, Qi Y, Zhang C, Gao Z, Zhang J, Jia L (2018) Antioxidant and anti-inflammation of enzymatic-hydrolysis residue polysaccharides by *Lentinula edodes*. *Int J Biol Macromol.* 120: 811-822.
25. Kokkinos PF, Faselis C, Myers J et al (2013) Interactive effects of fitness and statin treatment on mortality risk in veterans with dyslipidaemia: a cohort study. *Lancet.* 2(381): 394-9.
26. Ameln S, Dicks L, Prage A, Ellinger S (2018) Dietary supplements made from mushrooms. *Ernaehrungs Umschau Int.*
27. Cicero AFG, Colletti A, Bajraktari G, Descamps O, Djuric DM, Ezhov M. et al (2017) Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Nutr Res.* 75(9):731–767.
28. Poppe LM, Anders D, Kneitz H, Bröcker EB, Benoit S (2012) Flagellate dermatitis caused by Shiitake mushrooms. *An. bras. Dermatol.* 87(3): 463-466.
29. Stephany MP, Chung S, Handler MZ, Handler NS, Handler GA, Schwartz RA (2016) Shiitake mushroom dermatitis: a review. *Am J Clin Dermatol.* 17(5): 485-489.

Appendix 1 – Differences between the intermediate and final times with the baseline

Variable	Placebo Group		Intervention Group	
	T30 - Baseline	T60- Baseline	T30 - Baseline	T60- Baseline
Total Cholesterol	7.8	3.9	1.0	1.4
LDL	6.7	5.2	8.7	7.4
HDL	3.8	4.3	4.6	2.4
Triglycerides	9.4	63.2	15.8	18.2
Glucose	0.1	1.3	1.9	1.6
Catalase	0.2	0.2	0.2	0.6
GSH	0.0	0.2	0.2	0.1
TBARS	1.0	0.8	0.2	0.7

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As barras alimentícias contendo Shiitake foram desenvolvidas com foco na biotecnologia e na prevenção ou tratamento de doenças crônicas, especialmente dislipidemias. As barras doce 1 e doce 2 agradaram os voluntários, com aprovação na análise sensorial e intenção de compra. A formulação doce 1 obteve maior pontuação na preferência dos voluntários.

O Shiitake utilizado nas barras mostrou ter altas concentrações em cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco, manganês, compostos fenólicos e glucanas, portanto, as barras alimentícias mantiveram essas características, principalmente nas concentrações de proteínas, fibras, glucanas e fenóis. As barras também mostraram ser seguras por até 180 dias de vida em prateleira em temperatura de 25 °C e 37 °C.

Os níveis de triglicerídeos mostraram redução após 30 dias e após 60 dias de consumo no grupo intervenção. O Shiitake contribuiu com o aumento do antioxidante GSH e redução da peroxidação lipídica dos indivíduos sem que houvesse mudanças nos hábitos alimentares ou aumento de atividade física no período em estudo.

O Shiitake ao ser adicionados as barras de cereais deve passar por cozimento adequado, para não ocasionar dermatites em pessoas sensíveis ao Lentinan.

A barra com Shiitake pode ser uma alternativa de alimento funcional, estável para comercialização, apresentou boa aceitação, além da flexibilidade em ser adicionado de outros ingredientes funcionais benéficos à saúde. Alimento que pode ser considerado adjuvante na prevenção das dislipidemias, se atrelado a uma dieta saudável para potencializar os efeitos benéficos do Shiitake.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES-METZ, R.M.; ADAMS, C.; METZ, A.D. Pharmaceutical Development Phases: A Duration Analysis. **Social Science Research Network**. n. 274, p.30, 2004.
- ABUJAH, C.I.; OGBONNA, A. C.; OSUJI, C.M. Functional Components and Medicinal Properties of Food: A Review. **Journal of Food Science and Technology**. v.52, n.5, p.2522-2529, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**. v.105, p.121-126, 1984.
- AHMED, T.A.; ALJAEID, B.M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design, Development and Therapy**. Cairo, v.10, p.483-507, 2016.
- ALAM, N.; AMIN, R.; KHAN, A. et al. Comparative effects of oyster mushroom on lipid profile, liver and kidney function in hypercholesterolemic rats. **Mycobiology**. v.37, p.37-42, 2009.
- ALAM, N. et al. Hypolipidemic Activities of Dietary *Pleurotus ostreatus* in Hypercholesterolemic Rats. **Mycobiology**. Incheon-Korea, v.39, n.1, p.45-51, 2011.
- ARAUJO, G.S.; MATOS, L.J.B.L.; FERNANDES, J.O. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**. Fortaleza, v.20, p.95-98, 2013.
- AVINASH, J.; VINAY, S.; JHA, K. et al. The Unexplored Anticaries Potential of Shiitake Mushroom. **Pharmacogn Review**. Odisha India, v.10, n.20, p.100-104, 2016.
- BACH, F.; HELM, C. V.; BELLETTINI M. C. et al. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science and Technology**. Curitiba, v.52, p.2382-2392, 2017.
- BACH, F.; HELM, C. V., LIMA, E. A.; BELLETTINI, M. B.; HAMINIUK, C. W I. Influence of cultivation methods on the chemical and nutritional characteristics of *Lentinula edodes*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v.30, n.12, p.1006-1013, 2018.
- BADIMON L.; VILAHUR, G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. **Academy of Sciences**. New York, p.18-32, 2012.
- BAK, W.C.; PARK, J.H.; PARK, Y.; KA, K.H. Determination of Glucan Contents in the Fruiting Bodies and Mycelia of *Lentinula edodes* Cultivars. **Mycobiology**. v.42, n.3, p.301-304, 2014.
- BASTOS, G.A.; PAULO, E.M.; CHIARADIA, A.C.N. Aceitabilidade de barra de cereais potencialmente probiótica. **Food Technology**. Campinas, v.17, n.2, p.113-120, 2014.

BEEKMAN, M.; SCHUTTE, B.A.M.; AKKER, E.B. et al. Lifestyle-intervention-induced reduction of abdominal fat is reflected by a decreased circulating glycerol level and an increased HDL diameter. **bioRxiv**. 2019.

BISEN, P.S.; BAGHEL, R.K.; SANODIYA, B.S. et al. *Lentinus edodes*: A acrofungus with Pharmacological Activities. **Current Medicinal Chemistry**. v.17, p.2419-2430, 2010.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**. Louisiana, v.98, n.3, p.426-438, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**. London, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Aprova Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o Regulamento técnico para produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos Comestíveis**.

BRASIL. Ministério da 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 da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012. **Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. 2012**.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan as a biomaterial. **Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs**. v.18, p.1-24, 1990.

CHANG; S.T.; WASSER, S.P. Current and Future Research Trends in Agricultural and Biomedical Applications of Medicinal Mushrooms and Mushroom Products (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. Haifa-Israel, v. 20, n.12, p.1121-1133, 2018.

CHEUNG, C.F.; CHAN, B.N.; WONG, J.H. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**. v.13, p.5156-5186, 2015.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan

from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Research**. v.30, p.2776-2781, 1970.

CHOWDHURY, M.M.H.; KUBRA, K.; AHMED, S.R. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. Noakhali-Bangladesh, v.14, n.8, 2015.

CONTO, L.C.; SANTOS, J.; VEECK, A.P.L. et al. Sensory Properties Evaluation of Pine Nut (*Araucaria angustifolia*) Cereal Bars Using Response Surface Methodology. **Chemical Engineering Transactions**. v.44, 2015.

COVINO R.; MONTEIRO, A.R.G.; SCAPIM, M.R.S. et al. Manufacturing cereal bars with high nutritional value through experimental design. **Acta Scientiarum. Technology**. Maringá, v.37, n.1, p.149-154, 2015.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**. v. 49, p. 780–792, 2013.

DAI, X.; STANILKA, J.M.; ROWE, C.A. et al. Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushrooms Daily Improves Human immunity: A Randomized Dietary Intervention in Healthy Young Adults. **Journal of the American College of Nutrition**. Flórida, v. 34, n.6, p.478-487. 2015.

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

FABER, M.A.; YUYAMA, L.K.O.Y. Functional Dietary Cereal Bar Based an Amazon Fruits. **Journal of Nutrition Food Sciences**. Manaus, v.5, n.2, 2015.

FALUDI, A.A.; IZAR, M.C.O.; SARAIVA, J.F.K. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **SBC – Tecnologia da Informação e Comunicação**, v.109, n.1, p.1-76, 2017.

FAO, *Codex Alimentarius* Commission 1980. General principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. Appendix II in Report of the 17th Session of the Committee on Food Hygiene. Rome: Food and Agriculture Organization.

FARMACOPÉIA P. 2: **Imprensa Nacional de Lisboa**. Lisboa, 7^a edição oficial p. 211, 2002.

FEENEY, M.J.; DWYER, J.; HASLER-LEWIS, C.M. et al. Mushrooms and Health Summit Proceedings. **The Journal of Nutrition**. v.144, n.7, p.1128-1136, 2014.

FERREIRA, M.S.L.; SANTOS, M.C.P.; MORO, T.M.A. et al. Formulation and characterization of functional foods based on fruit and vegetable residue flour. **Journal Food Science Technology**. Rio de Janeiro, v.52, n.2, p.822-830, 2015.

FINIMUNDY, T.C.; DILLON, A.J.P.; HENRIQUES, J.A.P. et al. A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom. **Food and Nutrition Sciences**. Caxias do Sul, v.5, p.1095-1105, 2014.

FINIMUNDY, T.C.; SCOLA, G.; SCARIOT, F. J. et al. Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Response Induced by Shiitake Medicinal Mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetes) Aqueous Extract Against Larynx Carcinoma Cell Line. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. Caxias do Sul, v.20, 2018.

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

GARGANO, M.L.; GRIENSVEN, L.J.L.D.V.; ISIKHUEMHEN, O.S. et al. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. **Plant Biosystems**. Palermo-Italy, v.151, n.3, p.548–565, 2017.

GHOSH, K. A Review: Edible Mushrooms as Source of Dietary Fiber and its Health Effects. **Journal of Physical Sciences**. West Bengal-India, v.21, p.129-137, 2016.

GIADA, M.L.R. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. Intechopen. London, v.4, p.87-112, 2013.

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

GIBOT, L.; CHABAUD, S.; BOUHOUT, S. et al. Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.72, p.370-379, 2015.

GLAMOCLIJA, J.; SOKOVIC, M. Fungi a source with huge potential for “mushroom pharmaceuticals”. **Journal of Lekovite Sirovine**. Belgrade, Serbia, v.37, 2017.

GROTTO D.; GERENUTTI, M.; SOUZA, V.C.O.; BARBOSA, F. Jr. Deficiency of macro and micronutrients induced by *Lentinula edodes*. **Toxicology**. v.2, p.401-404, 2015.

GUNDE-CIMERMAN, N. et al. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. **National Institute of Chemistry**. Ljubljana, Slovenia, v.111, p.203-206, 1993.

GRUNDY, M.M.L.; QUINT, J.; RIEDERD, A. et al. Impact of hydrothermal and mechanical processing on dissolution kinetics and rheology of oat-glucan. **Carbohydrate Polymers**. London, v.166, p.387-397, 2017.

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

HADI, V.; NOROUZY, A.; TEHRANI, M.M. et al. Properties of Compact Food Bars: A Review Study. **Journal of Nutrition Fasting and Health**. v.6, n.3, p.125-131, 2018.

HELENO, S.A.; FERREIRA, R.C., ANTONIO, A.L. et al. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food bioscience**. v.11, n.1, p.48-55, 2015.

HUDSON, D.; MARGARITIS, A. Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.34, p.161-179, 2014.

INA, K.; FURUTA, R.; KATAOKA, T. et al. Chemo-Immunotherapy Using Lentinan for the Treatment of Gastric Cancer with Liver Metastases. **Medical Sciences**. Nagoya, v.4, n.8, 2016.

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

JAYACHANDRAN, M.; XIAO, J.; XU, B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**. v.18, p.1934, 2017.

JAWZALI, J.I.; SABER, H.K.; KHALIL, K.M. Assessment of nutritional status among dyslipidemia patients. **Saudi Journal for Health Sciences**. v.6, p.34-43, 2017.

JIN, Q.; YU, H.; WANG, X.; LI, K.; LI, P. Effect of the molecular weight of watersoluble chitosan on its fat-/cholesterol-binding capacities and inhibitory activities to pancreatic lipase. **PeerJ**. v. 5, p.3279, 2017.

KANG CM, HAN AH, HWANG HK et al. Anticancer effect of *Phellinus linteus*; potential clinical application in treating pancreatic ductal adenocarcinoma. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis**. Seoul-Korea, v. 9, n.1, 2013.

KERCKHOFFS, D.A.J.M.; HORNSTRA, G.; MENSINK, R.P. Cholesterol-lowering effect of β -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β -glucan is incorporated into bread and cookies. **American Journal of Clinical Nutrition**. Rockville, MD, v.78, p.221-227, 2003.

KRITTALAK, P.; PANIDA, B.; SUPAPORN, L. et al. Effect of Drying Process on the Physicochemical Properties and Biological Activities of Enzymatic Protein Hydrolysate from Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). **Chiang Mai Journal of Science**. v.45, n.2, p.762-773, 2018.

LACA, A.; MOUSIA, Z.; DIAZ, M.; WEBB, C.; PANDIELLA, S. S. Distribution of microbial contamination within cereal grains. **Journal of Food Engineering**. v.72, p.332-338, 2006.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S.L. et al. Study of Adhesion and Survival of Lactobacillus and Bifidobacterium on Table Olives with the Aim of Formulating a New Probiotic Food. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.8, p.4233-4240, 2005.

LESTARI, L. A.; HURIYATI, E.; MARSONO, Y. The development of low glycemic index cookie bars from foxtail millet (*Setaria italica*), arrowroot (*Maranta arundinacea*) flour, and kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal Food Science Technology**. v. 54, n. 6, p.1406-1413, 2017.

LIN, S.; CHEN, Y.; YU, H. et al. Comparative Study of Contents of Several Bioactive Components in Fruiting Bodies and Mycelia of Culinary-Medicinal Mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v.15, n.3, p. 315-323, 2013.

LI, S.; WANG, A.; LIU, L. et al. Evaluation of nutritional values of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) stipes. **Journal of Food Measurement and Characterization**. China, v.12, p.2012-2019, 2018.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v.4, n.1, p.18-26, 2010.

MA, G.; YANG, W.; ZHAO, L. et al. A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. **Food Science and Human Wellness**. Jiangsu-China, v.7, p.125-133, 2018.

MARTEL, J.; OJCIUS, D.M.; CHANG, C.J. et al. Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. **Nature Reviews Endocrinology**. Taiwan, v.13, p.149, 2017.

MARTIROSYAN, D.M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**. Dallas, v.5, n.6, p.209-223, 2015.

MCCLEARY, B.V.; DEVRIES, J.W.; PLYMOUTH, A.N. et al. Determination of Total Dietary Fiber (CODEX Definition) by Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. Ireland, v.93, p.221-233, 2010.

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

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

MOURA, S.C.S.R.; TAVARES, P.E.R.; ALVES, A.B. et al. Characterization, acceptability and shelf-life of a light fiber-rich banana (*Musa spp.*) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) bar. **Peak Journal of Food Science and Technology**. Campinas, v.1, n.5, p.68-80, 2013.

MUNHOZ, C.L.; GUIMARÃES, R.C.A.; Nozaki, V. T. et al. Preparation of a cereal bar containing bocaiuva: physical, nutritional, microbiological and sensory evaluation. **Acta Scientiarum Technology**. Maringá, v.36, n.3, p.553-560, 2014.

MUSZYŃSKA, B.; PAZDUR, P.; LAZUR, J., et al. *Lentinula edodes* (Shiitake) – biological activity. **Medicina Internacia Revuo**. v.27, n.3, p.189-195, 2017.

NAGASHIMA, Y.; YOSHINO, S.; SHIGERU YAMAMOTO, S. et al. *Lentinula edodes* mycelia extract plus adjuvant chemotherapy for breast cancer patients: Results of a randomized study on host quality of life and immune function improvement. **Molecular and Clinical Oncology**. v.7, p.359-366, 2017.

NASCIMENTO FILHO, V.F. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de Raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF), 1999.

NEYRINCK, A.M.; BINDELS, L.B.; BACKER, F.D. et al. Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action. **International Immunopharmacology**. v.9, p.767-773, 2009.

NILE, S.H.; PARK, W. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre Contents of Wild Growing Edible Mushrooms. **Czech Journal of Food Sciences**. Seoul-Korea, v.32, p.302-307, 2014.

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

PADMASHREE, A.; SHARMA G.K.; SRIHARI, K.A. et al. Development of shelf stable protein rich composite cereal bar. **Food Science and Technology**. Mysore-India, v.49, n.3, p.335-341, 2012.

PAGAMUNICI, L. M. SOUZA, A.H.P.; GOHARA, A.K. et al. Development, Characterization and Chemometric Analysis of a gluten-free Food Bar Containing Whole Flour From a new cultivar of Amaranth. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.38, n.3, p.270-277, 2014.

PAULA, N.S.; NATAL, D.I.G.; FERREIRA, H.A. et al. Characterization of cereal bars enriched with dietary fiber and omega 3. **Revista Chilena de Nutrición**. Viçosa, v.40, n.3, p.269-273, 2013.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M.F. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**. v.172, p.462-468, 2015.

PHAN, C.W.; WANG, J.K.; TAN, E.Y.Y. et al. Oyster mushroom, *Pleurotus giganteus* (Agaricomycetes): current status of the cultivation methods, chemical composition, biological, and health-promoting properties. **Food Reviews International**. Malaysia, v.35, n.9, p.324-341, 2019.

PINELA, J.; BARROS, L.; CARVALHO, A.M. et al. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. **Food and Chemical Toxicology**. Bragança-Portugal, v.50, n.3-4, p.829-834. 2012.

PINYA, S.; FERRIOL, P.; TEJADA, S. et al. Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*), maitake (*Grifola frondosa*). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Spain, p.517-526, 2019.

PRASAD, S.; RATHORE, H.; SHARMA, S. et al. Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food **International Journal of Food Science**. v.4, n.5, p.221-225, 2015.

RAHI D.K.; MALIK, D. Diversity of Mushrooms and Their Metabolites of Nutraceutical and Therapeutic Significance. **Journal of Mycology**. Índia, p.18, 2016.

RAHMAN, M.A.; ABDULLAH, N.; AMINUDIN, N. *Lentinula edodes* (shiitake mushroom): An assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. **Saudi Journal of Biological Sciences**. Malaysia, v.25, p.1515-1523, 2018.

RAHMAN, T.; CHOUDHURY, M.B.K. Shiitake Mushroom: A Tool of Medicine. **Bangladesh Journal of Medical Biochemistry**. v.5, n.1, p.24-32, 2012.

RANJBAR, M.E.; OLFATI, J.A.; AMANI, M. Influence of enriched soaking water on shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer) mushroom yield and properties. **Acta agricultura e Slovenica**. v.109, n.3, p.555-560, 2017.

REGNIER, T.; KAZAZ, S.; PLESSIS, B.; JAGER, K.; AUGUSTYN, W.; MERWE, R. R.; Badenhorst, J. Quality and safety of *Sterculia murex*, a scientifically unknown nut from Southern Africa. **South African Journal of Botany**. v.108, p.287–293, 2017.

REIS, F.S.; MARTINS, A.; VASCONCELOS, M.H. et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**. v.66, p.48-62, 2017.

RINCÃO, V.P.; YAMAMOTO, K.A.; RICARDO, N.M.P.S. et al. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. **Virology Journal**. Londrina, v.9, n.37, p.2-6, 2012.

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

SAUCEDO-POMPA, S.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G.C.G.; ROJAS-MOLINA, R. et al. Natural Beverages and Sensory Quality Based on Phenolic Contents. **Antioxidants in Foods and Its Applications**. v.4, p.69-86, 2018.

SBPC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. 2ª Edição. 130 p. ISBN 978-85-98416-94-6. 2010.

SCHNEIDER, I.; KRESSEL, G.; MEYER, A. et al. Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. **Journal of Functional Foods**. France, v.3, n.1, p.17-24, 2011.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**. v.10, n.2, p.37-51, 1999.

SHEIBANI, E.; MOGHADDAM A.D.; SHARIFAN, A. et al. Linear programming: an alternative approach for developing formulations for emergency food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.98, n.4, p.1444-1452, 2018.

SHIMIZU, K.; WATANABE, S.H; WATANABE, S. et al. Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer. **Hepato Gastroenterology**. USA, v.56, p.240-244, 2009.

SHIMIZU, T.; MORI, K.; OUCHI, K. et al. Effects of Dietary Intake of Japanese Mushrooms on Visceral Fat Accumulation and Gut Microbiota in Mice. **Nutrients**. Nagano-Japan, v.10, p.610, 2018.

SILVA, B.V.; BARREIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery Technologies. **Trends in Food Science & Technology**. v.50, p.144-158, 2016.

SPIM, S.R.V.; OLIVEIRA, B.G.C.C.; LEITE, F.G. et al. Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet. **European Journal of Nutrition**. v.56, p.2255-2264, 2017.

TERAMURA, H.; USHIYAMA, M.; OGIHARA, H. Evaluation of a novel dry sheet culture method (Sanita-kunR) for rapid enumeration of yeasts and molds in foods. **Journal of Microbiological Methods**. Kanagawa-Japan, v.109, p.16-19, 2015.

TWARDOWSKI, P.; KANAYA, N.; FRANKEL, P. et al. A phase I trial of mushroom powder in patients with biochemically recurrent prostate cancer: roles of cytokines and myeloid-derived suppressor cells for *Agaricus bisporus*- induced prostate-specific antigen responses. **Cancer**. Califórnia, v.121, n.17, p.2942-2950, 2015.

ULZIJARGAL, E.; MAU, J.L. Nutrient Compositions of Culinary-Medicinal Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. Taiwan, v.13, n.4, p.343-349, 2011.

VALVERDE, M.E.; PÉREZ, T.H.; LÓPEZ, O.P. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. **International Journal of Microbiology**, Irapuato-México, v.2015, p.1-14, 2015.

VETVICKA, V.; VETVICKOVA, J. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts. **Annals of Translational Medicine**. Louisville, USA, v.2, n.2, p.14, 2014.

WAGH, V.D.; DEORE, B.R. Ready to use therapeutic food (RUTF): An overview. **Advances in Life Sciences and Health**. v.2, n.1, p.1-15, 2015.

WASSER, S.P. Medicinal Mushrooms in Human Clinical Studies. Part I. Anticancer, Oncoimmunological, and Immunomodulatory Activities: A Review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 19, n.4, p.279-317, 2017.

WESA, K.M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; KLIMEK, V.M. et al. Maitake mushroom extract in myelodysplastic syndromes (MDS): a phase II study. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. v.64, p.237-247, 2015.

XU, H.; ZOU, S.; XU, X. et al. Anti-tumor effect of β -glucan from *Lentinus edodes* and the underlying mechanism. **Scientific Reports**. v.6, p.1-13. 2016.

YAHIA, E.M.; OROZCO, F.G.; PÉREZ, M.A.M. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Chemistry**. v.226, p.14–22, 2017.

YOSHIMURA, K.; UEDA, N.; ICHIOKA, K. et al. Use of complementary and alternative medicine by patients with urologic cancer: a prospective study at a single Japanese institution. **Support Care Cancer**. v.13, p.685-690, 2005.

YU, S.; WU, X.; FERGUSON, M. et al. Diets Containing Shiitake Mushroom Reduce Serum Lipids and Serum Lipophilic Antioxidant Capacity in Rats. **American Society for Nutrition**. Rockville MD, v.146, p.2491-2496, 2016.

ZHANG, J.J.; LI, Y.; ZHOU, T. et al. Bioactivities and Health Benefits of Mushrooms Mainly from China. **Molecules**. v.21, n.7, p.938, 2016.

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

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

APÊNDICE A - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fase I - Análise sensorial e intenção de compra

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da análise sensorial e intenção de compra de barras de cereais doce e salgada com adição de Shiitake da pesquisa “**Desenvolvimento e avaliação de barras de cereais com *Lentinula edodes* (Shiitake)**”. A sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a Instituição.

O Sr.(a) receberá uma via original deste termo onde constam o telefone e endereço da pesquisadora responsável, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Sara Rosicler Vieira Spim

ENDEREÇO: Rua Noel Medeiros Rosa, nº259 - Sorocaba/SP, CEP 18053170

TELEFONE: (15) 32027158; (15) 981527991

OBJETIVOS: Análise sensorial e intenção de compra de barras de cereais doce e salgada com adição de Shiitake.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Os candidatos serão convidados a participar da pesquisa respondendo a um questionário sobre textura, sabor, aroma, aparência e sua intenção de compra em relação ao produto testado. As amostras estarão prontas para o teste nas salas de análise sensorial localizado no Bloco E da Universidade de Sorocaba, e o resultado da pesquisa mostrará o grau de aceitabilidade de um produto novo que levará ao consumidor os benefícios e ação do cogumelo Shiitake. Você também será informado sobre os componentes da formulação para que seja manifestada qualquer intolerância alimentar, alergias ou aversão em relação às substâncias utilizadas na formulação das barras de cereais

RISCOS E DESCONFORTOS: Não haverá riscos e prejuízos de qualquer espécie para os participantes bem como desconfortos, riscos morais ou constrangimentos provocados pela pesquisa. As barras de cereais serão produzidas seguindo com rigor as Boas Práticas de Manipulação de Alimentos. Os componentes da formulação das barras de cereais doce incluem: cogumelo Shiitake seco; aveia em flocos; açúcar mascavo; ameixa seca; castanha do Pará; farinha de linhaça; glicose de milho; quinoa em grãos; lecitina de soja; flocos de arroz e chia em grãos. E das

barras de cereais salgadas incluem: cogumelo Shiitake seco; aveia em flocos; castanha do Pará; quinoa em grãos, semente de gergelim e linhaça; tomate seco; pasta de amendoim; queijo parmesão; lecitina de soja; condimentos e goma xantana e sal rosa. Assim, se houver qualquer manifestação de alergias ou intolerância aos ingredientes acima, o paciente não poderá participar do estudo para não ter qualquer risco.

BENEFÍCIOS: Não há benefício direto para o participante, trata-se de estudo experimental das barras para verificar qual é mais gostosa, qual terá mais aceitabilidade.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: A participação não é remunerada nem implicará em gastos para os participantes.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação. O pesquisador responsável se comprometerá a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação dos participantes.

Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG _____, CPF _____, declaro que li
as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto
intitulado " **Desenvolvimento e avaliação de barras de cereais com *Lentinula
edodes (Shiitake)***", que tem como pesquisadora responsável **Sara Rosicler Vieira
Spim** CRN 42208. Fui devidamente informado (a) dos procedimentos que serão
utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes,
confidencialidade da pesquisa e concordo em participar.

Foi-me garantido também que posso retirar o consentimento a qualquer
momento, sem que isso leve a qualquer penalidade.

Declaro ainda que recebi uma via do Termo de Consentimento.

NOME E ASSINATURA DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL:

Nome por extenso

Assinatura

APÊNDICE B - TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

Nome: _____ Data: _____

Avalie as amostras de barras de cereais (utilizando os números) e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.

Amostra _____

9. Gostei extremamente

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

Textura

Sabor

Aroma

Aparência

6. Gostei ligeiramente

5. Indiferente

4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei extremamente

Amostra _____

9. Gostei extremamente

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

Textura

Sabor

Aroma

Aparência

6. Gostei ligeiramente

5. Indiferente

4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei extremamente

Amostra _____

9. Gostei extremamente

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

Textura

Sabor

Aroma

Aparência

6. Gostei ligeiramente

5. Indiferente

4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei extremamente

Amostra _____

9. Gostei extremamente

8. Gostei muito

7. Gostei moderadamente

Textura

Sabor

Aroma

Aparência

6. Gostei ligeiramente

5. Indiferente

4. Desgostei ligeiramente

3. Desgostei moderadamente

2. Desgostei muito

1. Desgostei extremamente

Avalia as amostras de barras de cereais com Shiitake segundo sua intenção de compra:

5. Certamente compraria

Amostra

Avaliação

4. Possivelmente compraria

3. Talvez comprasse

2. Possivelmente não compraria

1. Certamente não compraria

APÊNDICE C - MATERIAL PARA DIVULGAÇÃO E RECRUTAMENTO

ESTAMOS RECRUTANDO VOLUNTÁRIOS

para avaliação da ingestão de
Barra de Cereal Funcional



Foto: Nikolas Spim

OBJETIVO

O objetivo deste estudo será avaliar a concentração de colesterol total, LDL e triglicerídeos com o consumo de barras de cereais funcionais com Shiitake por dois meses. O Shiitake é um alimento completo nutricionalmente por possuir alto teor proteico, vitaminas, minerais e composto bioativos como os fenóis e as glucanas.

PARA PARTICIPAR



- Idade entre 20 e 60 anos;
- Ambos os sexos;
- Apresentar pelo menos dois dos seguintes resultados bioquímicos (limítrofe):
Colesterol total 180 a 239 mg/dL;
LDL 130 a 159 mg/dL;
Triglicerídeos 150 a 200 mg/dL.

NÃO PODEM PARTICIPAR



- Em uso de medicamentos para controle do colesterol;
- Em tratamento de câncer, doenças neurodegenerativas, diabéticos e outras doenças que possam interferir no estudo;
- Em uso de suplementos como flavonoides e antioxidantes ou medicamentos imunossupressores e antibióticos;
- Gestantes, lactantes ou em reposição hormonal.

ALÉRGICOS



Os ingredientes que compõe este alimento funcional são: Shiitake, castanha do Pará, amendoim, açúcares mascavo e cristal, aveia, ameixa seca, quinoa, linhaça, chia, óleo de palma, glicerina e lecitina de soja.

**SERÁ NECESSÁRIO EXAMES COM
DATAS DE ATÉ TRÊS MESES.**

**PREVISTO
INÍCIO 26/09/2018
TÉRMINO 26/11/2018**

Estudo em andamento no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNISO.

INSCRIÇÕES E INFORMAÇÕES:

Entrar em contato com a pesquisadora Sara Spim (15) 98152-7991
ou e-mail sara.spim@uniso.br



UNISO

APÊNDICE D - TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo Clínico com participantes hipercolesterolêmicos

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa **“Consumo de alimento funcional produzido com *Lentinula edodes* (Shiitake) e seus efeitos clínicos em pacientes hipercolesterolêmicos”**.

A sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a Instituição.

O Sr.(a) receberá uma via original deste termo onde constam o telefone e endereço da pesquisadora responsável e equipe de pesquisa, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: Consumo de alimento funcional produzido com *Lentinula edodes* (Shiitake) e seus efeitos clínicos em pacientes hipercolesterolêmicos.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: *Sara Rosicler Vieira Spim, RA 50598, RG18598373 e CPF 109859368-51.

ENDEREÇO: Rua Noel Medeiros Rosa, nº259 – Bairro Júlio de Mesquita Filho-Sorocaba/SP.

TELEFONE: (15) 32027158; (15) 981527991

EQUIPE DA PESQUISA: Denise Grotto; Paula Monticelli Bertoni; Miriam Sanches do Nascimento Silveira.

OBJETIVOS: Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da ingestão diária de alimento funcional com Shiitake em pacientes com hipercolesterolemia por um período de 60 dias.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Sua participação nesta pesquisa consistirá em se apresentar na Universidade de Sorocaba (horário, dia e local estipulados) para coleta de sangue e receber um envelope pardo, sem identificação, com alimento funcional de cereais com Shiitake para ingestão durante 30 dias. Em 30 dias se apresentar para nova coleta de sangue e receber alimento funcional de cereais com Shiitake para mais 30 dias. Os participantes serão orientados e instruídos sobre a

ingestão do alimento de cereais quanto à quantidade (de acordo com peso de cada participante), frequência e horários.

Também será informado sobre os componentes utilizados na formulação deste alimento de cereais (Shiitake, aveia, amendoim, flocos de arroz, ameixa seca, castanha do pará, quinoa, linhaça, chia, açúcares e lecitina de soja) para que seja manifestada qualquer intolerância alimentar, alergias ou aversão em relação às substâncias utilizadas. Também serão orientados a registrar todas as ocorrências que eles acharem importante durante o estudo.

Serão orientados em relação a coleta de sangue nas três datas para os exames bioquímicos triglicerídeos, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, lipoproteína de densidade muito baixa – VLDL e glicose ao início do estudo, em trinta dias e ao término do estudo. Os procedimentos de coleta de sangue serão executados por profissionais de enfermagem nas dependências da Universidade. As amostras de sangue serão mantidas em refrigeração e enviadas ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de Sorocaba para separação do soro e congelamento à - 80°C para posterior análises.

RISCOS E DESCONFORTOS: Você será selecionado(a) utilizando randomização simples com sorteio de grupo. Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não acarretará prejuízo. Os participantes não poderão estar fazendo uso de drogas imunossupressoras ou antibióticos para não incidir nenhum tipo de interação. As mulheres não poderão estar grávidas, lactantes ou em reposição hormonal para não sofrer nenhum risco ou prejuízo.

BENEFÍCIOS: Além do benefício de ingerir um alimento nutritivo e funcional por sessenta dias, os participantes receberão os resultados e poderão acompanhar o andamento do projeto.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: A participação não é remunerada nem implicará em gastos para os participantes, eventuais despesas de

participação (passagem, por exemplo) podem ser custeadas ou ressarcidas pela pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação. O pesquisador responsável se comprometerá a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação dos participantes.

Pesquisador principal

Sara Rosicler Vieira Spim

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____ RG _____,
CPF _____, declaro que li as informações contidas no
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto intitulado “**Consumo de
alimento funcional produzido com *Lentinula edodes* (Shiitake) e seus efeitos
clínicos em pacientes hipercolesterolêmicos.**”, que tem como pesquisadora
responsável a doutoranda **Sara Rosicler Vieira Spim** e a **Prof. Dra. Denise Grotto**
como orientadora. **Paula Monticelli Bertoni** e **Miriam Sanches do Nascimento
Silveira** como enfermeiras responsáveis pela coleta de sangue. Fui devidamente
informado(a) dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos,
benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa e
concordo em participar.

Foi-me garantido também que posso retirar o consentimento a qualquer
momento, sem que isso leve a qualquer penalidade.

Declaro ainda que recebi uma via do Termo de Consentimento.

Sorocaba, _____.

NOME E ASSINATURA DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL:

Nome completo

Assinatura

APÊNDICE E - PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

- CAETANO, E.L.A.; CAMARGO, I.F.; LAURINO, L.F.; VIROEL, F.J.M.; MENDES, C.F.; SPIM, S.R.V.; PICKLER, T.B. EFFECTS OF MEDICINAL MUSHROOM AGARICUS BLAZEI ON GESTATIONAL DEVELOPMENT IN RATS WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN. In: XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Campos do Jordão. 2018.
- GUIMARÃES, N.C.; SPIM, S.R.V.; NÓBREGA, A.C.F.; GONÇALVES, M.R.; GROTO, D., SANTOS, V.S. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS TRATADOS CRONICAMENTE COM ÁGUA DO RIO DOCE - Lapetox – UNISO. Faculdade de Ciências da Saúde – UnB. In: XXXII Reunião Anual da FeSBE. Campos do Jordão / SP. Set. 2017.
- SPIM, S.R.V. DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTO FUNCIONAL COM *Lentinula edodes* (shiitake). In: IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL – IX SICOG. São José dos Campos /SP. Out. 2017.
- GROTO, D.; SPIM, S.R.V.; GERENUTTI, M. OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN MATERNAL EXPOSURE TO CAESALPINIA FERREA IN VIVO. In: VIII Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais e III Simpósio Iberoamericano de Investigação em Câncer. 2016. Univale Campus Itajaí – SC.
- SPIM, S.R.V.; LEITE, F.G.; OLIVEIRA, B.G.C.C.; GROTO, D. ESTADO REDOX DE RATOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA CO-EXPOSTOS AO *Lentinula edodes* (SHIITAKE). In: XII Congresso Internacional de Nutrição Funcional. 2016. São Paulo.
- CAETANO, E.L.A.; GENTIL, B.C.; SPIM, S.R.V.; LAURINO, L.F.; GERENUTTI, M. EXPOSIÇÃO MATERNA AO SHIITAKE (*Lentinula edodes*): AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS. In: XII Congresso Internacional de Nutrição Funcional. 2016. São Paulo.
- GENTIL, B.C.; CAETANO, E.L.A.; SPIM, S.R.V.; LAURINO, L.F.; GERENUTTI, M. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE REPRODUTIVA DE RATAS EXPOSTAS A BAIXAS DOSES DE *Lentinula edodes* (SHIITAKE). In: XII Congresso Internacional de Nutrição Funcional. 2016. São Paulo.
- VIROEL, F.J.M.; LAURINO, L.F.; SPIM, S.R.V.; GERENUTTI, G. e GROTO, D. "COMPOSTOS FENÓLICOS E GLUCANAS EM *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*". In: I Simpósio de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas. - II Mostra de Atividades Acadêmicas - Internacional. Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- HESSEL, B.M.; SPIM, S.R.V.; GROTO, D. e GERENUTTI, M. "PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO DE RATAS COM DMG-STZ TRATADAS COM SHIITAKE". In: I Simpósio de Pesquisa em

Ciências Farmacêuticas - II Mostra de Atividades Acadêmicas Internacional. Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.

- GROTTTO, D.; SANTOS, W.T.P.; PICKLER, T.B.; SPIM, S.R.V.; JOZALA, A.F. e GERENUTTI, M. OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN MATERNAL EXPOSURE TO *Caesalpinia ferrea* *IN VIVO*. In: VIII Congresso Íbero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Íbero-americano de Investigação em Câncer. Universidade do Vale do Itajaí/ SC. Out. 2016.
- SANTOS, W.T.P.; CHRISPIM, B.G.C.; OLIVEIRA, PICKLER, O.T.B.; SPIM, S.R.V. e GROTTTO, D. “PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PLACENTA E SUA APLICAÇÃO NA EXPOSIÇÃO MATERNA À *Caesalpinia ferrea*”. In: XIX Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica – EPIC - II Mostra de Atividades Acadêmicas Internacional. Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.

APÊNDICE F – PALESTRAS MINISTRADAS

- OS EFEITOS DO SHIITAKE NA SÍNDROME METABÓLICA, FUNÇÕES HEPÁTICAS E RENAL. In: Encontro Anual de Produtores de Cogumelos - Cogumelos Yuri. Sorocaba/SP. Ago. 2018.
- AÇÃO BIOATIVA DOS COGUMELOS NAS DISLIPIDEMIAS. In: II Mostra de Atividades Acadêmicas. MAAC – Internacional. Universidade de Sorocaba. Sorocaba/SP. Nov. 2016.
- AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR MOLÉCULAS BIOATIVAS. In: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Uniso. Mai. 2017.
- ALIMENTOS FUNCIONAIS NA PREVENÇÃO DE PATOLOGIAS. In: O Dia do Prevenir. Graduação em Fisioterapia. Universidade de Sorocaba – Uniso. Sorocaba/SP. Mai. 2017.
- DOSAGEM DA GLUTATIONA (GSH) POR ESPECTROFOTOMETRIA – Graduação em Medicina Veterinária – Universidade de Sorocaba – Uniso. Sorocaba/SP. Set. 2016.
- MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO. In: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Uniso. Sorocaba/SP. Mai. 2018.
- CARREIRA PROFISSIONAL – NUTRICIONISTA. ELETIVA “RODA DE PROFISSÕES”. In: E.E. Senador José Ermírio de Moraes. Sorocaba/SP. Nov. 2017.
- ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL – FISIOTERAPIA PREVENTIVA. Graduação em Fisioterapia - Universidade de Sorocaba- Uniso. Sorocaba/SP. Mar. 2018.

CURSOS DE EXTENSÃO MINISTRADO

- Curso de Extensão ministrado: Nutrição Clínica na Obesidade – Universidade de Sorocaba – Uniso. 16h/aula. 2016. Sorocaba/SP.
- Curso de Extensão ministrado: Plano Alimentar: Composição e prescrição dietética. Universidade de Sorocaba. Uniso. 20h/aula. Mai. 2016. Sorocaba/SP.
- Curso de Extensão ministrado: Nutrição Esportiva – Universidade de Sorocaba – Uniso. 28h/aula. Nov. 2017. Sorocaba/SP.

APÊNDICE G - MEMBRO DE COMISSÃO ORGANIZADORA DE EVENTOS E COLABORADORA EM PESQUISA

- Membro da Comissão Organizadora de Evento “10 ANOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - Uniso. Sorocaba/SP. Out. 2018.
- Membro da Comissão Organizadora “MAAC Jovem”, da II MOSTRA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS – MAAC – Internacional. Universidade de Sorocaba – Uniso. Sorocaba/SP. Nov. 2016. 30 horas.
- Membro da Comissão Avaliadora no “2º SIMPÓSIO DE GESTÃO E NEGÓCIOS”. Graduação em Administração. Universidade de Sorocaba. Uniso. Sorocaba/SP. Mai. 2019.
- Membro da Comissão Avaliadora no “1º SIMPÓSIO DE GESTÃO E NEGÓCIOS”. Uniso. Sorocaba/SP. Jun. 2018.
- Membro da Comissão Avaliadora “ALIMENTOS: ENERGIA E OUTRAS CURIOSIDADES – In: Feira de Ciências- Escola e Universidade. Universidade de Sorocaba – Uniso. Sorocaba/SP. Dez. 2016.
- Membro da Comissão Avaliadora dos “Trabalhos de Pesquisa da XIV Maratona de Projetos Interdisciplinares dos Cursos Tecnológicos da universidade de Sorocaba: Estratégias Inovadoras.” Universidade de Sorocaba - Uniso. Sorocaba/SP. Nov. 2017.
- Colaboradora e monitoria de Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição. ANÁLISES EM COMPOSTOS FENÓLICOS. Laboratório de análise Físico Química. Universidade de Sorocaba. Uniso. 2016. 20 horas.
- Colaboradora da Pesquisa “DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE BARRAS DE CEREAIS COM *Lentinula edodes* (SHIITAKE)” no Programa de iniciação científica (IC). Universidade de Sorocaba. Uniso. De ago. 2017 a jul. 2018.

APÊNDICE H – PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

- GABRIELA CHUNG GARCIA BELMONTE E SAMANTA MARIA DE PONTES MEDEIROS. Título: **“IMPLICAÇÕES DA TERAPIA NUTRICIONAL ENTERAL EM PACIENTES COM NEOPLASIAS”**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição da Universidade de Sorocaba - Uniso. Nov. 2018.
- BIANCA CARVALHO GENTIL E ÉRIKA LEÃO AJALA CAETANO. **TÍTULO: ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO *Lentinula edodes* (SHIITAKE)**. BANCA: GERENUTTI, M.; LAURINO, L. F.; SPIM, S. R. V. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Nutrição - Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- MARIANE BAGODI BATISTA DA SILVA. TÍTULO: **COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE COGUMELOS *Lentinula edodes* (SHIITAKE) e *Pleurotus ostreatus* (SHIMEJI)**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- DAMARIS MOREIRA DIAS E IARA FERNANDA ARAÚJO DE LIMA. **COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PAPINHA CASEIRA COM PAPINHAS INDUSTRIALIZADAS CONGELADAS COMERCIALIZADAS NAS CIDADES DE SÃO PAULO E SOROCABA**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- MICHELE LEITE ARANHA. **AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LANCHES TIPOS HAMBÚRGUER COMERCIALIZADOS EM DUAS REDES DE FAST FOOD DA CIDADE DE SOROCABA – SP**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- JANAINA KELLY BARBOSA MATTEIS. TÍTULO: **SOBREPESO E OBESIDADE NA ADOLESCÊNCIA E SEUS FATORES DETRMINATES**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- GABRIELA CHUNG GARCIA BELMONTE E SAMANTA MARIA DE PONTES MEDEIROS. TÍTULO: **IMPLICAÇÕES DA TERAPIA NUTRICIONAL ENTERAL EM PACIENTES COM NEOPLASIAS**. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- BIANCA CARVALHO GENTIL E ÉRIKA LEÃO AJALA CAETANO. TÍTULO: **ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO *Lentinula***

edodes (SHIITAKE). Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.

- SAMARA BARBOSA PEREIRA. TÍTULO: **ÍNDICE GLICÊMICA E CARGA GLICÊMICA NO CONTROLE DE DIABETES *MELITTUS* TIPO 2.** Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Nutrição – Universidade de Sorocaba – Uniso. Nov. 2016.
- MARIA CAROLINA SCHIMIDT ALVARENGA DA SILVA. **DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM COGUMELOS SHIITAKE.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Nutrição - Universidade de Sorocaba - Uniso. Nov. 2016.

APÊNDICE I – CÁLCULO DE DIFERENÇAS

Tabela 1 – Diferença nos tempos dentro do grupo intervenção com Teste T.

Grupo Intervenção		
	Teste T dif. T60-0	Teste T dif. T30-0
Colesterol total	0.7317	0.7708
LDL colesterol	0.8929	0.7627
HDL colesterol	0.6482	0.1089
Triglicerídeos	0.3901	0.1724
Glicose	0.2134	0.5585
Catalase	0.1557	0.5342
GSH	0.9888	0.0752
TBARS	0.2725	0.7907

Tabela 2 – Diferença entre os grupos nos tempos 60-0 e 30-0 com Teste T.

Controle x Intervenção			
	P- value Anova	Teste T dif. T60-0	Teste T dif. T30-0
Colesterol total	0.5526	0.9116	0.3569
LDL colesterol	0.4246	0.2769	0.2709
HDL colesterol	0.6180	0.9607	0.4288
Triglicerídeos	0.1017	0.2094	0.5326
Glicose	0.5382	0.2350	0.5855
Catalase	0.7011	0.3036	0.8930
GSH	0.0014	0.0409	0.0412
TBARS	0.0384	0.0336	0.2789

ANEXO A – DEPÓSITO DA PATENTE



28/11/2017 870170092279
17:40
29409161710912366

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 025575 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO DOM AGUIRRE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CNPJ/CNPJ: 71487094000113

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rod. Raposo Tavares, S/N - KM 92,5 - Pavimento 1, Sala 105 Vila
Artura

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18023-000

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 28/11/2017 às
17:40, Petição 870170092279

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE BARRAS NUTRACÊUTICAS DE COGUMELO E CEREAIS PARA REDUÇÃO DE COLESTEROL, E PRODUTOS OBTIDOS.

Resumo: PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE BARRAS NUTRACÊUTICAS DE COGUMELO E CEREAIS PARA REDUÇÃO DE COLESTEROL, E PRODUTOS OBTIDOS.

Refere-se a processos de obtenção de barras nutracêuticas de cogumelo e cereais, nas versões doce (BD) e salgada (BS), de rápido e prático consumo, direcionado aos cuidados com a dislipidemias, devido a sua capacidade de auxiliar na redução do colesterol; que apresentam em sua composição quantidades combinadas de cogumelo shiitake (8), aveia (12), linhaça (14 e 26), chia (13), quinoa (15) e flocos de arroz integral (16), dentre outros ingredientes, de modo a comporem um alimento funcional e com atividade na redução do colesterol, triglicerídeos e LDL, e também na prevenção do diabetes e de danos renais e hepáticos, devido aos nutrientes e fibras presentes em sua composição.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Geisler Chbane Bosso

Numero OAB:

Numero API: 891

CPF/CNPJ: 03923594801

Endereço: Rua XV de Novembro, 3171 - 16º Andar, Conj. 161 - Centro

Cidade: São José do Rio Preto

Estado: SP

CEP: 15015-110

Telefone: (17) 2136-8800

Fax: -

Email: cadastro@vilage.com.br

Escritório:

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: DENISE GROTTTO

CPF: 97480436068

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Humberto Notari, 6 - Bloco B, Apto. 21 Jardim Gonçalves

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18016-430

País: BRASIL

Telefone: (17) 213 68838

Fax:

Email: cadastro@village.com.br

Inventor 2 de 2

Nome: SARA ROSICLER VIEIRA SPIM

CPF: 10985936851

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Noel de Medeiros Rosa, 259 Conj. Habitacional Júlio de
Mesquita Filho

Cidade: Sorocaba

Estado: SP

CEP: 18053-170

País: BRASIL

Telefone: (17) 213 68838

Fax:

ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO I – FOOD CHEMISTRY

11/09/2019

Track your recent Co-Authored submission to FOOD... - Sara Rosicler Vieira Spim

Track your recent Co-Authored submission to FOODCHEM

Food Chemistry <eesserver@eesmail.elsevier.com>

qua 11/09/2019 15:36

Para:sara.spim@edu.uniso.br <sara.spim@edu.uniso.br>;

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Sara Rosicler Spim,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food Chemistry

Title: NUTRITIONAL, SENSORY, FLAVOR AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF A NOVEL MUSHROOM CEREAL BAR

Corresponding Author: Denise Grotto

Co-Authors: Sara Rosicler V Spim; Nathalia Roberta Cardoso M Castanho; Ana Maria H Pistila; Angela F Jozala; José M Oliveira Júnior; Valquíria Miwa H Yoshida;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=SaraRosicler&lname=Spim&email=sara.spim@edu.uniso.br>Or log in: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=sara.spim@edu.uniso.br>If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at denise.grotto@prof.uniso.br.

Thank you,

Food Chemistry

ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO II – EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION

14/11/2019

EJON-D-19-01053 - Submission Notification to co... - Sara Rosicler Vieira Spim

EJON-D-19-01053 - Submission Notification to co-author

em.ejon.0.67456f.6166dc33@editorialmanager.com em nome de
Editorial Office (EJON) <em@editorialmanager.com>

qui 14/11/2019 11:12

Para:Sara Rosicler Vieira Spim <sara.spim@edu.uniso.br>;

Re: "Effects of Lentinula edodes bar on lipid and antioxidant profiles in borderline high cholesterol individuals: A double blind randomized clinical trial"

Full author list: Sara Rosicler Vieira Spim; Ana Maria Holtz Pistila, Universidade de Sorocaba; Thaisa Borim Pickler, Master; Marcus Tolentino Silva, Ph.D.; Denise Grotto, Ph.D.

Dear Dr Spim,

We have received the submission entitled: "Effects of Lentinula edodes bar on lipid and antioxidant profiles in borderline high cholesterol individuals: A double blind randomized clinical trial" for possible publication in European Journal of Nutrition, and you are listed as one of the co-authors.

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

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

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition

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

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

ANEXO D - APROVAÇÃO DO CEP – ESTUDO I – PLATAFORMA BRASIL

UNIVERSIDADE DE SOROCABA	
-------------------------------------	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento e avaliação de barras de cereais com *Lentinula edodes* (Shiitake).

Pesquisador: Sara Rosicler Vieira Spim

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65105416.8.0000.5500

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO DOM AGUIRRE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.016.736

Apresentação do Projeto:

O projeto Desenvolvimento e avaliação de barras de cereais com *Lentinula edodes* (Shiitake), apresentado pela pesquisadora Sara Rosicler Vieira Spim trata-se de uma pesquisa de doutorado que pretende realizar um estudo experimental com materiais e medidas e experimental em humanos - Análise sensorial e intenção de compra de barras de cereal. Participarão da pesquisa 80 participantes. Os participantes da pesquisa serão entre alunos e funcionários da Universidade de Sorocaba – Sorocaba/SP de ambos os gêneros

Objetivo da Pesquisa:

Realizar análise sensorial e intenção de compra de barras de cereais doces e salgadas contendo Shiitake.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos benefícios, como trata-se de estudo experimental das barras para verificar qual é mais gostosa, e qual terá mais aceitabilidade, o participante também conhecerá um produto diferenciado com possibilidade de benefícios nutracêuticos no futuro, como por exemplo na redução do colesterol.

Riscos: Não haverá risco na ingestão das barras, pois pacientes com alergias ou intolerâncias a

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5		
Bairro: Vila Arthur	CEP: 13.023-000	
UF: SP	Município: SOROCABA	
Telefone: (15)2101-7101	Fax: (15)2101-7073	E-mail: cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE
SOROCABA



Continuação do Parecer: 2.016.736

quaisquer componentes das barras serão excluídos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Como critério de suspensão/encerramento relata-se que a Pesquisa será suspensa/encerrada caso falte verba orçamentária para a compra de matéria prima. A pesquisadora esclarece em sua carta resposta que que já foi contatado o fornecedor de cogumelos que fornecerá matéria prima à preço de custo. O Fornecedor dos ingredientes secundários das barras de cereais contribuirá com 20% de desconto, o Programa Pós-Graduação da Universidade de Sorocaba fornecerá uma verba de R\$1500,00 e o restante será custeado pela pesquisadora, assim viabilizando o projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente: CV lattes da pesquisadora, e da Denise Grotto, folha de rosto, autorização do Laboratório onde será desenvolvida a degustação com os participantes, questionário para o teste de aceitação e de compra, TCLE, carta de apresentação

Recomendações:

Não há recomendações do projeto, pois as pendências no projeto protocolado anteriorente foram sanadas, conforme descrito na sequencia: - Foi incluso a pesquisadora Denise Grotto como integrante ou participantes da pesquisa; foi detalhado como serão recrutados os alunos e funcionários da Universidade de Sorocaba ; foi incluso no cronograma a entrega dos relatórios parcial e final a este comitê ; Foram inclusos os benefícios aos participantes da pesquisa ; e esclarecido os critérios de suspensão de pesquisa , bem como custeio identificado no orçamento é do próprio pesquisador. Quanto aos termos obrigatórios está sendo mantido o sigilo do participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo com as normas estabelecidas pelo CEP. O pesquisador atendeu todos os quesitos solicitados pelo parecerista.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado na Reunião do Colegiado no dia 12 de abril de 2017.

O pesquisador, deve submeter ao CEP relatório parcial e no término do projeto relatório final, de acordo com as normas obrigatórias da CONEP.

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5

Bairro: Vila Artura

CEP: 13.023-000

UF: SP

Município: SOROCABA

Telefone: (15)2101-7101

Fax: (15)2101-7073

E-mail: cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE SOROCABA



Continuação do Parecer: 2.016.736

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_767257.pdf	14/03/2017 19:50:14		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	14/03/2017 19:48:03	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Outros	Questionario.pdf	14/03/2017 19:40:14	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	14/03/2017 10:16:45	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/02/2017 08:35:45	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_lab_sensorial.pdf	24/11/2016 20:19:03	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_DeniseGrotto.pdf	21/11/2016 20:47:58	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Outros	carta_apresentacao.pdf	18/11/2016 21:39:23	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_A_sensorial_PBrasil.pdf	24/08/2016 19:39:19	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/08/2016 19:30:23	Sara Rosicler Vieira Spim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SOROCABA, 16 de Abril de 2017

Assinado por:
Raquel de Mendonça Rosa Castro
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
Bairro: Vila Artura CEP: 18.023-000
UF: SP Município: SOROCABA
Telefone: (15)2101-7101 Fax: (15)2101-7073 E-mail: cep@uniso.br

ANEXO E - APROVAÇÃO DO CEP – ESTUDO II - PLATAFORMA BRASIL

UNIVERSIDADE DE
SOROCABA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Consumo de alimento produzido com Lentinula edodes (Shiitake) e seus efeitos clínicos em pacientes hipercolesterolêmicos

Pesquisador: Sara Rosider Vieira Spim

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 83741818.5.0000.5500

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO DOM AGUIRRE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.824.297

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa para obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso envolvendo um estudo clínico de fase II. O projeto será desenvolvido pela aluna Sara Rosider Spim como orientação da profa. Dra Denise Grotto. Estarão também envolvidas no projeto as pesquisadoras Miriam Sanches Silveira e Paula Bertoni, bem como a aluna de iniciação científica Ana Maria Holtz Pistila.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar os efeitos da ingestão de Shiitake empregando um alimento funcional (barra de cereal com adição de Shiitake) em pacientes hipercolesterolêmicos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a autora não haverá riscos para os pacientes. Possíveis problemas advindos da coleta de material serão investigados pela enfermeira responsável prof. Miriam Sanches.

Como benefícios a autora indica que os participantes receberão um alimento funcional (lanche) ao dia, agradável ao paladar e prático ao consumo. Além de poderem acessar os resultados ao final do estudo, identificando os possíveis efeitos advindos da ingestão do Shiitake no seu organismo.

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5

Bairro: Vila Artura

CEP: 13.023-000

UF: SP

Município: SOROCABA

Telefone: (15)2101-7085

Fax: (15)2101-7073

E-mail: cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE
SOROCABA



Continuação do Parecer: 2.824.297

Declaração de Instituição e Infraestrutura	autoriz_universidade.pdf	18/04/2018 20:02:17	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Outros	curriculo_lattes_sara.pdf	23/02/2018 15:55:01	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	23/02/2018 15:54:19	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Outros	curriculo_lattes_denisegrotto.pdf	06/02/2018 18:28:20	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_apresentacao_estolnico.pdf	06/02/2018 11:23:34	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	pb_termino_autorizacao_laboratorio.pdf	06/02/2018 11:19:29	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito
Folha de Rosto	pb_folha_rosto.pdf	06/02/2018 11:18:44	Sara Rosider Vieira Spim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SOROCABA, 15 de Agosto de 2018

Assinado por:
Raquel de Mendonça Rosa Castro
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
Bairro: Vila Artura CEP: 13.023-000
UF: SP Município: SOROCABA
Telefone: (15)2101-7085 Fax: (15)2101-7073 E-mail: cep@uniso.br