

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA  
SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EFEITOS DE DIETA SUPLEMENTADA  
COM SERRAGEM DE *Pinus* sp. MICELIADA COM  
*Pycnoporus sanguineus* SOBRE O METABOLISMO DE  
RATOS DIABÉTICOS**

**GIOVANA RECH**

**Caxias do Sul**

**2016**

**GIOVANA RECH**

**EFEITOS DE DIETA SUPLEMENTADA  
COM SERRAGEM DE *Pinus* sp. MICELIADA COM  
*Pycnoporus sanguineus* SOBRE O METABOLISMO DE  
RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marli Camassola

**Coorientador:** Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

**Caxias do Sul**

**2016**

R296e Rech, Giovana

EFEITOS DE DIETA SUPLEMENTADA COM SERRAGEM DE  
Pinus sp. MICELIADA COM *Pycnoporus sanguineus* SOBRE O  
METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS / Giovana Rech. – 2016.  
71 f

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Matheus Parmegiani Jahn.

1. Diabetes. 2. Dislipidemia. 3. *Pycnoporus sanguineus*. 4. *Pinus* sp.  
5. Ratos. I. Camassola, Marli, orient. II. Parmegiani Jahn, Matheus,  
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a).

# **GIOVANA RECH**

## **EFEITOS DE DIETA SUPLEMENTADA COM SERRAGEM DE *Pinus* sp. MICELIADA COM *Pycnoporus sanguineus* SOBRE O METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 12 DE DEZEMBRO DE 2016.

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Camassola

---

Coorientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

---

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melissa Schwanz

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eloane Malvessi

Dedico este trabalho, com todo meu amor e consideração, a minha mãe, Maria Lúcia Zanotti Rech, ao meu pai, Roberto Antônio Rech e ao meu irmão, Vinícius Roberto Rech.

“Science is not only a disciple of reason, but, also,  
one of romance and passion.”

(Stephen Hawking)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marli Camassola, um verdadeiro exemplo de dedicação e profissionalismo, por todos ensinamentos. Sou muito grata simplesmente por ter aceitado ser minha orientadora e ter me proporcionado tantas experiências e aprendizado.

Ao Professor Dr. Matheus Parmegiani Jahn, por ter aceitado fazer parte do trabalho e não ter medido esforços durante a execução, pelas contribuições que tanto agregaram meu crescimento acadêmico e pessoal, pelas conversas reconfortantes, pela paciência, pelo constante incentivo e por ter sido um coorientador muito melhor do que eu esperava.

Aos professores Dra. Eloane Malvessi e Dr. Aldo José Pinheiro Dillon pelas importantes contribuições na banca de acompanhamento e pelo incentivo.

À professora Dra. Melissa Schwanz pelo acolhimento durante o estágio em docência.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por contribuírem com minha formação acadêmica.

Às agências de fomento CAPES, FAPERGS e CNPq e à Universidade de Caxias do Sul pelo apoio e suporte financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Dra. Roselei Fontana, pela paciência, por estar sempre disponível, principalmente nos momentos de apuro.

À Simone Maria Andriolo Gross, que tive o prazer de conviver, por ter colaborado muito com a execução do trabalho, além da amizade e apoio.

Às alunas de iniciação científica que colaboraram com a execução prática deste trabalho, especialmente à Larissa da Silva que esteve a maior parte do tempo ao meu lado ajudando na execução experimental, agradeço a amizade, paciência e colaboração.

À Raquel Brandalise e ao Keoma da Silva pela ajuda na execução experimental do trabalho, pela amizade, pelo incentivo, pela parceria e pelos momentos de descontração.

A todos os colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas pela amizade, cafés, jantas, conversas, apoio e auxílio científico.

Às amigas Gabriela Chilanti e Gabriela Gambato pelo incentivo e por estarem do meu lado em momentos importantes.

À todas amigas e a todos amigos que de uma forma ou outra contribuíram com o trabalho e torceram por mim.

Aos meus queridos pais, Maria Lúcia e Roberto, e ao meu irmão, Vinícius, por todo o suporte oferecido durante este período. Serei eternamente grata por tudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
3.1 Diabetes <i>mellitus</i> .....	19
3.1.1 Dislipidemia e diabetes .....	24
3.2 Macrofungos: características gerais e aplicações .....	27
3.2.1 <i>Pycnoporus spp.</i> .....	30
3.3 <i>Pinus sp.</i> : características gerais e aplicações.....	32
4. RESULTADOS .....	35
5. CONCLUSÕES.....	59
6. PERSPECTIVAS.....	60
7. REFERÊNCIAS .....	61

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição calórica e centesimal da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* (micélio), da serragem de *Pinus* sp. (serragem), da ração comercial não suplementada (Ração), da ração suplementadas com 20% de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus. sanguineus* (Ração + *Pyc*) e ração suplementadas com 20% de serragem de *Pinus* sp. (Ração + *Pinus*).

**Tabela 2.** Compostos fenólicos e cafeína presentes na serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus*, na serragem de *Pinus* sp., na ração não suplementada (Ração), na ração suplementada com 20% de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* (Ração + *Pyc*) e na ração suplementada com 20% de serragem de *Pinus* sp. (Ração + *Pinus*).

**Tabela 3.** Consumo de líquido e ração, variação de peso, índice renal e índice hepático nos diferentes grupos.

**Tabela 4.** Dosagem dos parâmetros hematológicos nos diferentes grupos.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Valores da dosagem plasmática de colesterol total (A), colesterol não-HDL (B) e colesterol HDL (C) nos diferentes grupos.

**Figura 2.** Valores da dosagem plasmática de triglicerídeos nos diferentes grupos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADA - *American Diabetes Association*

AGEs - *Advanced glycation end-products*

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

DM - *Diabetes mellitus*

DM1- *Diabetes mellitus* tipo 1

DM2 - *Diabetes mellitus* tipo 2

FDA - *Food and Drug Administration*

GLP-1 - *Glucagon-like peptide-1*

HDL-colesterol - *High density lipoprotein*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

LDL-colesterol - *Low density lipoprotein*

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PPAR - *Peroxisome proliferator-activated receptor*

STZ – Estreptozotocina

VLDL-colesterol - *Very low density lipoprotein*

## RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de disfunções metabólicas que se caracteriza por problemas relacionados com a secreção e/ou ação da insulina e que resultam em hiperglicemia. Além das complicações relacionadas ao diabetes, é frequente a associação do diabetes com a dislipidemia, a qual se caracteriza por alterações nos parâmetros de lipídeos e de lipoproteínas. Diversos compostos têm sido estudados com intuito de auxiliar o tratamento do diabetes, especialmente substâncias advindas de fontes naturais. Cogumelos são fontes de diversos compostos com diferentes atividades biológicas e muitos desses são empregados para complementar o tratamento de doenças. Ademais, resíduos lignocelulósicos podem ser aproveitados para a produção de cogumelos, por exemplo a serragem de *Pinus* sp. São escassos os estudos acerca das propriedades biológicas do micélio de *Pycnoporus sanguineus* cultivado em estado sólido e do substrato para cultivo, serragem de *Pinus* sp., especialmente em modelo experimental de diabetes. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de dietas suplementadas com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp. sobre o metabolismo de ratos controles e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo três grupos controles e três grupos diabéticos, tratados com ração normal (comercial), ração suplementada com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp. por um período de quatro semanas. Foram avaliados o perfil de consumo de líquido e ração e os efeitos sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os resultados indicam que para os grupos de ratos diabéticos tratados com ração suplementada com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e serragem de *Pinus* sp. houve diminuição significativa nos níveis séricos de colesterol total em 20,64% e 15,42%, de colesterol não-HDL em 33,53% e 38,43% e de triglicerídeos em 69,81% e 70,03%, respectivamente.

Simultaneamente houve aumento significativos dos níveis de HDL-colesterol em 12,57% no grupo de animais diabéticos tratados com suplementação de serragem de *Pinus* sp. Foram evidenciadas algumas alterações nos parâmetros hematológicos em função da suplementação. Contudo, são necessários estudos adicionais para a elucidação dos mecanismos de ação e dos componentes responsáveis para tal efeito das duas formulações empregadas.

**Palavras-chave:** *Pycnopus sanguineus*, *Pinus* sp., diabetes, dislipidemia, triglicerídeos, ratos

## ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a heterogeneous group of metabolic dysfunctions which is characterized by problems related to secretion and/or action of insulin that results in hyperglycemia. Besides the complications related to diabetes, the association to dyslipidemia is frequent, which is characterized by changes in the standards of lipids and lipoproteins. Several compounds have been studied with the objective to assist the treatment of diabetes, especially substances that have come from natural sources. Mushrooms are sources of several compounds with different biological activities and many of these are used to complement the treatment of diseases. Furthermore, lignocellulosic residue may be used for the production of mushrooms, e.g. *Pinus* sp. sawdust. There are just a few studies concerning the biological properties from *Pycnoporus sanguineus* mycelium cultivated in solid state and the substrate for cultivation, *Pinus* sp. sawdust, especially in experimental model of diabetes. Having this in mind, this work had as its objective to evaluate the effects of diets supplemented with *P. sanguineus* mycelium and *Pinus* sp. sawdust over the metabolism of control and streptozotocin-induced diabetic rats. The animals were divided in six groups, being three control groups and three diabetic groups, treated with normal (commercial) ration, supplemented with *P. sanguineus* mycelium and *Pinus* sp. sawdust for a period of four weeks. The profile of consumption of liquid and ration and the effects over the biochemical and hematological parameters were evaluated. The results indicate that for the group of diabetic rats treated with supplemented ration with *P. sanguineus* mycelium and *Pinus* sp. sawdust there was a significant decrease in serum levels of total cholesterol in 20.64% and 15.42%, non-HDL cholesterol in 33.53% and 38.43% and triglycerides in 69.81% and 70.03%, respectively. Simultaneously there was a meaningful increase on HDL-cholesterol levels in 12.57% in the group of diabetic animals treated with

supplementation of *Pinus* sp. sawdust. There was evidence of some changes in hematologic standards due to supplementation. However, additional studies are required to clarify the action mechanisms and the components responsible for such effect of the two formulations applied.

**Key words:** *Pycnopus sanguineus*, *Pinus* sp., diabetes, dyslipidemia, triglycerides, rats

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é classificado como uma desordem metabólica caracterizado principalmente por hiperglicemia, frequentemente acompanhado por dislipidemia. O DM está assumindo proporções consideradas epidêmicas em vários países. Esse fato é atribuído ao envelhecimento populacional, a urbanização e ao estilo de vida adotado atualmente que se configura por sedentarismo e obesidade (SBD, 2015). A hiperglicemia resultante de disfunções da ação da insulina, entre outras consequências, desencadeia mudanças no perfil lipídico dos indivíduos acometidos pela condição. A dislipidemia associada ao diabetes é caracterizada principalmente por hipertrigliceridemia, superprodução de quilomicrons, aumento de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol, do inglês *very low density lipoprotein*), predominância de partícula densas e pequenas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol, do inglês *low density lipoprotein*), redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol, do inglês *high density lipoprotein*) e aumento de lipemia pós-prandial (Dominic, 2013; Wu & Parhofer, 2014).

Embora o tratamento convencional para o diabetes esteja bem estabelecido pelas diretrizes nacionais e internacionais, o mesmo não é suficiente para a crescente demanda (Munir *et al.*, 2013). Sendo assim, diversas alternativas farmacológicas são descritas, no entanto, potenciais efeitos adversos de novos agentes têm sido relatados e são poucos os estudos clínicos (Philippe & Raccach, 2009). Em função disso, existe uma crescente busca por novos compostos, especialmente os advindos de fontes naturais, para o tratamento de doenças como o diabetes, da mesma forma, sugere-se que alimentos funcionais e nutracêuticos possam auxiliar no tratamento convencional.

No que diz respeito às fontes naturais, há anos os cogumelos são empregados em tratamentos de doenças por possuírem inúmeras propriedades biológicas e por serem uma fonte de diversos compostos bioativos (Lindequist *et al.*, 2005).

A espécie *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto produtor do pigmento cinabarina. Esse macrofungo possui potencial emprego na biotecnologia, principalmente na área de bioprocessos, uma vez que é produtor de enzimas de interesse, destacando-se as lacases (Smânia *et al.*, 1997; Lomascolo *et al.*, 2011). Um potencial campo de estudo é acerca das propriedades biológicas de *P. sanguineus*, visto que são poucos os dados reportados. Sendo que para diversas outras espécies de basidiomicetos são atribuídas propriedades medicinais (Money, 2016).

Para a produção de cogumelos, inclusive de *P. sanguineus*, podem ser reaproveitados substratos lignocelulósicos, como a serragem de *Pinus* sp. que é um resíduo da indústria madeireira (Gambato *et al.*, 2016). Estudos acerca das propriedades de espécies de *Pinus* sp. indicam que essas são também uma potencial fonte de constituintes de interesse (Politeo *et al.*, 2011).

Sendo almejada a descoberta por novas substâncias que possam atuar no tratamento do diabetes e podendo empregar a serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e a serragem de *Pinus* sp. como suplemento em rações, o foco deste trabalho foi avaliar os efeitos do micélio de *P. sanguineus* cultivado em estado sólido com serragem de *Pinus* sp. sobre o metabolismo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de ração suplementada com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* sobre o metabolismo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o cultivo de micélio *P. sanguineus* empregando serragem de *Pinus* sp. como substrato.
- Suplementar rações comerciais com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp.
- Analisar a composição centesimal e conteúdo de compostos fenólicos da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus*, da serragem de *Pinus* sp., das rações normal (comercial) e das rações suplementadas com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e serragem de *Pinus* sp.
- Avaliar os efeitos da suplementação com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp. sobre o comportamento do consumo de líquido e ração dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.
- Calcular e avaliar o índice renal e hepático dos ratos saudáveis e diabéticos.
- Avaliar os efeitos da suplementação com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp. no perfil bioquímico e hematológico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.
- Avaliar a hepatotoxicidade da suplementação com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e com serragem de *Pinus* sp.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Diabetes *mellitus***

O diabetes *mellitus* (DM) é classificado como um grupo heterogêneo de disfunções metabólicas que se caracteriza por problemas relacionados com a secreção e/ou ação da insulina e que resultam em hiperglicemia, frequentemente acompanhado por dislipidemia. Como consequência, podem ser desencadeadas complicações como doença cardiovascular, neuropatia, nefropatia e retinopatia. Essa condição é classificada em diferentes tipos de acordo com a sua etiologia. O diabetes tipo 1 (DM1), também conhecido como insulino-dependente, acomete cerca de 5-10% dos indivíduos diagnosticados com diabetes, ocorre predominantemente em crianças e adultos jovens e trata-se da destruição autoimune das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, estando relacionado a pré-disposição genética e a fatores ambientais. O diabetes tipo 2 (DM2), também conhecido como não insulino-dependente, é o mais comum e acomete aproximadamente 90-95% dos indivíduos diagnosticados com diabetes, sendo caracterizada essencialmente por resistência à insulina. A resistência à insulina é definida como uma disfunção nas vias de sinalização mediadas pela insulina em que concentrações normais do hormônio não geram a resposta biológica adequada, o que provoca um aumento ineficiente da secreção de insulina. A redução da ação da insulina está principalmente relacionada a defeitos na célula-alvo a nível de receptor, sendo a obesidade e a gordura abdominal algumas das causas da resistência à insulina (ADA, 2014; SBD, 2015).

São relatados outros tipos menos frequentes de diabetes os quais as formas clínicas apresentam variações. Entre as condições clínicas associadas ao diabetes estão defeitos genéticos na função das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzido por medicamentos ou agentes químicos,

infecções, formas incomuns autoimunes e outras síndromes genéticas. O diabetes gestacional se apresenta de forma semelhante ao DM2 e inicia durante a gestação. Na maioria dos casos ocorre reversão após o parto, no entanto, o risco de desenvolvimento de DM2 nos anos seguintes é aumentado (SBD, 2015). O termo “diabetes duplo” designa a combinação de ambos os tipos de diabetes, DM1 e DM2, o qual o indivíduo com DM1 apresenta também fatores agravantes como obesidade e resistência à insulina. A prevalência de pacientes que apresentam esse perfil tem aumentado significativamente (Merger *et al.*, 2016). Além disso, existem duas condições referidas como pré-diabetes que se configuram por glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Em ambos os casos existe risco de desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (SBD, 2015).

Atualmente, estima-se que 415 milhões de pessoas sejam acometidas pelo DM em todo o mundo e que em 2040 o número aumente para 642 milhões de pessoas. O Brasil está na lista dos 10 países do mundo mais acometidos pelo DM com estimativa de mais de 14 milhões de indivíduos portadores da condição (IDF, 2016). Ainda, segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que ocorra em torno de 1,5 milhões de mortes todo ano atribuídas ao DM (WHO, 2016)

A hiperglicemia, observada no diabetes não tratado, é responsável por desencadear sintomas como poliúria, polidipsia, polifagia e significativa perda de peso (ADA, 2014). As células endoteliais vasculares apresentam um risco particular de desenvolver hiperglicemia intracelular, uma vez que a glicose pode entrar nessas células por difusão passiva, não sendo necessária a ação da insulina (Domingueti *et al.*, 2016). Em condição hiperglicêmica ocorre uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção vascular, além de danos a proteínas, lípidos de membrana e ácidos nucleicos (Bandeira *et al.*, 2013). O

estresse oxidativo está relacionado também com o aparecimento de complicações relacionada ao DM como nefropatia e neuropatia (Osawa & Fato, 2005).

Além do estresse oxidativo, são desencadeados outros processos induzidos pela hiperglicemia, incluindo auto-oxidação da glicose, superprodução de produtos finais de glicação avançada (do inglês AGEs, *advanced glycation end-products*), aumento do fluxo de hexosamina, ativação de diacilglicerol, de proteína quinase C e da via do polioliol. Em hiperglicemia, a via glicolítica está saturada e a glicose em excesso intracelular é desviada para a via do polioliol o que leva ao aumento da sua atividade. O sorbitol é um produto da oxidação da glicose gerado pela enzima aldose redutase, sendo oxidado à frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. O acúmulo de sorbitol leva à diminuição de NADPH, o qual é essencial para regeneração de enzimas antioxidantes. As lesões ocorrem por aumento do estresse osmótico induzido pelos polióis, diminuição da atividade da bomba sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ ), aumento citosólico do NADH/NAD<sup>+</sup> e redução do NADPH (Oyenihi *et al.*, 2015).

Os AGEs, por sua vez, estão presentes no organismo como produtos do metabolismo normal, no entanto, a dieta ainda é a principal fonte dos mesmos. A concentração aumentada de AGEs é um processo comum no envelhecimento e é também observada no diabetes. O caráter pró-oxidante de AGEs aumenta o estresse oxidativo no organismo, tendo como agravante a redução da função renal que compromete a remoção de AGEs da circulação (Vlassara & Striker, 2013).

O diabetes é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica. Em pacientes diabéticos, as chances de desenvolvimento de doenças cardíacas e acidente vascular encefálico aumentam de quatro a cinco vezes, comparado aos não-diabéticos. As

complicações cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com DM1 e DM2 (Domingueti *et al.*, 2016).

A neuropatia, uma disfunção nervosa envolvendo o sistema nervoso somático e autônomo causada pela hiperglicemia, é a complicação mais comum do DM, acometendo até 50% dos pacientes com diabetes DM1 e DM2. No DM1, geralmente os sintomas de polineuropatia distal aparecem após vários anos de hiperglicemia prolongada crônica. Contrariamente, os pacientes com DM2 que apresentam polineuropatia distal após apenas alguns anos de controle glicêmico inadequado (Oyenihi *et al.*, 2015).

O DM2 e a doença de Alzheimer eram consideradas desordens independentes. No entanto, as duas condições apresentam características fisiopatológicas comuns, um exemplo é o estresse oxidativo. Hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina são fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. A associação entre ambas condições é denominada de diabetes tipo 3 por ser desencadeado por problemas relacionados à insulina, com conseqüente neurodegeneração e problemas cognitivos (Kandimalla *et al.*, 2016; Redondo *et al.*, 2016).

Por variados motivos, o DM2 pode ser negligenciado. Estima-se que aproximadamente 50% de todos os casos de DM2 no mundo não são diagnosticados. Esse fato contribui para o desenvolvimento de complicações que se agravam com o passar do tempo, sendo mais custoso para os sistemas de saúde o tratamento do DM2 em estágios avançados (Beagley *et al.*, 2014).

Atualmente são aplicados três critérios para o diagnóstico de DM: sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso simultâneo a glicemia casual  $>200$  mg/dL, glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL ou glicemia de 2 horas após ingestão de 75 g de glicose  $> 200$  mg/dL (SBD, 2015).

Para controle da hiperglicemia estão disponíveis medicamentos que agem através de diferentes mecanismos. A insulina é empregada para o tratamento de DM1 enquanto que para o DM2 são utilizados hipoglicemiantes. Dentre as alternativas farmacológicas encontram-se as biguanidas que agem aumentando a sensibilidade à insulina, as glitazonas que provocam a diminuição da produção hepática de glicose, as glinidas que atuam no aumento da secreção de insulina e os inibidores das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, que causam o retardo na absorção de glicose. Mais recentemente aprovados estão o peptídeo semelhante a glucagon 1 (do inglês *Glucagon-like peptide-1*, GLP-1), inibidores de dipeptidil-peptidase-4 (DPP) e análogos de amilina (Philippe & Raccah, 2009). Além da terapia medicamentosa, outras abordagens para o controle glicêmico são recomendadas, tais como dieta adequada e prática de exercícios físicos (SBD, 2015).

Uma vez que as alternativas terapêuticas para o tratamento do DM podem apresentar efeitos adversos, a investigação de diferentes moléculas se faz necessário. Estudos reportam a pesquisa por novas fontes de substâncias que auxiliem na prevenção e no tratamento de complicações desencadeadas pelo diabetes. Entre essas estão piranocumarina (Domínguez-Mendoza *et al.*, 2016), taurina (Sirdah, 2015), desidroepiandrosterona (DHEA) (Jahn *et al.*, 2010), vitaminas (Patel *et al.*, 2016) e polifenóis (Cao *et al.*, 2015). Há evidências de que os polifenóis podem ser empregados com auxiliares no tratamento do DM. Baseado em estudos, sugere-se que os polifenóis agem na modulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, diminuindo a hiperglicemia, a dislipidemia e a resistência à insulina, estresse oxidativo e processos inflamatórios e melhorando o metabolismo do tecido adiposo. Por consequência, podem prevenir o desenvolvimento de complicações do DM a longo prazo, incluindo doença cardiovascular, neuropatia, nefropatia e retinopatia (Bahadoran *et al.*, 2013).

Um dos empregos do diabetes experimental é na busca por tratamentos inovadores e na elucidação dos mecanismos relacionados ao DM que ainda não foram compreendidos. Ratos são comumente utilizados como modelos animais para DM1. Aloxano e estreptozotocina são substâncias frequentemente empregadas para indução do diabetes. A estreptozotocina (STZ, 2-desoxi-2-(3-(3-metil-nitrosoureido)-D-glucopiranosose) é um antimicrobiano sintetizado pela bactéria *Streptomyces achromogenes*, além do emprego na indução do diabetes experimental, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de câncer metastático de ilhotas pancreáticas. A administração dá-se por via intraperitoneal ou por via intravenosa e as doses variam de 35 mg/kg a 80mg/kg. Após a administração de estreptozotocina, ocorre alquilação do DNA, liberação de óxido nítrico intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio, esses por fim desencadeiam danos ao DNA das células  $\beta$  (Kahraman *et al.*, 2015; Radenković *et al.*, 2016). Sendo assim, a busca por novas opções terapêuticas ou adjuvantes no tratamento do diabetes se faz necessária visto a magnitude dos problemas relacionados ao diabetes.

### **3.1.1 Dislipidemia e diabetes**

É frequente a associação do DM com a dislipidemia, a qual se caracteriza por mudanças nos parâmetros de lipídeos e de lipoproteínas. A dislipidemia configura-se por aumento sérico de triglicerídeos, redução de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e alterações em lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol). Isso devido também ao fato de que a insulina está envolvida em todas as etapas de produção e secreção de lipoproteína de densidade muito baixa densidade (VLDL-colesterol) (Wu & Parhofer, 2014).

O perfil lipídico de diabéticos não tratados frequentemente difere de indivíduos não-diabéticos. Em pacientes acometidos por DM1 e DM2 observa-se níveis elevados de

triglicerídeos, diminuição do HDL-colesterol e partículas menores e densas de LDL-colesterol. O aumento de LDL-colesterol é observado no DM1 e em indivíduos acometidos por DM2 os níveis são similares aos dos não-diabéticos (Dake & Sora, 2016).

As mudanças no perfil lipídico do indivíduo são causadas pela hiperglicemia e resistência à insulina. A insulina é responsável por regular a atividade da enzima lipoproteína lipase, a qual é responsável pela hidrólise de triglicerídeos. Em situações como resistência à insulina, ocorre aumento plasmático de triglicerídeos e diminuição de HDL-colesterol (Jaiswal *et al.*, 2014). As alterações nos parâmetros de lipídeos representam o principal fator para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos (Wu & Parhofer, 2014).

Os lipídeos apresentam importantes funções na estrutura de membrana celular, sinalização intracelular e manutenção da energia. No entanto, o acúmulo, quando em excesso, de lipídeos em órgãos causa disfunção e morte celular (Brookheart *et al.*, 2009). Dentre os lipídeos de importância biológica estão os fosfolipídeos, o colesterol, os triacilgliceróis e os ácidos graxos. Os fosfolipídeos são importantes do ponto de vista fisiológico uma vez que formam a estrutura básica das membranas celulares (Lenoir *et al.*, 2007). O colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D, além de atuar na fluidez de membranas e na ativação de enzimas localizadas nas mesmas (Rozner & Garti, 2006). A grande parte do colesterol é biossintetizado principalmente dentro das células hepáticas. Apenas uma parte do colesterol circulante é proveniente da dieta, no entanto, a ingestão excessiva de colesterol pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, como consequência, desencadeia estresse oxidativo o que contribui para hipercolesterolemia (Hegele, 2009; Luo *et al.*, 2009). Os triglicerídeos, são formados por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol através de ligações ésteres, esses constituem uma das formas de armazenamento energético mais

importante no organismo e são depositados nos tecidos adiposo e muscular (Sposito *et al.*, 2007). Os ácidos graxos, por sua vez, são ácidos carboxílicos classificados em saturados, monoinsaturados e polinsaturados (Nelson & Cox., 2014).

O HDL-colesterol promove o transporte de lipídeos e lisofosfolípídios até o fígado. Além disso, metaboliza hidroperóxidos lipídicos prevenindo o acúmulo de LDL-colesterol, evitando formação de placas de ateromas (Soran *et al.*, 2015). Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que se desenvolve em resposta à agressão endotelial nas artérias (Sposito *et al.*, 2007). Isso ocorre em função do acúmulo de lipídeos e elementos fibrosos no lúmen de artérias e trata-se do fator mais importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Libby, 2002). Níveis plasmáticos elevados de LDL-colesterol são um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doença cardíaca isquêmica associada (Ramasamy, 2016).

As estatinas são empregadas no controle dos níveis de colesterol, além de aumentarem os níveis de HDL-colesterol que tem efeitos protetores cardiovasculares e reduzem a susceptibilidade de oxidação lipoproteica (Jain *et al.*, 2007). As estatinas compõem a classe de medicamentos de primeira escolha no tratamento de dislipidemia. No entanto, estima-se que 5-10% dos pacientes desenvolvem intolerância às estatinas em função de efeitos musculares (mialgia) ou aumento da creatina quinase (CK) (Ahmad, 2014). Outras classes de medicamentos também podem ser empregadas como fibratos, niacina, além de inibidores da produção de lipoproteínas, ácido biliar, ezetimibe, ômega 3 e extratos de espécies vegetais (Dominic, 2013; Tiwari & Khikhar, 2014).

Nutracêuticos e alimentos funcionais podem auxiliar no tratamento da dislipidemia. Muitos desses compostos agem por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (Scicchitano *et al.*, 2014). São reportadas mais de 40 substâncias utilizadas como auxiliares no controle do perfil lipídico. Entre os principais estão: fibras, berberina,

fitosteróis, soja, policosanol e levedura de arroz vermelho. Esses compostos agem aumentando os níveis de HDL-colesterol e reduzindo os níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides (Mannarino *et al.*, 2014).

Visto a importância de novas alternativas para controle de dislipidemia e a ampla distribuição de substâncias naturais com potencial efeito hipocolesterolêmico é relevante a investigação a fim de obtenção de substâncias que auxiliem no tratamento da dislipidemia. Muitos são os estudos que apontam as espécies vegetais como fontes potenciais de substâncias de interesse e como auxiliares no controle de dislipidemias. Ademais, os macrofungos também são explorados como agentes para diminuição do colesterol (Schneider *et al.*, 2011).

### **3.2 Macrofungos: características gerais e aplicações**

Os macrofungos, também conhecidos como cogumelos, pertencem ao reino Fungi. Dentre o mesmo, o filo Basidiomycota é o segundo maior e se destaca com aproximadamente 31515 espécies identificadas (Blackwell, 2011). A classe dos basidiomicetos possui expressivo potencial biotecnológico, principalmente para produção de enzimas, suplementos dietéticos, compostos ativos e na área de biorremediação (Ruthesa *et al.*, 2016). São descritas várias propriedades oriundas de basidiomicetos, entre elas, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, citostática, antialérgica, hipoglicemiante, antiaterogênica, anti-inflamatória e hepatoprotetora (Lindequist *et al.*, 2005).

Os cogumelos comestíveis são fontes importantes de nutrientes e de compostos bioativos além de possuírem sabor peculiar. O basidioma representa a estrutura que é conhecida como cogumelo, o micélio, por sua vez, trata-se de filamentos que produzem o basidioma sob condições favoráveis (Chang, 2008). Estudos sugerem que as

concentrações dos constituintes químicos diferem em relação as espécies de cogumelos e entre o basidioma e o micélio (Lo *et al.*, 2012).

Os macrofungos possuem quantidades consideráveis de proteínas, destacando-se a presença de aminoácidos essenciais, alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados, elevado teor de potássio e fósforo e baixa quantidade de lipídeos e sódio (Kozarski *et al.*, 2015). Esses vêm ganhando espaço no âmbito de alimentos funcionais, uma vez que estudos indicam que o consumo desses pode melhorar, prevenir ou auxiliar no tratamento de algumas doenças (Money, 2016).

Cogumelos contêm expressiva quantidade de polissacarídeos, como  $\beta$ -glucanos, os quais apresentam propriedades hipocolesterolemiantes e anticoagulantes. O consumo de cogumelo pode produzir efeito hipocolesterolêmico por diferentes mecanismos, tais como diminuição de VLDL-colesterol, melhorando o metabolismo lipídico, inibindo a atividade de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA) e, conseqüentemente, diminuindo o risco de desenvolvimento da aterosclerose (Guillamón *et al.*, 2010).

À diversas espécies de cogumelos é atribuído efeito hipocolesterolêmico, como por exemplo: *Pleurotus ostreatus* (Schneider, 2011) *Auricularia auricula* (Cheung, 1996), *Tremella fuciformis* (Cheung, 1996) e *Agaricus bisporus* (Fukushima *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2010). Este fato reforça a importância da pesquisa com cogumelos uma vez que esses são potenciais fontes de compostos bioativos que podem ser empregados como nutracêuticos, auxiliando no controle dos níveis de lipídeos. É possível que pacientes dislipidêmicos obtenham benefícios ao introduzir suplementos ou alimentos funcionais que interfiram no perfil lipídico. Esses ainda, são uma alternativa para pacientes os quais não é recomendado o tratamento convencional, como os intolerantes a estatinas, por exemplo (Mannarino *et al.*, 2014).

Um possível mecanismo de ação benéfico a partir do consumo de cogumelos é através da lovastatina. Esse composto é um metabólito secundário de cogumelos com propriedade de inibição de forma competitiva da enzima de HMG-CoA a qual está envolvida na biossíntese de colesterol (Chen *et al.*, 2012). A HMG-CoA redutase é a terceira enzima na via de biossíntese do colesterol e a primeira etapa limitante de velocidade, visto que as etapas anteriores são reversíveis. Essa enzima catalisa a redução de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-glutaril-CoA em mevalonato com oxidação de duas moléculas de NADPH (Mulder *et al.*, 2015).

A quitina (N-acetilglicosamina) é um componente estrutural presente nas paredes celulares dos fungos e por desacetilação parcial é produzido quitosana. A quitosana é classificada como fibra alimentar, atua na diminuição da absorção de colesterol e é empregada como alimento funcional por possuir atividade hipocolesteremiante (Nitschke *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos presentes em basidiomicetes possuem atividades biológicas, tais como antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória, antinociceptiva, antiviral, antioxidante, hipoglicemiantes e também efeitos hepatoprotetores (Ruthesa *et al.*, 2016).

Os cogumelos comestíveis também têm sido usados como fonte de antioxidantes. Entre os compostos com propriedades antioxidantes presentes nos macrofungos estão os polifenóis, polissacarídeos, vitaminas, carotenoides e minerais (Kozaleski *et al.*, 2015). Os antioxidantes possibilitam o controle da produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento das defesas antioxidantes intracelulares (Ceriello *et al.*, 2016). Os compostos antioxidantes e anti-inflamatórios presentes em cogumelos também podem contribuir para reduzir o risco de aterosclerose (Guillamón *et al.*, 2010).

### 3.2.1 *Pycnoporus* spp.

Dentre tantos basidiomicetos, destaca-se o gênero *Pycnoporus* sp., composto por quatro espécies: *Pycnoporus sanguineus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus puniceus* e *Pycnoporus coccineus*. Essas estão inseridas na ordem Aphyllophorales e pertencentes à família Polyporaceae (Baumer, 2009).

A espécie *P. sanguineus* é também conhecida como orelha-de-pau (Baumer, 2009). É comum sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais (Lomascolo *et al.*, 2011). Tendo sido também isolada e identificada no Rio Grande do Sul (Rosa, 2013). É um fungo de crescimento lento, responsável pela podridão branca de madeiras mortas. Relata-se a sua utilização na medicina popular por tribos indígenas das Américas e da África para o tratamento de várias doenças (Smânia *et al.*, 2003). A atividade antimicrobiana de *P. sanguineus* é conhecida desde 1946, quando foi isolado o poliporin, um composto que age frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e não tóxico em animais (Rosa *et al.*, 2003). A espécie *P. sanguineus* sintetiza diversos pigmentos que apresentam a estrutura básica 3-fenoxazona. Dentre os pigmentos, a cinabarina mostra atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Smânia *et al.*, 1997).

O micélio de *P. sanguineus* cultivado em meio líquido apresenta promissora atividade antioxidante, sendo a mesma atribuída à produção de compostos do metabolismo secundário que possuem capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno (Borderes *et al.*, 2011). Exopolissacarídeos produzidos em cultivo líquido por *P. sanguineus* apresentam potencial atividade antioxidante com alta capacidade de varredura dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e hidroxil ( $\bullet\text{OH}^\cdot$ ) (Cao *et al.*, 2015).

Estudos reportam o emprego de *P. sanguineus* em diferentes áreas biotecnológicas, especialmente na produção de enzimas como invertase (Quiroga *et al.* 1995),  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucosidase (Siqueira *et al.*, 1997), exo-poligalacturonase (Quiroga *et al.*, 2009), lignina peroxidase (Sharma *et al.*, 2011), celulases e xilanases (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011).

Apresenta também atividade leishmanicida que foi atribuída ao composto ergosterol-5,8-endoperoxido obtido do extrato do basidioma de *P. sanguineus* (Correa *et al.*, 2006). A partir do extrato de proteína de *P. sanguineus* foi produzida nanopartícula de ouro a fim de degradação de 4-nitroanilina, um contaminante (Shi *et al.*, 2015). Em cultivo líquido de *P. sanguineus* foi produzida a enzima tirosinase com finalidade de bioconversão de p-tirosol em hidroxitirosol e ácido p-cumárico em ácido cafeico (Halaouli *et al.*, 2005). A vanilina, um produto empregado na indústria farmacêutica e alimentícia, foi produzida por *P. sanguineus* em condição de fermentação empregando como precursor o ácido vanílico. Ademais verificou-se correlação entre a produção de vanilina e lacase (Pacheco *et al.*, 2013).

Todavia, outros estudos reportam a produção de enzimas por *P. sanguineus* com emprego na área ambiental. Destaca-se as lacases que são enzimas capazes de oxidar anéis fenólicos em radicais fenoxílicos com potencial aplicabilidade, principalmente na área de biorremediação (Garcia, 2013). Em um estudo foi demonstrada a produção de lacase por *P. sanguineus* que apresenta alto poder redutor com aplicabilidade em biocombustíveis (Fokina *et al.*, 2015).

Outro emprego de lacase purificada advinda de cultivo submerso de *P. sanguineus* é na bioconversão da rutina em oligômeros com maior atividade antioxidante e com aplicabilidade farmacêutica e cosmética (Uzan *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos reportam o emprego da espécie *P. sanguineus* na área de bioprocessos, alguns estudos sugerem que esse possui potencial atividade biológica, mas poucas pesquisas *in vivo* têm sido realizadas. Nesse sentido, a busca por substâncias naturais eficazes em reduzir os níveis de colesterol e de radicais livres se faz necessária. Portanto, as propriedades e particularidades dos macrofungos, aliadas a seu potencial hipolipidêmico, tornam os mesmos alvos importantes de pesquisa para os eventos associados à hiperlipidemia.

### **3.3 *Pinus* sp.: características gerais e aplicações**

Inserido na família Pinaceae, o gênero *Pinus* sp. engloba aproximadamente 110 espécies incluídas no grupo das gimnospermas (Syring *et al.*, 2005). As árvores do gênero *Pinus* sp. são originárias do hemisfério Norte e há mais de 60 anos foram introduzidas no Sul do Brasil a fim de reflorestamento para a produção de energia, de madeira, e para a indústria de papel e celulose. Atualmente, o Brasil possui uma das maiores áreas cultivadas do mundo (Pacheco *et al.*, 2009; Bernardes, 2014).

Reporta-se a presença de compostos ativos isolados a partir de diferentes espécies de *Pinus* sp. sendo atribuído aos mesmos efeito anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, antimutagênico e antitumoral. Os óleos de *Pinus* sp. são amplamente empregados como fragrâncias em cosméticos, aditivos e aromatizantes para alimentos e bebidas, além de servirem como intermediários para síntese de produtos (Politeo *et al.*, 2011).

A atividade antimicrobiana de *P. densiflora*, *P. thunbergii* e *P. rigida* foi avaliada frente a diversas espécies de micro-organismos. Os óleos essenciais das três espécies apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias como *Salmonella enteritidis* e

*Pseudomonas aeruginosa*, além de outras bactérias Gram-negativas. A atividade reportada é atribuída ao constituinte majoritário dos óleos, o  $\alpha$ -humulene (Kim *et al.*, 2013). Em outra pesquisa, foi avaliado o potencial biológico de óleos essenciais das resinas de *P. brutia* e *P. pinea*. Os compostos majoritários encontrados nos óleos de ambas as espécies foram  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e cariofileno e os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como atividade inseticida e antioxidante (Zeynep *et al.*, 2014). A análise da composição química dos óleos essenciais de *P. ponderosa*, *P. resinosa* e *P. strobus* indicou que  $\beta$ -pineno foi o composto majoritário em *P. resinosa* e *P. ponderosa* com teor de 42,4% e 45,7%, respectivamente. Para a espécie *P. strobus* destaca-se a presença de  $\alpha$ -pineno com teor de 17,7%. A atividade antifúngica foi investigada frente as espécies *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* e *Fusarium poae*, sendo que a espécie *Pinus ponderosa* apresentou maior atividade antifúngica a qual foi atribuída à sua composição química (Baranowska *et al.*, 2002).

Ao analisar as sementes de *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. canariensis*, Kadri *et al.* (2015) demonstraram que as mesmas são constituídas majoritariamente de lipídeos, proteína, além de apresentarem elementos como fósforo, potássio e magnésio. Sendo que os principais ácidos graxos insaturados presentes foram o ácido linoleico e ácido oleico e o principal ácido graxo saturado foi ácido palmítico. Em relação aos compostos voláteis, destaca-se o limoneno com maior teor. Kadri *et al.* (2014) verificaram que os lipídeos, glicolipídios e fosfolipídios de sementes de *Pinus halepensis* possuem atividade antiangiogênica, além de não apresentarem efeito tóxico em diferentes linhagens de células neoplásicas.

O extrato de *P. densiflora* é um potencial agente protetor de danos causados por radiação UVB em modelo utilizando fibroblastos de pele humana. O extrato apresenta

atividade antioxidante e inibe a atividade de elastase *in vitro* e aumenta a expressão de pró-colágeno (Jung *et al.*, 2014).

A serragem de *Pinus* sp. pode ser empregada para produção de cogumelos constituindo uma alternativa de reaproveitamento de resíduos da indústria madeireira (Croan, 2000). Um exemplo é o emprego da serragem como substrato para cultivo, em estado sólido, de cogumelos a fim de produção de enzimas, como lacase e manganês peroxidase (Camassola *et al.*, 2013).

Grande parte dos estudos relacionam os compostos obtidos de *Pinus* sp. com atividades biológicas, destacando-se a atividade antimicrobiana em função da presença de substâncias voláteis. Visto que a serragem de *Pinus* sp. pode ser empregada como substrato para produção de cogumelos, estudos adicionais referentes à sua composição e atividade se fazem importantes. São escassos os relatos a respeito dos efeitos de *Pinus* sp. *in vivo*, especialmente em modelos animais.

Diante das informações, pesquisas acerca do diabetes, principalmente no aspecto terapêutico, se fazem importantes tendo em vista os impactos em termos de qualidade de vida dos indivíduos diabéticos, assim como os gastos em saúde pública. A busca por novas alternativas de tratamento do diabetes torna as fontes naturais, como espécies vegetais e cogumelos, importantes alvos de pesquisa. Considerando que são escassos os estudos na literatura que avaliem os efeitos das espécies *P. sanguineus* e *Pinus* sp. sobre o metabolismo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, torna-se fundamental a investigação no sentido de elucidação das atividades biológicas das mesmas.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado:

**Efeito hipolipemiante da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina**

Giovana Rech<sup>a,b,\*</sup>; Larissa Lopes da Silva<sup>a</sup>; Keoma da Silva<sup>b</sup>; Roselei Claudete Fontana<sup>a</sup>; Matheus Parmegiani Jahn<sup>b</sup>; Marli Camassola<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enzimas e Biomassas, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>b</sup> Universidade de Caxias do Sul – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Fisiologia, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brasil.

\*Autor correspondente:

Giovana Rech – Universidade de Caxias do Sul – Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Caxias do Sul, Rio Grande do Sul – Fone: +55 54 32182076

e-mail: [grech6@ucs.br](mailto:grech6@ucs.br)

## Resumo

A hiperglicemia e a resistência à insulina, observadas no diabetes *mellitus* não controlado, desencadeiam, entre outras consequências, mudanças no perfil lipídico dos indivíduos acometidos pela condição. Diferentes compostos têm sido testados para auxiliar no tratamento das complicações causadas pelo diabetes *mellitus*, inclusive os advindos de fontes naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação em dieta com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Ratos Wistar machos controles (saudáveis) e diabéticos, induzidos por estreptozotocina, foram tratados com rações suplementadas com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e serragem *Pinus* sp. durante quatro semanas. Não foram observados efeitos benéficos da suplementação nos parâmetros hematológicos. Nos grupos de ratos diabéticos tratados com ração suplementada com *P. sanguineus* e com ração suplementada com *Pinus* sp, houve diminuição significativa dos níveis séricos de colesterol total em 20,64% e 15,42%, de colesterol não-HDL em 33,53% e 38,43% e de triglicédeos em 69,81% e 70,03%, respectivamente. Simultaneamente, houve aumento significativo do nível sérico de HDL-colesterol em 12,57% no grupo de ratos diabéticos que recebeu dieta formulada com serragem de *Pinus* sp. Os resultados indicam que a serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e o meio de cultivo, serragem de *Pinus* sp., se apresentam como potenciais agentes no controle da dislipidemia associada ao diabetes.

**Palavras-chave:** *Pycnoporus*, *Pinus*, diabetes, dislipidemia, triglicédeos, ratos

## **1. Introdução**

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de disfunções metabólicas que se caracteriza por problemas relacionados com a secreção e/ou ação da insulina e que resultam em hiperglicemia, podendo desencadear complicações no sistema cardiovascular, neuropatia, nefropatia e retinopatia (ADA, 2014). Atualmente estima-se que 415 milhões de pessoas sejam acometidas pelo diabetes em todo o mundo e que em 2040 o número aumente para 642 milhões (IDF, 2016).

A hiperglicemia e, principalmente, a resistência à insulina são responsáveis por desencadear alterações lipídicas no diabetes. Isso ocorre, pois, a insulina regula a quantidade de ácidos graxos livres e está envolvida na produção e secreção de VLDL-colesterol (Wu & Parhofer, 2014). No diabetes não tratado, a dislipidemia se caracteriza por níveis elevados de triglicerídeos, diminuição do HDL-colesterol, predominância de partículas menores e densas de LDL-colesterol e aumento de LDL-colesterol (Dake & Sora, 2016).

Há uma crescente busca por novos compostos para o tratamento de doenças como o diabetes, especialmente os advindos de fontes naturais. Adicionalmente, sugere-se que alimentos funcionais e nutracêuticos possam auxiliar no tratamento convencional (Bahadoran et al., 2013). No que diz respeito às fontes naturais, há anos os cogumelos são empregados em tratamentos de doenças por possuírem inúmeras propriedades biológicas e por serem uma fonte importante de compostos bioativos (Lindequist et al., 2005). O consumo de cogumelos pode produzir efeito hipocolesterolêmico por meio de diferentes mecanismos. Isso ocorre em função da sua composição caracterizada por conteúdo expressivo de fibras, proteínas e de compostos bioativos como polissacarídeos e antioxidantes (Guillamón et al., 2010).

Pertencente à família Polyporaceae, a espécie *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto com potencial emprego na área biotecnológica principalmente na área de bioprocessos. É um macrofungo produtor de enzimas como as lacases e de pigmentos como a cinabarina que possui conhecida atividade antimicrobiana (Lomascolo et al., 2011; Smânia et al., 1997).

A serragem de *Pinus* sp. é um resíduo da indústria madeireira e por ser um substrato lignocelulósico pode ser reaproveitado para a produção de micélio e cogumelo, inclusive *P. sanguineus* (Gambato et al., 2016). Inserido na família Pinaceae o gênero *Pinus* sp. é caracterizado por diferentes espécies que apresentam atividade antimicrobiana (Kim et al., 2013; Zeynep et al., 2014), bem como atividade antiangiogênica (Kadri et al., 2014) e antioxidante (Jung et al., 2014).

Sendo almejada a descoberta por novas substâncias que possam atuar no tratamento do diabetes, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do micélio de *P. sanguineus* cultivado em estado sólido em meio formulado com serragem de *Pinus* sp. e da serragem de *Pinus* sp., isoladamente, sobre o metabolismo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Reagentes**

Estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Company), Kits bioquímicos colorimétricos (Labtest Diagnóstica S.A.): ALT, AST, HDL, LDL, Colesterol total, Albumina, Glicose e Triglicerídeos. Todos os outros reagentes e solventes foram obtidos a partir de *Sigma Chemical Company*. Todos os produtos químicos utilizados foram de grau CLAE.

## **2.2 Coleta do macrofungo**

A espécie *Pycnoporus sanguineus* 14G foi coletada no município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. A autorização especial de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético está sob o processo número 02001.007656/2012-11, no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

## **2.3 Produção da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus***

O micélio isolado foi repicado em placas de Petri em meio de manutenção constituído por 2% de serragem moída, 2% de farelo de trigo moído, 0,2% de carbonato de cálcio e 2% de ágar (Camassola et al., 2013). Os meios foram incubados a 24°C por 7 a 10 dias até o completo crescimento do micélio na placa. Após, os micélios de *P. sanguineus* crescidos em placa foram inoculados em sistemas de crescimento contendo 1,5 kg de meio de produção de micélio. O meio foi constituído por 94% de serragem de *Pinus* sp., 5% de farelo de trigo e 1% (m/m) de carbonato de cálcio. A umidade foi ajustada para 66% e os sistemas de crescimento foram mantidos sob abrigo de luz, com temperatura (20±2°C) e com umidade controladas (50-80%) (Gambato et al., 2016).

## **2.4 Preparação das rações**

A serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e a serragem de *Pinus* sp., foram secas em estufa a ±80°C por 3 a 5 dias para desidratação e foram utilizados para suplementar rações padronizadas para ratos. A ração normal (comercial) foi produzida por Nuvilab (Curitiba, Paraná, Brasil). As rações suplementadas com 20% de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e 20% de serragem de *Pinus* sp. foram preparadas pela empresa Pragsoluções Biociências (Jaú, SP, Brasil). As formulações foram acondicionadas em temperatura ambiente (22±2°C), ao abrigo da luz e umidade até o momento do uso.

## **2.5 Composição centesimal do micélio, da serragem e das rações**

As rações, assim como o micélio de *P. sanguineus* crescido em serragem e a serragem de *Pinus* sp. foram avaliadas quanto a composição centesimal, sendo determinado umidade, carboidratos, lipídeos, proteínas, fibras e cinzas (AOAC, 2011; IAL, 2008).

## **2.6 Determinação dos compostos fenólicos e cafeína**

Foi empregado 1 g de amostra de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus*, de serragem de *Pinus* sp., das rações comercial e suplementadas e adicionado 10 mL de água destilada a 100°C. A suspensão foi mantida sob agitação durante 30 minutos. Após, a mistura foi centrifugada a 3220xg por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana 0,22 µm. A análise foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando coluna C-18 e fase móvel constituída de água/ácido acético/metanol (80:5:15) e fluxo de 0,4mL/min a 30°C e leitura em 280nm. Foram empregados os padrões ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína, ácido p-cumárico e ácido ferúlico (Puttaraju et al., 2006).

## **2.7 Animais**

Ratos Wistar machos com 60 dias de idade, adquiridos do Biotério Central da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), foram mantidos no biotério do laboratório de Fisiologia da Universidade de Caxias do Sul sob temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso a comida e água.

### **2.7.1 Comissão de ética**

Todo o experimento seguiu o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” desenvolvido pelo *Institute of Laboratory Animal Research* (National Academic Press: Washington, 2011) de acordo com as recomendações do Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal e da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul, sob o número 013/2015.

### **2.7.2 Indução do diabetes**

A indução do diabetes foi realizada por meio de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Company) na dose de 65mg/kg. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01 mol/L pH 4,5) e ácido cítrico (0,01 mol/L pH 4,5) e injetada logo após a diluição (Radenković et al., 2016). Os animais controle receberam o mesmo volume da solução tampão (2 mL/kg). Após 72 horas, a glicemia foi medida com glicosímetro ACCU-CHEK e foram considerados diabéticos os ratos que apresentava concentração de glicose plasmática superior a 200 mg/dL segundo Al-Malki & El Rabey (2015).

## **2.8 Desenho experimental**

Após a indução do diabetes, os animais foram divididos em seis grupos experimentais compostos por seis ratos cada. Os grupos controles (CTR-N, CTR-Pinus e CTR-Pyc) e os grupos diabéticos (DBT-N, DBT-Pinus e DBT-Pyc) foram tratados durante 4 semanas empregando dieta não suplementada (Ração), dieta suplementada com 20% de serragem de *Pinus* sp. (Ração + Pinus) e dieta suplementada com 20% de micélio de *P. sanguineus* (Ração + Pyc). O consumo de ração e água pelos animais bem como o peso corpóreo foram acompanhados semanalmente.

### **2.8.1 Obtenção do soro**

Após o término do protocolo experimental, amostras de sangue troncular foram coletadas em seguida da decapitação e armazenadas em tubos contendo anticoagulante EDTA para análise hematológica e em tubos sem anticoagulante que foram centrifugadas por 10 minutos a 2012xg para análise bioquímica.

### **2.8.2 Índice renal e hepático**

Foram retirados e pesados os rins e o fígado para determinação dos índices renais e hepáticos que foram calculados a partir do peso do órgão dividido pelo peso do animal multiplicado por 100. Esse dado expressa o peso do órgão proporcionalmente ao peso do animal.

### **2.8.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Foram avaliados os parâmetros bioquímicos mediante análise das concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, fração não-HDL (calculada a partir da diferença entre o colesterol total e HDL-colesterol, correspondendo ao LDL-colesterol e VLDL-colesterol), triglicerídeos, albumina e glicose. Foram avaliadas as dosagens das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), indicadoras de função hepática. Esses parâmetros foram determinados utilizando kits enzimáticos comerciais (Labtest Diagnóstica) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom). Os parâmetros hematológicos foram avaliados por meio da contagem de células sanguíneas em analisador hematológico (SDH-3 VET, Labtest Diagnóstica).

### **2.9 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos das análises de composição das rações estão apresentados em médias e desvio padrão e os resultados das análises dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos grupos experimentais estão apresentados em médias e erro padrão da média. Os resultados foram analisados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram distribuição normal. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada com o teste de *Tukey*. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $p < 0,05$ . Para o tratamento estatístico foi utilizado o software *SigmaStat*, versão 3.5.

### 3. Resultados

O completo crescimento do micélio de *P. sanguineus* cultivado em serragem de *Pinus* sp. ocorreu após 45 dias da realização do inóculo. Do conteúdo de macronutrientes, as fibras foram os constituintes majoritários na serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus*. e na serragem de *Pinus* sp. Nas formulações suplementadas, as fibras e os carboidratos foram os compostos presentes em maior teor. O valor calórico das rações suplementadas foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao da ração normal (comercial) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição calórica e centesimal da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* (micélio), da serragem de *Pinus* sp. (serragem), da ração comercial não suplementada (Ração), da ração suplementadas com 20% de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* (Ração + *Pyc*) e ração suplementadas com 20% de serragem de *Pinus* sp. (Ração + *Pinus*)

	Serragem	Micélio	Ração	Ração + <i>Pinus</i>	Ração + <i>Pyc</i>
<b>Carboidrato** (%)</b>	3,39±1,22 <sup>a</sup>	6,13±0,75 <sup>a</sup>	32,68±1,52 <sup>b</sup>	33,12±0,89 <sup>b</sup>	28,74±1,58 <sup>b</sup>
<b>Umidade (%)</b>	4,93±0,65 <sup>a</sup>	5,78±0,13 <sup>a</sup>	10,27±0,60 <sup>b</sup>	4,88±0,23 <sup>a</sup>	4,93±0,05 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (%)</b>	1,18±0,50 <sup>c</sup>	2,19±0,32 <sup>c</sup>	9,10±0,30 <sup>a</sup>	5,19±0,25 <sup>b</sup>	5,24±0,24 <sup>b</sup>
<b>Fibra alimentar (%)</b>	84,04±0,52 <sup>a</sup>	78,48±1,81 <sup>a</sup>	17,24±4,15 <sup>c</sup>	31,93±1,24 <sup>b</sup>	33,65±0,06 <sup>b</sup>
<b>Proteína (%)</b>	1,18±0,05 <sup>c</sup>	1,73±0,05 <sup>c</sup>	18,18±0,06 <sup>a</sup>	15,55±0,26 <sup>b</sup>	16,20±0,69 <sup>b</sup>
<b>Lipídeo (%)</b>	5,28±1,67 <sup>a</sup>	5,69±1,18 <sup>a</sup>	12,53±1,18 <sup>b</sup>	9,33±0,70 <sup>ab</sup>	11,24±1,81 <sup>ab</sup>
<b>VL (kcal)</b>	65,80±1,57 <sup>a</sup>	82,77±1,23 <sup>b</sup>	315,81±0,98 <sup>d</sup>	278,65±1,67 <sup>c</sup>	280,92±0,86 <sup>c</sup>

Fator de conversão do nitrogênio em proteína: 4,38 \*\* Carboidrato = 100-(% umidade + % proteína + % de lipídeo + % cinzas + fibra) VL valor calórico: Energia (kcal) = 4 × (g proteína + g carboidrato) + 9 × g gordura; Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa na mesma linha ( $p < 0,05$ ).

Foi evidenciada a presença de diferentes compostos fenólicos em todas as amostras. Destaca-se que no meio onde ocorreu desenvolvimento do micélio houve incremento nas concentrações de ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido p-cumárico em relação ao meio sem desenvolvimento micelial (serragem). O ácido gálico foi o composto fenólico detectado em maior teor nas duas formulações suplementadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Compostos fenólicos e cafeína presentes na serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus*, na serragem de *Pinus* sp., na ração não suplementada (Ração), na ração suplementada com 20% de serragem de *Pinus* sp. miceliada com *Pycnoporus sanguineus* (Ração + *Pyc*) e na ração suplementada com 20% de serragem de *Pinus* sp. (Ração + *Pinus*)

	Serragem	Micélio	Ração	Ração + <i>Pinus</i>	Ração + <i>Pyc</i>
Ácido gálico	0,210±0,0004 <sup>d</sup>	0,192±0,0009 <sup>d</sup>	0,234±0,001 <sup>cd</sup>	0,377±0,002 <sup>a</sup>	0,347±0,008 <sup>b</sup>
Catequina	0,158±0,0012 <sup>b</sup>	0,183±0,013 <sup>b</sup>	0,241±0,016 <sup>a</sup>	0,178±0,011 <sup>b</sup>	0,234±0,012 <sup>a</sup>
Ácido Clorogênico	0,175±0,00002 <sup>c</sup>	0,251±0,006 <sup>a</sup>	0,213±0,002 <sup>b</sup>	0,220±0,001 <sup>b</sup>	0,222±0,001 <sup>b</sup>
Ácido Cafeico	0,014±0,0025 <sup>b</sup>	0,083±0,008 <sup>a</sup>	0,069±0,004 <sup>a</sup>	0,025±0,003 <sup>b</sup>	0,022±0,008 <sup>b</sup>
Ácido p-cumárico	0,083±0,0003 <sup>b</sup>	0,127±0,009 <sup>a</sup>	0,081±0,0004 <sup>b</sup>	0,083±0,0006 <sup>b</sup>	0,089±0,0007 <sup>b</sup>
Ácido Ferúlico	0,118±0,00 <sup>a</sup>	nd*	0,119±0,0002 <sup>a</sup>	0,118±0,0004 <sup>a</sup>	0,118±0,0002 <sup>a</sup>
Cafeína	0,050±0,0007 <sup>a</sup>	0,047±0,00002 <sup>b</sup>	0,048±0,00005 <sup>ab</sup>	0,049±0,0001 <sup>ab</sup>	0,048±0,0009 <sup>ab</sup>

Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa na mesma linha ( $p < 0,05$ ); nd: não detectado

O consumo de ração e água pelos animais foi significativamente superior ( $p < 0,050$ ) nos grupos diabéticos DBT-N, DBT-Pinus e DBT-Pyc em comparação aos grupos controles CTR-N, CTR-Pinus e CTR-Pyc. No entanto, a variação de peso corpóreo nos grupos diabéticos DBT-N, DBT-Pinus e DBT-Pyc foi significativamente inferior ( $p < 0,050$ ) aos dos grupos controle CTR-N, CTR-Pinus e CTR-Pyc. Os valores de índice hepático e renal foram significativamente superiores ( $p < 0,050$ ) nos grupos diabéticos DBT-N, DBT-Pinus e DBT-Pyc em comparação aos grupos controles CTR-N, CTR-Pinus e CTR-Pyc, sendo que não houve interferência do tratamento (Tabela 3).

**Tabela 3.** Consumo de líquido e ração, variação de peso, índice renal e índice hepático nos diferentes grupos

	CRT-N	CRT-Pinus	CRT-Pyc	DBT-N	DBT-Pinus	DBT-Pyc
CL (mL)	42,83±1,40 <sup>a</sup>	44,79±1,33 <sup>a</sup>	47,71±1,41 <sup>a</sup>	143,06±10,74 <sup>c</sup>	127,79±3,34 <sup>b</sup>	142,15±7,24 <sup>bc</sup>
C R (g)	24,17±0,81 <sup>a</sup>	30,81±1,51 <sup>b</sup>	28,69±1,22 <sup>ab</sup>	38,65±1,54 <sup>c</sup>	37,17±0,79 <sup>c</sup>	40,94±1,13 <sup>c</sup>
Δ P (g)	111,50±5,69 <sup>a</sup>	106,67±2,10 <sup>a</sup>	110,50±7,09 <sup>a</sup>	-33,33±12,56 <sup>b</sup>	-65,17±11,11 <sup>c</sup>	-53,33±9,72 <sup>c</sup>
I H %	3,51±0,07 <sup>ab</sup>	3,18±0,07 <sup>a</sup>	3,35±0,08 <sup>a</sup>	4,06±0,11 <sup>c</sup>	3,84±0,06 <sup>c</sup>	3,81±0,03 <sup>bc</sup>
I R %	0,57±0,01 <sup>a</sup>	0,58±0,01 <sup>a</sup>	0,62±0,01 <sup>a</sup>	1,15±0,06 <sup>b</sup>	1,02±0,04 <sup>b</sup>	1,17±0,05 <sup>b</sup>

CL (mL): Consumo de líquido; CR (g): Consumo de ração; ΔP (g): Variação de peso; IH: Índice Hepático; IR: Índice Renal. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=6). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa na mesma linha ( $p < 0,05$ )

Em relação aos parâmetros hematológicos, houve diminuição significativa ( $p < 0,050$ ) dos leucócitos e eritrócitos, nos grupos DBT-Pinus e DBT-Pyc em relação ao DBT-N, indicando que o tratamento pode ter diminuído a contagem dessas células sanguíneas. Para os resultados da análise de plaquetas e hematócrito não foi evidenciada interferência benéfica do tratamento (Tabela 4).

**Tabela 4.** Dosagem dos parâmetros hematológicos nos diferentes grupos

	<b>CRT-N</b>	<b>CRT-Pinus</b>	<b>CRT-Pyc</b>	<b>DBT-N</b>	<b>DBT- Pinus</b>	<b>DBT-Pyc</b>
<b>Leucócitos (<math>10^9/L</math>)</b>	7,94±0,38 <sup>a</sup>	10,27±1,11 <sup>a</sup>	6,72±0,54 <sup>b</sup>	6,67±0,66 <sup>b</sup>	5,06±0,52 <sup>c</sup>	4,95±0,51 <sup>c</sup>
<b>Eritrócitos (<math>10^{12}/L</math>)</b>	9,21±0,04 <sup>a</sup>	8,99±0,07 <sup>b</sup>	8,74±0,17 <sup>c</sup>	8,81±0,12 <sup>bc</sup>	8,50±0,07 <sup>d</sup>	8,40±0,07 <sup>d</sup>
<b>Plaquetas (<math>10^9/L</math>)</b>	770,17±37,99 <sup>a</sup>	667,17±41,72 <sup>ab</sup>	626,67±20,31 <sup>ab</sup>	562,17±36,70 <sup>bc</sup>	471,33±35,49 <sup>c</sup>	506,17±35,49 <sup>bc</sup>
<b>Hematócrito (%)</b>	45,68±0,37 <sup>bc</sup>	44,81±0,76 <sup>c</sup>	43,62±0,40 <sup>d</sup>	47,09±0,46 <sup>a</sup>	45,86±0,61 <sup>b</sup>	44,37±0,48 <sup>cd</sup>

Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa na mesma linha ( $p < 0,05$ )

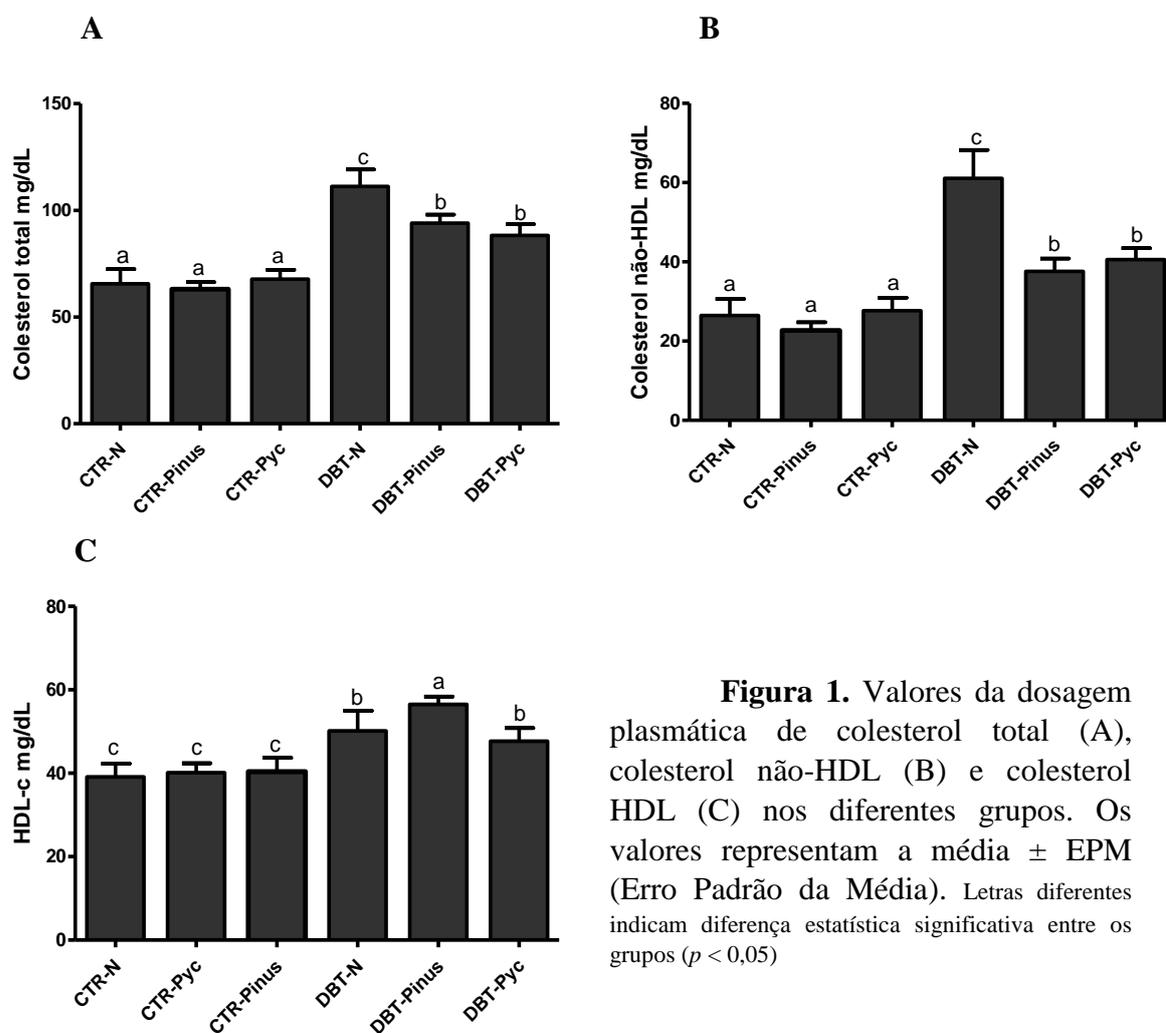
A suplementação resultou no aumento glicêmico significativo ( $p < 0,050$ ) nos grupos DBT-Pinus e DBT-Pyc em relação ao grupo DBT-N. A dosagem de albumina foi significativamente menor ( $P < 0,050$ ) nos grupos DBT-N, DBT-Pinus e DBT-Pyc em comparação aos respectivos controles CRT-N, CRT-Pinus e CRT-Pyc. Para os resultados das dosagens das enzimas transaminases (ALT e AST) não foi evidenciada interferência do tratamento (Tabela 4 e 5).

**Tabela 5** Dosagem sérica de Aspartato Amino Transferase, Alanina Amino Transferase, Albumina e Glicose

	<b>CRT-N</b>	<b>CRT-Pinus</b>	<b>CRT-Pyc</b>	<b>DBT-N</b>	<b>DBT-Pinus</b>	<b>DBT-Pyc</b>
<b>AST (U/L)</b>	134,07±8,50 <sup>ab</sup>	142,44±10,58 <sup>b</sup>	124,69±4,77 <sup>ab</sup>	110±8,42 <sup>ab</sup>	101,63±6,10 <sup>a</sup>	103,45±6,39 <sup>a</sup>
<b>ALT (U/L)</b>	45,46±3,28 <sup>ab</sup>	45,61±3,35 <sup>ab</sup>	40,81±2,62 <sup>ab</sup>	31,28±3,76 <sup>a</sup>	49,39±3,81 <sup>b</sup>	49,68±4,87 <sup>b</sup>
<b>Albumina (g/dL)</b>	2,73±0,09 <sup>a</sup>	2,57±0,17 <sup>ab</sup>	2,68±0,03 <sup>a</sup>	2,45±0,05 <sup>cb</sup>	2,40±0,06 <sup>cd</sup>	2,25±0,03 <sup>d</sup>
<b>Glicose (mg/dL)</b>	119,65±6,55 <sup>a</sup>	108,55±6,15 <sup>a</sup>	123,93±3,51 <sup>a</sup>	634,89±21,86 <sup>b</sup>	710,97±16,85 <sup>c</sup>	694,65±16,51 <sup>c</sup>

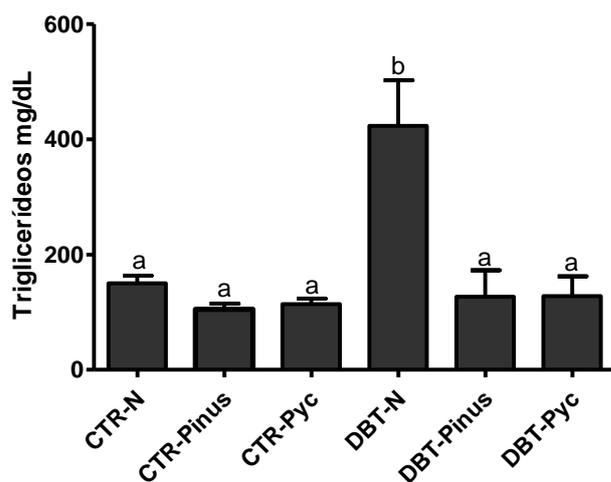
AST: Aspartato Amino Trasferase ALT: Alanina Amino Transferase Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa na mesma linha ( $p < 0,05$ )

Os níveis séricos de colesterol total nos grupos DBT-Pinus ( $94,07 \pm 3,89$  mg/dL) e DBT-Pyc ( $88,27 \pm 5,25$  mg/dL) diminuíram significativamente ( $p < 0,050$ ) após o tratamento, comparado ao grupo DBT-N ( $111,23 \pm 7,96$  mg/dL), bem como os níveis séricos de colesterol não-HDL nos grupos diabéticos tratados DBT-Pinus ( $37,59 \pm 7,95$ mg/dL) e DBT-Pyc ( $40,58 \pm 7,95$ mg/dL) que diminuíram significativamente ( $p < 0,050$ ) comparado ao grupo DBT-N ( $61,06 \pm 15,98$ mg/dL). Sendo que não houve diminuição do nível sérico de HDL-colesterol que, por sua vez, aumentou significativamente ( $p < 0,050$ ) no grupo DBT-Pinus ( $56,48 \pm 1,86$  mg/dL) em relação a DBT-N ( $50,17 \pm 4,83$ mg/dL) (Figura 1).



**Figura 1.** Valores da dosagem plasmática de colesterol total (A), colesterol não-HDL (B) e colesterol HDL (C) nos diferentes grupos. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ )

Os grupos diabéticos tratados apresentaram significativa redução ( $p < 0,050$ ) nos valores de triglicerídeos DBT-Pinus ( $126,91 \pm 45,91$  mg/dL) e DBT-Pyc ( $127,82 \pm 34,38$  mg/dL) a ponto de ficarem estatisticamente iguais aos grupos controles CTR-Pinus ( $104,91 \pm 9,80$  mg/dL) e CTR-Pyc ( $113,92 \pm 9,63$  mg/dL) em comparação com o grupo DBT-N ( $423,52 \pm 79,21$  mg/dL) (Figura 2).



**Figura 2** Valores da dosagem plasmática de triglicerídeos nos diferentes grupos. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (Erro Padrão da Média). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ )

#### 4. Discussão

A dislipidemia associada ao diabetes é um dos principais fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos (Wu & Parhofer, 2014). As estatinas compõem o principal tratamento farmacológico de dislipidemia que, embora seja seguro, desencadeia intolerância em uma parcela dos indivíduos tratados (Ahmad, 2014). Os fibratos são empregados para o tratamento da hipertrigliceridemia e frequentemente são associados às estatinas, muito embora essa combinação aumente o risco de efeitos adversos, especialmente miopatia e rabdomiólise (Wu & Parhofer, 2014). Há uma crescente busca por alternativas não farmacológicas para o tratamento de doenças

e estudos indicam que produtos de fontes naturais podem auxiliar no tratamento da dislipidemia e ainda prevenir o desencadeamento de doenças cardiovasculares (Cicero & Colletti 2016). Alguns cogumelos têm sido descritos como fontes de compostos hipolipemiantes (Guillamón et al., 2010) e a produção dos mesmos pode ser realizada empregando resíduos lignocelulósicos como a serragem de *Pinus* sp. Comparada a outras fontes de carbono, a serragem de *Pinus* sp. foi reportada como um dos melhores substratos para a produção de *P. sanguineus* nos aspectos de rendimento, eficiência biológica e produtividade (Gambato et al., 2016). A serragem de *Pinus* sp. é um resíduo da indústria madeireira e o aproveitamento da mesma se faz importante para reduzir impactos ambientais. Embora o teor de proteínas presente na serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* produzido para este estudo seja reduzido, o conteúdo de fibras é superior ao presente em outros basidiomas como *Agaricus bisporus* (Jeong et al., 2010), *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* (Bonatti et al., 2004). No diabetes, o consumo de fibras contribui de forma benéfica, uma vez que aumenta a sensibilidade à insulina, contribui com o controle do peso corporal e hiperlipidemia (Li & Uppal 2010). Os cogumelos comestíveis estão disponíveis sob a forma de basidioma. No entanto, é possível a obtenção de compostos de interesse também no micélio o qual diminui o tempo e custo de produção. Entretanto, ressalta-se que as concentrações dos constituintes químicos diferem entre as espécies de cogumelos e entre o basidioma e o micélio (Lo et al., 2012). Além disso, o substrato de crescimento interfere na composição química do cogumelo (Gambato et al., 2016).

Os compostos fenólicos detectados em maior teor na serragem miceliada e na serragem apresentaram diferentes teores nas respectivas rações suplementadas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de outros componentes da ração influenciarem no resultado de compostos fenólicos. O ácido gálico, presente em maior teor nas rações suplementadas,

pode ter contribuído para o efeito hipolipidêmico observado nos grupos diabéticos tratados. No estudo de Punithavathi et al (2011), foi atribuído ao ácido gálico atividades anti-hiperglicemia, antiperoxidação lipídica, antioxidante e antilipidêmica em ratos diabéticos. Adicionalmente, os polifenóis contribuem para a prevenção do estresse oxidativo e consequentes complicações do diabetes (Bahadoran et al., 2013).

A diminuição significativa dos leucócitos e eritrócitos evidenciada nos grupos diabéticos que receberam tratamento pode ser atribuída a condição diabética e alguma interferência do tratamento. Entretanto, os resultados da contagem dessas células estão dentro dos valores de referência normais para a espécie estudada (Lapchik et al., 2009; Lindstrom et al., 2015).

Não foi evidenciada atividade anti-hiperglicêmica com o tratamento nos grupos DBT-Pinus e DBT-Pyc. O aumento da glicemia nesses grupos, em relação ao DBT-N, pode ser atribuído a maior disponibilidade de substrato gliconeogênico, como o glicerol, advindo da oxidação de triglicerídeos, que possivelmente foi maior nesses grupos. A outras espécies de macrofungos é atribuída atividade antidiabética. O extrato aquoso da espécie *Pleurotus sajor-caju* apresenta atividade anti-hiperglicêmica a qual foi atribuída possivelmente aos  $\beta$ -glucanos (Ng et al., 2015), enquanto que para a espécie *Ganoderma lucidum*, a atividade hipoglicemiante foi atribuída aos polissacarídeos, triterpenóides, proteoglicanos e proteínas (Ma et al., 2015) e tanto o basidioma como o micélio cultivado em estado líquido de *Catathelasma ventricosum* produzem polissacarídeos com atividade antidiabética (Liu et al., 2013).

O tratamento com *P. sanguineus* e *Pinus* sp. não alterou os níveis de transaminases (ALT e AST) indicando que possivelmente a suplementação não causou danos hepáticos, diferente do tratamento com estatinas que pode desencadear elevação nos níveis de ALT e AST (Mckenney et al., 2006). Mesmo assim, os resultados de IH e IR indicam que a

suplementação não ofereceu proteção hepática e renal sendo que a hipertrofia desses órgãos pode ser atribuída a condição hiperglicêmica.

Observou-se que a suplementação causou interferência no metabolismo de lipídeos nos ratos diabéticos, apresentando significativo efeito hipolipidêmico no parâmetro dos triglicerídeos diminuindo em 69,81% no grupo DBT-Pyc e 70,03% no grupo DBT-Pinus em relação ao grupo DBT-N. A diminuição observada neste estudo é superior a relatada no estudo Jeong et al (2010) em que os níveis de triglicerídeos foram diminuídos em 39,1% após o tratamento de ratos diabéticos com *Agaricus bisporus*. É superior também a diminuição alcançada por tratamentos convencionais, como os fibratos que diminuem os níveis de triglicerídeos de 20 a 40% (Szapary & Rader, 2001).

Da mesma forma, houve diminuição do colesterol não-HDL nos grupos DBT-Pyc e DBT-Pinus em 33,53% e 38,43% e do colesterol total em 20,64% e 15,42%, respectivamente, em relação ao grupo DBT-N. Simultaneamente, houve aumento significativo dos níveis séricos de HDL-colesterol em 12,57% no grupo de ratos diabéticos que recebeu dieta formulada com serragem de *Pinus* sp. Estudos atribuem atividade hipolipidêmica às fibras presentes no basidioma dos macrofungos *Agaricus bisporus* (Fukushima et al., 2000), *Auricularia auricula* (Cheung, 1996; Chen et al., 2011) e *Tremella fuciformis* (Cheung, 1996). Outros estudos reportam atividade hipocolesterolêmica da espécie *Pleurotus ostreatus* em função da sua capacidade antioxidante (Hossain et al., 2003) bem como devido à presença de compostos como o ácido linoleico e o ergosterol (Schneider, 2011). Ainda, a atividade hipolipidêmica, atribuída à capacidade antioxidante, é descrita para a espécie *P. pinaster*, o qual a partir do extrato composto por procianidinas, catequina, taxifolina e outros ácidos fenólicos, é empregado no tratamento de desordens como obesidade, dislipidemia e diabetes (Gulati, 2015). Um dos possíveis mecanismos para a redução dos triglicerídeos é através da

ativação de receptores nucleares de expressão gênica de peroxissomas (PPAR- $\alpha$  - *Peroxisome proliferator-activated receptor*) o qual é também o mecanismo atribuído aos fibratos (Wu & Parhofer, 2014). PPAR- $\alpha$  é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos. Esse mecanismo é sugerido em estudos em que o aumento desses receptores é decorrente de agonistas como polissacarídeos presentes em *Pleurotus tuber-regium* (Huang et al., 2014), de constituintes do extrato metanólico de *Cantharellus cibarius* (Hong et al., 2012), bem como da composição química do extrato de *P. pinaster* (Bang & Choung, 2014).

A diminuição significativa do colesterol total e do colesterol não-HDL relacionada com os altos teores de fibras encontrados em ambas as formulações estudadas pode ser explicada pelo mecanismo relacionados aos ácidos biliares. As fibras são responsáveis por diminuir a reabsorção dos ácidos biliares da circulação entero-hepática o que aumenta a excreção fecal dos mesmos. Isso contribui para o aumento da conversão de colesterol hepático em ácidos biliares com consequente diminuição do colesterol sanguíneo (Cheung, 1996; Jeong et al., 2010; Guillamón et al., 2010).

Embora mais estudos sejam necessários, a partir dos dados verifica-se que a serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* apresenta propriedade hipolipemiante podendo ser atribuída à composição química. Visto que o substrato pode interferir na composição química do micélio, o mesmo também deve ser investigado em relação à sua atividade. Os mecanismos pelos quais o efeito hipolipidêmico das formulações suplementadas ocorreram não foram completamente esclarecidos. Neste estudo, além da serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus*, surpreendentemente, o próprio meio de cultivo, a serragem de *Pinus* sp. também se apresenta como um novo e potencial agente para tratamento de dislipidemia associada ao diabetes. Este trabalho torna-se relevante por apontar a potencial atividade no controle lipídico *in vivo* de um resíduo industrial, o

que contribui para o reaproveitamento e diminuição dos impactos ambientais e, também, de uma espécie de fungo até então pouco investigada.

## **5. Conclusão**

Este estudo demonstrou que a serragem miceliada com *P. sanguineus* e a serragem de *Pinus* sp. diminuíram significativamente os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e do colesterol não-HDL. Simultaneamente, a serragem de *Pinus* sp. promoveu também o aumento significativo dos níveis séricos do HDL-colesterol em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Os resultados obtidos são relevantes e podem contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos que auxiliem no controle de dislipidemia associada ao diabetes. Todavia, ressalta-se a importância de novas pesquisas a fim de verificar o exato mecanismo e os possíveis compostos envolvidos no efeito hipolipidêmico.

## **6. Agradecimentos**

Este trabalho teve como suporte o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e VITAMED Ltda.

## 7. Referências

- ADA - American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 37(1): 81-90.
- Ahmad, Z. (2014). Statin intolerance. *The American Journal of Cardiology*. 113(10): 1765-1771.
- Al-Malki, A. L., & El Rabey, H. A. (2015). The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *BioMed Research International*. 2015: 381040.
- AOAC - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (2011) AOAC. Washington.
- Bahadoram, Z., Mirmiram, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 12:43.
- Bang, C. Y., & Choung, S. Y. (2014). Enzogenol improves diabetes-related metabolic change in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 66: 875-885.
- Bonatti, M., Karnopp, P., Soares H. M., & Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*. 88: 425-428.
- Camassola, M., Rosa, L. O., Calloni, R., Gaio, T. A., & Dillon, A. J. P. (2013). Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. *Brazilian Journal of Microbiology*. 213(44): 207-213.
- Chen, G., Luo, Y. C., Ji, B. P., Li, B., Su, W., Xiao, Z. L., & Zhang, G. Z. (2011). Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice

- fed a cholesterol-enriched diet. *Journal of Food Science and Technology*. 48(6):692-698.
- Cheung, P. C. K. (1996). The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (Tree-ear) and *Tremella fuciformis* (White jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*. 16(10): 1721-1725.
- Cicero, A. F. G., & Colletti. A. (2016). Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: The available clinical data. *Phytomedicine*. 23: 1113-1118.
- Dake, A. W., & Sora, N. D. (2016). Diabetic Dyslipidemia Review: An Update on Current Concepts and Management Guidelines of Diabetic Dyslipidemia. *American Journal of the Medical Sciences*. 351(4): 361:365.
- Fukushima, M., Nakano, M., Morii, Y., Ohashi, T., Fujiwara, Y., & Sonoyama, K. (2000). Hepatic LDL Receptor mRNA in Rats Is Increased by Dietary Mushroom (*Agaricus bisporus*) Fiber and Sugar Beet Fiber *Journal of Nutrition*.130:2151-2156.
- Gambato, G., Todescato, K., Pavão, E. M., Scortegagna, A.; Fontana, R. C.; Salvados, M.; & Camassola, M. (2016). Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus* *Bioresource Technology*. 207: 46-51.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 81: 715-723.
- Gulati, O. P. (2015). Pycnogenol® in Metabolic Syndrome and Related Disorders. *Phytotherapy Research*. 29: 949-968.

- Hong, S. S., Lee, J. H., Jeong, W., Kim, N., Jin, H. Z., Hwang, B. Y., Lee, H. J., Lee, S. J., Jang, D. S., Jang, D. S., & Lee, D. (2012). Acetylenic acid analogues from the edible mushroom Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and their effects on the gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22: 2347-2349.
- Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E. K., Alam, N., Hussain, S., Hasan, M., Choudhury, S. K., & Mahmud, I. (2003). Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30: 470-475.
- Huang, H. Y., Korivi, M., Yang, H. T., Huang, C. C., Chaing, Y. Y., & Tsai, Y. C. (2014). Effect of *Pleurotus tuber-regium* Polysaccharides Supplementation on the Progression of Diabetes Complications in Obese-Diabetic Rats. *The Chinese Journal of Physiology*. 57(4): 198-204.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1ª ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- IDF -International Diabetes Federation (2016). IDF Atlas (6th ed.). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation (<http://www.idf.org/diabetesatlas>).
- Jeong, S. C., Jeong, Y. T., Yang, B. K., Islamb, R., Koyyalamudia, S. R., Panga, G., Choa, K. Y., & Song, C. H. (2010). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*. 30: 49-56.
- Jung, H. Y., Shin, J. C., Park, S. M., Kim, N. R., Kwak, W., & Choi, B. H. (2014). *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression. *Toxicology Reports*. 1: 658–666.

- Kadri, N., Khettalb, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Zaidib, R. Y.; Montero, V. B., & Jean-Louis Montero, J. L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. Seeds. *Industrial Crops and Products*. 54: 6-12.
- Kim, H., Lee, B., & Yun, K. W. (2013). Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Pinus* species. *Industrial Crops and Products*. 44: 323-329.
- Lapchik, V. B. V., Mattaraia, V. G. M., & Ko, G. M. (2009). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Ed. Athneu.
- Li, C., & Uppal, M. (2010). Clinical Update on Dietary Fibre in Diabetes: Food Sources to Physiological Effects. Canadian Diabetes Association National Nutrition Committee. *Canadian Journal of Diabetes*. 34(4): 355-361.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2(3): 285-299.
- Lindstrom, N. M., Moore, D. M., Zimmerman, K., & Smith, S. A. (2015) Hematologic assessment in pet rats, mice, hamsters, and gerbils: blood sample collection and blood cell identification. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 18(1):21-32.
- Liu, Y., Sun, J., Rao, S., Shengqi, R., Su, Y., Li, J., Li, C., Xu, S., & Yang, Y. (2015). Antidiabetic activity of mycelia selenium-polysaccharide from *Catathelasma ventricosum* in STZ-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*. 62: 285-291.
- Lo, Y. C., Lin, S. Y., Ulzjargal, E., Chen, S. Y., Chien, R. C., Tzou, Y. J., & Mau, J. L. (2012). Comparative Study of Contents of Several Bioactive Components in

- Fruiting Bodies and Mycelia of Culinary-Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 14(4): 357-363.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J., & Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92: 1129-1149.
- Ma, H. T., Hsieh, J., & Chen, S. T. (2015). Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. 114: 109-113.
- McKenney, J. M., Davidson, M. H., Jacobson, T. A., & Guyton, J. R. (2006). Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. *American Journal of Cardiology*. 97(8): 89-94.
- Ng, S. H., Zain, M. S. M, Zakaria, F., Ishak, W. R. W., & Ahmad, W. A. N. W. (2015). Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of *Pleurotus sajor-caju* Aqueous Extract in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *BioMed Research International*. 2015:214918.
- Punithavathi, V. R., Prince, P. S. M., Kumar, M. R., & Selvakumari, C. J. (2011). Protective Effects of Gallic Acid on Hepatic Lipid Peroxide Metabolism, Glycoprotein Components and Lipids in Streptozotocin-Induced Type II Diabetic Wistar Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 25:2.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 9764-9772.
- Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 78: 13-31.

- Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Kring, U., Berger, R. G., & Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*. 17-24.
- Smânia, E. F. A., Smânia, A., Loguercio-Leite, C., & Gil, M. L. (1997). Optimal Parameters for Cinnabarin Synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 70: 57-59.
- Szapary, P. O., & Rader, D. J. (2001) Pharmacological management of high triglycerides and low high-density lipoprotein cholesterol. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:113-120.
- Wu, L., & Parhofer, K. G. (2014). Diabetic dyslipidemia. *Metabolism*. 63: 1469-1479.
- Zeynep, U., Salih, K., Fuat, B., 1, Burhan, A., Selim, E., Menderes, C., & Göksin, K. M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12(12): 901-910.

## 8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no estudo foi possível concluir que:

- foi possível produzir micélio de *P. sanguineus* em cultivo em estado sólido utilizando serragem de *Pinus* sp. como substrato;
- as fibras foram os macronutrientes em maior teor na serragem miceliada com *P. sanguineus* e na serragem de *Pinus* sp.;
- as fibras e os carboidratos foram os macronutrientes em maior teor nas rações suplementadas;
- o ácido gálico foi o composto fenólico detectado em maior teor nas rações suplementadas;
- o tratamento com as formulações suplementadas com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e serragem de *Pinus* sp. resultou em algumas alterações nos parâmetros hematológicos;
- o tratamento com as formulações suplementadas com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* e serragem de *Pinus* sp. promoveram redução nos níveis séricos de triglicérides, colesterol total e colesterol não-HDL nos grupos de ratos diabéticos;
- o tratamento com a formulação suplementada com serragem de *Pinus* sp. proporcionou aumento de HDL-colesterol no grupo de ratos diabéticos;
- não foi evidenciada hepatotoxicidade em função da suplementação com serragem de *Pinus* sp. miceliada com *P. sanguineus* nem da serragem de *Pinus* sp.

## 9. PERSPECTIVAS

A conclusão deste trabalho indica que outros estudos podem ser desenvolvidos a fim de aprimorar o entendimento acerca das propriedades biológicas da serragem miceliada com *P. sanguineus* e da serragem de *Pinus sp.* Sendo assim, as perspectivas são:

- determinar os compostos majoritários da serragem de *Pinus sp.* miceliada com *P. sanguineus* e da serragem de *Pinus sp.*;
- avaliar os mecanismos pelos quais ocorrem os efeitos biológicos do micélio de *P. sanguineus* e da serragem de *Pinus sp.*;
- determinar o conteúdo de aminoácidos, vitaminas e minerais do micélio, da serragem e das rações;
- comparar os efeitos biológicos do micélio e do basidioma do macrofungo *P. sanguineus*;
- pesquisar a presença de polissacarídeos e determinar o teor de cinabarina e ergosterol na serragem de *Pinus sp.* miceliada com *P. sanguineus*;
- formular rações com diferentes concentrações de serragem de *Pinus sp.* miceliada com *P. sanguineus* e de serragem *Pinus sp.* e avaliar o efeito hipolipemiante;
- realizar ensaio de expressão de PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) em células hepáticas dos ratos tratados;
- avaliar se a serragem de *Pinus sp.* miceliada com *P. sanguineus* e a serragem de *Pinus sp.* exercem efeito antioxidante no sangue e nos tecidos dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- investigar outras propriedades biológicas da serragem de *Pinus sp.* miceliada com *P. sanguineus* e da serragem *Pinus sp.*, como por exemplo, atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e antitumoral.

## 10. REFERÊNCIAS

- ADA - American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. 37(1): 81-90.
- Ahmad, Z. (2014). Statin intolerance. **Am. J. Cardiol.** 113(10): 1765-1771.
- Bahadoram, Z.; Mirmiram, P.; Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J. Diabetes Metab. Disord.** 12:43.
- Bandeira, S. M.; Fonseca, L. J. S.; Guedes, G. S.; Rabelo, L, A.; Goulart, M. O.F.; Vasconcelo, S. M. L. (2013). Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus. **Int. J. Mol. Sci.** 14: 3265-3284.
- Baranowska, M. K.; Mardarowicz, M.; Wiwart, M.; Poblócka, L.; Dynowskad, M. (2002). Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*, **Zeitschrift für Naturforschung**. 57: 478- 482.
- Baumer, J. D. (2009). Produção do antibiótico cinabarina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Beagley, J.; Guariguata, L.; Weil, C.; Motala, A. A. (2014). Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 103: 150-160.
- Bernardes, C. T. V. (2014). Avaliação das atividades antimicrobianas, antisséptica e esterilizante de extratos e metabólitos de *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Pinus elliottii* Engelm. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. **Am. J. Bot.** 98: 426–438.
- Borderes, J.; Costa, A.; Guedes, A.; Tavares, L. B. B. (2011). Antioxidant Activity of the Extracts from *Pycnoporus sanguineus* Mycelium. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 54 (6): 1167-1174.
- Brookheart, R. T.; Michel, C. I. Schaffer, J. E. (2009). As a Matter of Fat. **Cell Metab.** 10: 8.
- Camassola, M., Rosa, L. O., Calloni, R., Gaio, T. A., & Dillon, A. J. P. (2013). Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. **Brazilian J. Microbiol.** 213(44): 207-213.
- Cao, H.; Xie, Y.; Chen, X. (2015). Type 2 diabetes diminishes the benefits of dietary antioxidants: Evidence from the different free radical scavenging potential. **Food Chem.** 186: 106-112.
- Ceriello, A.; Testa, R.; Genovese, S. (2016). Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** 26: 285-292.
- Chang ST. (2008). Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: Cheung PCK, editor. **Mushrooms as functional foods**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 1-33.
- Chen, S. Y.; Ho, K. J.; Hsieh, Y. J. Wang, L. T.; Mau, J. L. (2012). Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. **Food Sci. Technol.** 47: 274-278.
- Cheung, P. C. K. (1996). The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (Tree-ear) and *Tremella fuciformis* (White jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. **Nutr. Res.** 16(10): 1721-1725.

- Correa, E.; Cardona, D.; Quiñones, W.; Torres, F.; Franco, A. E.; Vélez, I. D. Robledo, S.; Echeverri, F. (2006). Leishmanicidal Activity of *Pycnoporus sanguineus* **Phytother. Res.** 20: 497-499.
- Croan, S. C.; (2000). Conversion of Wood Waste into Value-Added Products by Edible and Medicinal *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Species (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **Int. J. Med. Mushroom.** 2: 73-80.
- Dake, A. W. & Sora, N. D. (2016). Diabetic Dyslipidemia Review: An Update on Current Concepts and Management Guidelines of Diabetic Dyslipidemia. **Am. J. Med. Sci.** 351(4): 361:365.
- Domingueti, C. P.; Dusse, L. M. S.; Carvalho, M. G.; Souza, L. P.; Gomes, K. B.; Fernandes, A. P. (2016). Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications **J. Diabetes Complicat.** 30:738-745.
- Domínguez-Mendoza, E. A.; Cornejo-Garrido, J.; Burgueño-Tapia, E.; Ordaz-Pichardo, C. (2016). Antidiabetic effect, antioxidant activity, and toxicity of 3',4'-Di-O-acetyl-cis-khellactone in Streptozotocin-induced diabetic rats. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 26: 4086-4091.
- Dominic S. (2013). Diabetic Dyslipidemia: From Evolving Pathophysiological Insight to Emerging Therapeutic Targets. **Can. J. Diabetes.** 37: 319-326.
- Fokina, O.; Eipper, J.; Winandy, L.; Kerzenmacher, S.; Fischer, R. (2015). Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresour. Technol.** 175: 445-453.
- Fukushima, M.; Nakano, M.; Morii, Y.; Ohashi, T.; Fujiwara, Y.; Sonoyama, K. (2000). Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. **J. Nutr.** 130: 2151-2156.

- Gambato, G. (2016). Produção dos macrofungos *Pleurotus albidus* e *Pycnoporus sanguineus* e avaliação da atividade mitocondrial e redox em células endoteliais EA.hy926 em hiperglicemia. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul.
- Garcia, T. A. (2013). Purificação e caracterização de lacases de *Pycnoporus sanguineus*. **Tese de doutorado**. Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Brasília.
- Guillamón, E.; García-Lafuente, A.; Lozano, M.; D'Arrigo, M.; Rostagno, M. A.; Villares, A.; Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**. 81: 715-723.
- Halaouli, S.; Asther, M.; Kruus, K.; Guo, L.; Hamdi, M.; Sigoillot, J. C.; Asther, M.; Lomascolo, A. (2005). Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. **J. Appl. Microbiol.** 98: 332–343.
- Hegele, R. A. (2009) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nat. Rev. Genet.** 10: 109-121.
- IDF - International Diabetes Federation (2016). IDF Atlas (6th ed.). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation (<http://www.idf.org/diabetesatlas>).
- Jahn, M. P.; Jacob, M. H. V. M.; Gomes, L. F.; Duarte, R.; Araújo, A.S.R.; Belló-Klein, A.; Ribeiro, M. F. M.; Kucharski, L.C. (2010). The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 120: 38-44.
- Jain, K. S.; Kathiravan, m. k.; Somani, R. S.; Shishoo, C. J. (2007). The biology and chemistry of hyperlipidemia. **Bioorg. Med. Chem.** 15: 4674-4699.

- Jaiswal, M.; Schinske, A.; Pop-Busui, R. (2014). Lipids and lipid management in diabetes **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.** 28: 325-338.
- Jeong, S. C.; Jeong, Y. T. Yang, B. K.; Islamb, R.; Koyyalamudia, S. R.; Panga, G.; Choa, K. Y.; Song, C. H. (2010). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. **Nutr. Res.** 30: 49-56.
- Jung, H. Y.; Shin, J. C.; Park, S. M.; Kim, N. R.; Kwak, W.; Choi, B. H. (2014). *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression. **Toxicol. Rep.** 1: 658–666.
- Kadri, N.; Khettal, B.; Aid, Y.; Kherfella, S.; Sobhi, W.; Montero, V. B. (2015). Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents **Food Chem.** 188: 184–192
- Kadri, N.; Khettalb, B.; Adjeblib, A.; Cresteilc, T.; Zaidib, R. Y.; Monteroa, V. B.; Jean-Louis Montero, J. L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. Seeds. **Ind. Crops. Prod.** 54: 6-12.
- Kahraman, S.; Aydin, C.; Elpek, G. O.; Dirice, E.; Sanlioglu, D. (2015). Diabetes-Resistant NOR Mice Are More Severely Affected by Streptozotocin Compared to the Diabetes-Prone NOD Mice: Correlations with Liver and Kidney GLUT2 Expressions **J. Diabetes Res.** 8.
- Kandimalla, R.; Thirumala, V.; Reddy, H. (2016). Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochim. Biophys. Acta.**

- Kim, H.; Lee, B.; Yun, K. W. (2013). Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Pinus* species. **Ind. Crops. Prod.** 44 : 323-329.
- Kozarski, M.; Klaus, A.; Jakovljevic, D.; Todorovic, N.; Vunduk, J.; Petrović, P.; Niksic, M.; Vrvic, M. M.; Griensven, L. (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. **Molecules** 20:19489-19525.
- Lenoir, G.; Williamson, P.; Holthuis, J. C. (2007). On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 11(6): 654–661.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. **Nature.** 420:868-874.
- Lindequist, U.; Niedermeyer, T. H. J.; Jülich W. D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** 2(3): 285-299.
- Lindequist, U.; Niedermeyer, T. H. J.; Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** 2(3): 285-299.
- Lo, Y. C.; Lin, S.Y.; Ulzijargal, E.; Chen, S. Y.; Chien, R. C.; Tzou, Y. J.; Mau, J. L. (2012). Comparative Study of Contents of Several Bioactive Components in Fruiting Bodies and Mycelia of Culinary-Medicinal Mushrooms. **Int. J. Med. Mushrooms.** 14(4): 357-363.
- Lomascolo, A.; Uzan-Boukhris, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Sigoillot, J.; Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 92: 1129-1149.
- Luo, Y.; Chen, G.; Li, B.; Ji, B.; Guo, Y.; Tian, F. (2009). Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. **Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.** 10: 215-221.

- Mannarino, M. R.; Ministrini, S.; Pirro, M. (2014). Nutraceuticals for the treatment of hypercholesterolemia. **Eur. J. Intern. Med.** 25: 592-599.
- Merger, S.R.; Kerner, W.; Stadler, M.; Zeyfang, A.; Jehle, P.; Müller-Korbsch,; Holl, R. W. (2016). Prevalence and comorbidities of double diabetes **Diabetes Res. Clin. Pract.** 119: 48-56.
- Money, N. P. (2016). Are mushrooms medicinal? **Fungal Biol.** 120: 449-453.
- Mulder, K. C. L.; Mulinari, F.; Franco, O. L.; Soares, M. S. F.; Magalhães, B. S.; Parachin, N. S. (2015). Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. **Biotechnol. Adv.** 33: 648-665.
- Munir, K. M., Chandrasekaran, S., Gao, F., & Quon, M. J. (2013). Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 305(6): 679-86.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2014). **Princípios de bioquímica de Lehninger** (6th ed.). Porto Alegre: Artmed. 1298 p.
- Nitschke, J.; Altenbach, H. J.; Malolepszy, T.; Mölleken, H (2011) A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms **Carbohydr. Res.** 346: 1307-1310.
- Osawa, T., & Fato, Y. (2005). Protective Role of Antioxidative Food Factors in Oxidative Stress Caused by Hyperglycemia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1043: 440-451.
- Oyenihi, A. B.; Ayeleso, A. O.; Mukwevho, E.; Masola B. (2015). Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. **Biomed. Res. Int.**
- Pacheco, R.; Silva, R. R.; Morini, M. S; Brandão, C. R. A. (2009). A comparison of the leaf-litter ant fauna in a secondary atlantic forest with an adjacent pine plantation in southeastern Brazil. **Neotrop Entomol.** 38: 55-65.

- Pacheco, S. M. V., Morgado, A. F., & Agenos, J. F. (2013). Biossíntese de vanilina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MIP 95001. **Biotemas**. 26(3): 1-9.
- Patel, N.; Amin, P.; Shenoy, A. (2016). Is vitamin E supplementation effective in reducing mortality related to cardiovascular events in people with type 2 diabetes mellitus? A systematic review **IJC Metab. Endocr.** 12: 42-45.
- Philippe, J. & Raccah, D. (2009). Treating type 2 diabetes: how safe are current therapeutic agents? **Int. J. Clin. Pract.** 63:321.
- Politeo, O.; Skocibusic, M.; Maravic, A.; Ruscic, M.; Milos, M. (2011) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Endemic Dalmatian Black Pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*). **Chem. Biodivers.** 8.
- Quiroga E. N.; Vattuone, M. A.; Sampietro, A. R. (1995). Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1251:1275-80.
- Quiroga, E. N.; Sgariglia, M. A.; Molina, C. F.; Sampietro, D. R.; Soberon, J. R.; Vattuone, M. A. (2009). Purification and characterization of an exopolygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. **Mycol. Res.** 113: 1404-1410.
- Quiroz-Castañeda, R. E., Pérez-Mejía, N., Martínez-Anaya, C., Acosta-Urdapilleta, L., & Folch-Mallol, J. (2011). Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**, 22(3), 565–72.
- Radenković, M.; Stojanović, M.; Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** 78: 13-31.

- Ramasamy, I. (2016). Update on the molecular biology of dyslipidemias. **Clin. Chim. Acta** 454: 143–185.
- Redondo, M. T.; Beltrán-Brotóns, J. L.; Reales, J. M.; Ballesteros, S. (2016). Executive functions in patients with Alzheimer's disease, type 2 diabetes mellitus patients and cognitively healthy older adults. **Exp. Geront.** 83: 47-55.
- Rosa, L. H.; Machado, K. M. G.; Jacob, C. C.; Capelari, M.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. (2003). Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 98(7): 967-974.
- Rosa, L. O. (2013). Levantamento de macrofungos (filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina) do nordeste do Rio Grande do Sul e avaliação do seu potencial ligninolítico. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Rozner, S. & Garti, N., (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. **Colloids Surf. A.** 282–283: 435–456.
- Ruthesa, A. C.; Smiderle, F. R.; Iacomini, M. (2016). Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. **Carbohydr. Polym.** 136: 358-375.
- SBD. (2015). **Diretrizes SBD 2015.** (J. E. P. de Oliveira & S. Vencio, Eds.) (2014th–2015th ed.). São Paulo: Farmacêutica, AC.
- Schneider, I.; Kressel, G.; Meyer, A.; Kring, U.; Berger, R. G.; Hahn, A. (2011). Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. **J. Funct. Foods.** 17-24.
- Scicchitano, P.; Cameli, M.; Maiello, M.; Modesti, P. A.; Muiesan, M. L.; Novo, S.; Palmiero, P.; Saba, P. S.; Pedrinelli, R.; Ciccone, M. M. (2014). Nutraceuticals and dyslipidaemia: Beyond the common therapeutics. **J. Funct. Foods.** 611-32.

- Sharma, J. K., Yadav, M., Singh, N. P., & Yadav, K. D. S. (2011). Purification and characterisation of lignin peroxidase from *Pycnoporus sanguineus* MTCC-137. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 47(5), 532–537.
- Shi, C.; Zhu, N.; Cao, Y.; Wu, P. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline. **Nanoscale Res. Lett.** 10:147.
- Siqueira, E. M. A.; Mizuta, K.; Giglio, J. R. (1997). *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of  $\alpha$ -amylase. **Mycol Res** 2:188-190.
- Sirdah, M. M. (2015). Protective and therapeutic effectiveness of taurine in diabetes mellitus: A rationale for antioxidant supplementation. **Diabetes Metab. Syndr.** 9: 55-64.
- Smânia, A. Jr.; Marques, C. J. S.; Smânia, E. F. A.; Zanetti, C. R.; Carobrez, S. G.; Tramonte, R.; Loguercio-Leite, C. (2003). Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytother Res.** 17: 1069-1072.
- Smânia, E. F. A.; Smânia, A.; Loguercio-Leite, C.; Gil, M. L. (1997). Optimal Parameters for Cinnabarin Synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 70: 57-59.
- Soran, H.; Schofield, J. D.; Durrington, P. N. (2015). Antioxidant properties of HDL. **Front. Pharmacol.** 6-22.
- Sposito, A. C. (2007). IV Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e Diretrizes de prevenção da aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 77: 3.

- Syring, J.; Willyard, A.; Cronn, R.; Liston, A. (2005). Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci **Am. J. Bot.** 92(12): 2086-2100.
- Tiwari, V.; Khokhar, M. (2014). Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance. **Eur. J. Pharmacol.** 741156-170.
- Uzan, E., Portet, B., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., & Lomascolo, A. (2011). *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 90(1), 97–105.
- Vlassara, H.; Striker, G. E. (2013). Advanced Glycation Endproducts in Diabetes and Diabetic Complications. **Endocrin. Metab. Clin.** 42: 697-719.
- WHO. (2016) World Health Organization [www.who.int/diabetes/](http://www.who.int/diabetes/)
- Wu, L. & Parhofer, K. G. (2014). Diabetic dyslipidemia. **Metabolism.** 63: 1469-1479.
- Zeynep, U.; Salih, K.; Fuat, B.; 1, Burhan, A.; Selim, E.; Menderes, C.; Göksin, K. M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. **Chin J Nat Med.** 12(12): 901-910.
- Zhang, J. (2008). Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. **Nutr. Res.** 28(6): 383-390.