

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JANAÍNA ÂNGELA TÚRMINA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA *IN VIVO* DO  
EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO PELO FUNGO *Lasiodiplodia  
theobromae* MMPI**

**Guarapuava  
2012**

**JANAÍNA ÂNGELA TÚRMINA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA *IN VIVO* DO  
EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO PELO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*  
*MMPI***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro**

**Guarapuava  
2012**

Túrmina, Janaína Ângela

T941a Avaliação da toxicidade subcrônica *in vivo* do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI / Janaína Ângela Túrmina. -- Guarapuava, 2012.  
ix, 50 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências da Saúde, 2012

Orientador: Emerson Carraro

Banca examinadora: Mário Antonio Alves da Cunha, Herta Dalla Santa, Weber Francisco Nunes da Silva, David Linvingstone

#### Bibliografia

1. Farmácia. 2. Lasiodiplodana. 3. EPS. 4. Glucanas fúngicas. 5. Toxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

# TERMO DE APROVAÇÃO

JANAÍNA ÂNGELA TÚRMINA

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA *IN VIVO* DO EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO PELO FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* *MMPI*

Dissertação aprovada em 29/10/2012 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: UNICENTRO  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: UTFPR  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: UNICENTRO  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: UNICENTRO  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: UNICENTRO

Guarapuava, \_\_\_ de outubro de 2012.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais,*

*Miguel e Ildete, pelo amor incondicional, apoio e incentivo constante para a  
realização dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela orientação superior em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Gabriel, pela cumplicidade, amizade e carinho em todos os momentos.  
Amo você!

Ao meu gauchinho, Carlos Ricardo, seu amor, dedicação, orientação e paciência foram essenciais para a conclusão desta etapa tão importante. A você, pelo imenso amor, muito obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Carraro, pela oportunidade, confiança, orientação e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, representado pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Rubiana M. Mainardes, e ao corpo docente pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Najeh Khalil, que primeiramente me acolheu e viabilizou a oportunidade de trabalhar com o Prof. Emerson.

Em especial, ao Prof. Dr. Mário Antonio Alves da Cunha, pela confiança, amizade, ensinamentos e incentivo desde a graduação. Sua ajuda e dedicação foram essenciais para a realização deste trabalho.

As melhores amigas que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso: Giselly, Wanessa, Claudia, Ana e Daiana.

Aos amigos e colegas de mestrado Tiago, Verusca e Luiz, vocês foram essenciais nesta caminhada. Obrigada por todos os momentos memoráveis! Em especial, ao colega e amigo João Luiz (*in memoriam*).....me faltam palavras, minha saudade é imensurável.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Estrutura da  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) D-Glucana ; (B) Estrutura da  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) D-glucana. **12**
- Figura 2.** Estrutura do EPS produzido por *L.theobromae* MMPI(  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 6)-glucana) . **18**
- Figura 3.** Fungo *L. theobromae* MMPI cultivado em BDA. **25**
- Figura 4:** Etapas da produção de lasiodiplodana: (A, B, C e D) Etapas para o preparo do inóculo; (E) Produção do EPS em biorreator de mistura; (F) EPS dialisado. **26**
- Figura 5.** Avaliação ponderal dos camundongos machos durante tratamento subcrônico com lasiodiplodana. n= 8. (Valores: média  $\pm$  desvio padrão) **29**
- Figura 6.** Avaliação ponderal das fêmeas durante tratamento subcrônico com lasiodiplodana. n= 8. (Valores: média  $\pm$  desvio padrão) **31**
- Figura 7.** Marcadores de bioquímicos de toxicidade em camundongos machos submetidos ao tratamento subcrônico com lasiodiplodana. Transaminases (A) AST and (B) AST; (C) creatinina e (D) uréia . (\*)Valores onde  $p < 0.05$ . n= 8.(Valores: média  $\pm$  desvio padrão) **32**
- Figura 8.** Marcadores bioquímicos de toxicidade em camundongos fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com lasiodiplodana. Transaminases (A) AST and (B) AST; (C) creatinina e (D) uréia . (\*)Valores onde  $p < 0.05$ . n=8. (Valores: média  $\pm$  desvio padrão) **32**
- Figura 9.** Níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) em camundongos expostos ao tratamento subcrônico com lasiodiplodana (A) machos e (B) fêmeas. (\*) Valores onde  $p < 0,05$ . **34**
- Figura 10.** Cortes histológicos dos machos (aumento de 100X) (A) Tecido renal do grupo controle; (B) Tecido renal do grupo tratado com EPS ; (C) Tecido esplênico do grupo controle; (D) Tecido esplênico do grupo tratado com EPS; (E) Tecido cardíaco do grupo controle; (F) Tecido cardíaco do grupo tratado com EPS; (G) tecido hepático do grupo controle; (H) tecido hepático do grupo tratado com EPS. **39**
- Figura 11.** Cortes histológicos das fêmeas (aumento de 100X) (A) Tecido renal do grupo controle; (B) Tecido renal do grupo tratado com EPS ; (C) Tecido esplênico do grupo controle; (D) Tecido esplênico do grupo tratado com EPS; (E) Tecido cardíaco do grupo controle; (F) Tecido cardíaco do grupo tratado com EPS; (G) tecido hepático do grupo controle; (H) tecido hepático do grupo tratado com EPS. **40**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Perfil lipídico dos grupos machos e fêmeas após 28 dias de tratamento com lasiodiplodana por gavagem. **36**
- Tabela 2:** Parâmetros hematológicos dos grupos machos e fêmeas após 28 dias de tratamento com lasiodiplodana por gavagem. **37**

## **Resumo**

$\beta$ -glucanas, que são compostos não celulósicos, têm sido consideradas como os produtos naturais que podem ser úteis na prevenção e tratamento de várias doenças em seres humanos. Estudos que avaliam a toxicidade causada por exopolissacarídeos fúngicos (EPS) do tipo  $\beta(1\rightarrow6)$ -D glucana são escassos. Este estudo avaliou os efeitos do tratamento sub- crônico com EPS sobre parametros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, a fim de avaliar a toxicidade. Trinta e dois camundongos, 16 machos e 16 fêmeas, foram utilizados no estudo, sendo estratificados em dois grupos, o grupo tratado com EPS, o qual recebeu (50 mg / kg) por dia, durante 28 dias por gavagem, e o grupo controle que recebeu solução salina, durante o mesmo período. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para as determinações hematológicas e bioquímicas. O fígado, coração, rins e baço foram coletados para análises histopatológicas. Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança, seguida do teste de post hoc de Tukey (significância de  $p<0,05$ ), entre os resultados dos quatro grupos de estudo. No grupo tratado com EPS ocorreu redução significativa da glicose (35%,  $P <0,01$ ), redução das transaminases em ambos os sexos (AST e ALT; 40%;  $P<0,05$ ) e uréia (20%,  $P <0,01$ ) no sexo feminino. Os resultados mostraram que o tratamento subcrônico com EPS não gerou alterações hematológicas e histopatológicas. Em conclusão, o estudo mostrou que a ingestão de EPS ( $\beta$  1-6 D-glucana) não evidenciou qualquer sinal de toxicidade em camundongos, independente do gênero.

**Palavras- chave:** lasiodiplodana, EPS, glucanas fúngicas, toxicidade.

## **Abstract**

$\beta$ -Glucans that are non-cellulosic have been considered as natural products that can be useful in preventing and treating several disease conditions in humans. Studies evaluating the toxicity caused by fungal exopolysaccharide (EPS) of the type  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan are scarce. This study evaluated the effects of subchronic treatments with EPS lasiodiplodan on toxicity, biochemical, hematological, and histopathological alterations. Thirty-two mice, 16 males and 16 females, were used in the study stratified into two groups; the treated group received EPS (50 mg/Kg) daily (28 days) via gavage and the control group received saline during the same period. Blood samples were collected via cardiac puncture for hematological and biochemical determinations. The liver, heart, kidneys, and spleen were collected for histopathological analysis. The statistical analysis was performed through one-way analysis of variance and only  $P < 0.05$  F-values are presented. Significant reduction in blood glucose in males (35%;  $P < 0.01$ ), transaminases activity in both sex (AST and ALT; 40%;  $P < 0.05$ ), and urea (20%;  $P < 0.01$ ) in females, were observed with the treatment using EPS. The results showed that sub-chronic treatments with EPS did not generate hematological and histopathological alterations. In conclusion, the study showed that the intake of EPS ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 6 D-glucan) did not produced any sign of toxicity in mice, independent of gender.

**Keywords:** lasiodiplodan, EPS, fungal glucan, toxicity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 Exopolissacarídeos fúngicos.....	13
1.2 Propriedades Farmacológicas de EPS fúngicos.....	15
1.3 Atividade Hipocolesterolêmica de EPS fúngicos.....	18
1.4 Atividade Hipoglicêmica dos EPS fúngicos.....	17
1.5 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI.....	20
1.6 Investigação de Toxicidade.....	21
1.7 Marcadores Bioquímicos de Toxicidade.....	23
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Materiais.....	26
3.1.1 Reagentes.....	26
3.1.2 Equipamentos.....	26
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Fungo.....	26
3.2.2 Preparo do Inóculo.....	27
3.2.3 Produção do EPS em Biorreator de Mistura.....	27
3.2.4 Separação do EPS e biomassa fúngica.....	27
3.2.5 Preparo da <i>Lasiodiplodana</i> .....	28
3.2.6 Protocolo experimental para avaliação da toxicidade in vivo.....	28
3.2.7 Análises bioquímicas e hematológicas.....	30
3.2.8 Análise Histopatológica.....	30
3.2.9 Análise estatística.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
4.1 Triagem comportamental e Letalidade.....	31
4.2 Influência do EPS <i>Lasiodiplodana</i> no peso dos Camundongos após tratamento subcrônico.....	31
4.3. Avaliação de Parâmetros Bioquímicos de Toxicidade.....	32
4.4 Avaliação do Perfil Glicêmico.....	35

4.5 Avaliação do Perfil Lipídico.....	37
4.6 Parâmetros Hematológicos.....	38
4.7 Parâmetros Histopatológicos.....	39
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

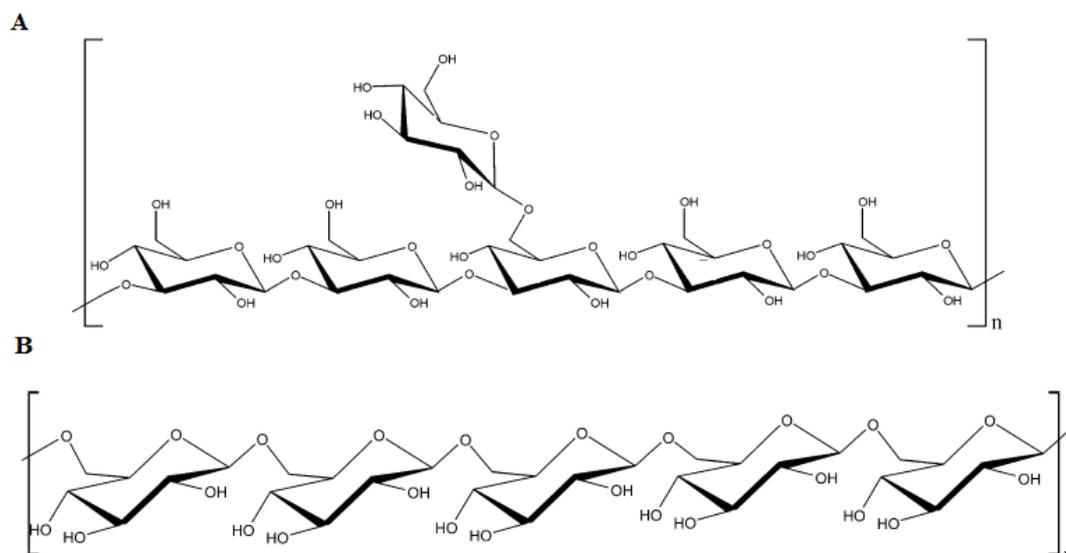
### 1.1 Exopolissacarídeos fúngicos

Polissacarídeos são moléculas naturais constituídas por monossacarídeos conectados entre si por ligações glicosídicas. Estes polímeros diferenciam-se, basicamente, pelos monômeros constituintes, tipos de ligação, comprimento da cadeia, números de ramificações e grupos substituintes (NASCIMENTO, 2010).

Podem ser classificados como homopolímeros ou heteropolímeros (BONGIOVANI, 2008). A maioria dos polissacarídeos de fungos são homopolissacarídeos, ou seja, compostos por um único tipo de monômero, normalmente glicose, reunidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  ou  $\alpha$ . No caso das glucanas, por exemplo, as ligações entre suas unidades de glicose podem ser do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6),  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4);  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), podendo conter ramificações ao longo da cadeia principal (BARBOSA et al, 2004; MORADALI et al, 2007).

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio de cultivo na forma de material viscoso (BONGIOVANI, 2008; MIRANDA et al, 2011).

Nos fungos, as  $\beta$ -glucanas ocorrem como polímeros de glicose ligados por ligações lineares do tipo  $\beta$ (1-6) D-Glucana ou por ligações  $\beta$  (1-3) D-Glucana com cadeias laterais ligadas por ligações  $\beta$  (1-6) (TSONI, BROWN, 2008). Essas diferenças estruturais como, por exemplo, diferenças no comprimento da cadeia polissacarídica, extensão da ramificação e o comprimento dessas ramificações, podem ter grandes implicações para a atividade biológica da  $\beta$ -glucana (BAGGIO, 2010). A estrutura básica das  $\beta$ -glucanas está demonstrada na Figura 1.



**Figura 1:** (A) Estrutura da  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) D-Glucana ; (B) Estrutura da  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) D-glucana (VASCONCELOS *et al*, 2008).

As glucanas que apresentam ligações do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 6) são as mais descritas em artigos e patentes e apresentam estruturas lineares, ramificadas ou cíclicas, são alvo das pesquisas por seus efeitos imunológicos e farmacológicos (VASCONCELOS *et al*, 2008). Porém, glucanas do tipo  $\beta$ -D-(1-6)-glucanas são incomuns, até mesmo raras (SHAHINIAN, BUSSEY, 2000).

A biossíntese de EPS está diretamente associada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente. Desempenham diversas funções nos microrganismos tais como proteção contra dessecação, constituem uma barreira impedindo a união de vírus a sítios específicos da parede celular, neutralizam toxinas, atuam como fonte de carbono e energia, são importantes na conversão do excesso de substrato em um material pouco metabolizável por outros microrganismos, além de interagirem com células de animais ou plantas com relações específicas, simbióticas ou patogênicas (BULLOCK; KRISTIANSEN, 1987).

Nos fungos, as glucanas podem contribuir para manter o pH ótimo para enzimas, além de impedirem a desidratação das hifas e de regularem a concentração de glicose extracelular (CORRADI *et al*, 2006).

Fungos, bactérias e plantas vêm sendo pesquisados como potenciais fontes dessas macromoléculas de polissacarídeos. A possibilidade de aplicação desses

compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem levado a intensivos estudos relacionados à sua extração e caracterização (FUKUDA et al., 2009).

Os EPS fúngicos têm despertado interesse na área médica, devido a algumas atividades evidenciadas, tais como: uso como matriz hidrofílica para a liberação controlada de drogas (MATRICARDI et al, 2006), para o desenvolvimento de vacinas bacterianas, modulador do sistema imunológico, agente cicatrizante e no controle de tumores, efeito hiperglicêmico e hipocolesterolêmico (ZHANG et al, 2007).

## 1.2 Propriedades farmacológicas de exopolissacarídeos fúngicos

Os EPS fúngicos são uma classe de biopolímeros de alto valor tecnológico com ampla variedade de aplicações médicas (CHOA et al, 2006). EPS, são considerados moléculas farmacologicamente ativas, apresentando atividade antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana e anticoagulante (ISHIBASHI, 2004; SARANGI, 2006; TELLES, 2010). Diferentes funções biológicas desses EPS foram analisadas, como hipoglicemiantes, antivirais, atuação na diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos (FUKUDA, 2009).

A aplicação terapêutica parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (COLLEONI-SIRGHIE et al, 2003).

Algumas  $\beta$ -glucanas têm atividade antitumoral como a Lentinana produzida pelo basideomiceto *Lentinula edodes* e a Schizophylana produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* (RAU, 2002). Outras após alguma modificação estrutural apresentam atividade antitrombótica e anticoagulante como a Curdlana ( $\beta$ -1,3-glucana) sulfatada (ALBAN; FRANZ, 2000).

O desenvolvimento de estudos científicos que comprovem as atividades biológicas imunomodulatória, antimicrobiana, antitumoral das  $\beta$ -glucanas, é fundamental para comprovação de sua eficácia e segurança para uso humano (QUEIROZ, 2008).

Ao Considerarmos a biodiversidade do planeta e a importância destas macromoléculas como produtos naturais, bem como suas aplicações nas mais diferentes áreas, pesquisas sobre o isolamento de novas cepas fúngicas devem ser intensificadas,

uma vez que a produção não depende de variações sazonais e ou climáticas e, portanto, novos EPS com diferentes aplicações poderão ser descobertos (BARBOSA, 2004).

Os EPS têm sido alvo de intensas pesquisas por possuírem atividade modificadora da resposta biológica, alterando positivamente a resposta do hospedeiro. Sendo, portanto, de grande aplicação para a terapia médica (TELLES, 2010).

Com o intuito de desenvolver novas substâncias antitumorais com baixa ou nenhuma toxicidade, glucanas fúngicas tem sido testadas, visando a obtenção de novos imunoterápicos que não apresentem efeitos colaterais (HAN et al, 1999). As glucanas são estudadas como componentes de um grupo de drogas conhecidas como modificadores de resposta biológica, que influenciam a resposta do hospedeiro por estimulação do sistema imune e que entre outras funções, incluem efeitos antitumorais e prevenção de efeitos carcinogênicos (SILVEIRA, 2010; VASCONCELOS, 2008).

Grande parte das  $\beta$ -D-glucanas com atividade biológica são derivadas de fungos, são denominadas de modificadores da resposta biológica, pois interagem e modificam a resposta imunológica do hospedeiro, controlam a homeostase, regulam o biorritmo, prevenindo várias doenças (DIJKGRAAF et al, 2002).

Segundo Abbas e Lichtman (2005), modificadores de resposta biológica são moléculas utilizadas clinicamente como moduladores da inflamação, imunidade e hematopoiese, atuando como ativadores ou supressores da resposta de células do sistema imune como macrófagos e monócitos, neutrófilos, células “Natural Killer” (NK), eosinófilos e linfócitos. Os principais efeitos biológicos promovidos pelos modificadores de resposta biológica são atividades antitumoral, antiviral, antifúngica, antiparasitária, antibacteriana e anticoagulante.

A estrutura de polissacarídeos considerados modificadores de resposta biológica é bastante variada, podendo ser constituída por diferentes monossacarídeos. Além da diversidade monossacarídica podem apresentar grupos fostato, acetil, carboxílicos, sulfatos, peptídeos e lipídeos. O tipo de ligação glicosídica também varia podendo ser  $\alpha$ -,  $\beta$ -, (1-2), (1-3), (1-4) ou (1-6) (LEUNG et al, 2004).

Experimentos *in vitro* mostraram que  $\beta$ -glucanas podem ativar leucócitos, estimulando a atividade fagocitária e apresentam atividade antimicrobiana. Além disso, podem estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (SMIDERLE et al, 2008).

Trabalhos recentes têm dado ênfase aos EPS, com ação sobre o sistema imune e como componentes antioxidantes. Muitas espécies de fungos contem uma variedade de

moléculas sequestradoras de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (DORE, 2006).

Conforme reportado por Nosál'ová et al (2001) e Paulsen (2002), a atividade biológica dos polissacarídeos fúngicos foi caracterizada pela presença de  $\beta$ -glucanas e o primeiro teste biológico foi realizado em 1969. A utilização de polissacarídeos em tumores transplantados fez com que os tumores parassem de crescer.

Cao e Lin (2004) investigaram a atividade antitumoral de polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum* em camundongos, inoculados com Sarcoma 180 ( $2 \times 10^6$  células/animal), tratados por via oral por 10 dias e os animais sacrificados no décimo dia, obtendo taxas de inibição do crescimento tumoral de 35,2%, 45,2% e 61,9% para as doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, respectivamente.

Um polissacarídeo complexo obtido do fungo *Agaricus blazei* Murrill foi testado por Gonzaga et al (2009) para verificar a inibição do crescimento do Sarcoma 180 em camundongos Swiss machos. Os animais foram inoculados com  $2,9 \times 10^6$  células e receberam o polissacarídeo dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal ou oral, por gavagem, por sete dias consecutivos, nas doses de 25 e 50 mg/Kg. A avaliação foi feita no oitavo dia de experimento, obtendo-se taxas de inibição de 42,1% e 47,2%, no tratamento intraperitoneal, para as doses de 25 e 50 mg/Kg, respectivamente, e de 38,8% e 46,0% no tratamento oral, para as doses de 25 e 50 mg/Kg, respectivamente. O mesmo estudo ainda aponta um aumento na sobrevivência dos animais tratados com o polissacarídeo.

Estudos, *in vivo*, após administração prolongada de extratos do fungo *Coriolus versicolor*, demonstraram redução tumoral significativa, em ratos, inoculados com células leucêmicas, carcinoma nasofaríngeo, câncer hepático, sarcoma (Walker 256, MCS-8) (FORTES, 2007).

A lentinana, polissacarídeo isolado do fungo *Lentinus edodes*, foi testada através do uso de Sarcoma 180 transplantado em ratos. A lentinana demonstrou atividade antitumoral, apresentando 80% de redução da massa tumoral ou completa regressão na maioria dos animais testados (WASSER, 2002).

Diversos fungos, como os do gênero *Pleurotus*, possuem  $\beta$ -glucanas que participam do mecanismo de ação antitumoral. Os possíveis mecanismos de ação destas substâncias são a ativação e a expansão clonal de células T, inibição da neovascularização induzida pelo crescimento tumoral nas células do Sarcoma 180 *in vitro*, indução de apoptose nas células tumorais, estimulação das funções imunológicas,

aumento das células NK e T auxiliares e estímulo e síntese de interleucinas, prolongamento da sobrevivência e maior tolerância à quimioterapia (DE BARBA, 2010; FORTES, 2007).

### 1.3 Atividade hipocolesterolêmica de exopolissacarídeos fúngicos

Estudos epidemiológicos têm mostrado diversos efeitos benéficos na saúde proporcionados pela ingestão de  $\beta$ -D-glucanas, incluindo uma associação inversa com o risco de doenças cardiovasculares (HORN et al, 2008).

Vários estudos clínicos, com experimentos *in vivo*, mostraram que a ingestão de  $\beta$ -D-glucanas contribuiu para redução do colesterol total e LDL-colesterol, enquanto que os níveis de HDL-colesterol e triglicérides não foram significativamente influenciados (JONKER et al, 2010).

Miranda e colaboradores (2011) demonstraram que a botriosferana, extraída do fungo *Botryosphaeria rhodina*, mostrou uma tendência em diminuir em 18% os níveis de colesterol total e 27% de LDL-colesterol, indicando um efeito hipocolesterêmico em ratos.

Nicolosi e colaboradores (1999), em estudo *in vivo*, administraram por gavagem 100 mg/Kg de quitina-glucana em camundongos *swiss* durante 8 semanas e obtiveram resultados de redução nos níveis de colesterol total, enquanto que os valores de HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides não sofreram diferenças significativas.

Em outro estudo com animais, mostraram que o consumo de glucanas fúngicas pode diminuir o colesterol no sangue ou reduzir lesões ateroscleróticas em coelhos com uma dieta rica em colesterol (BOHN, 1995).

Preparações concentradas de  $\beta$ -D glucanas têm demonstrado uma atividade de redução do colesterol nos humanos e em modelos animais de hipercolesterolemia (ONNING et al, 1999). Um recente estudo em hamsters hipercolesterolêmicos demonstrou redução do colesterol com a ingestão de  $\beta$ -(1,3) D glucana (DELANEY et al, 2003). Semelhantes observações foram descritas por Maganani (2008) na avaliação do efeito hipocolesterêmico da  $\beta$ -glucana extraída de *Sacharomyces cerevisiae* administrada a camundongos em dieta hipercolesterolêmica.

Diferentes hipóteses discutem o efeito proporcionado pelas glucanas; uma estaria relacionada com a absorção e metabolismo de lipídios, prejudicando a absorção do colesterol; outras relacionam o aumento da excreção de ácidos biliares e esteróis. As

glucanas seriam capazes de alterar a biossíntese de colesterol ou de acelerar a produção de lipoproteínas pelo fígado. Ocorreria uma produção de ácidos graxos de cadeia curta através da fermentação da fibra no cólon. O aumento da viscosidade promovido pelas glucanas nos conteúdos gastrintestinais contribuiria para a sensação de saciedade e diminuiriam com isso, a necessidade de ingestão de alimentos (MIRANDA, 2006).

#### **1.4 Atividade hipoglicêmica dos exopolissacarídeos fúngicos**

A *diabetes mellitus* resulta da diminuição da secreção e/ou da ação da insulina, envolvendo processos patogênicos específicos, como, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência a ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (KALEEM et al., 2008).

Embora existam diferentes tipos de agentes hipoglicemiantes orais, que atuam apenas em associação com a insulina no tratamento de *diabetes mellitus*, nos últimos anos houve um grande aumento da procura por produtos naturais com atividade antidiabética. Isto se deve ao fato de que o uso contínuo de drogas antidiabéticas sintéticas causam diversos efeitos colaterais e toxicidade a alguns órgãos (MIRANDA, 2006).

Alguns pesquisadores sugerem que os fungos medicinais ou os seus extratos, quando utilizados como suplementos dietéticos, exibem atividade hipoglicêmica em estudos experimentais e clínicos (NOVAES, 2004; HWANG et al., 2005), por conterem substâncias que parecem atuar no mecanismo de regulação do metabolismo da glicose (SULLIVAN, 2006).

Um exopolissacarídeo produzido a partir de cultura submersa de *Phellinus baunni* apresentou efeito hipoglicêmico em ratos com *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina (HORN et al., 2008).

*Phellinus baunni* é bastante utilizado em países asiáticos pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, tais como aterosclerose e diabetes mellitus. Sabe-se que o extrato deste fungo é rico em  $\beta$ - glucanas, o que leva os pesquisadores a acreditarem que este seja o composto bioativo responsável pelas atividades contra algumas enfermidades (JANG et al., 2004).

Em ratos geneticamente diabéticos alimentados com glucana obtida do fungo *Grifola frondosa*, detectou-se uma diminuição dos níveis de glicose no sangue, aumentando a sensibilidade à insulina (MAYELL, 2011).

A botriosferana, produzida pelo fungo, *Botryosphaeria rhodina*, apresentou uma redução de 52% dos níveis de glicose plasmática em ratos com diabetes mellitus tipo I, a qual foi induzida pela droga estreptozotocina (MIRANDA et al, 2011).

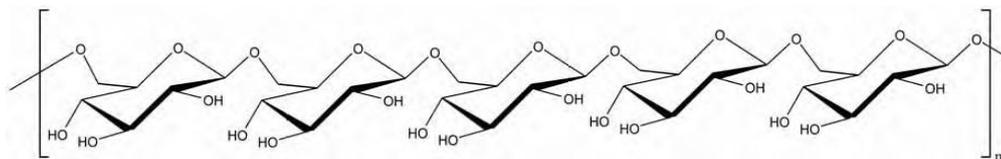
Segundo Fortes (2007) em estudo com pacientes portadores de câncer colorretal, a suplementação dietética com glucana do fungo *Agaricus sylvaticus* foi capaz de reduzir a glicemia de jejum dos pacientes, apresentando efeitos benéficos no metabolismo dos carboidratos e, conseqüentemente, no prognóstico desses pacientes.

As  $\beta$ -glucanas apresentam ação na redução da glicemia pós-prandial e nos níveis de secreção de insulina. Estes efeitos têm sido relacionados à propriedade deste polissacarídeo de induzir alta viscosidade quando em solução, formando uma camada gelatinosa. Esta camada resiste aos efeitos convectivos das contrações intestinais, diminuindo a absorção de açúcar pelos enterócitos. A redução da glicose e dos níveis de insulina após as refeições é dependente tanto do peso molecular da  $\beta$ -glucana quanto da dose ingerida. Estudos apontam ainda que as  $\beta$ -glucanas aumentam a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose e destacam o papel das  $\beta$ -glucanas na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares e de *diabetes mellitus* (RIBEIRO, 2009).

### **1.5 *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**

*Lasiodiplodia theobromae* forma teleomórfica do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, é típico de regiões tropicais e subtropicais, sendo patogênico a numerosas espécies vegetais, em que um mesmo isolado é capaz de infectar diferentes hospedeiros (PEREIRA et al, 2009).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) produz um exopolissacarídeo, denominado lasiodiplodana, que ainda não foi explorado tecnologicamente. A lasiodiplodana foi caracterizada quimicamente como  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) D-glucana (VASCONCELOS et al, 2008; CUNHA et al, 2012). Figura 2.



**Figura 2:** Estrutura do EPS produzido por *L.theobromae* MMPI ( $\beta$ -D(1-6)-glucana) (VASCONCELOS, 2008).

Exopolissacarídeos fúngicos do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) D-glucana são incomuns, até mesmo raros, e de acordo com a literatura, essas glucanas tem um papel chave na formação da parede celular, pois facilita a interação entre os constituintes da parede, através de ligações cruzadas (SHAHINIAN, BUSSEY, 2000).

Vários autores têm tentado estabelecer uma correlação entre a estrutura química de exopolissacarídeos e a atividade antitumoral. Entre os fatores que podem influenciar a atividade antitumoral, podem ser citados: A. Estrutura da cadeia principal; B. Grau de ramificação; C. Presença de grupos substituintes; e D. Conformação (SILVEIRA, 2010).

Cunha et al, (2012) evidenciaram em estudos *in vitro* que o EPS, lasiodiplodana, produzido pelo fungo *L. theobromae* MMPI, mostrou uma importante atividade antiproliferativa em células de câncer de mama (MCF-7). Foi determinada a concentração de EPS 100  $\mu$ g / ml, como IC<sub>50</sub> e a atividade antiproliferativa de lasiodiplodana foi dose-dependente.

De acordo com estudos realizados por Rubin-Bejerano et al (2007),  $\beta$ -(1-6)-D-glucanas podem ser imunoestimuladoras mais potentes de células do sistema imune, como neutrófilos, do que  $\beta$ -(1-3)-Dglucanas, já consagradas com este tipo de atividade biológica. Ainda, segundo esses autores, foi observado que  $\beta$ -(1-6)-D-glucana estimulou tanto células fagocitárias quanto substâncias que reagem com oxigênio, mostrando também uma possível atividade antioxidante para essas moléculas.

## 1.6 Investigação de toxicidade

Toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo. Esta propriedade é verificada através da avaliação toxicológica onde se obtém dados como dosagem, sinais, efeitos provocados que irão determinar o potencial

de toxicidade. Uma das formas de proceder à avaliação toxicológica é através da administração de quantidade do composto em estudo ou doses do extrato em animais podendo ser realizada a toxicidade aguda, subcrônica ou crônica (LIMA, 2009).

Os ensaios de toxicidade de doses repetidas são utilizados para a obtenção de informações sobre a toxicidade de substâncias químicas com exposições repetidas. Nestes estudos, que podem durar 28 ou 90 dias, determina-se o estabelecimento dos níveis nos quais não são observados efeitos tóxicos, a identificação e caracterização dos órgãos afetados, a severidade após a exposição repetida e a reversão dos efeitos tóxicos. A via de administração deve ser aquela pretendida para o uso, ou de provável exposição (OGA; CAMARGO; BASTIUZZO, 2008).

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade. Em estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, função renal, bem como nos parâmetros hematológicos. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular. Portanto, é evidente a importância da avaliação desses parâmetros para detectar possível toxicidade de qualquer composto analisado (PITA, 2011).

Apesar de grande parte das  $\beta$ -D-glucanas com atividade biológica serem derivadas de fungos e receberem a denominação de modificadores da resposta biológica, os dados de segurança sobre a ingestão dessas moléculas são limitados a partir da ausência de estudos toxicológicos, *in vivo*, sobre os efeitos da ingestão crônica de concentrados de  $\beta$ -glucanas.

### **1.7 Marcadores bioquímicos de toxicidade**

A ação tóxica de uma substância pode muitas vezes comprometer alguns órgãos. O fígado é muito suscetível à ação de compostos químicos. Entre os fatores que levam a essa suscetibilidade, cita-se o fato de qualquer substância administrada via oral, que sofre absorção no trato gastrointestinal ser transportada primeiramente para o fígado, pela veia porta hepática. Assim sendo, um agente tóxico vai primeiramente passar pelo fígado para ser distribuído na corrente sanguínea (LORA, 2007).

Em relação às enzimas hepáticas, o aumento da fosfatase alcalina (FA), da gama glutamiltransferase (GGT), da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) pode resultar de alterações reversíveis a irreversíveis nas membranas hepatocelulares associadas com necrose, colestase, hipoxia, hipoperfusão, inflamação, ação de agentes infecciosos e toxinas ou excesso de depósitos hepatocitários de lipídeos ou glicogênio. Desordens hepatocelulares agudas apresentam um aumento significativo na atividade das enzimas ALT e AST (MOTA, 2003).

As enzimas são responsáveis pela maioria das reações químicas do corpo, sendo encontradas em todos os tecidos. Algumas são identificadas no plasma ou no soro e a mensuração de sua taxa sanguínea pode indicar um estado de normalidade ou de dano celular. A enzima AST, que catalisa a transaminação de L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, é encontrada em quase todos os tecidos, logo, a atividade sérica da AST não é específica para nenhum tecido, porém o músculo e o fígado podem ser considerados suas maiores fontes (LIMA, 2009).

A atividade das aminotransferases tem sido usada como indicadora de danos hepatocelulares desde 1955. A ALT é encontrada no fígado e catalisa a transferência do grupo amino da alanina, permanecendo o ácido pirúvico. A atividade da ALT é significativamente elevada em uma variedade de alterações hepáticas incluindo infecções virais, cirrose, esteatose não alcoólica e toxicidade por drogas (MONTEIRO, 2010).

Segundo Henry (2008), as aminotransferases são enzimas que indicam alterações na função hepática, pois concentrações elevadas de ALT indicam alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos. A ALT é um indicador sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, uma vez que a AST não é liberada tão rapidamente quando comparada a ALT, pois essa última é essencialmente citoplasmática. As enzimas são liberadas pelos hepatócitos por meio de uma variedade de mecanismos, os quais determinam o padrão de elevação enzimática. O padrão mais comum de elevação na lesão é o dano irreversível à membrana celular seguido de morte da célula, levando ao extravasamento das enzimas citoplasmáticas.

A FA sérica tem grande significado clínico na investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações da atividade da enzima são encontradas, principalmente na obstrução extrahepática. Neste caso, a atividade da FA se eleva devido ao incremento na síntese da enzima, induzida pela colestase (HENRY, 2008).

Na avaliação da função renal, pode-se usar a creatinina sérica para estimar o ritmo de filtração glomerular. Valores aumentados indicam a deterioração da função renal, sendo que o nível sérico geralmente acompanha, paralelamente, a severidade da doença renal (KIRSZTAJN, 2007).

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não proteico formado irreversivelmente pela hidrólise não enzimática da creatina liberada durante a defosforilação da creatina fosfato. Embora muitos tecidos utilizem a creatina, o músculo esquelético é o principal estoque de creatina e sítio de produção de creatinina. Uma vez gerada, a creatinina entra na circulação por difusão simples e é filtrada pelos rins, sendo posteriormente excretada na urina (HEYMSFIELD et al, 2005).

A excreção de creatinina só é realizada por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal (KIRSZTAINS, 2007). Diferente da uréia, a produção de creatinina é constante e muito pouco afetada pelo aumento do catabolismo das proteínas tissulares e da dieta (HENRY, 2008).

A uréia é o maior produto final do catabolismo de aminoácidos e proteínas, e é gerada no fígado através do ciclo da uréia. Do fígado, a uréia entra no sangue para ser distribuída a todos os fluidos intracelulares e extracelulares. A maior parte da uréia é finalmente excretada pelos rins, porém quantidades mínimas são também excretadas pela transpiração e degradadas por bactérias nos intestinos. As concentrações séricas de uréia variam amplamente no indivíduo saudável e são influenciadas por fatores diversos como a ingestão dietária de proteínas e o estado de hidratação (WOO; CANNON, 1995).

A principal utilidade clínica da uréia parece estar na determinação em conjunto com a creatinina. O nível de uréia serve como um índice preditivo da insuficiência renal sintomática e de desordens hepáticas (GARCIA; KANAAN 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade oral subcrônica do EPS lasiodiplodana, produzido pelo fungo *L.theobromae* MMPI em camundongos, machos e fêmeas, da linhagem Swiss (*Mus musculus*).

### 2.2 Objetivos específicos

- Produzir o EPS lasiodiplodana, através do cultivo do fungo *L. theobromae* MMPI sob fermentação submersa, utilizando glicose como única fonte de carbono;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do EPS através da determinação de parâmetros bioquímicos toxicológicos e hematológicos e da investigação histopatológica de órgãos vitais;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do EPS através da observação do surgimento de sinais clínicos de toxicidade e letalidade;
- Avaliar o perfil lipídico *in vivo* a partir do tratamento subcrônico com EPS;
- Avaliar alterações na glicemia a partir do tratamento subcrônico com EPS.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### **3.1.1 Reagentes**

Os reagentes foram adquiridos comercialmente com grau de pureza adequado aos experimentos. Os principais reagentes utilizados foram: glicose, sais para preparo de Meio Mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), meio PDA (agar-batata-dextrose), Ágar Saboraud-dextrose, fenol P.A. cristal, ácido sulfúrico concentrado, formalina 10%, etanol P.A. , Kits Labtest, Corante *May-Grunwald-Giemsa*.

##### **3.1.2 Equipamentos**

Os equipamentos utilizados para a medida de pH: pH-metro modelo B474 (Micronal); para os ensaios em biorreator: reator de mistura Biostat® B (B. Braun Biotech International) equipado com turbina de Rushton, sonda de oxigênio e pH; Centrífuga de bancada modelo Z200A (Hermle); Centrífuga de bancada microprocessada modelo NT 820 (Nova Técnica); Balança analítica modelo AB204-S (Mettler Toledo); Espectrofotômetro modelo B295II (Micronal); Para avaliação da

toxicidade: Analisador Bioquímico (Labtest 240) e microscópio óptico binocular ( Bio Focus).

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Fungo

No presente trabalho utilizamos o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*) o qual foi mantido em meio PDA (Ágar-batata-dextrose) sob refrigeração a 4°C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo meio PDA (figura 3).



**Figura 3:** Fungo *L. theobromae* MMPI cultivado em Agar BDA.

### 3.2.2 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, inicialmente foi transferido uma alçada de micélio do fungo para uma placa de Petri contendo meio PDA. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas. O micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Meio Mineral Mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L) e cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (180 rpm). A pré-cultura foi homogeneizada em mixer. O homogeneizado de células foi centrifugado e no micélio recuperado foi adicionada

solução fisiológica estéril para originar uma solução padrão com absorvância de 0,4 a 0,5 lido em 400 nm (STELUTI et al, 2004).

### **3.2.3 Produção do exopolissacarídeo em biorreator de mistura**

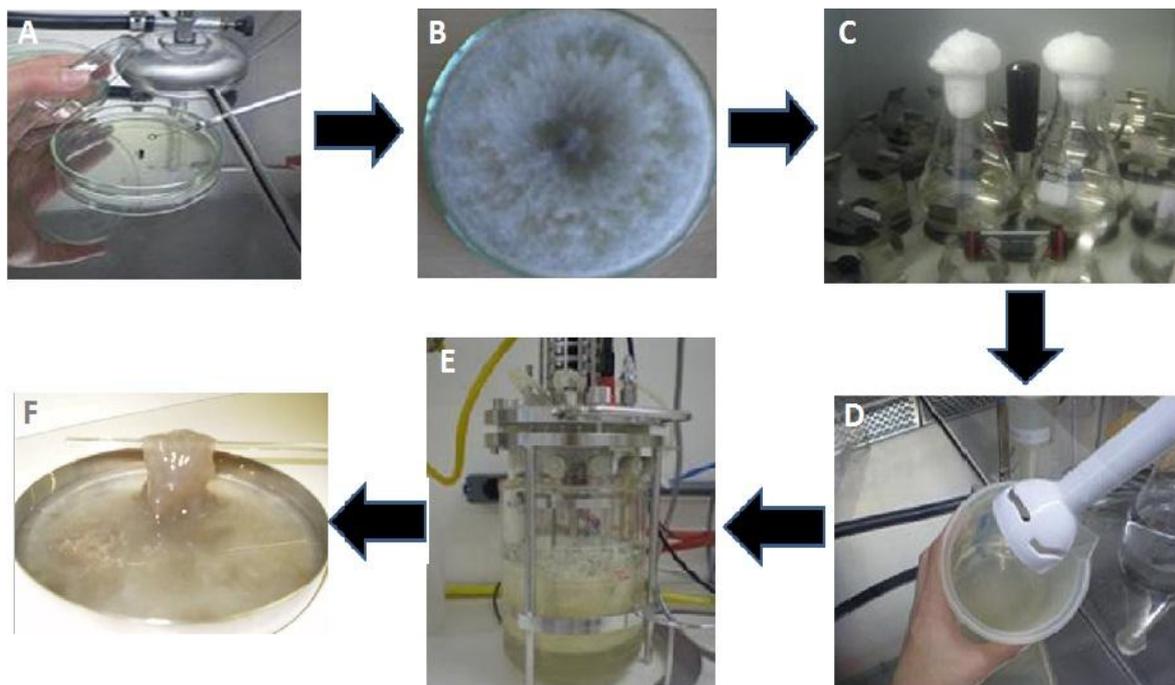
O EPS lasiodiplodana, foi produzido de acordo com Cunha e colaboradores (2012). *L.theobromae* foi cultivado em cultura submersa, em biorreator de mistura (Biostat B, B. Braun International) com cuba de 2 L, equipado com sonda de oxigênio, eletrodo para o monitoramento de pH. O volume de trabalho foi de 1,0 L, fluxo de ar de 0,8 vvc, tempo de cultivo de 96 horas e 28 °C de temperatura.

O meio de cultivo para a produção do EPS foi formulado com a fonte de carbono, glicose, na concentração de 20 g/L, fonte de nitrogênio, extrato de levedura, na concentração de 2 g/L, 50 mL de inóculo e 1000mL Meio de Sais Minerais de Vogel (VOGEL, 1956). O pH inicial ajustado para 6,0 com solução molar de ácido clorídrico (HCl).

### **3.2.4 Separação do exopolissacarídeo e biomassa fúngica**

A biomassa fúngica foi separada do caldo fermentado por centrifugação (1250 x g 30 min.), lavada com solução fisiológica estéril, recuperada por filtração e seca 70 °C até massa constante.

O EPS foi recuperado do caldo fermentado, livre de células, por precipitação com 4 volumes de etanol absoluto. Após isso o EPS foi dialisado, liofilizado e congelado.



**Figura 4:** Etapas da produção de lasiodiplodana: (A, B, C e D) Etapas para o preparo do inóculo; (E) Produção do EPS em biorreator de mistura; (F) EPS dialisado.

### 3.2.5 Preparo da lasiodiplodana

Foi preparada uma solução de EPS lasiodiplodana na concentração de 5 g/L em salina fisiológica. Após a solubilização parcial, esta foi autoclavada à 120°C, por 20 minutos, e após ter sido resfriada foi transferida para recipientes previamente esterilizados com volumes suficientes para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Uma amostra da solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (DULBOIS et al, 1956). Através destas análises foram dosadas a concentração de EPS utilizada durante todo o experimento.

### 3.2.6 Protocolo experimental para avaliação da toxicidade in vivo

Foram utilizados 32 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), sendo 16 machos e 16 fêmeas, pesando entre 25 e 30 g, com faixa etária próxima de 60 dias, provenientes do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno mantidos sob condições controladas de

temperatura (25°C) e ciclo claro/ escuro (12h/12h) com água e alimentação (ração Purina). Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA/UNICENTRO, protocolo nº 046/2011.

Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo dois grupos compostos por machos, grupo controle e grupo EPS e dois grupos compostos por fêmeas, controle e EPS. Os grupos controle, macho e fêmea, receberam via gavagem solução salina fisiológica (NaCl, 0,9%). Nos outros dois grupos foram administrados, via gavagem, o EPS lasiodiplodana na dose de 50mg/Kg por dia, durante os 28 dias do tratamento, respeitando o mesmo intervalo da aplicação da solução salina.

Em relação a dose, foi escolhida a máxima concentração em função da capacidade de solubilização do EPS.

A avaliação clínica dos seguintes parâmetros: modificações na pele, pêlos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e do sistema nervoso central foi realizada diariamente, contemplando a avaliação de efeitos gerais (ALMEIDA et al, 1983), ou seja, alterações no estado consciente e disposição, no sistema motor, no tônus muscular, no sistema nervoso central (tremores, convulsão e sedação) e no sistema nervoso autônomo (lacrimejamento, salivação e respiração).

### **3.2.7 Análises bioquímicas e hematológicas**

No final do período do tratamento e após jejum de 12 horas, os camundongos receberam anestesia com Ketamina (1 µL por grama de peso) e Xilazina ( 0,5 µL por grama de peso) e foi realizada punção cardíaca para a coleta de amostras de sangue. As amostras foram colocadas em tubos heparinizados, os quais foram imediatamente destinados para as determinações bioquímicas, utilizando os Kits BioLab para as seguintes determinações: Glicose, Colesterol total, LDL- Colesterol, HDL-Colesterol, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e uréia.

Os parâmetros hematológicos dos animais como a contagem global de leucócitos, foi realizada em câmara de Neubauer. Extensões sanguíneas coradas com

May-Grunwald-Giemsa foram confeccionadas para a contagem diferencial de leucócitos (DACIE e LEWS, 1991).

### **3.2.8 Análise Histopatológica**

Após a eutanásia dos animais, os seguintes órgãos foram retirados: fígado, coração, rins e baço; armazenados e fixados em formaldeído 10%, por um período mínimo de 48 horas. Em seguida os fragmentos foram submetidos à clivagem e processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.). Os órgãos descritos acima foram avaliados quanto à presença ou não de congestão, edema, hemorragia, degeneração ou necrose.

### **3.2.9 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança e com post hoc de Tukey (significância de  $P < 0,05$ ), entre os resultados dos quatro grupos de estudo.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

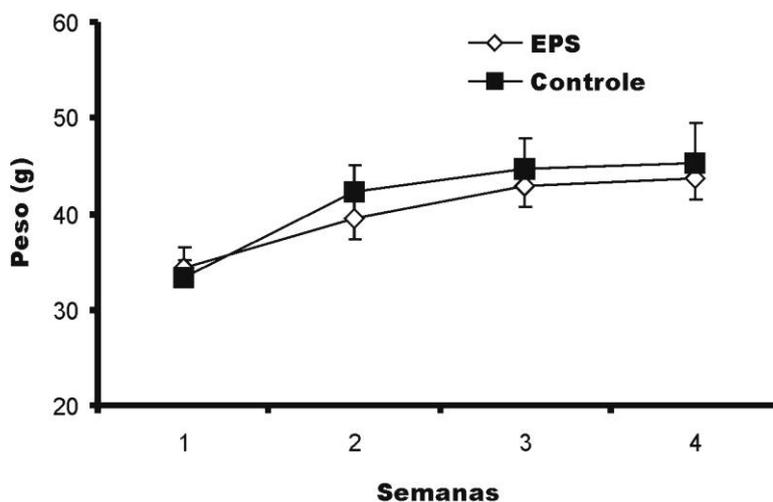
A seguir estão apresentados os resultados de toxicidade, perfil glicêmico e lipídico decorrentes do uso subcrônico da lasiodiplodana em camundongos machos e fêmeas.

### **4.1 Triagem comportamental e letalidade**

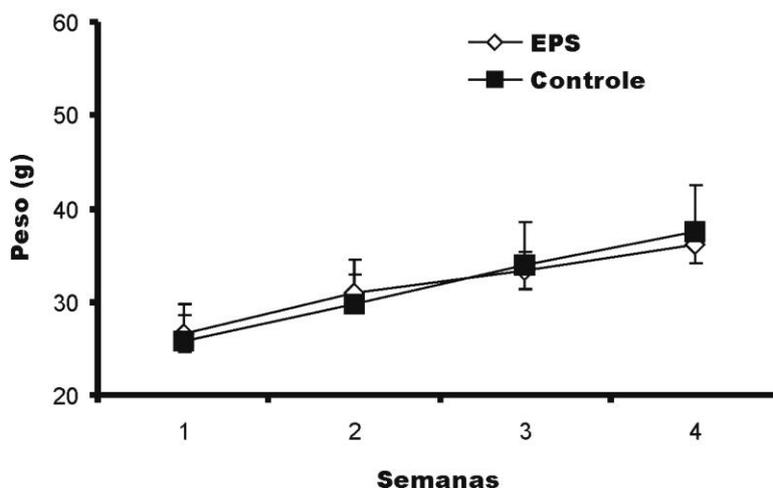
Durante o tratamento, não foram identificados sinais de toxicidade nos animais, em ambos os sexos. Além disso, o percentual de letalidade foi nulo durante os 28 dias de tratamento.

#### 4.2 Influência do exopolissacarídeo lasiodiplodana no peso dos camundongos após tratamento subcrônico

As figuras 4 e 5 mostram o ganho de peso dos camundongos machos e fêmeas no decorrer do tratamento. Os resultados mostram que não houve diferença significativa na evolução ponderal entre os grupos tratamento e controle para machos e fêmeas.



**Figura 5.** Avaliação ponderal dos camundongos machos durante tratamento subcrônico com lasiodiplodana. n=8. (Valores: média  $\pm$  desvio padrão)



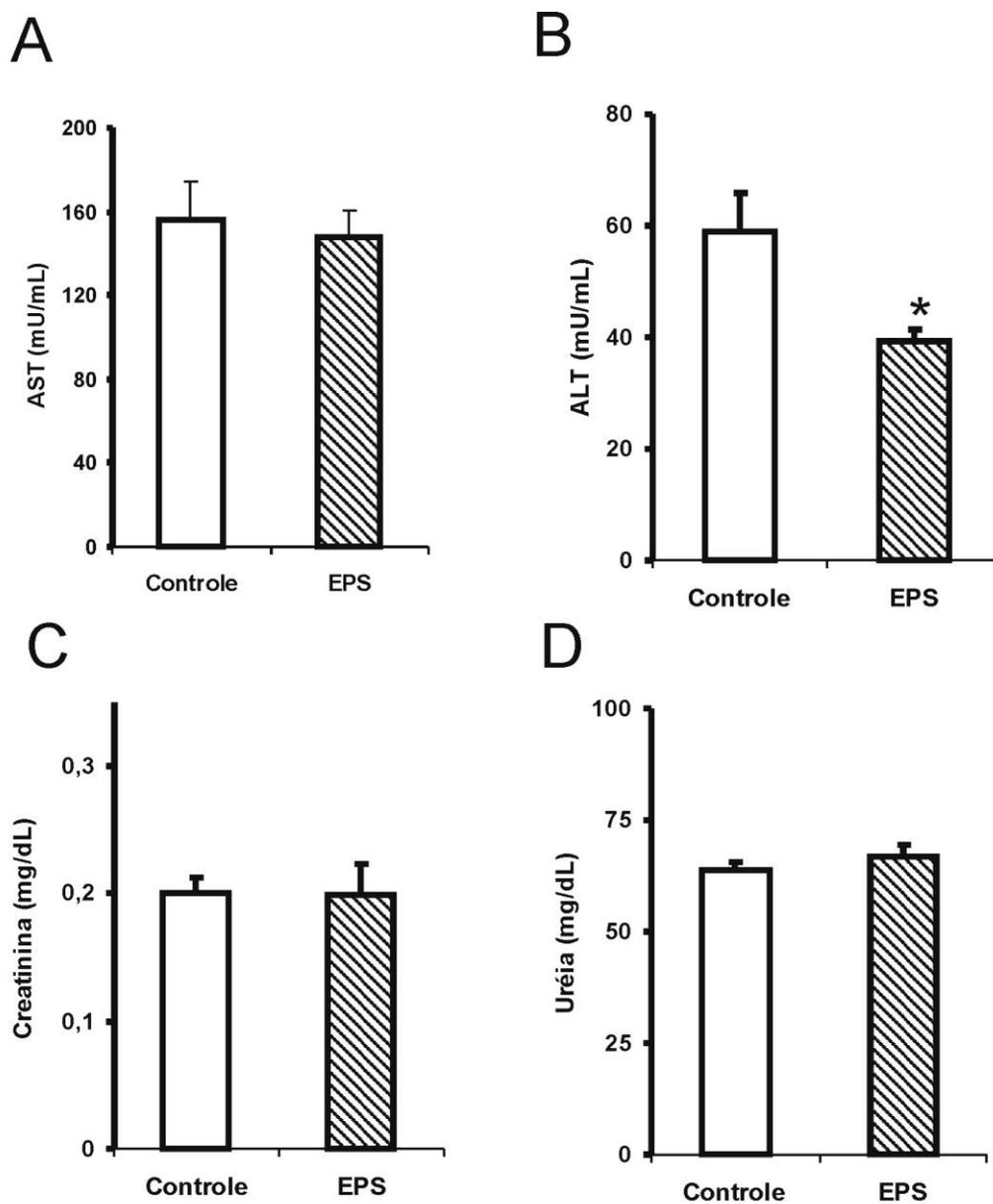
**Figura 6.** Avaliação ponderal das fêmeas durante tratamento subcrônico com lasiodiplodana. n=8. (Valores: média  $\pm$  desvio padrão)

Poucos trabalhos citam a perda de peso corpóreo dos animais durante experimentos com EPS fúngicos. Talvez, esta falta de dados explique a inexistência de diferenças estatísticas entre os grupos controle e os tratamentos com diferentes EPS, sugerindo que as glucanas provavelmente não alteram significativamente o ganho de peso dos animais, quando realizado o tratamento por gavagem (MIRANDA, 2006).

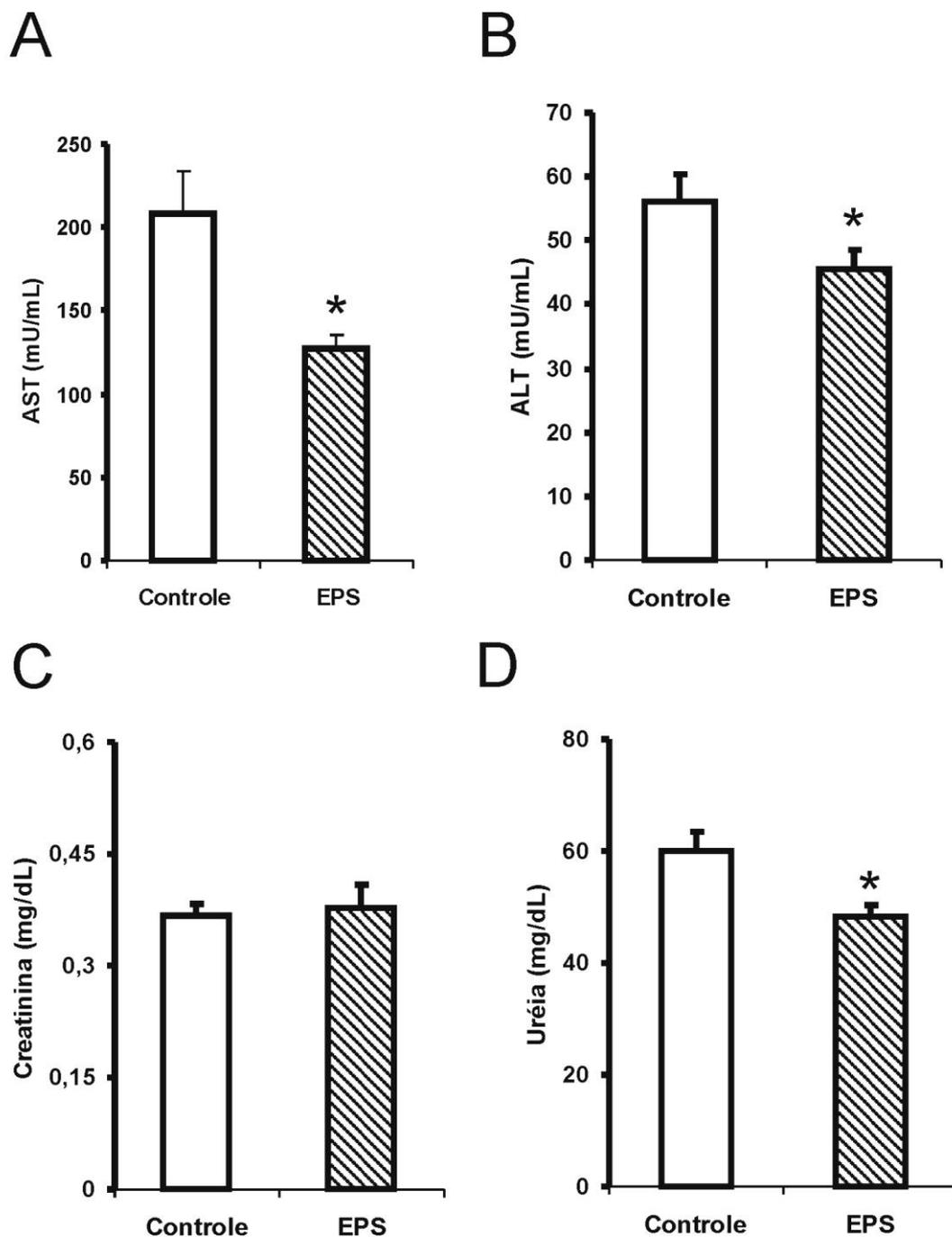
Um estudo com a ingestão de  $\beta$ -(1-3)-D-glucana, psyllium, 8g/dia por gavagem mostrou uma redução de 13% no peso de ratos tratados em relação ao grupo controle (KHOURY et al, 2011).

#### 4.3. Avaliação de Parâmetros Bioquímicos de Toxicidade

Em relação aos marcadores de hepatotoxicidade, houve uma significativa redução na atividade da ALT nos machos (35%) [F(1,14): 3,0;  $P < 0.05$ ; ver Fig. 6] e nas fêmeas (20%) [F(1,14): 4,5;  $P < 0.05$ ; ver Fig. 7]. Os níveis de AST nos machos também foram menores nos grupos tratados ( $148 \pm 36,33$ ) em relação ao grupo controle ( $155,71 \pm 53,74$ ), porém sem significado estatístico. De forma semelhante, foi verificada uma redução de 40% na atividade da AST [F(1,14): 9,9;  $P < 0.05$ ] e de 20% nos valores de uréia, observadas somente nas fêmeas [F(1,14): 8,3;  $P < 0.01$ ].



**Figura 7.** Marcadores bioquímicos de toxicidade em camundongos machos submetidos ao tratamento subcrônico com o EPS lasiodiplodana. Transaminases (A) AST e (B) ALT; (C) creatinina e (D) ureia. (\*) Valores onde  $p < 0.05$ .  $n=8$ . (Valores: média  $\pm$  desvio padrão)



**Figura 8.** Marcadores bioquímicos de toxicidade em camundongos fêmeas submetidos ao tratamento subcrônico com o EPS lasiodiplodana. Transaminases (A) AST e (B) ALT; (C) creatinina e (D) uréia. (\*) Valores onde  $p < 0.05$ .  $n=8$ . (Valores: média  $\pm$  desvio padrão)

Na avaliação de toxicidade por drogas há alguns exemplos em que a elevação de ALT sérica em roedores ocorreu mesmo na ausência de danos histológicos ao fígado (YANG *et al*, 2009).

Até o presente momento, são escassos os estudos que investigam o efeito do tratamento subcrônico ou crônico em marcadores bioquímicos e toxicidade a partir do uso de  $\beta$ -D-glucanas. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento subcrônico com o EPS, em machos e fêmeas, não elevou os níveis de AST e ALT, sugerindo ausência de dano hepático.

Outro estudo corrobora com os resultados do presente trabalho. Já foi relatado que o EPS de *Lentinula edodes*, na dose 65 mg/Kg, foi capaz de diminuir os níveis de AST e ALT em ratos submetidos ao tratamento durante 30 dias (SHAH *et al*, 2011).

Em relação aos marcadores de lesão renal, avaliados pela creatinina e uréia, não foram verificadas alterações significativas.

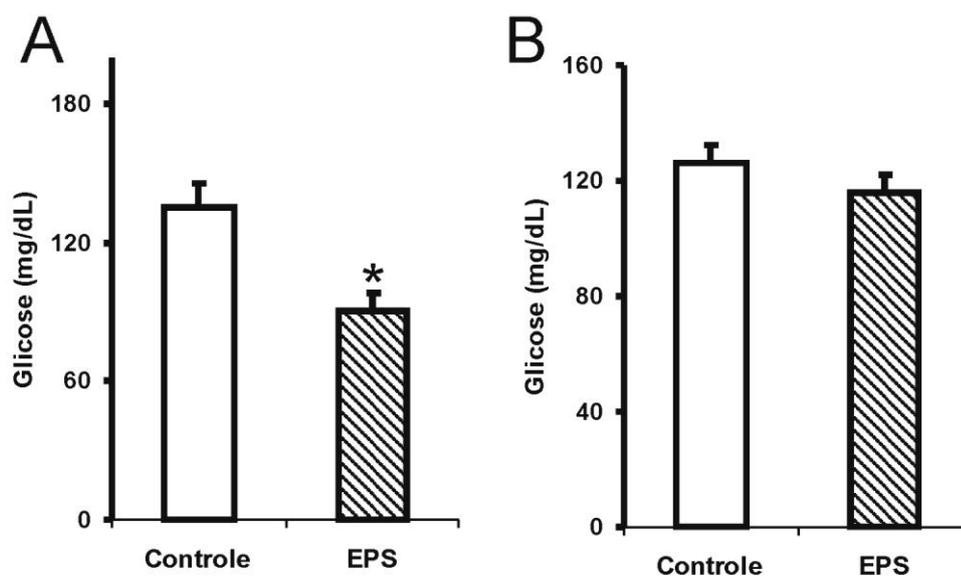
Os valores de creatinina e de uréia não apresentaram elevações, independente do sexo, o que remete para uma ausência de dano renal e hepático, respectivamente. De forma interessante, o grupo das fêmeas apresentou redução de 20% nos valores de uréia.

Em nosso trabalho a lasiodiplodana reduziu significativamente os níveis de uréia nas fêmeas, porém não houve elevação dos níveis séricos de transaminases, sugerindo que esta alteração dos níveis de uréia não foi ocasionada por lesão hepática, mas provavelmente pelo estado de hidratação ou pela ingestão diária.

Valores aumentados de uréia e creatinina podem sugerir comprometimento da função renal, no presente estudo não foi observado elevação destes parâmetros. Portanto, nenhum sinal de toxicidade renal pode ser relacionado a administração da lasiodiplodana.

#### **4.4 Avaliação do perfil glicêmico**

O uso subcrônico do EPS repercutiu em redução significativa na glicemia (35%) somente nos camundongos machos [F(1,14): 9,5; P<0.01], sendo observada apenas uma tendência para redução (10%) nas fêmeas (Figura 8).



**Figura 9.** Níveis plasmáticos de glicose (mg/dL) em camundongos expostos ao tratamento subcrônico com o EPS lasiodiplodana (A) machos e (B) fêmeas. (\*) Valores onde  $p < 0,05$ . (Valores: média  $\pm$  desvio padrão)

Outros estudos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo. Recentemente, Miranda *et al* (2011) mostraram um efeito hipoglicêmico a partir do uso da botriosferana ( $\beta$ - 1 $\rightarrow$ 3 D-glucana) durante duas semanas, onde foi mostrada uma redução de 50% nos níveis de glicemia e 20% nos níveis de LDL em ratos diabéticos (indução por estreptozotocina- STZ) tratados com dieta hiperlipídica.

Igualmente, polissacarídeos solúveis derivados da *Tremella mesentérica* mostraram uma redução significativa nos níveis glicêmicos em ratos diabéticos (indução por estreptozotocina STZ) (NICOLOSI *et al*, 1999).

Em trabalho com uso do EPS produzido pelo fungo *Phellinus baumii* quando administrado por gavagem em ratos diabéticos, foi verificado uma redução de 52% nos níveis plasmáticos de glicose (HWANG *et al*, 2005)

Nenhum trabalho até o presente, explica como os EPS são absorvidos para a corrente sanguínea, visto que, estes compostos são macromoléculas e não podem ser absorvidos pelas células do trato gastrointestinal. Uma hipótese seria que possivelmente existiria um transportador específico para determinadas  $\beta$ - glucanas, levando-as até a corrente sanguínea (SILVA, 2009).

Há muito interesse pelo uso de produtos naturais para o controle do diabetes e resistência a insulina desencadeando obesidade. Desta forma, o uso de biopolímeros,

mais especificamente as  $\beta$ -glucanas, tem mostrado resultados promissores no controle glicêmico (CHEN, 2008; KIM *et al*, 2008; MIRANDA *et al*, 2011), porém estes estudos não traçam ainda um mecanismo de ação que explique a redução dos níveis de glicose plasmática observados.

Segundo Hawng *et al* (2005) acredita-se que muitos destes efeitos podem estar relacionados à uma atuação corretiva das funções hepáticas e pancreáticas, percebidas pela redução na atividade de transaminases hepáticas (AST e ALT) mostradas no presente estudo. Entretanto, ainda se desconhece o mecanismo que desencadeia especificamente este efeito.

O presente estudo se propôs a avaliar a possível existência de algum efeito tóxico a partir do uso subcrônico do EPS. De forma interessante neste estudo, foi observada redução nos níveis de glicose, mesmo que somente nos camundongos machos e na atividade de transaminases hepáticas até mesmo nestes camundongos saudáveis, o que pode ser levado em consideração para futuras investigações de  $\beta$ -D-glucanas no campo preventivo e coadjuvante no tratamento de diferentes doenças crônico-degenerativas, como diabetes, hipertensão e dislipidemias.

#### **4.5 Avaliação do Perfil Lipídico**

Os valores de colesterol total, LDL, VLDL, HDL e triglicerídeos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e EPS para ambos sexos (Tabela 1). Os animais estudados no presente trabalho não apresentavam hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, conforme os valores de referência apresentados nos grupos controles machos e fêmeas tratados com solução salina (Ver Tabela 1).

**Tabela 1:** Perfil lipídico dos grupos machos e fêmeas após 28 dias de tratamento com o EPS lasiodiplodana por gavagem.

<b>Tratamento</b>	<b>Colesterol</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>VLDL</b>	<b>Triglicerídeos</b>
<b>Grupo<sup>a</sup></b>	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
<b><i>Machos</i></b>					
Controle	143 ± 14.2	37 ± 3.9	70 ± 14,0	36 ± 12,0	178 ± 61,0
EPS	133 ± 17.2	36 ± 9,0	61± 14.1	36 ± 10,0	180 ± 50,0
<b><i>Fêmeas</i></b>					
Controle	100 ± 8,17	26 ± 4.8	42 ± 16.6	32 ± 12,4	161 ± 19.0
EPS	91 ± 17,11	20 ± 6.6	38 ±16.7	33 ± 8.5	164 ± 64.6

<sup>a</sup> n = 8. (Valores: média ± DP)

A administração da lasiodiplodana mostrou uma redução nos níveis plasmáticos de colesterol, em ambos os sexos, porém esta redução não foi estatisticamente significativa. Nos machos, o grupo tratado com EPS, mostrou uma redução de 7 % nos níveis de colesterol e nas fêmeas houve uma redução de 9% .

Poucos estudos examinaram os efeitos hipocolesterolêmicos de  $\beta$ - glucanas, produzidas em cultura submersa (HWANG *et al*, 2006) ou de polissacarídeos em animais hiperlipidêmicos (CASTRO, 2003). Desta forma, futuros estudos usando modelos com diabetes, hipercolesterolêmica e hipertrigliceridemia podem ser conduzidos para avaliar um real poder preventivo ou tratativo a partir do uso de  $\beta$ -D-glucans.

Embora o mecanismo de atividade hipocolesterolêmica de diferentes glucanas seja pouco claro, tem-se proposto que o aumento da viscosidade desses EPS podem reduzir a absorção do colesterol e triglicerídeos, ou diminuem a atividade de enzimas digestivas, reduzindo assim os níveis lipídicos (NICOLOSI *et al*, 1999).

#### 4.6 Parâmetros hematológicos

Entre os grupos controle e EPS, de ambos os sexos, não foram observadas diferenças significantes em relação à contagem global de leucócitos. Da mesma forma, também não foram observadas alterações na contagem diferencial de leucócitos, conforme apresentado na tabela 2. Este resultado sugere que o EPS não desenvolveu nenhuma resposta inflamatória na análise destes parâmetros hematológicos, de acordo com os valores de referências sugeridos na literatura segundo Lorenzi (2006).

**Tabela 2:** Parâmetros hematológicos dos grupos machos e fêmeas após 28 dias de tratamento com o EPS lasiodiplodana por gavagem.

Leucograma	Controle <sup>a</sup>		EPS <sup>a</sup>	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Leucócitos totais (mm <sup>3</sup> )	4,3 ± 0,20	4,0 ± 0,31	4,2 ± 0,12	4,1 ± 0,67
Neutrófilos (%)	25 ± 1,58	25,5 ± 1,50	21 ± 2,21	21,87 ± 3,32
Bastonetes (%)	0,62 ± 0,18	1,12 ± 0,22	1,0 ± 0,18	1,425 ± 0,20
Linfócitos (%)	71,12 ± 2,01	72,12 ± 2,30	75,5 ± 2,73	75,12 ± 3,18
Monócitos (%)	2,85 ± 0,91	2,95 ± 0,85	1,97 ± 0,45	3,0 ± 0,46
Eosinófilos (%)	0,37 ± 0,18	0,75 ± 0,17	0,12 ± 0,08	0,12 ± 0,08

<sup>a</sup>n = 8. (Valores: Média ± DP)

Outro estudo corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. A administração de uma  $\beta$ -(1-3)-D-glucana, 70 mg/Kg, durante 13 semanas em ratos, não apresentou alteração nos parâmetros hematológicos, alterando apenas o perfil bioquímico (JONKER et al, 2010).

#### 4.7 Parâmetros Histopatológicos

O exame histopatológico dos órgãos vitais (rim, baço, coração e fígado) não detectou alteração em machos e fêmeas, tanto no grupo controle quanto ao tratado com o EPS lasiodiplodana. Conforme podemos visualizar nas figuras 10 e 11.

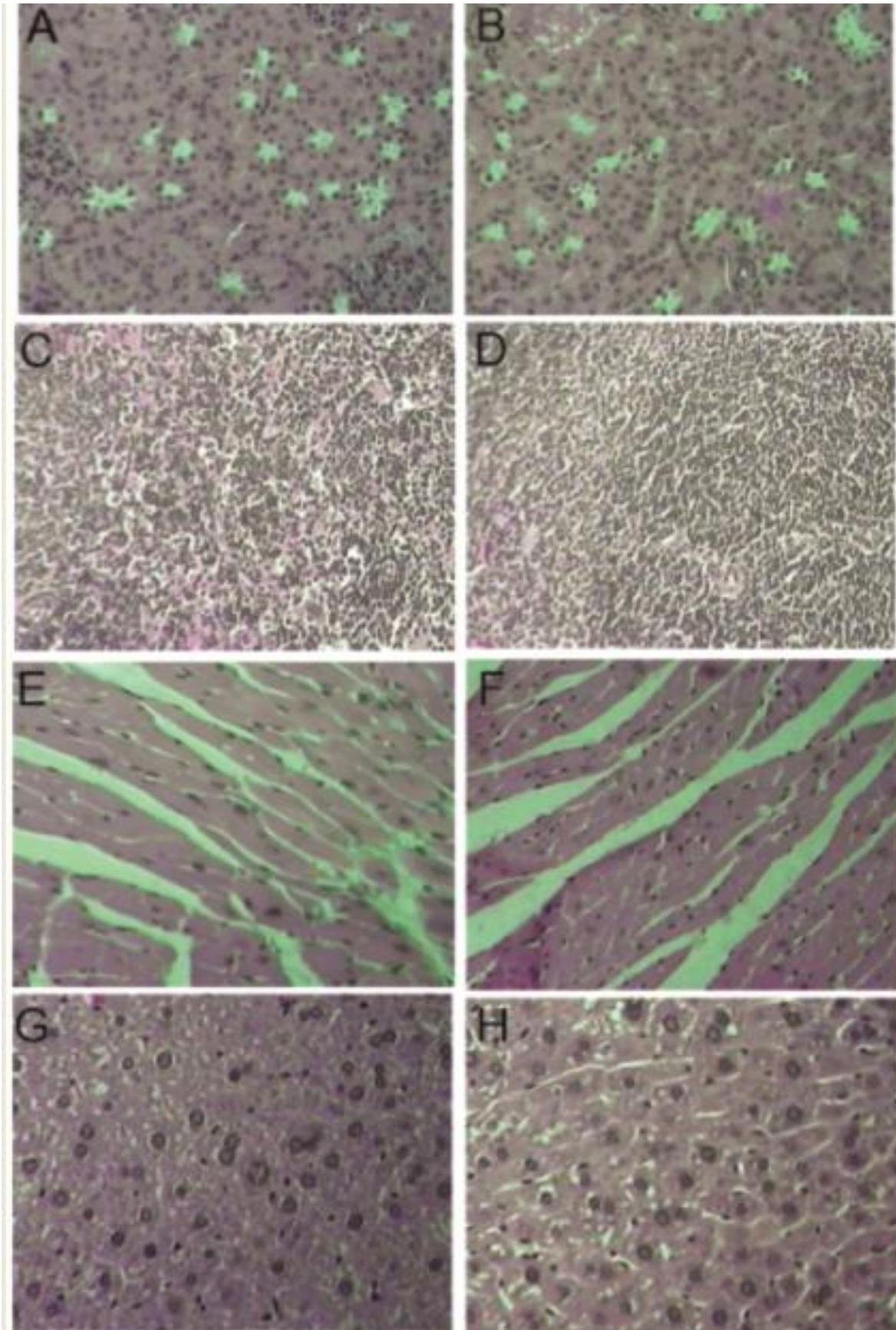
Nos rins, o EPS não promoveu alterações histológicas em ambos os sexos. Não foram encontrados focos de inflamação ou fibrose, congestão ou áreas de hemorragia. A arquitetura lobular foi preservada, o córtex apresentou glomérulos regularmente distribuídos, cápsula de Bowman, com espaço de refração artefactual além de tufo capilares finos. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não evidenciaram alterações (Figuras 10A, 10B, 11A e 11B). Este resultado confirma a avaliação bioquímica que não mostrou alterações metabólicas neste órgão.

O baço apresentou características histológicas normais (Figuras 10C, 10D, 11C e 11D) e o tecido cardíaco, representado por fibrocélulas, com estriações transversais e núcleos únicos ou duplos, centralmente posicionados, permanecendo intacto, sem nenhuma infiltração inflamatória, edema ou degeneração fibrilar ( Figuras 10E, 10F, 11E e 11F).

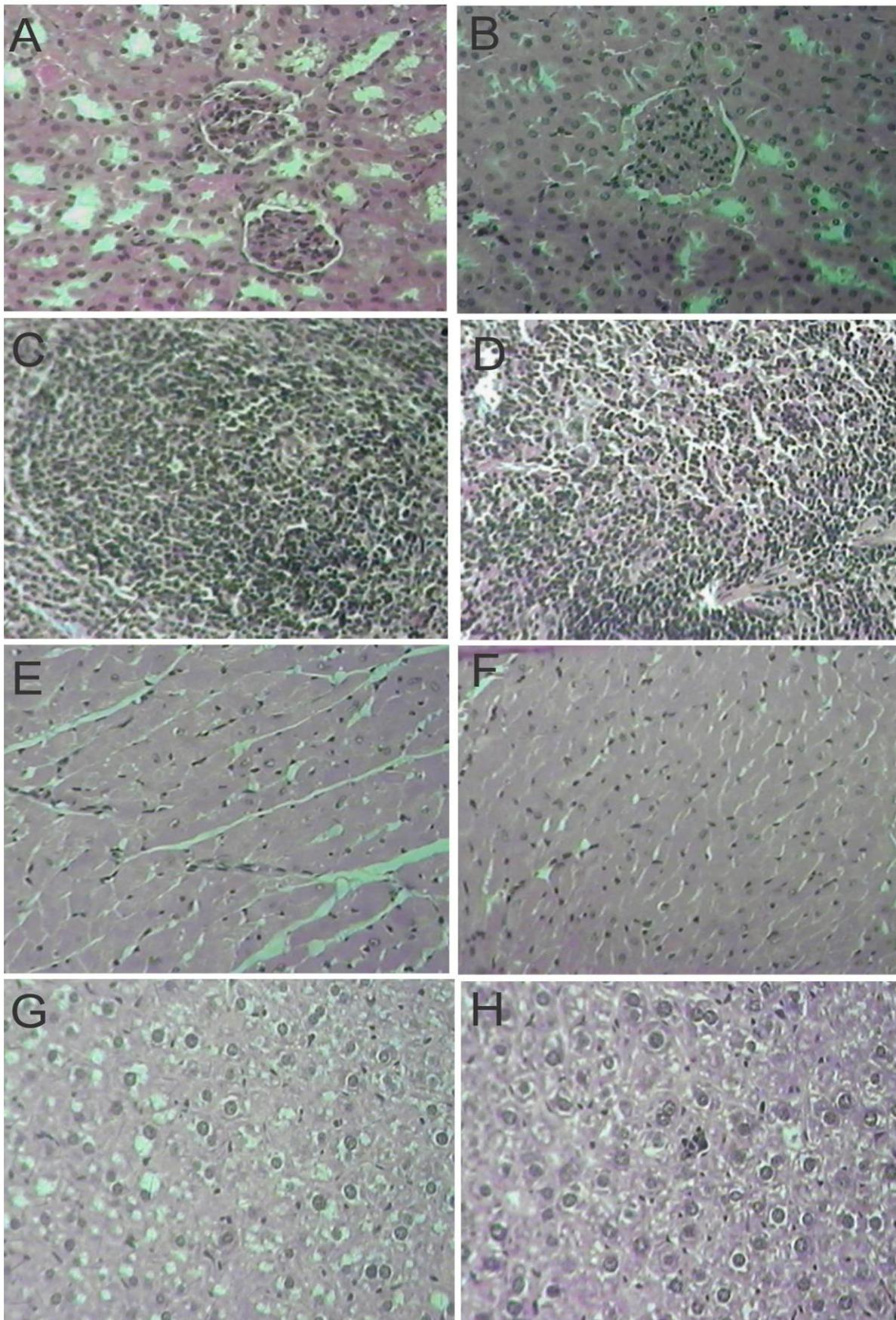
No fígado o tratamento subcrônico com lasiodiplodana não alterou a arquitetura lobular, com hepatócitos normais isomorfos. Com espaços portais com tríades vasculobiliares sem particularidades histológicas. Ausência de vacuolização, congestão ou processo inflamatório.

A ausência de alterações histopatológicas do fígado (Figuras 10G, 10H, 11G e 11H) está de acordo com o perfil bioquímico apresentado pelos animais no presente estudo.

Karaduman *et al* (2010) relataram o efeito hepatoprotetor de uma  $\beta$ - 1 $\rightarrow$ 3 D- glucana. Neste estudo, o EPS mostrou diminuição representativa da lesão hepática, verificada a partir de estudo histopatológico em modelo de toxicidade hepática induzida por taxol. De forma semelhante, outra  $\beta$ - 1 $\rightarrow$ 3 D- glucana também apresentou um efeito preventivo na toxicidade hepática do acetaminofeno. Os resultados sugeriram que a glucana exerce efeitos citoprotectores contra os danos oxidativos e pode ser de uso terapêutico na prevenção da toxicidade induzida pelo acetaminofeno (TOKLU *et al*, 2006).



**Figura 10.** Cortes histológicas dos machos (aumento de 100X) (A) Tecido renal do grupo controle; (B) Tecido renal do grupo tratado com EPS ; (C) Tecido esplênico do grupo controle; (D) Tecido esplênico do grupo tratado com EPS; (E) Tecido cardíaco do grupo controle; (F) Tecido cardíaco do grupo tratado com EPS; (G) tecido hepático do grupo controle; (H) tecido hepático do grupo tratado com EPS.



**Figura 11.** Cortes histológicas das fêmeas (aumento de 100X) (A) Tecido renal do grupo controle; (B) Tecido renal do grupo tratado com EPS ; (C) Tecido esplênico do grupo controle; (D) Tecido esplênico do grupo tratado com EPS; (E) Tecido cardíaco do grupo controle; (F) Tecido cardíaco do grupo tratado com EPS; (G) tecido hepático do grupo controle; (H) tecido hepático do grupo tratado com EPS.

## 5. CONCLUSÃO

- O fungo *L. theobromae* MMPI produziu o EPS, denominado lasiodiplodana, em fermentação submersa, quando utilizado glicose como única fonte de carbono.
- O estudo mostrou que a ingestão subcrônica do EPS lasiodiplodana não apresentou qualquer sinal de toxicidade e letalidade em camundongos, independente do sexo.
- O tratamento subcrônico com lasiodiplodana reduziu os níveis de ALT em machos e de AST e ALT nas fêmeas, sugerindo um efeito hepatoprotetor.
- A lasiodiplodana, na concentração testada, exibiu significativa atividade hipoglicemia em camundongos machos, reduzindo em 35% os níveis plasmáticos de glicose.
- O tratamento subcrônico com lasiodiplodana não evidenciou alterações hematológicas e histopatológicas.
- O perfil lipídico dos camundongos não foi alterado a partir do uso subcrônico de lasiodiplodana.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALBAN, S.; FRANS, G.. Characterization of the anticoagulant actions of a semi synthetic curdlan sulfate. *Thrombosis Research*. v. 99, p. 377-388, 2000.
- ALMEIDA, R.N.; ALMEIDA, J.A.; LACET, M.A.A.; THOMAS, G. Triagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. In: SIMPÓSIO DE PRODUTOS NATURAIS, 2., 1983. *Anais*. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, Ed. Universitária, p.345-356, 1983.
- BABICEK, K., CECHOVA, I, SIMON, R.I. Toxicological assessment of a particulate yeast beta1,3 glucan in mice. *Food and Chemical Toxicology* ,p.1719-1730, 2007.
- BAGGIO, C. H. Tese (Doutorado em Farmacologia)- *Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e antiinflamatória da (1→3),(1→6) b-glucana isolada do Pleurotus pulmonarius*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 25, p. 29-42, 2004
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BERWANGER, A. L. S. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulate*. . Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS, 2005.
- BONGIOVANI, R..A.M. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). *Características reológicas do exopolissacarídeo botriosferana produzido pelo fungo Botryosphaeria rhodina MAMB- 05 em três fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose*. Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, SP, 2008.
- BOHN, J.; MILLER, J.N.  $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BULOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Biotecnologia Básica*. Zaragoza: Acribia, p. 449-450. 1987.
- CAO, Q. Z.; LIN, Z. B. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacol Sin*, v.25, p.833-838, 2004.

CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J.; BENEDICTO, M.L. Effects of diet supplementation with three soluble polysaccharides on serum lipid levels of hypercholesterolemic rats. *Food Chem.*, v.80, p. 323-330, 2003.

CHEN, J. RAYMOND K. *Beta*-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vasc. Health Risk Manag.*, v.4, p. 1265-1272, 2008.

CHOA, E. J., OHA, J. Y., CHANGB, H. Y. AND YUN, J. W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 127 , p. 129–140, 2006.

COLLEONI-SIRGHI, M.; FULTON, D. B.; WHITE, P. J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- $\beta$ -D-glucans from high- $\beta$ -glucan and traditional oat lines. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 237-249, 2003.

CORRADI DA SILVA, M.L., MARTINEZ, P.F., IZELI, N.L., SILVA, I.R., VASCONCELOS, A.F.D., CARDOSO, M.S., STELUTTI, R.M., GIESE, E.C., BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, v. 29, p. 85-92, 2006.

CUNHA, M.A.A.; BARROSO, R.R.; IVANOV, R.V.; BARBOSA, A.M. Produção de exopolissacarídeo pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MMPI. VI Semana de Tecnologia em Alimentos (UTFPR). v. 02, 20, 2009.

CUNHA, M.A.A.; TURMINA, J.A.; BARROSO, R.R.; IVANOV, R.V.; MARQUES, P.T.; FONSECA, E.A.; FONTES, Z.B.; DEKKER, R.F.; BARBOSA, A.M. Lasiodiplodan, an exocellular (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D- -glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. [\*Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology\*](#), v.39, 1179-1188, 2012.

DACIE, J.V. ; S.M. LEWIS. *Practical Haematology*. 7 ed., Churchill Livingstone, London, 1991

DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall  $\beta$ -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. *Biopolymers: polysaccharides II – polysaccharides from eukaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. v. 6, p. 179-213, 2002.

DE BARBA, F.F.M. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente). *Estudo da atividade antitumoral de substâncias bioativas de Pleurotus djamor sobre sarcoma 180 in vivo*. Universidade da Região de Joinville, 2010.

DELANEY, T.; CARLSON, S.; FRAZER, T.; ZHENG, R.; HESS, K.; OSTERGREN, K.; KIERZEK, J.; HAWORTH, N.; KNUTSON, K.; JUNKER, D.; JONKER, D. Evaluation of the toxicity of concentrated barley  $\beta$ -glucan in a 28-day feeding study in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* v.41 , p.477–487, 2003.

DORE, C. M. P. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). *Estudo de glucanas extraídas dos fungos *Geastrum factum* e *Polyporus dermatopus**. Universidade do Rio Grande do Norte, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBER, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p. 350-356, 1956.

FORTES, R.C. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana). *Efeitos Hematológicos, imunológicos na glicemia de jejum de pacientes com câncer gastrointestinal, após suplementação dietética com fungos Agaricus sylvaticus*. Universidade de Brasília - UNB, 2007.

FUKUDA E.K.; VASCONCELOS A. F. D. ; MATIAS A.C.; BARBOSA A. M.; SILVA, M. L. C; Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GARCIA, M.A.T.; KANAAN, S. *Bioquímica Clínica*. 1 ed., Atheneu: Rio de Janeiro, 2008.

GONZAGA, M. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA RDE, O.; LIMA, M. W.; SOARES SDE, A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *J Nat Med*, v.63, p.32-40, 2009.

HAN, S.B.; LEE, C.W.; JEON, Y.J.; HONG, N.D.; YOO, I.D.; YANG, K-H.; KIM, H.M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*, v.41, p.157-164, 1999.

HENRY, J.B. *Diagnóstico clínico: tratamento por métodos laboratoriais*. 20 ed. Manole: São Paulo, 2008.

HEYMSFIELD SB, LOHMAN, T, WANG Z. Human body composition Human Kinetics, p. 206-208, 2005.

HORN, L., MCCOIN, M., KRIS-ETHERTON, P.M., BURKE, F., CARSON, J.A., CHAMPAGNE, C.M., KARMALLY, W., SIKAND, G., The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *Journal of the American Dietetic Association* v. 108, 287-331, 2008.

HUMERES, E. DA CRUZ, G. OLIVEIRA, A. Toxicidade do fentiom relacionada à idade e ao tempo de exposição de machos e fêmeas. *An. Soc. Entomol. Bras.* vol.28, n.2, p. 285-292, 1999.

HWANG, H.J.; KIM, S.W.; JOO, J.H., KIM, H.O. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, v. 76, p.3069-3080, 2005.

ISHIBASHI, K-I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, S.; OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus*  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 42, p. 155-166, 2004.

JANG,B.S.;KIM,J.C.;RHEE,M.H.;JANG,K.H.;SONG,J.C.;KWON,O.D.;PARK,S.C.Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baunni* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Biotechnonology Letters*, v.26, p. 31-33, 2004.

JONKER D., KUPER C. M., MAQUET, M., NOLLEVAUX, G.,GAUTIER, S. Subchronic (13-week) oral toxicity study in rats with fungal chitin-glucan from *Aspergillus niger*. *Food and Chemical Toxicology* v. 48 , p. 2695–2701, 2010.

KALEEM, M.; MEDHA P.; AHMED Q U.; ASIF M.; BANO B. Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med* ; v.49, p 802- 812, 2008.

KARADUMAN, D.; EREN, B.; KELES, O.N. The protective effect of beta-1,3-D-glucan on taxol-induced hepatotoxicity: a histopathological and stereological study. *Drug Chem Toxicol.*, v.33, p. 8-16, 2010.

KIHO T.; MORIMOTO, H.; SAKUSHIMA M.; USUI S.; UKAI S. Polysaccharides in fungi. XXXV: Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.18, p. 1627-1629, 1995.

KIHO,T.; HUI, J.; YAMANE, A.; UKAI, S. Hipoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.16, p. 1291-1293, 2001.

KIM,D.H.; YANG, B.K.; JEONG, S.C.; HUR, N.J.; DAS, S.; YUN, J.W.; CHOI, J.W.; LEE, Y.S.; SONG, C. A preliminary study on the hypoglycemic effect of the exopolysaccharides produced by Five different medicinal mushrooms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.11, p. 167-171, 2001.

KIM, Y.W.; KIM, K.H.; CHOI, H.J.; LEE, D.S. Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol. Lett.*, v. 27, p.483-487, 2005.

KIRSZTAJN, G.M. Avaliação do ritmo de Filtração Glomerular.*Jornal Brasileiro Patologia Med.*, v.3, p.257-264, 2007.

KHOURY, D.E.; CUDA,C.; LUHOVYY, B.L.; ANDERSON,G.H. Beta Glucan:Health Benefits in Obesity andMetabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, v.20, p. 28, 2012.

LIMA,A.P. Dissertação (Mestrado em Biopatologia) *Análise Bioquímica e Histológica da toxicidade do Symphytum officinale fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos*. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, São José dos Campos, 2009.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; ZHU, L.F.; HUI, Y.Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Chemical and Biological Characterization of a Polysaccharide Biological Response Modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology*, Oxford, v. 14, n. 6, p. 501-510, 2004.

LORENZI, T.F. *Manual de Hematologia - Propedêutica e Clínica*, 4 ed., Guanabara

Koogan: São Paulo, 2006.

MAGNANI, M.; GOMEZ, R.J.H.C.  $\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, p. 631-650, 2008.

MATRICARDI, P.; ONORATI, I.; COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F. Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 316, p. 21–28, 2006.

MAYELL, M. Maitake Extracts and Their Therapeutic Potential. *Alternative Medicine*, v.6, p. 48-60, 2011.

MIRANDA, C.C.B.O. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). *Produção de Botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipogliceminante e hipocolesterolêmica*. Universidade Estadual de Londrina- UEL, 2006.

MIRANDA, C.C.B.; DEKKER, R.F.H.; ZAIA, C.T.; CASTRO, I.; BARBOSA, A.M. Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic, hypoglycaemic and hypocholesterolaemic activities in mice and rats. *Journal of Biotechnology* v.131, p.58–64, 2011.

MIRANDA, C.B.O.; DEKKER, R.F.H.; SERPELONI, J.M.; FONSECA, E.A.I.; COLUSC, I.M.S.; BARBOSA, A.M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.42, p.172–177, 2008.

MONTEIRO, E.A.S. Tese (Doutorado em Farmacologia). *Avaliação toxicológica da *Ipomoea asarifolia* em ratos*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, 2010.

MOTA, V.T. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*. 4 ed. Médica Missau: Porto Alegre, 2003.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. B. A; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímero via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia sp.* 7070. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n.2 p. 300-305, 2003.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, Omaha, v. 7, p. 701–724, 2007.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1513-1519, 2003.

NASCIMENTOS, M. S. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). *Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum**.

Universidade do Rio Grande do Norte, 2010.

NICOLOSI, R., BELL, S.J., BISTRIAN, B.R., GREENBERG, I., FORSE, R.A., BLACKBURN, G.L. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70, p.208–212, 1999.

NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biochemistry*, v. 153, p. 376- 380, 1944.

NOVAES, M.R.C.G.; FORTES, R.C.; GARCEZ, L.C. Cogumelos Comestíveis da família *Agaricaceae*: Aspectos nutricionais e atividade farmacológica no câncer. *Revista Sociedade Brasileira Farmacologia Hospitalar* v.2, p.15-20, 2004.

NOSÁL'OVÁ, V.; BOBEK, P.; CERNÁ, S.; GALBAVÝ, S.; STVRTINA, S. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol Res*, v.50, p.575-581, 2001.

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

ONNING, G., WALLMARK, A., PERSSON, M., AKESSON, B., ELMSTAHL, S., OSTE, R., Consumption of oat milk for 5 weeks lowers serum cholesterol and LDL cholesterol in free-living men with moderate hypercholesterolemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*. V.43, p.301– 309, 1999.

PAULSEN, B. S. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochem Rev*, v.1, p.379–387, 2002.

PITA, J.C.L.R. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). *Avaliação da Atividade Antitumoral e Toxicidade do Trachylobano-360 de Xylopi langsdorffiana St. Hil. E Tul. (Annonaceae)*. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2010.

QUEIROZ, L. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). *Avaliação do extrato do fungo Caripia Montagner no processo inflamatório*. Universidade do Rio Grande do Norte, 2008.

PEREIRA, A.V.S. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). *Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de Lasiodiplodia theobromae*, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

PITA, J.C.R.L. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). *Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de Xylopi langsdorffiana*. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

RIBEIRO, A.O.; UMEMURA, G.S.; SOUSA, R.S. Atividade Antidiabética e Efeitos Fisiológicos Associados aos  $\beta$ -Glucanos Presentes em *Rhynchelytrum repens*. *Ciênc. Biol. Saúde*, v.11, p.41-50, 2009.

RUBIN-BEJERANO, I.; ABEIJON, C.; MAGNELLI, P.; GRISAFI, P.; FINK, G. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host & Microbe*, v.11, 2007.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLIK, S. K. AND MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*, v. 6, p. 1287-1297, 2006.

SILVA, M.M.C.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M.; CUSTODIO, J.B.A.; Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*; v. 1464, p. 41-61; 2009.

SILVEIRA, J.C. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). *Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, v.160, p. 61-68, 1945.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugar. A new sugar reagent. p. 61-68, 1945.

SOUZA, C.M.C.O. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). *Produção de Metabólitos com atividade antimicrobiana e antioxidante de *Lentinula edodes* em cultivo submerso.*, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; CARBONERO, E.R.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.M.; SANTOS, A.R.S.; IACOMINI, M.N. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, v. 597, p. 86–91, 2008.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. *Journal of Basic Microbiology*, v. 44, p. 480-486, 2004.

SHAHINIAN, S.; BUSSEY, H.  $\beta$ -1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.35, n.3, p.477-489, 2000.

SHAH, S.K.; WALKER, P.A.M.D.; MOORE-OLUFEMI, S.D.; SUNDARESAN, A.; KULKARNI, A.D.; ANDRASSY, R.J. An Evidence-Based Review of a *Lentinula edodes* Mushroom Extract as Complementary Therapy in the Surgical Oncology Patient. *J. Parenteral Enteral. Nutri.*, v.20, p. 1-10, 2011.

SULLIVAN, R.; SMITH, J.E.; ROWAN, N.J. Medicinal mushroom and cancer therapy. *Spring*, v.49, p.159-170, 2006.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides.

*Trends in Biotechnology*, Limerick, v. 16, p. 41-46, 1998.

TELLES, C. B.S. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). *Análises estruturais e atividades biológicas de exopolissacarídeo extraído do fungo Pleurotus sabor-caju e de seu derivado sulfatado quimicamente*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal, 2010.

TOKLU, H.Z.; SEHIRLI, A.O.; VELIOĞLU-OĞÜNÇ, A.; CETINEL, S.; SENER, G. Acetaminophen-induced toxicity is prevented by beta-D-glucan treatment in mice. *Eur J Pharmacol.*, v. 543, p. 133-140, 2006.

TSONI, S. V.; BROWN, G. D. beta-glucans and dectin-1. *Ann N Y Acad Sci*, v.1143, p. 45-60, 2008.

VASCONCELOS, A.F.; MONTEIRO, N.; DEKKER, R.F.; BARBOSA, A.M.; CARBONERO, E.; SILVEIRA, J.L.; SASSAKI, G.L.; SILVA, R.; CONRADI, M.L. Three exopolysaccharides of the  $\beta$ -(1-6)-D-glucan type and a  $\beta$ -(1-3;1-6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. *Carbohydrate Research*, v.343, p.2481–2485, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. *Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42-47, 1956.

WASSER, S.P.; Medicinal Mushroom as a source of antitumor and imunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.60, p.258-274, 2002.

WOO J, CANNON DC. Intermediários metabólicos e íons inorgânicos. In: Henry JB. Diagnósticos clínicos & tratamentos: por métodos laboratoriais. 18. Ed. São Paulo: Manole; 1995.

YANG RZ, PARK S, REAGAN WJ, GOLDSTEIN R, ZHONG S, LAWTON M, RAJAMOHAN F, QIAN K, LIU L, GONG DW. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*. V.49, p. 598-607, 2009.

ZOHURIAAM, M. J.; SHOKROLAHI, F.. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*. v. 23, p. 575-579, 2004.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, Amsterdam, v. 18, p. 4-19, 2007

## 7. ANEXO



## Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

### COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 014/2012 - CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 25 de Maio de 2012

Senhor Professor

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: “ **Avaliação de atividades biológicas e toxicidade *in vivo* do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**”, parecer 046/2011 foi analisado e considerado **APROVADO**, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 04 de Maio de 2012.
2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
  - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
  - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
  - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisador: **Janaina Angela Túrmina**

Atenciosamente

Prof. Rosilene Rebeca  
**Coordenadora do CEUA/UNICENTRO**  
 Port. 1.983/2011 - GR/UNICENTRO

AO SENHOR: Prof. Emerson Carraro  
 CIÊNCIA DA SAÚDE  
 UNICENTRO

Home Page: <http://www.unicentro.br>

**Campus Santa Cruz:** Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR  
**Campus CEDETEG:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR  
**Campus de Irati:** PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

