

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA LASIODIPLODANA MODIFICADA  
QUIMICAMENTE POR CARBOXIMETILAÇÃO SOBRE UM MODELO ANIMAL DE  
DIABETES

ANDRÉ LUIZ SNAK

GUARAPUAVA

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA LASIODIPLODANA MODIFICADA  
QUIMICAMENTE POR CARBOXIMETILAÇÃO SOBRE UM MODELO ANIMAL DE  
DIABETES

ANDRÉ LUIZ SNAK

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADOR:** PROFº DR. CARLOS RICARDO MANECK MALFATTI  
**CO-ORIENTADOR:** PROFº DR. WEBER CLÁUDIO FRANCISCO NUNES DA SILVA

GUARAPUAVA

2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por não permitir que eu desistisse dos meus sonhos e pelas conquistas até o momento, peço a Ele ainda que, me conceda sabedoria para conquistar muito mais.

Aos meus pais Josafat e Maria, por me ensinarem através de atos cotidianos a ter princípios e a cumprir meus objetivos com determinação e humildade. Obrigado por serem além de pais para mim, exemplos a serem seguidos.

À minha esposa Daniela Wendler por me apoiar em todos os momentos desta caminhada. Cada gesto de amor, compreensão e dedicação vindo de você, impulsionou as nossas conquistas. Obrigado por fazer parte desta fase tão importante da minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos, os quais tiveram um papel extremamente essencial na minha formação pessoal e profissional. E que, nunca mediram esforços para que eu chegasse aonde cheguei. Obrigado por toda a dedicação, amor e incentivo.

Ao professor orientador, Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, por repassar seus ensinamentos e tornar possível a formação superior de tantos profissionais. Obrigado pela confiança, paciência e dedicação ao longo do Mestrado. Foi uma oportunidade indescritível realizar este trabalho contando com o seu apoio.

Ao meu colega de mestrado, Renan Garcia Michel, que em nenhum momento deixou de lutar para que tudo desse certo. Sabemos muito bem o significado da conclusão desta etapa em nossas vidas. Foi preciso muito mais que sabedoria para realizar este projeto, tivemos que doar finais de semanas, feriados, dias, noites... Mas cada esforço valeu a pena, podemos afirmar com certeza.

Ao meu colega de laboratório, Luiz Augusto da Silva. Agradeço por toda a ajuda e incentivo oferecido, como amigo e como profissional, durante as várias etapas deste trabalho.

Ao professor da Universidade Tecnológica do Paraná em Pato Branco, Dr. Mário A. A. Cunha, pelo auxílio na produção e modificação química da Lasiodiplodana, exopolissacarídeo alvo de nossa pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram a tornar possível a conclusão deste projeto. Saibam que esse é o significado de grupo de pesquisa. Difícil conseguir citar todos os nomes, mas a aqueles que colaboraram, meu sentimento de gratidão.

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”**

**- Charles Chaplin**

## RESUMO

SNAK, André Luiz. Avaliação do efeito hipoglicemiante de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana modificada quimicamente por carboximetilação sobre um modelo animal diabético. 2016. 37p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014.

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença que vem crescentemente afetando a população mundial, caracterizada pela elevação anormal dos níveis de glicose no sangue, resulta de defeitos na secreção de insulina ou na sua ação sobre o organismo. Levantamentos realizados demonstram uma epidemia de DM em curso, projetando um número a nível mundial de 471 milhões de portadores da doença em 2035. Na busca de novas alternativas de tratamento, alguns polissacarídeos oriundos de plantas, algas, bactérias e fungos despertaram interesse de indústrias químicas e farmacêuticas, e de diversos grupos de pesquisas em vários países do mundo. Dentre os polissacarídeos de interesse, destacam-se as  $\beta$ -glucanas, as quais apresentam efeitos biológicos comprovados, principalmente no tratamento do DM. Porém, sua baixa solubilidade dificulta o seu uso com fins terapêuticos, havendo a necessidade da modificação química da molécula, melhorando esse aspecto negativo da baixa solubilidade. As modificações químicas na estrutura das glucanas por carboximetilação têm contribuído para aumentar a solubilidade da molécula, favorecendo então testes específicos sobre diferentes modelos de doenças. O objetivo deste estudo foi testar sobre um modelo de animais diabéticos, o efeito hipoglicemiante da  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana modificada quimicamente por carboximetilação. Foram utilizados 30 ratos wistar machos, com 110 dias de idade e  $266 \pm 15$  g. de peso. A indução do diabetes foi realizada pela administração de Aloxan Monohidratado, na concentração de 125 mg/kg peso animal. De forma sub-crônica, os grupos de animais receberam 5 e 15 mg/kg de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em cultivo submerso, modificada quimicamente por carboximetilação, 15 mg/kg de Metformina, além de solução salina para os grupos controle. A duração do respectivo tratamento foi de 28 dias, sendo neste período monitorado semanalmente o peso, níveis glicêmicos e diariamente o consumo de ração e água. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados para coleta sanguínea e posteriormente sacrificados para a retirada de seus órgãos. Foram realizadas análises bioquímicas quantificando os níveis de Colesterol, Triglicerídeos, TGO, TGP, Ureia, Creatinina e Glicose, além da avaliação histológica dos Rins, do Pâncreas e Fígado dos animais.

**Palavras-chave:** Diabetes, Exopolissacarídeo, carboximetilação e Glicemia.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disease that is increasingly affecting the world's population, characterized by abnormal elevation of glucose levels in the blood, results from defects in insulin secretion or in its action on the body. Surveys show a DM epidemic in progress, designing a number worldwide of 471 million people with the disease in 2035. In the search for new treatment alternatives, some polysaccharides derived from plants, algae, bacteria and fungi aroused interest of the chemical and pharmaceutical, and various research groups in countries around the world. Among the polysaccharides of interest, there are the  $\beta$ -glucans, which have demonstrated biological effects, especially in the treatment of diabetes. However, its low solubility hinders its use for therapeutic purposes, with the necessity of chemical modification of the molecule, improving negative aspect of this low solubility. The chemical modifications in the structure of glucan to carboxymethylation, has contributed to increase the solubility of the molecule, so favoring specific tests on different models of disease. The aim of this study was to test on a model of diabetic animals, the hypoglycemic effect of  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  6) -D-glucan chemically modified by carboxymethylation. 30 Wistar rats were used, with 110 days old and  $266 \pm 15$  g. of weight. The induction of diabetes was performed by administering Aloxan Monohydrate at a concentration of 125 mg / kg animal body weight. In sub-chronic form, the animal groups received 5 and 15 mg / kg  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  6) -D-glucana produced the fungus in submerged culture *Lasiodiplodia theobromae* MMPI chemically modified by carboxymethylation, 15 mg / kg of metformin, in addition saline for the control groups. Their term of treatment was 28 days and this period monitored weekly weight, glucose levels and daily feed intake and water. At the end of treatment, animals were anesthetized for blood collection and later sacrificed for removal of organs. They were performed biochemical analyzes quantifying cholesterol levels, triglycerides, SGOT, SGPT, urea, creatinine and glucose in addition to histological evaluation of the kidneys, the pancreas and liver of animals.

**Keywords:** Diabetes, exopolysaccharide, *Lasiodiplodana*, carboxymethylation and glycemia.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Representação molecular da lasiodiplodana.

**Figura 2.** Avaliação da evolução de peso corpóreo dos ratos wistar durante tratamento subcrônico com LC.

**Figura 3:** Evolução da Glicemia no Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).

**Figura 4:** Peso do pâncreas dos animais ao final do experimento.

**Figura 5:** Peso do fígado dos animais ao final do experimento.

**Figura 6:** Peso do rim dos animais ao final do experimento

**Figura 7:** Peso do rim dos animais ao final do experimento.

**Figura 8:** Níveis de peroxidação lipídica em fígado.

**Figura 9:** Níveis de peroxidação lipídica em pâncreas.



## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Formação dos Grupos Experimentais.

**Tabela 2** - Efeito da LC nos parâmetros bioquímicos – Marcadores hepáticos e renais.

**Tabela 3** - Efeito da LC nos parâmetros bioquímicos – Parâmetros gerais

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALX	Aloxano
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
BRM	Modificadores de Resposta Biológica
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
EPS	Exopolissacarídeo
EPS-C	Exopolissacarídeo Carboximetilado
PUC-PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
STZ	Streptozotocina
TTOG	Teste de Tolerância Oral à Glicose
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
CS	Grupo Controle Saudável
DB	Grupo Diabético
MET	Grupo Controle Positivo
LC5	Grupo Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg
LC15	Grupo Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg
HE	Hematoxilina-Eosina
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS .....	12
1.2.1 Objetivo Geral.....	12
1.2.2 Objetivos Específicos .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1. Diabetes <i>mellitus</i> .....	13
2.2. Polissacarídeos .....	14
2.3. Exopolissacarídeos .....	15
2.4. $\beta$ -D-glucanas .....	16
2.5. Fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	17
2.5.1. Lasiodiplodana .....	17
2.6. Modificações na Estrutura Química de Glucanas - Carboximetilação .....	19
2.7. Indução de Diabetes em Animais .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1. Tipo de Pesquisa .....	21
3.2. Animais .....	21
3.3. Indução ao Diabetes Experimental .....	21
3.4. Cepa Fúngica.....	22
3.5. Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana.....	22
3.6. Modificação Química da Lasiodiplodana por Carboximetilação .....	23
3.7. Protocolo Experimental .....	24
3.7.1. Administração dos Tratamentos .....	24
3.7.2. Distribuição dos Grupos .....	24
3.7.3. Avaliação da Evolução Ponderal.....	24
3.7.4. Dosagens Glicêmicas.....	25
3.7.5. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG).....	25
3.8. Análises bioquímicas .....	25
3.9. Determinação da Peroxidação Lipídica por Malondialdeído.....	25
3.10. Destinação dos Animais .....	26
3.11. Análises Estatísticas .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	27
4.1. Evolução Ponderal.....	28

4.2. Teste Oral de Tolerância a Glicose.....	30
4.3. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos .....	31
4.4. Níveis de Peroxidação Lipídica.....	40
5. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença em que os níveis de glicose no sangue se elevavam acima dos níveis plasmáticos considerados normais. É considerada uma desordem metabólica de muitas etiologias, resultante de defeitos na secreção de insulina, na sua ação no organismo ou a associação dos mesmos, que compromete o controle glicêmico dos pacientes portadores desta patologia. Os efeitos crônicos do DM incluem danos e falhas em vários órgãos do corpo, podendo apresentar sintomas clínicos como poliúria, polidipsia, cegueira, diminuição da sensibilidade da pele e falha renal (WHO, 2013, DONG, 2011).

Devido ao aumento do número de casos do DM, esta patologia pode ser vista como um problema de saúde pública mundial que afeta cada vez mais pessoas (WHO, 2016). Nesse sentido, atenção especial tem sido dispensada aos diferentes níveis preventivos do DM. A fim de melhorar a qualidade de vida dos portadores desta patologia, novas alternativas de tratamento e prevenção vem sendo estudadas por diversos grupos de pesquisa.

Pesquisas realizadas com polissacarídeos revelam que alguns desses polímeros apresentam ações biológicas, como a atividade anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti-inflamatória e tem sido descrita como efetiva no tratamento de várias enfermidades, como infecções microbianas, câncer, alterações dos níveis de colesterol e no diabetes (FREITAS, 2009; NASCIMENTO, 2010).

Tendo em vista que a lasiodiplodana liofilizada tem baixa solubilidade em água, segundo Barbosa (2003), foi realizado um processo de modificação química por carboximetilação a fim de melhorar a solubilidades e biodisponibilidade, buscando potencializar os efeitos hipoglicemiantes, que já foram atribuídos a esta classe de exopolissacarídeo (EPS) por Miranda-Nantes et al. (2011). Este aspecto permite confirmar a relevância e a importância deste estudo para o âmbito do meio científico, além de seus alcances sócio-econômicos, visando a contribuição para a redução dos impactos negativos da DM na sociedade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito hipoglicemiante da Lasiodiplodana modificada quimicamente por carboximetilação, através do tratamento subcrônico de animais diabéticos induzido por ALX.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com a LC sobre os níveis de glicose plasmática dos animais induzidos ao DM por ALX;
- Acompanhar a evolução ponderal dos grupos durante o tratamento subcrônico com a LC;
- Quantificar as variações dos níveis de colesterol total e triglicérides dos grupos após o tratamento subcrônico dos animais diabéticos com a LC;
- Identificar o nível de toxicidade *in vivo* da LC através da determinação de parâmetros bioquímicos, tais como creatinina (CRE), uréia (URE), aspartato aminotransferase (ALT), alanina aminotransferase, albumina, proteínas totais);
- Comparar através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os níveis de peroxidação lipídica dos tecidos renais e hepáticos dos grupos em estudo;
- Avaliar o potencial terapêutico e tóxico da LC nos diferentes grupos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Diabetes *mellitus*

O nome diabetes *mellitus* tem origem na palavra do grego antigo, a doença era conhecida como “sifão”, porque os médicos da época observaram que os diabéticos tinham como principais sintomas, poliúria e o desejo excessivo de ingerir líquidos. A parte “mellito” da denominação provém do grego antigo para mel, utilizada porque os médicos, nos séculos passados diagnosticavam a doença pela degustação adocicada da urina do paciente (NIEMAN, 2011).

O DM é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação ou secreção de insulina, gestação, medicamentos, concentrações altas de corticosteroides e fatores genéticos. Considerada uma doença metabólica, afeta cerca de 347 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2013), e a sua prevalência vem aumentando, visto que, em 1985 em todo o mundo havia 30 milhões de indivíduos com DM (WHO, 1999). Atualmente nos países da América Central e Sul, a prevalência de DM foi estimada em 26,4 milhões de pessoas e projetada para 40 milhões em 2030, destacando-se esta patologia como uma pandemia (IDF, 2012).

O DM pode ser classificado em quatro subclasses: (a) o tipo 1, causado pela destruição das células pancreáticas e a deficiência total da produção de insulina; (b) o tipo 2, caracterizado por resistência à insulina e deficiência relativa de sua produção, ocorrendo geralmente em pessoas com mais de 30 anos e/ou obesas; (c) tipos associados a doenças ou síndromes específicas; (d) diabetes gestacional (BRASIL, 2013).

O diabetes tipo 2 é responsável por cerca de 90% dos casos da doença, sendo uma das dez principais causas de morte no mundo atualmente, seguido em frequência pelo DM tipo 1, que responde por aproximadamente 8% dos casos. O DM tipo 2 costuma ter um início insidioso e sintomas mais brandos comparados com o tipo 1. Na grande maioria das vezes se manifesta em adultos com longa história de excesso de peso e em indivíduos com histórico familiar, podendo surgir nestes casos com diferentes graus de gravidade (ADA, 2010).

O DM tipo 1 é caracterizado por destruição das células  $\beta$  que levam a uma deficiência de insulina. Tem sua classificação em autoimune e idiopática, onde no DM autoimune ocorre a destruição imunomediada de células  $\beta$  pancreáticas com

consequente deficiência de insulina. Na idiopática como o nome indica, não há uma etiologia conhecida para essa forma de DM, sendo responsável pela minoria dos casos de DM1, sendo caracterizada pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células  $\beta$  pancreáticas (MILECH et al., 2016).

O diagnóstico do DM é baseado na detecção da hiperglicemia em pacientes suspeitos. Existem quatro tipos de exames que podem ser utilizados no diagnóstico do DM: glicemia casual, glicemia de jejum, teste de tolerância oral à glicose (TOTG) e, em alguns casos, hemoglobina glicosilada (HbA1c) (BRASIL, 2013).

### 3.2. Polissacarídeos

Constituindo um dos grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera, os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos. São constituídos de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si através da unidade monomérica, no grau de ramificação, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias (FREITAS et al., 2009).

A diversidade estrutural desta macromolécula lhe confere a capacidade de atuar sobre diversos processos biológicos, como os de sinalização celular, respostas imunes, prevenção de patogênese e desenvolvimento celular. Esta característica insere os polissacarídeos num campo de aplicação vasto que engloba desde indústrias de alimentos, farmacêuticas até biomédicas (CHANDRA et al., 2011; CUNHA et al., 2012).

A aplicação terapêutica dos polissacarídeos, ao que parece, depende da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas modificações na estrutura de cada polímero resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (MUELLER et al., 2000; OOI & LIU, 1999). Além disso, os polissacarídeos podem ter sua atividade biológica associada à redução dos níveis de colesterol em humanos, aumento da excreção de lipídeos e estimulação do sistema imune (WASSER, 2002; CHEN & RAYMOND, 2008)

Diante dos diversos efeitos biológicos de alguns polissacarídeos, observamos algumas limitações no seu uso, como o elevado peso molecular,



viscosidade dos mesmos e, ainda, a baixa solubilidade de alguns, o que dificulta sua aplicação com eficiência nos estudos científicos. Nesse sentido a modificação química pode ser uma oportuna estratégia para aplicação dos mesmos como agentes terapêuticos, fato permitido graças às mudanças estruturas da molécula, a qual após tratada com ácido e base forte aumenta o seu poder nucleofílico e se torna mais solúvel (ZHANG et al., 2013; ZONG; CAO; WANG, 2012).

### 3.3.Exopolissacarídeos

Dentre os polissacarídeos estudados existem os exopolissacarídeos (EPSs), os quais são definidos comumente como polissacarídeos extracelulares, produzidos por fungos e bactérias, e excretados para o meio extracelular na forma de limo (SILVA & HASHIMOTO, 2006; KANG & COTTRELL, 1979; SUTHERLAND,1998). A biossíntese de alguns exopolissacarídeos está associada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas do meio ambiente. Deste modo, desempenham diversas funções na célula, tais como, proteção contra dessecação, infecções virais, neutralização de toxinas, atuam como fonte de carbono e energia, além de interagirem com células de animais ou vegetais, com relações específicas, patogênicas ou simbióticas (BULOCK & KRISTIANSEN, 1987).

Os EPS podem ser divididos em homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos, dependendo de seus componentes monossacarídicos. Os homopolissacarídeos consistem de unidades repetidas de alguns monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, como a dextrana (unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranoose) ou a levana (unidades de  $\beta$ -D-frutopiranoose), enquanto que os heteropolissacarídeos são compostos de diferentes tipos de monossacarídeos como as gomas xantana (unidade de  $\beta$ -D-glicopiranoose,  $\beta$ -D-manopiranoose, ácido  $\beta$ -D-glucurônico e a  $\alpha$ -D-manopiranoose) e a gelana (unidades de  $\beta$ -D-glicopiranoose,  $\alpha$ -L-ramnose e ácido  $\beta$ -D-glucurônico) (DONOT et al., 2012; GARNA et al., 2011).

Estes EPSs são objeto de intensa pesquisa mundial, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores, principalmente o farmacêutico (BARBOSA et al., 2004). Estudos em humanos e animais demonstram que alguns polissacarídeos fúngicos, incluindo  $\beta$ -Glucanas, têm a capacidade de diminuir os níveis de glicose no sangue (KIM et al., 2005). Em um modelo animal diabético, a

atividade hiperglicêmica produzida pela botriosferana, um exopolissacárido solúvel em água, composto por  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana, isolada a partir do meio de cultura de *Botryosphaeria rhodina* MAMB, é capaz de reduzir 52% dos níveis de glicose plasmática (MIRANDA-NANTES et al., 2011).

### 3.4. $\beta$ -D-glucanas

As glucanas são consideradas polímeros de unidades D-glicopiranosídicas, unidas por ligações glicosídicas, podendo apresentar configurações  $\alpha$  ou  $\beta$ . Apesar da simplicidade de sua estrutura, existe uma grande diversidade encontrada no número e configuração anomérica das unidades de D-glicopiranoose, posição e sequência das ligações glicosídicas ao longo da cadeia, grau de ramificação e conformação de sua cadeia (GRABAUM et al., 2012).

As  $\beta$ -D-glucanas de origem fúngica são polissacarídeos constituídos de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, como (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6), (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6) e (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4). Isoladas da parede celular de leveduras, micélio fúngico e corpo de frutificação de fungo, as glucanas também são produzidas de modo extracelularmente por fungos em cultivos submersos (NOVAK & VETVICKA, 2008).

Segundo Zonget al. (2012), as  $\beta$ -glucanas pertencem ao grupo dos compostos fisiologicamente ativos, chamados de Modificadores de Resposta Biológica (BRM). Esses polímeros não são sintetizados pelo organismo humano, portanto não são reconhecidos pelo sistema imunológico como moléculas do próprio corpo, conseqüentemente induzem a resposta inata e adaptativa do sistema imune (GRAUBAUM et al., 2012).

Algumas  $\beta$ -glucanas fúngicas demonstram inúmeras atividades biológicas de interesse, como exemplo: redução em 25% das gripes comuns sintomáticas (AUNGER et al., 2013), maior ação imunomodulatória (ZYCOVA et al., 2013; KIM et al., 2011), atividade antioxidante (DENG et al., 2012), ação probiótica (LAM & CHEUNG, 2013) e atividade antiproliferativa (FANG et al., 2012). Além de possuir efeito protetor contra infecções microbianas causadas por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergilosas*, *Escherichia coli*, *Toxoplasma*

*gondii*, *Plasmodium berghei*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi* e *Eimeria vermiformis* (NOVAK & VETVICKA, 2009).

Estudos em humanos e animais tem demonstrado que alguns polissacarídeos fúngicos, incluindo  $\beta$ -Glucanas, têm a capacidade de diminuir os níveis de glicose no sangue (KIM et al., 2005).

### 3.5.Fungo *Lasiodiplodia theobromae*

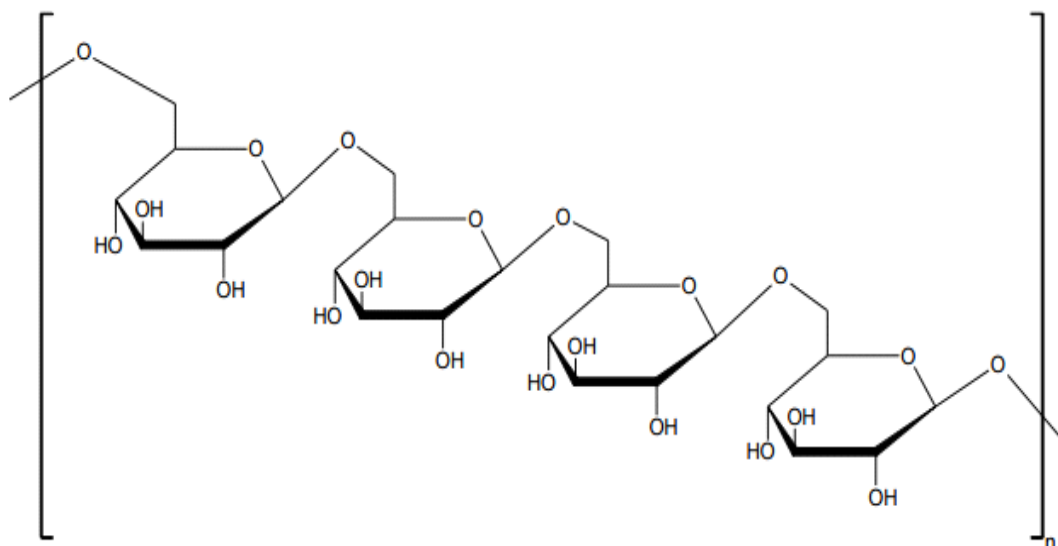
O fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertence à família *Botryosphaeriaceae*, gênero *Lasiodiplodia* e representa o estado assexuado do *Botryosphaeria* (MUNIZ et al., 2011). É típico de regiões tropicais e subtropicais, sendo patogênico a numerosas espécies vegetais, em que um mesmo isolado, é capaz de infectar diferentes hospedeiros (PEREIRA et al., 2009).

Isolado de Pinha (*Annona squamosa*), o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI produz um exopolissacarídeo denominado lasiodiplodana, caracterizado quimicamente como  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) D-glucana, polissacarídeo ainda pouco explorado, mais com grandes potenciais terapêuticos (VASCONCELOS et al., 2008; CUNHA et al., 2012).

#### 3.5.1. Lasiodiplodana

Descrita na literatura como (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucana (Figura 1) (VASCONCELOS et al., 2008, CUNHA et al., 2012), a Lasiodiplodana é comumente encontrada como compostos insolúveis da parede celular de ascomicetos e basidiomicetos (LESAGE & BUSSEY, 2006). Fato que torna seu processo de isolamento um pouco complicado, principalmente por envolver múltiplas etapas de extração com hexano (remoção de lipídios), seguida por extração com água quente e fria e um álcali (CORRADI DA SILVA et al., 2008).

Porém, a lasiodiplodana é secretada no meio de cultivo submerso, facilitando sua precipitação com etanol, sendo seu isolamento mais simples e econômico do que a extração da parede celular de fungos (SOMENSI, 2014).



**Fonte:** Luna (2016).

Em um estudo realizado por Túrmina et al. (2012), os efeitos toxicológicos do tratamento sub-crônico da lasiodiplodana em ratos através da avaliação de alterações dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos foram avaliados. O estudo concluiu que o tratamento com lasiodiplodana na concentração de 50 mg/Kg não gera efeitos tóxicos aos animais e ainda, na mesma concentração ocorre um significativo efeito hipocolesterolêmico.

Outra atividade importante deste EPS foi comprovadas por estudos, onde, a lasiodiplodana em dose dependente apresenta atividade anti-proliferativa *in vitro* frente a células de câncer de mama (MCF-7) em ensaios *in vitro* (CUNHA, 2012). A mesma substancia, porém, modificada por sulfatação, apresenta atividade anticoagulante de interesse clinico (VASCONCELOS et al.,2013).

## 2. Método de extração da *Lasiodiplodana theobromae*

O *L.theobromae* foi cultivado em cultura submersa em biorreator de mistura- com cuba de 2 L, equipado com eletrodo para monitoramento de pH e sonda de oxigênio. O volume de trabalho foi de 1,0 L, fluxo de ar de 0,8 vvcv, 28°C de temperatura e tempo de cultivo de 96 horas. Para o cultivo deste EPS foi formulado um meio com fonte de carbono, glicose, fonte de nitrogênio, extrato de levedura, inóculo e sais minerais de Vogel, bem como, pH inicial de 6,0 ajustado com solução molar de ácido clorídrico (CUNHA, 2012; VOGEL, 1956)

### 2.6. Modificações na Estrutura Química de Glucanas - Carboximetilação

Consideradas como importantes ferramentas para aumentar as propriedades biológicas dos polissacarídeos em gerais, as modificações químicas estruturais como a sulfatação, carboximetilação, fosforilação e acetilação, aumentam a aplicabilidade farmacológica destas biomacromoléculas (TRANQUILAN-ARANILLA et al., 2012; YE et al. 2012; JINDAL et al. 2013). Visto que as atividades biológicas das  $\beta$ -glucanas são influenciadas pela estrutura molecular, tipo de ligação glicosídica, ramificações ao longo da cadeia, peso molecular e a solubilidade em água (GRAUBAUM et al., 2012; VOLMAN et al., 2008), o processo de modificação química pode ser uma alternativa para ampliar a resposta biológica já comprovada ou até mesmo favorecer novas aplicações farmacológicas destas substâncias.

A carboximetilação de vários polímeros naturais tem sido estudada nos últimos anos a fim de avaliar se suas propriedades são melhores em relação a molécula original, visando uma melhor aplicabilidade na área química, farmacêutica, de alimentos e indústria de cosméticos (TRANQUILAN-ARANILLA et al. 2012). A carboximetilação na grande maioria das vezes é realizada por meio da suspensão do biopolímero com ácido cloroacético em condições alcalinas (SYNYTSYA & NOVÁK, 2013), onde a amostra é tratada com uma base forte, como hidróxido de sódio, que desprotona os grupos hidroxil livres para formar alcóxidos, aumentando seu poder nucleofílico. No entanto, grupos carboximetílicos

são formados em uma reação entre o alcóxido e ácido cloroacético (DODI et al., 2011).

O processo de carboximetilação é determinante para o parâmetro de hidrossolubilidade da lasiodiplodana. Em estudo realizado por KAGIMURA et al. (2015), a molécula bruta passou de 3% de solubilidade para 63% após a derivatização química, onde ocorreu a inserção dos grupos químicos carboximetila diminuindo as interações intermoleculares e intramoleculares, tornando a molécula mais solúvel podendo desta forma potencializar sua aplicação em estudos clínicos farmacológicos.

## 2.7. Indução de Diabetes em Animais

Devido ao grande risco, a complexidade e variabilidade do diabetes *mellitus*, estudos que envolve pacientes são frequentemente inconclusivos em relação aos mecanismos patológicos da doença, deste modo, diversos modelos de indução do diabetes *mellitus* estão disponíveis para a pesquisa científica, os quais incluem: destruição química das células  $\beta$  pancreáticas, pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventro medial, dietas ricas em açúcares, gorduras e altas doses de hormônios contra regulatórios como os glicocorticóides (CAZAROLLI, 2004).

No entanto, a forma mais utilizada é a indução do diabetes por agentes químicos, principalmente pela administração dos agentes citotóxicos como a aloxana (ALX) e estreptozotocina (STZ), ambos seletivos para células  $\beta$  (DELFINO et al., 2002; NEGRI, 2005; LENZEN, 2008). Através do modelo de indução química, é possível investigar as complicações causadas e avaliar os possíveis efeitos de intervenções terapêuticas, facilitando a descobertas de novos agentes terapêuticos, neste caso hipoglicemiante.

A grande afinidade do ALX pelas células  $\beta$ -pancreáticas, facilita a indução mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) ao modelo de diabetes. O ALX tem como produto de sua redução o ácido dialurônico, sendo que, juntos eles estabelecem um ciclo redox com formação de radicais superóxidos. Tais radicais são dismutados a peróxido de hidrogênio e na sequência dão origem a radicais altamente reativos de hidroxila pela reação de fenton. A associação entre a ação das EROs e o aumento maciço das concentrações de cálcio citosólico devido ao influxo extracelular como também pela liberação do cálcio intracelular, causa a destruição

das células  $\beta$ -pancreáticas (BATTELL et al., 1999; SZKUDELSKI, 2001). Ao serem destruídas pela ação da ALX, ocorre a diminuição da produção de insulina pelo organismo. A ausência da insulina produzirá um estado hiperglicêmico, caracterizando um quadro de DM (LEZEN, 1988; SKUDELSKI, 2001).

A ALX pode agir também em outros órgãos, como por exemplo, no fígado. No entanto, o fígado possui uma capacidade antioxidante maior que a dose necessária para citotoxicidade das células  $\beta$ - pancreáticas (LENZEN et al, 1996; SZKUDELSKI; KANDULSKA; OKULICZ, 1998). Sendo assim, o modelo experimental de DM induzido por ALX é do tipo 1, devido à ausência ou significativa diminuição de insulina, desequilibrando a homeostase glicêmica (VIANA et al., 2004). De acordo com Lenzen e Panten (1988), animais diabéticos induzidos por ALX, apresentam sintomas similares aos descritos em DM em humanos, como perda de peso, poliúria, polidipsia, glicosúria, cetonúria entre outros (KULKARNI et al., 2002; VADLAMUDI, 1983).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de Pesquisa

Este estudo consiste em uma pesquisa experimental aplicada, com abordagem quantitativa e caracterizada pelo desenho experimental em ensaio clínico terapêutico, distribuição randomizada das amostras e com controle das variáveis (GAYA et al., 2008).

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 50 ratos machos, albinos da linhagem wistar, com 110 dias de idade e  $266 \pm 15$  g de peso, provenientes do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC). Os animais foram acondicionados em gaiolas, sendo 3 animais por caixa, durante todo o processo experimental em local apropriado, em condições de temperatura controlada ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ausente de ruídos, com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro, tratados com ração para roedores vendida comercialmente. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos.

Os animais foram alojados em estantes apropriadas, dentro de gaiolas para ratos com base em polipropileno, autoclaváveis, resistente a ácidos, nas medidas de 41x34x16cm e tampa de arame de aço carbono com tratamento de zincagem, malha 7,5mm, além de bebedouro de 700 mL específico para animais de pesquisa.

No decorrer do estudo, os grupos foram avaliados em relação ao peso e consumo de ração e água, identificando assim a evolução ponderal dos animais. Todos os procedimentos experimentais realizados foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA/UNICENTRO, protocolo nº 030/2015.

#### 3.3 Indução ao Diabetes Experimental

A indução ao diabetes nos animais foi realizada através da aplicação de aloxana (125 mg/kg - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Para a indução, os animais foram mantidos em jejum sólido por 12 horas. Após este



período realizou-se a pesagem e dosagem da glicemia de cada indivíduo na pré-indução. Os ratos foram induzidos ao diabetes por aloxana diluída em solução salina (0,9%) administrada via intraperitoneal (DIAS et al., 2011). Visto que presente composto é fotossensível, o preparo da solução foi realizado em ambiente escuro, utilizando frasco âmbar envolvido por papel alumínio para evitar contato com a luz.

A confirmação da instalação do quadro de diabetes foi feita três dias após a injeção do agente indutor, sendo realizada a quantificação da glicose plasmática por coleta de sangue via punção caudal, quantificando os valores através de glicosimêtro da marca Accu Cheack Advantage<sup>®</sup>. Todos os animais que apresentaram glicemia superior a 150 mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais dos grupos controle receberam injeção de solução salina (0,9%), por via intraperitoneal, na dose única e equimolar da aloxana.

#### 3.4. Cepa Fúngica

O alvo do presente estudo foi o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*), o qual foi mantido em meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol a 4°C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol (KAGIMURA et al., 2015).

#### 3.5. Produção Biotecnológica da Lasiodiplodana

A produção do Exopolissacarídeo foi realizada pelo laboratório biotecnológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, em parceria com o laboratório de pesquisa BIOMED da UNICENTRO, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti.

Inicialmente foi realizada a confecção do inóculo, onde houve a transferência uma alçada de micélio do fungo para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud com cloranfenicol. Após Incubação 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 de Sais Minerais de Vogel

- VMSM (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L), então cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (150 rpm). Posteriormente a pré-cultura foi homogeneizada em mixer por 30 segundos e o homogeneizado de células foi centrifugado. Para recuperar o micélio, foi adicionada água destilada esterilizada, originando uma solução padrão (inóculo) com absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (STELUTI; GIESE e PIGGATO, 2004).

Para o cultivo submerso do EPS *lasiodiplodana*, foi utilizado um biorreator de bancada (Biostat B, B. Braun International, Alemanha) com cuba de 2 L, equipado com termopar para controle de temperatura. O volume de trabalho foi de 1,0 L, fluxo de ar de 0,8 vvm, tempo de cultivo de 72 horas, 28 °C de temperatura e 400 rpm de velocidade de agitação da turbina. Como meio de cultivo foi empregado meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956) e glicose (20 g/L) como fonte de carbono e um volume de inóculo inicial de 100 mL (CUNHA et al., 2012).

Ao final do processo a biomassa foi separada do caldo de cultivo por centrifugação (1500 x g, 30 min.) e dialisado contra água usando tubos de diálise com diâmetro de poros de 12 kD (1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich), processo sob refrigeração (4°C). Posteriormente, o exopolissacarídeo (EPS) foi precipitado com etanol absoluto a 4°C (overnight em geladeira). O precipitado foi separado por filtração em papel filtro e foi ressolubilizado em água destilada a 60 °C sob agitação. O material obtido foi novamente submetido à intensa diálise contra água destilada e liofilizado (CUNHA et al., 2012).

### 3.6. Modificação Química da *Lasiodiplodana* por Carboximetilação

O processo de carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizado seguindo protocolo descrito por Wang e Zhang (2009) com adaptações. A *lasiodiplodana* (250 mg) foi suspensa em 15 mL de isopropanol à temperatura ambiente e mantida sob agitação por 15 minutos. A seguir foram adicionados lentamente 10 mL de solução de NaOH 30% (m/v) e a mistura foi agitada a 50 °C até completa solubilização da *lasiodiplodana*. Posteriormente foram acrescentados 3 g de ácido cloroacético (suspenso em pequena quantidade de água destilada) sob agitação. A reação foi conduzida por 8 horas a 50 °C. Após o resfriamento da mistura, à temperatura ambiente, a mesma foi neutralizada com solução de HCl (0,5M). A solução resultante foi dialisada contra água destilada por 8 dias com

trocas frequentes de água, usando tubos de diálise 1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich. O produto obtido do dialisado (lasiodiplodana carboximetilada) foi liofilizado (CUNHA et al., 2012).

### 3.7. Protocolo Experimental

#### 3.7.1. Administração dos Tratamentos

A administração dos tratamentos ocorreu de forma subcrônica em um período de 28 dias, realizadas via gavagem utilizou-se de lasiodiplodana carboximetilada  $(-(1\rightarrow6)-D\text{-glucana carboximetilada})$ , Metformina<sup>®</sup> e solução salina (NaCl 0,9%).

A lasiodiplodana carboximetilada liofilizada, foi diluída com solução salina (NaCl 0,9%) à uma concentração de 15 mg/mL. Para o controle positivo, foi utilizada Metformina<sup>®</sup>, manipulada em uma concentração de 5mg/mL.

#### 3.7.2. Distribuição dos Grupos

Para formar os grupos experimentais os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, conforme apresentado na tabela 01. Os grupos formados por 6 animais cada, foram divididos da seguinte maneira: Grupo Controle Saudável (CS), Grupo Diabético (DB), Grupo Controle Positivo (MET), Grupo Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg de peso animal (LC5) e Grupo Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg de peso animal (LC15).

**Tabela 1:** Formação dos Grupos Experimentais.

Grupos	Intervenção	N
Controle Saudável (CS)	Salina (NaCl 0,9%)	6
Controle Diabético (DB)	Salina (NaCl 0,9%)	6
Controle Positivo (MET)	Metformina	6
Tratamento (LC5)	LC5 mg/Kg	6
Tratamento (LC15)	LC15 mg/Kg	6

#### 3.7.3. Avaliação da Evolução Ponderal

O acompanhamento da evolução dos animais foi realizado através da pesagem individual dos animais a cada semana de tratamento, com o auxílio de uma balança apropriada. As gaiolas foram abastecidas com 250 g/dia de ração e 1400 mL/dia de água e durante a reposição do dia seguinte, as quantidades consumidas de ambas foram conferidas e anotadas.

#### 3.7.4. Dosagens Glicêmicas

Os níveis de glicose plasmática dos animais foram mensurados semanalmente após um período de 8 horas de jejum, utilizando um glicosímetro da marca Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indiana, USA), com amostras de sangue obtidas por punção caudal.

#### 3.7.5. Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Para o teste de tolerância oral à glicose os animais receberam uma dose de glicose (1g/kg de peso corpóreo) via gavagem após um jejum de aproximadamente 8 horas. As amostras de sangue foram obtidas por punção caudal e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0' (Glicose Basal), 30', 60' e 120', com o auxílio de um glicosímetro.

#### 3.8. Análises bioquímicas

Ao final do período de tratamento e após um jejum de 12 horas, os animais receberam anestesia com Ketamina (1mL /Kg de peso) e Xilazina (0,5 mL /Kg de peso), sendo realizada posteriormente a punção cardíaca para a coleta de amostras de sangue. As amostras foram colocadas em tubos fluoretados e com ativador de coagulo, as quais foram imediatamente destinadas para as determinações bioquímicas. As análises bioquímicas foram realizadas no equipamento automatizado da Mindray® (BS-200E), utilizando os Kits BioClin® para as seguintes determinações: ácido úrico, glicose, Cclesterol Total, Triglicerídeos, aspartato aminotransfersase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e uréia.

### 3.9.Determinação da Peroxidação Lipídica por Malondialdeído

O grau de peroxidação lipídica foi determinado pela medição dos níveis de TBARS, seguindo metodologia descrita por Okahawaet al., (1979). Foi preparado um homogenato a 10% do tecido avaliado (rim, fígado) em Tris HCL 30 mM pH7,4. Em um tubo de ensaio foram adicionados 350µL do homogenato, 350 µL de BHT, 800 µL de TBA (0,8%), 800 µL de ácido acético, 320 µL de SDS (8,1%) e 160 µL de água destilada.

Os tubos preparados foram agitados em vortex, mantidos em banho de água fervente por 1 hora e posteriormente resfriados em água corrente. Os tubos foram então centrifugados a 1200 rpm por 5 min. e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 535 nm para determinação da quantidade de malondialdeído/g de tecido.

### 3.10.Destinação dos Animais

Após a eutanásia dos animais, as carcaças foram mantidas sob congelamento em freezer até o descarte final, o qual foi realizado por uma empresa especializada e aprovada pelos órgãos competentes e que mantém contrato com a UNICENTRO para estes fins.

### 3.11. Análises Estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas de Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> e os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 2010<sup>®</sup>. Inicialmente foi realizada a análise de normalidade das variáveis utilizando teste *Shapiro-Wilk*, e após, foi aplicado o teste de Levene para homogeneidade, os dados se mostraram com distribuição normal, porém, não homogêneos, posteriormente foi realizado one-way ANOVA, considerando significância para  $p < 0.05$ . Para identificar as diferenças significativas foi utilizado o teste de LSD. Para a análise do TOTG, foi realizado Kruskal Wallis já que os resultados não foram normais nem homogêneos. Todos os resultados foram representados como média  $\pm$  EP na forma de gráficos ou tabelas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O aumento da incidência de diabetes é uma das maiores preocupações atuais em saúde pública no mundo, sendo projetado em cálculos epidemiológicos que o número de diabéticos nos países da América Central e Sul, chegue a aproximadamente 40 milhões em 2030 caso não haja intervenções eficientes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012). Desta forma, tornam-se imprescindíveis estudos envolvendo novas substâncias com possível efeito hipoglicemiante, capaz de reduzir os níveis glicêmicos sem gerar efeitos colaterais indesejado e com baixo custo de produção.

Para avaliar o efeito ou a ampliação do mesmo em relação a sua atividade biológica, é necessário utilizar modelos experimentais de Diabetes *Mellitus* que forneçam de modo preciso, informações que possam ser úteis no desenvolvimento de procedimentos mais eficazes, na prevenção e no tratamento da doença. Podemos citar como exemplo, o modelo diabético aloxânico utilizado neste estudo, o qual foi reconhecido pela similaridade ao quadro diabético insulino-dependente (LENZEN, 2008), sendo capaz de fornecer informação relevantes na descoberta de novos agentes hipoglicemiantes.

Porém, neste modelo de diabetes, foram identificados sinais de toxicidade aos animais induzidos, havendo um percentual de letalidade próximo de 40% durante o tratamento, porcentagem acima dos valores obtidos em estudos realizados por Oliveira (2012) e Silva (2011), que obtiveram uma taxa de letalidade de 25 e 15% respectivamente ao final da primeira semana pós-indução.

Devido a escassez de informações que envolvem o possível efeito hipoglicemiante da lasiodiplodana carboximetilada, o presente estudo contrastou o modelo experimental de diabetes induzido por ALX com tratamento a base deste biopolímero, buscando observar o comportamento patológico frente a esse, através da observação de parâmetros ponderais e bioquímico dos animais.

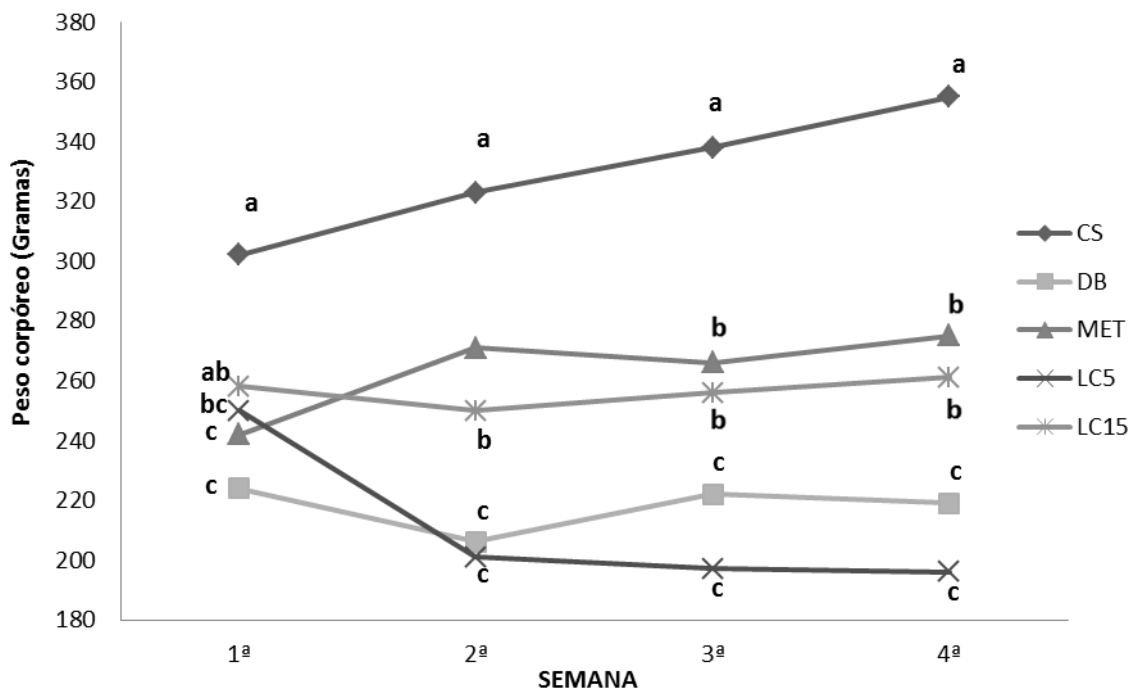
Como uma das bases deste experimento, podemos citar um estudo realizado por Túrmina et al. (2012), que avaliou os efeitos da Lasiodiplodana sem modificação química em ratos albinos suíços (*Mus musculus*), os quais foram tratados de modo subcrônico durante 28 dias, concluindo que, a lasiodiplodana sem modificação química, não apresenta sinais de toxicidade e nem alterações

hematológicas ou histopatológicas, havendo apenas um efeito hipoglicemiante memorável em ratos machos saudáveis.

#### 4.1. Evolução Ponderal

Os resultados da evolução de peso corpóreo dos animais obtidos semanalmente durante o tratamento subcrônicos com a LC, são apresentados na figura 02.

**Figura 2:** Evolução de peso corpóreo dos animais durante tratamento subcrônico com LC.



Controle Saudável (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo Metformina 10 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). (a, b e c) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos;  $p < 0.05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Os animais deste estudo, foram acompanhados semanalmente afim de avaliar seu desenvolvimento ponderal. Em relação ao peso dos animais, os grupos ao início do experimento apresentavam semelhança estatística. Logo após a indução do modelo de diabetes e início do tratamento, foram identificadas alterações significantes de peso entre os grupos em estudo, onde ao primeiro ponto de pesagem (final da 1ª semana de tratamento), foi verificada uma redução de peso nos

grupos DB e MET de 25 e 18% respectivamente, quando comparados ao grupo CS [(CS:  $300 \pm 10,3$ ; MET:  $246 \pm 29,8$ ; DB:  $223 \pm 25,7$ ) ( $p < 0,05$ ) ver fig. 02]. Ao transcorrer a 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana de tratamento, o comportamento do peso dos animais entre os grupos, permaneceu semelhante estatisticamente, onde ao final do tratamento, o grupo CS diferiu de todos os outros grupos em estudo, enquanto o grupo MET diferiu somente dos grupos LC5 e DB [(2<sup>a</sup> semana: CS:  $322,8 \pm 11,41$ ; DB:  $206,1 \pm 23,46$ ; MET:  $271,1 \pm 34,6$ ; LC5:  $201,2 \pm 44,17$ ; LC15:  $258,8 \pm 51,06$ ); (3<sup>a</sup> semana: CS:  $338,0 \pm 12,43$ ; DB:  $222,0 \pm 27,24$ ; MET:  $265,6 \pm 34,9$ ; LC5:  $196,5 \pm 44,4$ ; LC15:  $288,2 \pm 75,09$ ); (4<sup>a</sup> semana: CS:  $354,5 \pm 5,17$ ; DB:  $219,1 \pm 29,9$ ; MET:  $274,8 \pm 41,1$ ; LC5:  $196,0 \pm 48,1$ ; LC15:  $287,5 \pm 71,8$ ) ( $p < 0,05$ ) ver fig. 02]. O grupo LC15 apresentou semelhança ao grupo MET, porém diferiu do grupo CS [(4<sup>a</sup> semana: LC15:  $287,5 \pm 71,8$ ; MET:  $274,8 \pm 41,1$ ; CS:  $354,5 \pm 5,17$ ) ( $p < 0,05$ ) ver fig. 02].

Até o presente momento, são escassos os estudos que investigam as alterações do peso corpóreo dos animais diabéticos, frente ao tratamento com LC. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento com a LC na concentração de 15 mg/Kg peso animal (LC15), foi capaz de reduzir a perda de peso nos animais diabéticos em 24%, quando comparados aos animais do grupo DB, podendo ser comparado ao grupo MET, o qual apresentou uma redução de 20% em relação ao grupo DB. Estes dados corroboram para comprovar que a LC em determinada concentração, reduz significativamente a perda de peso nos animais diabéticos, podendo a mesma ser comparada a Metformina<sup>®</sup>, um agente hipoglicemiante utilizado clinicamente em humanos que possuem o DM tipo 2.

Neste estudo, os grupos de animais em experimentação se comportaram de modo distinto, sendo comprovada essa diferença através de testes estatísticos que apresentaram o valor de  $p < 0,05$ . Em relação à evolução ponderal e estado geral dos animais do grupo DB, foi observado alterações características muito similares ao quadro de diabetes em humanos, que contrasta completamente da evolução dos animais sadio. O grupo CS ao longo do experimento, apresentou um bom estado geral, com animais ativos, apetite normal, tônus e reflexos conservados, além do ganho progressivo de peso e manutenção da ingestão hídrica e alimentar. O comportamento dos animais do grupo DB foi completamente diferente, sendo caracterizado por apatia, alterações da pelagem, odor forte da urina, anorexia, além do comprometimento acentuado e progressivo do estado geral dos animais. Este

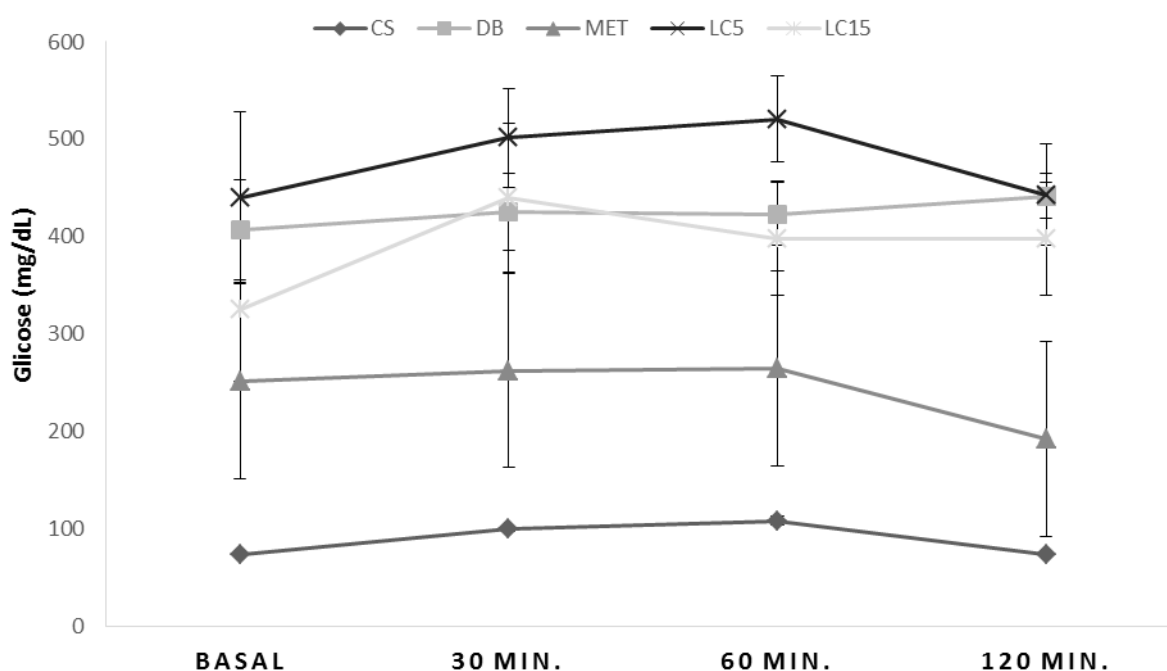


comportamento esta em conformidade com outros trabalhos já realizado por Lerco (2003) e Silva & Nogueira (2015), que utilizaram o mesmo modelo diabético aloxânico.

#### 4.2. Teste Oral de Tolerância a Glicose

Os dados referentes à resposta da glicemia sanguínea dos animais após estímulo com concentração padrão de glicose são apresentados na Figura 3.

**Figura 3:** Evolução da Glicemia no Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).



Valores de glicemia capilar durante o TOTG. Controle Saudável (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo - Metformina 5 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm. (a, b e c) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis).

O TOTG consistiu em administrar aos animais, uma dose padrão de glicose (1g/kg de peso corpóreo), realizando posteriormente de modo sequencial, dosagens de glicemia capilar nos tempos de 0 (Basal), 30, 60, e 120 minutos (GROSS & NEHME, 2002). O teste foi realizado após 14 dias de tratamento, os valores médios de todos os pontos da curva foram analisados, demonstrando que a curva de resposta à glicose dos grupos CS e MET são diferentes estatisticamente, porém o

grupo MET apresentou os menores valores entre os demais grupos, sendo próximos aos valores do grupo CS, considerados neste estudo como normais [(CS – Basal =  $74 \pm 2,65$ ; 30 min. =  $100 \pm 2,38$ ; 60 min. =  $108 \pm 4,03$ ; 120 min. =  $74 \pm 3,15$ ), (MET – Basal =  $252 \pm 87,11$ ; 30 min. =  $263 \pm 46,36$ ; 60 min. =  $264 \pm 51,32$ ; 120 min. =  $193 \pm 55,40$ );  $P < 0.05$ ; Ver Fig. 03].

Os grupos DB, LC5 e LC15 também mostraram valores glicêmicos com semelhança entre si, mas diferindo do restante dos grupos [(DB – Basal =  $407 \pm 51,73$ ; 30 min. =  $426 \pm 39,84$ ; 60 min. =  $423 \pm 32,62$ ; 120 min. =  $441 \pm 22,93$ ), (LC5 – Basal =  $441 \pm 87,11$ ; 30 min. =  $501 \pm 51,27$ ; 60 min. =  $521 \pm 44,08$ ; 120 min. =  $443 \pm 51,74$ ), (LC15 – Basal =  $325 \pm 73,83$ ; 30 min. =  $440 \pm 76,81$ ; 60 min. =  $398 \pm 58,37$ ; 120 min. =  $398 \pm 58,13$ );  $P < 0.05$ ; Ver Fig. 03]. Estes grupos apresentaram uma taxa glicêmica média considerada alta quando comparadas ao grupo controle saudável (CS). O esperado efeito hipoglicemiante da LC não foi evidente neste estudo quando analisada a média da curva glicêmica dos grupos. Nos animais induzidos ao diabetes por ALX, em nenhuma das concentrações de LC foi perceptível a redução dos níveis glicêmicos.

Poucos trabalhos citam o comportamento da curva glicêmica em animais induzidos ao diabetes por ALX. Talvez, esta falta de dados explique o comportamento entre os grupos CS e MET, os quais apresentam diferença estatística entre si, o que não era esperado neste estudo. Alguns dados em humanos, obtidos por Tapola et al. (2005), Ludwig (2003) e Saris (2003), demonstraram a diminuição dos níveis de glicose pós-prandial após a ingestão de glucanas provenientes de aveia. Tanto o pico quanto a curva da glicemia se apresentaram mais discretos nos pacientes saudáveis que receberam glucana. Também foi relatado de modo qualitativo a redução da sensação de fome causada pela rápida diminuição da glicemia.

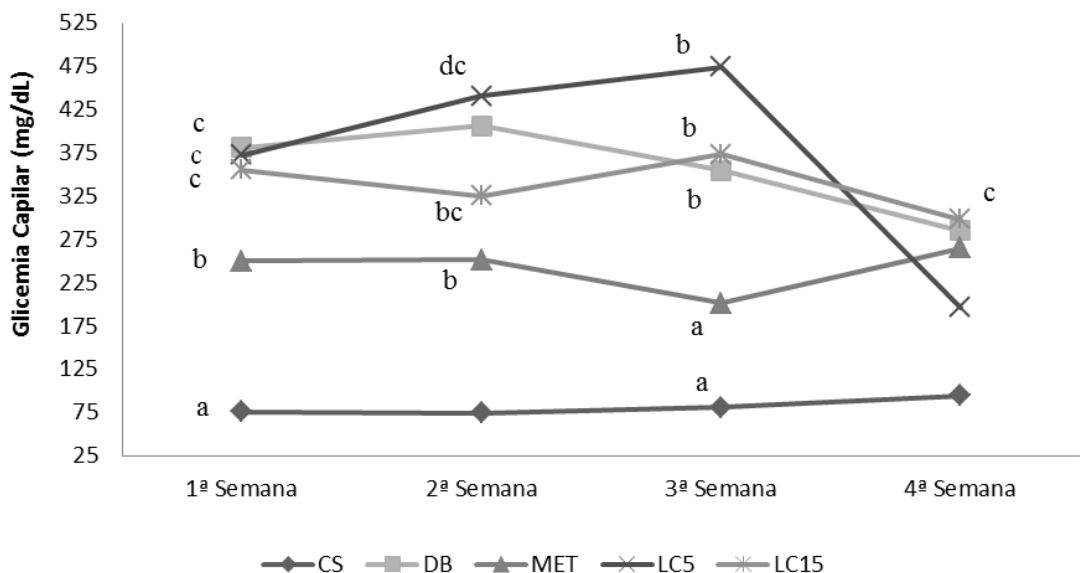
#### 4.3. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

A glicemia capilar dos animais foi acompanhada semanalmente durante todo o experimento, e seus resultados são apresentados no gráfico da figura 04. Segundo Melo et al. (2012), os níveis glicêmicos em jejum de ratos saudáveis permanecem na faixa de 79 a 144 mg/dL, valores próximos aos citados por Dantas et al. (2006), que em um estudo obteve valores de  $108 \pm 17,4$  mg/dL. Neste estudo, os

animais saudáveis apresentaram valores inferiores aos citados anteriormente, porém esses valores não influenciaram na análise estatística, pois os grupos foram comparados entre si e não somente ao controle saudável.

Após a indução por ALX dos grupos controle e tratamento, foi notável uma acentuada hiperglicemia nos animais, onde todos apresentaram média glicêmica superior a 150 mg/dL após 72 horas da injeção do composto diabetogênico. Este quadro se manteve durante o experimento, havendo apenas uma mudança do curso glicêmico no grupo LC5, que ao final do experimento, apresentou uma redução glicêmica significativa.

**Figura 4:** Glicemia capilar dos animais durante o experimento.



Valores de glicemia capilar durante o tratamento subcrônico. Controle Saudável (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo Metformina 5 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm. (a, b, c e d) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0.05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Na avaliação da glicemia capilar, houve diferença estatística entre os grupos a partir do 7º dia de tratamento. Ao final da primeira semana o grupo CS e MET diferiram entre si e aos demais grupos em estudo, havendo semelhança apenas entre os grupos DB, LC5 e LC15 [(CS:  $75,0 \pm 3,46$ ; MET:  $250,0 \pm 50,6$ ; DB:  $381,2 \pm 32,7$ ; LC5:  $372,5 \pm 30,3$ ; LC15:  $354,5 \pm 44,4$ ) ( $p < 0.05$ ) ver fig. 04]. Após a

segunda semana, o grupo CS continuou diferindo dos demais grupos, ressaltando apenas a semelhança do grupo LC15 em relação ao grupo MET [(CS:  $73,8 \pm 2,6$ ; DB:  $406,0 \pm 51,7$ ; MET:  $251,0 \pm 87,1$ ; LC5:  $440,0 \pm 58,0$ ; LC15:  $325,0 \pm 73,8$ ) ( $p < 0.05$ ) ver fig. 04].

Ao fim da terceira semana de tratamento, houve algumas mudança nos valores glicêmicos dos grupos em teste. O grupo MET apresentou semelhança ao grupo CS, diferindo dos demais grupos em estudo. Os grupos LC5, LC15 e DB apresentaram semelhança entre si, diferindo do grupo CS e MET [(LC5:  $474,0 \pm 7,1$ ; LC15:  $373,0 \pm 33,1$ ; DB:  $354,0 \pm 67,7$ ; CS:  $80,5 \pm 6,3$ ; MET:  $201,0 \pm 60,7$ ) ( $p < 0.05$ ) ver fig. 04].

Ao final da quarta semana, o grupo CS diferiu dos demais grupos, e ainda os grupos LC5 e LC15 apresentaram semelhança ao grupo MET [(CS:  $94,0 \pm 14,2$ ; DB:  $285,0 \pm 16,5$ ; MET:  $265,0 \pm 29,9$ ; LC5:  $196,0 \pm 36,9$ ; LC15:  $298,0 \pm 22,2$ ) ( $p < 0.05$ ) ver fig. 04]. O grupo LC5 ao final do tratamento apresentou um comportamento totalmente diferente das semanas anteriores, onde os níveis glicêmicos tiveram uma redução de forma abrupta, logo que, o comportamento glicêmico era de constante elevação, surgindo então uma instabilidade da média glicêmica do grupo. Para explicar a redução glicêmica abrupta do grupo LC5 ao final do tratamento, podemos relacionar a mesma com a redução do consumo ração e da ingestão hídrica dos animais, o aumento dos níveis das enzimas hepáticas, a redução dos níveis de proteínas totais e albumina, além da elevação dos marcadores de função renal, o que sugere um agravamento das condições clínicas dos animais induzidos ao diabetes por ALX.

Os resultados obtidos neste estudo utilizando a LC, não correspondem aos encontrados em outros trabalhos que empregaram as glucanas no controle da hiperglicemia. O uso oral de corpos de frutificação e do polissacarídeo produzido por *Tremella mesenterica* e *T. aurantia* reduzem a glicose plasmática de modo significativo em animais saudáveis e induzidos ao diabetes, sendo que o modelo de indução empregado pelos autores, inclui o modelo de indução por modificação genética e indução química por Streptozotocina. Vale ressaltar que no presente estudo, o modelo de indução ao diabetes foi diferente aos modelos utilizados pelos autores citados anteriormente (KIHO, 1995).

Segundo Paula et al. (2005), a inclusão de glucanas na dieta gera uma diminuição importante na absorção da glicose pelos enterócitos, levando a

diminuição da glicose plasmática, induzindo a sensação de saciedade segundo Liats et al. (2009). Porém nenhum destes trabalhos demonstraram os efeitos hipoglicemiantes de moléculas modificadas quimicamente pelo processo de carboximetilação, sobre modelos de DM induzido por ALX.

Como base para esta pesquisa, descrevemos um comportamento observado em um estudo realizado por Túrmina (2012), onde animais saudáveis receberam uma dose de 50 mg/dL de Lasiodiplodana sem modificação química de modo subcrônico, sendo evidente ao final do experimento uma redução de 35% dos níveis de glicose plasmáticas em ratos machos. Neste estudo, buscou-se verificar a ampliação do efeito hipoglicemiante citado anteriormente, após a modificação química da lasiodiplodana pelo processo de carboximetilação, o qual segundo Somense (2014), após a derivatização química aumenta sua solubilidade em água para 63%, onde antes permanecia próximo de 3%. A inserção dos grupos químicos carboximetila diminuiu as interações intermoleculares e intramoleculares, tornando a molécula mais solúvel podendo desta forma potencializar sua aplicação em estudos clínicos.

Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos ao final do tratamento são apresentados nas Tabela 02 e 03.

**Tabela 2:** Efeito da LC nos parâmetros bioquímicos – Marcadores hepáticos e renais.

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DB	MET	LC5	LC15
Creatinina (mg/dL)	<sup>a</sup> 0,47 ± 0,02	<sup>ab</sup> 0,54 ± 0,03	<sup>b</sup> 0,62 ± 0,07	<sup>b</sup> 0,62 ± 0,10	<sup>b</sup> 0,64 ± 0,06
Uréia (mg/dL)	<sup>a</sup> 38,0 ± 2,1	<sup>b</sup> 64,1 ± 5,4	<sup>c</sup> 92,3 ± 17,0	<sup>d</sup> 155,7 ± 16,5	<sup>e</sup> 88,6 ± 9,5
AST (UI/L)	<sup>a</sup> 167 ± 27,2	<sup>a</sup> 140 ± 26,7	<sup>a</sup> 171 ± 32,6	<sup>b</sup> 293 ± 10,85	<sup>a</sup> 183 ± 15,7
ALT (UI/L)	<sup>a</sup> 50 ± 3,9	<sup>b</sup> 107 ± 15,2	<sup>b</sup> 116 ± 22,8	<sup>c</sup> 259 ± 11,4	<sup>b</sup> 129 ± 8,7
Prot. Totais (g/dL)	<sup>a</sup> 6,0 ± 0,00	<sup>b</sup> 5,17 ± 0,31	<sup>a</sup> 6,00 ± 0,00	<sup>c</sup> 4,33 ± 0,47	<sup>ab</sup> 5,4 ± 0,22
Albumina (g/dL)	<sup>a</sup> 2,98 ± 0,13	<sup>a</sup> 2,85 ± 0,08	<sup>a</sup> 2,95 ± 0,05	<sup>b</sup> 2,10 ± 0,04	<sup>c</sup> 2,38 ± 0,05

Controle Saudável – (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo -Metformina 5 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg de peso animal (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). Os dados foram expressos como média ± epm. (a, b e c) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0.05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Ao final do experimento, foi realizada a dosagem de creatinina e uréia a fim de avaliar a função renal dos animais em estudo. Em relação aos níveis de creatinina, foi evidenciada uma semelhança estatística entre o grupo CS e DB [(CS:  $0,47 \pm 0,02$ ; DB:  $0,54 \pm 0,03$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2] e uma diferença entre o grupo CS e os grupos tratamento LC5 e LC15 [(CS:  $0,47 \pm 0,02$ ; LC5:  $0,62 \pm 0,10$ ; LC15:  $0,64 \pm 0,06$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2]. Quando avaliada a concentração de uréia, o grupo CS diferiu significativamente dos grupos DB, LC5 e LC15 [(CS:  $38,0 \pm 2,1$ ; LC5:  $155,7 \pm 16,5$ ; LC15:  $88,6 \pm 9,5$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2]. O grupo LC15 apresentou semelhança estatística com o grupo MET e diferença com o grupo LC5 [(LC15:  $88,6 \pm 9,5$ ; MET:  $92,3 \pm 17,0$ ; LC5:  $155,7 \pm 16,5$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2].

Os valores de creatinina quantificados no soro dos animais do grupo CS, condiz com estudos prévios de padronização dos parâmetros de função renal de ratos saudáveis, os quais foram relatados em estudos realizados por Dantas et al. (2008) e Melo et al. (2012), que identificaram a média dos níveis normais de creatinina em ratos saudáveis ( $0,50 \pm 0,07$  mg/dL). Neste estudo os resultados encontrados nos animais diabéticos sem tratamento (Grupo DB) contradiz um estudo realizado por Facundo (2013), que identificou a elevação dos níveis de creatinina sérica em ratos diabéticos sem tratamento. Em relação aos grupos tratamento LC5 e LC15, os mesmos não apresentaram um efeito protetor a nível renal, pois diferiram estatisticamente do grupo CS, sendo evidente a elevação de creatinina sérica nestes grupos. Porém não foi possível identificar se esta elevação está relacionada ao modelo de indução ao diabetes ou a substância carboximetilada em estudo.

Em relação aos níveis de uréia o grupo CS apresentou valores próximos ao mencionado por Dantas et al. (2006), que em estudo concluiu que a média dos animais saudáveis deve permanecer entre 40,4 e 55,6 mg/dL. Diferente dos níveis de creatinina, a uréia se comportou de modo semelhante a outros estudos já realizados com animais diabéticos. Evidentemente os níveis de uréia do grupo DB tiveram um significativo aumento, condizendo aos estudos realizados por Nogueira Junior et al. (2005) e (HENRY, 2008), que em experimentos com animais diabéticos, evidenciaram a elevação significativa dos níveis de uréia, em decorrência de uma provável complicação renal desencadeada pelo modelo diabético, bem como pelo fato da falta de insulina levar a uma exacerbação de processos catabólicos no organismo, envolvendo gorduras, proteínas e carboidratos.

A escassez de estudos que avaliam os níveis de uréia em ratos diabéticos tratados com exopolissacarídeos modificado quimicamente pelo processo de carboximetilação, dificulta a correlação do aumento dos níveis de uréia nos grupos tratamento LC5 e LC15, que se apresentaram diferentes entre si e ao grupo CS. Em um estudos realizado por Túrmina (2012), foi demonstrado que a utilização da lasiodiplodanana concentração de 50 mg/Kg de peso animal, não alterou os níveis de uréia em animais machos saudáveis, havendo ainda uma redução de 20% dos níveis em fêmeas saudáveis. Nota-se que a LC não foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de uréia, elevação característica do quadro de DM induzido em ratos.

A utilidade clínica da uréia depende da determinação em conjunto da creatinina, um marcador que neste estudo demonstrou normalidade para animais induzidos ao diabetes. O nível de uréia serve como um índice preditivo da insuficiência renal sintomática e de desordens hepáticas (GARCIA & KANAAN 2008). Nota-se neste estudo que a uréia teve sua elevação de modo proporcional às enzimas hepáticas, trazendo evidencias importantes para comprovar que a LC é capaz de gerar um efeito tóxico a nível hepático, porém não tóxico a nível renal.

Na avaliação dos danos hepáticos, é imprescindível o uso das aminotransferases, as quais são consideradas bons marcadores, uma vez que os tecidos hepáticos apresenta quantidades consideráveis de tais enzimas e o aumento da sua atividade no soro é decorrente de sua liberação na corrente sanguínea através do aumento da permeabilidade ou dano causado ao tecido hepático. A ALT é considerada um marcador mais sensível ao dano hepático do que a AST, pois sua liberação ocorre de forma mais rápida na corrente sanguínea pelo fato da mesma se encontrar no citoplasma das células, enquanto a AST é liberada em danos mais severos ao tecido, devido ao fato de ser proveniente do conteúdo interno das mitocôndrias (HENRY, 2008).

Em relação aos marcadores de lesão hepática, houve um aumento significativo de 75% da atividade de AST no grupo LC5, quando comparado ao grupo CS [(LC5:  $293 \pm 10,85$ ; CS:  $167 \pm 27,2$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 2], e uma elevação de 71% na atividade quando comparado ao grupo MET [(LC5:  $293 \pm 10,85$ ; MET:  $171 \pm 32,6$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 2]. Para AST os grupos LC15, MET, DB e CS não diferiram estaticamente entre si. Quando avaliada a atividade de ALT, foi evidente a elevação dos valores do grupo LC5, onde o mesmo apresentou uma elevação de 419% de sua atividade quando comparado ao grupo CS [(LC5:  $259 \pm 11,4$ ; CS:  $50 \pm$

3,9);  $p < 0.05$ ; ver tab. 2] e uma elevação de 123% na comparação com grupo MET [(LC5:  $293 \pm 10,85$ ; MET:  $116 \pm 22,8$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 2]. Para ALT o grupo CS diferiu estatisticamente de todos os outros grupos em estudo ( $p < 0,05$ ).

A partir dos resultados das quantificações das enzimas hepáticas séricas, nota-se que há um dano superficial e profundo ao tecido hepático nos animais diabéticos tratados com LC, dano evidenciado pelo aumento da atividade da enzima ALT e AST no grupo LC5, que utilizou como tratamento a LC na concentração de 5 mg/Kg peso animal.

Segundo Dantas (2006), em animais saudáveis, os níveis normais de AST deve permanecer em uma faixa de 69,3 a 92,7 UI/L, e ALT entre 38,7 a 63,3 UI/L. No entanto, os resultados deste presente estudo demonstrou que os níveis de AST dos animais saudáveis, diferiram do estudo relatado anteriormente, sendo semelhante apenas nas concentrações de ALT.

A elevação dos níveis de ALT e AST comumente é relatada em modelos de animais diabéticos, onde, segundo Ghosh e Suryawanshi (2001) e Pereira (2014) indicam disfunção hepática associada ao quadro de necrose tecidual. Estudos prévios realizados por Túrmina (2012) e SHAH et al. (2011) demonstraram que o uso da lasiodiplodana sem modificação química em ratos saudáveis, não aumenta os níveis das aminotransferases, comprovando que as glucanas por si só não geram efeitos hepatotóxicos.

No presente estudo em que utilizou-se a LC, nota-se um significativo aumento dos níveis de ALT e AST no grupo LC5 quando comparados ao grupo CS e DB, o que condiz com um dano superficial e profundo ao tecido hepático. O grupo tratamento LC5 também demonstrou uma significativa diminuição dos valores da glicemia nos ratos diabéticos, o que pode estar associado com ados dano hepáticos evidentes neste estudo.

Para avaliar a função hepática dos animais após o tratamento, foram realizadas dosagens séricas de Proteínas Totais (PT) e Albumina (ALB), onde os resultados obtidos apresentaram variações significativas. Em estudos avaliando os valores de proteínas séricas em ratos saudáveis da linhagem Wistar, Lima et al. (2014), consideraram a faixa de normalidade para proteínas totais entre  $5,75 \pm 0,87$  g/dL e para albumina  $2,65 \pm 0,30$ . Carvalho et al. (2009) em um trabalho sobre o perfil bioquímico de ratos da mesma linhagem encontraram valores médios de



proteínas totais de  $6,15 \pm 0,07$  e  $2,76 \pm 0,27$  para albumina. Ambos os valores vão de encontro com os resultados obtidos dos animais saudáveis deste estudo.

Em relação as proteínas totais, o grupo LC5 diferiu estatisticamente de todos os outros grupos em estudo e seus níveis séricos apresentaram uma redução de 28% quando comparado ao grupo CS [(LC5:  $4,33 \pm 0,47$ ; CS:  $6,0 \pm 0,00$ )];  $p < 0,05$ ; ver tab. 2] e de forma semelhante, uma redução de 16% na comparação com o grupo DB [(LC5:  $4,33 \pm 0,47$ ; DB:  $5,17 \pm 0,31$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2]. Ainda em relação as proteínas totais, o grupo tratamento LC15 apresentou semelhança estatística com os grupos MET, DB e CS [(LC15:  $5,4 \pm 0,22$ ; MET:  $6,0 \pm 0,00$ ; DB:  $5,17 \pm 0,31$ ; CS:  $6,0 \pm 0,00$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2].

Os animais do grupo DB deste estudo, apresentaram valores reduzidos de proteínas totais, fato já esperado pois se tratam de ratos diabéticos tratados apenas com solução salina. Segundo Silva et al. (2011) e Ashraf et al. (2013), a redução dos valores de proteínas totais é uma das características apresentadas por ratos diabéticos, devido à mudança na forma de produção energética. Segundo os autores citados anteriormente, os animais portadores do DM aumentam o catabolismo de proteínas, apresentam um comprometimento hepático e reduzem os valores de GH, o que diminui a síntese e a disponibilidade de proteínas circulantes, tudo isso graças a redução dos níveis de glicose intracelular ocasionada pela doença.

O grupo tratamento com LC na concentração de 5 mg/Kg de peso animal (LC5), apresentou valores reduzidos das proteínas totais quando comparado ao demais grupos. Nota-se também uma glicemia reduzida neste grupo, o que condiz com uma possível alteração do status nutricional dos animais. Segundo Burt e Portmann (2011), situações como doenças renais ou hepáticas, desnutrição e infecções prolongadas, costumam gerar diminuição nos níveis séricos de albumina e proteínas totais.

Quando avaliada as concentrações de albumina sérica nos animais, foi possível evidenciar uma diferença estatística entre os grupos em estudo, onde o LC5 e LC15 diferiram-se entre si e aos demais grupos em estudo, sendo evidente uma redução da concentração de albumina no grupo LC5 de 29% em relação ao grupo CS [(LC5:  $2,10 \pm 0,04$ ; CS:  $2,98 \pm 0,13$ ); ( $p < 0,05$ ); ver tab. 2] e de 26% em relação ao grupo DB [(LC5:  $2,10 \pm 0,04$ ; DB:  $2,85 \pm 0,08$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2]. No grupo LC15, de forma semelhante, houve uma redução de 36% da concentração de albumina em relação ao grupo CS [(LC15:  $2,39 \pm 0,05$ ; CS:  $2,98 \pm 0,13$ );  $p < 0,05$ ;

ver tab. 2] e 16% em relação ao grupo DB [(LC15:  $2,38 \pm 0,05$ ; DB:  $2,85 \pm 0,08$ );  $p < 0,05$ ; ver tab. 2].

Após a quantificação dos níveis de albumina sérica, foi identificado uma importante redução nos grupos tratamento LC5 e LC15. Porém a ausência de estudos com a lasiodiplodana carboximetilada dificultou uma comparação dos níveis de albumina a outros estudos. Segundo Nogueira Junior (2005), os níveis de albumina dos animais induzidos ao diabetes apresentam reduzidos na grande maioria das vezes, consequência dos danos gerados pelo modelo químico de indução. Assim como nas proteínas totais, os níveis de albumina sérica mostraram-se reduzidos. Segundo Burt e Portmann (2011), a redução dos níveis de albumina podem estar relacionadas com doenças renais ou hepáticas, desnutrição e infecções crônicas. Neste estudo foi evidente o comprometimento hepático nos animais do grupo tratamento, juntamente com o agravamento do estado geral e nutricional dos animais, o que explica a redução dos níveis séricos de albumina.

**Tabela 3:** Efeito da LC nos parâmetros bioquímicos – Parâmetros Lipídico e glicêmico

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DB	MET	LC5	LC15
Colesterol (mg/dL)	$67,50 \pm 5,92$	$72,23 \pm 1,73$	$88,67 \pm 8,37$	$74,67 \pm 14,08$	$78,60 \pm 4,70$
Triglicérides (mg/dL)	<sup>a</sup> $48,00 \pm 3,37$	<sup>ab</sup> $86,67 \pm 7,99$	<sup>abc</sup> $116,33 \pm 35,67$	<sup>bc</sup> $193,30 \pm 66,14$	<sup>c</sup> $201,60 \pm 3,35$

Controle Saudável – (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo Metformina 5 mg/Kg peso animal (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg peso animal (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/kg peso animal (LC15). Os dados foram expressos como média  $\pm$  epm. (a, b e c) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0,05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

Em um estudo de padronização dos valores de parâmetros bioquímicos em ratos realizado por Lima et al. (2014), os níveis normais de colesterol total permaneceram na faixa de  $60,68 \pm 6,51$  mg/dL. Em um outro estudo realizado por Dantas et al. (2006), os níveis encontrados permaneceram na faixa de  $87 \pm 18,1$  mg/dL. Neste estudo, os valores de colesterol total em animais saudáveis, condizem com o encontrado na literatura (Ver Tabela 3). Os grupos de animais avaliados no

presente trabalho não apresentavam hipercolesterolemia. Seus valores de colesterol total não diferiram entre os grupos controles e tratamentos [(CS:  $67,50 \pm 5,92$ ; DB:  $72,23 \pm 1,73$ ; MET:  $88,67 \pm 8,37$ ; LC5:  $74,67 \pm 14,08$ ; LC15:  $78,60 \pm 4,70$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 3], mostrando que o efeito hipocolesterolêmico da lasiodiplodana relatado por Túrmina (2012) não é ampliado e nem mantido após o processo de carboximetilação desta molécula.

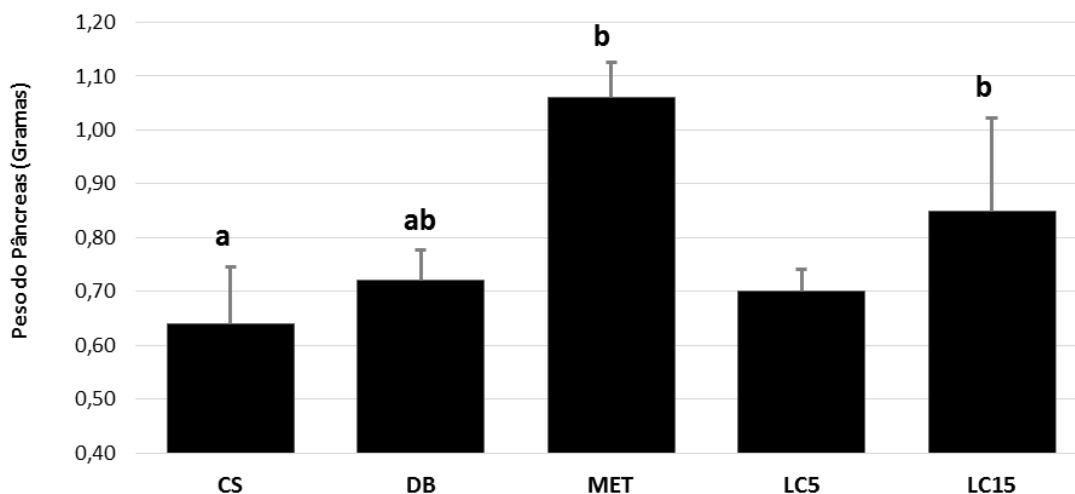
Diferente do colesterol total, quando quantificado os níveis de triglicérides, foi possível identificar a presença da hipertrigliceridemia nos grupos tratamento LC5 e LC15. Na comparação entre os grupos, houve um aumento significativo de 301% da concentração de triglicérides no grupo LC5 em relação ao grupo CS [(CS:  $48,00 \pm 3,37$ ; LC5:  $193,3 \pm 66,14$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 3], no entanto o grupo LC5 apresentou semelhança estatística aos demais grupos. No grupo LC15, houve um aumento significativo de 320% e 80% respectivamente quando comparada aos grupos CS e DB [(CS:  $48,00 \pm 3,37$ ; DB:  $86,67 \pm 7,99$ ; LC15:  $201,6 \pm 3,35$ );  $p < 0.05$ ; ver tab. 3].

#### 4.4. Níveis de Peroxidação Lipídica

A quantificação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem por finalidade avaliar os danos causados em processos oxidativos induzidos por diversas espécies reativas, principalmente Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (SCHAFER; BUETTNER, 2001; JOHANSEN et al., 2005; REIS et al., 2008). Considerados biomarcadores da peroxidação lipídica, o TBARS tem suas concentrações aumentadas diante dos danos causados por várias espécies de substâncias reativas, podendo ser quantificados por técnicas tradicionais simples de bioquímica (VASCONCELOS et al., 2007).

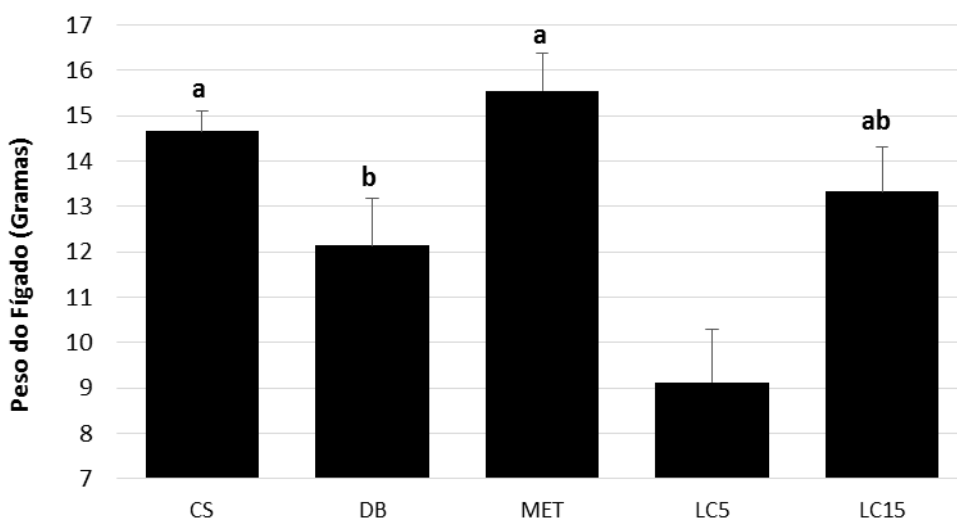
Os resultados dos efeitos da LC na peroxidação lipídica no fígado e rim dos animais são apresentados nas Figuras 05 e 06 respectivamente.

**Figura 5:** Níveis de peroxidação lipídica em fígado por TBARS.



Valores de TBARS para fígado. Dados representam a média  $\pm$  epm (n=30). (a,b) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos;  $p < 0,05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

**Figura 6:** Níveis de peroxidação lipídica em rim por TBARS.



Valores de TBARS para rim. Dados representam a média  $\pm$  epm (n=30). (a,b, c e d) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0,05$ ; Teste de Levene; ANOVA one-way).

No presente estudo, foram quantificados os níveis de TBARS de fígado e rim dos animais de todos os grupos, os quais apresentaram comportamentos diferentes entre os órgãos avaliados. Quando quantificado os níveis de peroxidação lipídica do fígado, o grupo LC5 apresentou uma redução significativa em relação

aos grupos CS e MET, porém o mesmo demonstrou semelhança estatística ao grupo DB [(LC5:  $0,3 \pm 0,03$ ; CS:  $0,48 \pm 0,05$ ; MET:  $0,46 \pm 0,02$ ; DB:  $0,38 \pm 0,06$ );  $p < 0,05$ ; ver fig. 08]. Por sua vez, os grupos DB e LC15 apresentaram semelhança entre si e aos demais grupos em estudo (DB:  $0,38 \pm 0,06$ ; LC15:  $0,38 \pm 0,03$ );  $p < 0,05$ ; ver fig. 08].

O comportamento do grupo DB em relação aos níveis de TBARS no tecido hepático, foi aposto ao citado por Reis et al. (2008), que relatou uma maior atividade do sistema oxidante em decorrência da patologia experimental instalada, o qual favorece o estresse oxidativo e que ainda independe do agente indutor.

Ainda sobre a avaliação do fígado dos animais, o grupo CS apresentou semelhança aos grupos DB, MET e LC15, havendo apenas uma redução significativa dos níveis de TBARS no grupo LC5 quando comparado ao CS e MET. No entanto, essa redução vem ao encontro dos resultados obtidos nos parâmetros bioquímicos deste estudo, que apresentaram no grupo LC5 uma intensa elevação dos danos hepáticos, quantificados através dos marcadores de lesão hepática AST e ALT (Ver tab. 02).

A literatura apresenta alguns estudos relacionados a atividade antioxidante de exopolissacarídeos, muitos desses utilizaram o TBARS como biomarcador em seus resultados. Porém, nenhum estudo foi encontrado utilizando essas substâncias modificadas quimicamente pelo processo de carboximetilação, o qual investigasse os reais danos celulares pela quantificação de TBARS em doenças crônicas, como é o do diabetes *mellitus*.

Um estudo realizado por Yuan et al. (2009), avaliou a atividade antioxidante in vivo de uma  $\beta$ -glucana extraída de *Phellinus ribis*, onde amostras de plasma de ratos tratados com a  $\beta$ -glucana, apresentaram uma redução dos níveis de TBARS e um aumento da atividade enzimática do Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationa Peroxidase (GSH-Px).

Neste presente estudo que se avaliou os níveis de TBARS em tecidos após tratamento subcrônico com a lasiodiplodana carboximetilada, foi evidente a redução dos níveis de TBARS na concentração de 5 mg/Kg peso animal, efeito contrário ao grupo LC15 (15 mg/Kg peso animal) que não apresentou o efeito redutor. As substâncias antioxidantes, presentes nos exopolissacarídeos, podem estar relacionadas a essa queda de peroxidação lipídica, devido à capacidade de reagir com os radicais livres (SHIMIZU, 2004). Outro fator que pode ter influenciado o

comportamento distinto dos grupos tratamento, em parte, inclui a modificação química da molécula por carboximetilação e as concentrações utilizadas, pois em pequenas doses (5mg/Kg peso animal), o efeito redutor foi evidenciado, o que não ocorreu em uma concentração maior (15mg/Kg peso animal).

Quando analisada a peroxidação lipídica do rim, foi evidente a elevação dos níveis nos grupos DB e MET na comparação ao grupo CS. Estatisticamente o grupo LC5 diferiu do grupo DB, sendo semelhante apenas com o grupo CS e tratamento LC15 [(LC5:  $0,26 \pm 0,03$ ; DB:  $0,44 \pm 0,05$ ; CS:  $0,18 \pm 0,04$ ; LC15:  $0,34 \pm 0,07$ );  $p < 0,05$ ; ver fig. 09]. No entanto, o grupo LC15 diferiu do grupo MET e CS, apresentando semelhança estatística aos grupos LC5 e DB [(LC15:  $0,34 \pm 0,07$ ; MET:  $0,52 \pm 0,07$ ; CS:  $0,18 \pm 0,04$ ; LC5:  $0,26 \pm 0,03$ ; DB:  $0,44 \pm 0,05$ );  $p < 0,05$ ; ver fig. 09].

Os níveis de TBARS nos rins dos animais do grupo LC5 (5 mg/Kg peso animal), mostraram-se reduzido, diferentemente do grupo LC15 (15 mg/Kg peso animal), que não demonstrou esse efeito biológico. Devemos ressaltar que esses dados relatados anteriormente favorecem para comprovar que a LC é dependente da dose aplicada como tratamento, comportamento não relato por Yuan et al. (2009), que utilizou uma  $\beta$ -glucana extraída de *Phellinus ribissem* modificação química, obtendo uma resposta biológica redutora dependente da concentração utilizada.

## 5. CONCLUSÃO

Em virtude dos fatos apresentados anteriormente, o presente estudo investigou as propriedades terapêuticas hipoglicemiantes da Lasiodiplodana que é um EPS  $\beta$ -(1→6)-D-glucana, produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado da Fruta-pinha, após sua modificação química por carboximetilação. Visto que, pesquisas recentes elucidaram que os EPS têm efeitos moduladores da resposta biológica (BOHN & BEMILLER, 1995), além de se mostrarem eficazes no tratamento de doenças, tais como o cancro, infecções microbianas, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus* e ainda um potencial efeito redutor dos riscos de doenças cardiovasculares (CHEN & RAYMOND, 2008; NOVAK & VETVICKA, 2008).

Assim, a partir da avaliação dos resultados obtidos por meio deste estudo, pode-se concluir que:

- A LC na concentração de 5 mg/Kg de peso animal, promoveu ao final do tratamento, uma redução significativa dos níveis de glicose capilar ao jejum de ratos induzidos ao diabetes por ALX;
- O TOTG não apresentou mudança de comportamento nos grupos tratamento LC5 e LC15 quando comparados ao grupo CS e MET;
- A LC na concentração de 15 mg/Kg de peso animal, promoveu redução da perda de peso nos animais diabéticos em 28% quando comparado aos animais diabético salina;
- A modificação química por carboximetilação da lasiodiplodana, gerou um dano superficial e profundo no tecido hepático nos animais do grupo tratamento de menor concentração, além da redução dos níveis de proteínas totais e albumina sérica;
- Os níveis de creatinina sérica dos animais diabéticos tratados com a LC, se demonstraram elevados quando comparados aos do grupo saudável e normais quando comparados ao grupo MET;
- A LC na concentração de 5 e 15 mg/kg de peso animal, não foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de uréia sérica em animais diabéticos induzidos por ALX;
- A LC na concentração de 5 mg/Kg de peso animal, foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TBARS nos rins e fígado dos animais diabéticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **Alexandria**, v. 33, n. 1, p. 62–69, 2010.

BARBOSA A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3-1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**. v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina, Londrina**, v. 25, p. 29-42, 2004.

BOHN, J. A. & BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Reserch**. v. 28, p. 3–14, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (2013). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica Diabetes mellitus. **Cadernos de Atenção Básica**, n° 36. Disponível em: <[file:///C:/Users/Andre/Downloads/CAB%20DIABETES 36.pdf](file:///C:/Users/Andre/Downloads/CAB%20DIABETES%2036.pdf)>. Acesso em: 23 jun. 2016.

CARVALHO, J. C. T.; PERAZZO, F. F.; MACHADO, L.; BERAU, D. Biologic Activity and Biotechnological Development of Natural Products. **Bio.Med. Research International**. Article ID. 971745, 4 p. 2013.

CHANDRA, N.; SUSHIMITA, Y.; MANJUSHA, O.; et al. Quantitative evaluation of Carbohydrate levels in diferent natural foodstuffs by uv-visible spectrophometer. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 44–45, 2011.

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.

CHEN, J.; RAYMOND, K. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. **Vascular health and risk management**, v. 4, n. 6, p. 1265–72, jan. 2008.

CUNHA, M. A. A.; et al., Lasiodiplodan, an exocellular (16)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and antiproliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179-1188, 2012.

DONG, J.; CAI, F.; SHEN, R.; LIU, Y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1066-1071, 2011.

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.



FREITAS, F.; et al., Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

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

GAYA, A. et al. Ciências do movimento humano: **introdução à metodologia da pesquisa**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 304 p.

GRAUBAUM, H. J. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using an insoluble yeast beta-glucan to improve the immune defense system. **Food and nutrition sciences**. v. 3, p. 738-746, 2012.

GROSS, J. L.; NEHME, M. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. Bras. EndocrinolMetab**, São Paulo, v. 46, n. 1, 2002.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas update 2012: Regional & Country Facctsheets**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetes-atlas-update-2012-regional-country factsheets>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

JINDAL, M.; RANA, V.; KUMAR, V.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; TIWARY, A. K. Sulfonylation of Aeglemarmelos gum: synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymer**.v. 92, p. 1660-1668, 2013.

KANG, K. S; COTTRELL, I. W. Em Polysaccharides in Microbial Technology, PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D., eds.; **Academic. Press**: New York, 1979, p. 417.

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

KIHO T. et al. 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.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.**Diabetologia**, Berlin, v. 51, p. 216–226, 2008

LERCO, Mauro M., et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta. Cirúrgica Brasileira - Vol 18 (2) 2003 – 135**.

MIRANDA, C. C. B. O.; ROBERT, F. H. D.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÓLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlasto genic activity exhibited bybotryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphae riarhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 42, p. 172-177, 2008.

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O.; FONSECA, E. A. I.; ZAIA, C. T. B. V.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; CASTRO, I. A.; BARBOSA, A. M. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in diabetes-induced and hyperlipidemia conditions in rats. **Mycobiology**. v. 39, p. 187-193, 2011.

MUELLER, A et al. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v. 10, n. 4, p. 339-46, abr. 2000.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; COOKE, P., WOOD, D.; GUEDES, M. I. F. Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodiatheobromae*: Microscopical features. **Micron**, v. 42, p. 419-428, 2011.

NASCIMENTO, M. S. Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.

NIEMAN, D.C. **Exercício e Saúde**. São Paulo:Manole, 2011, p. 600.

NOVAK, M. & VETVICKA, V.  $\beta$ -Glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanism of action. **J. Immu. Notoxicol**.5:47-57, 2008.

OLIVEIRA IVG. **Monitoramento da indução do Diabetes mellitus em ratos Wistar com aloxana em diferentes doses**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2012.

OOI, V. E., LIU, F.A review of pharmacology activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 1, 195-206, 1999.

PAULI, J. R. Obesidade e Diabetes: Bases Moleculares da Etiopatogenia. Em: CYINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular**. Savier: São Paulo, 2011.

PEREIRA, A.V.S. **Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobroma* Patogênico ao Mamão**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

PINHEIRO, A. C. S.; PAIS, A. A.; TARDIVO, A. C. B.; ALVES, M. J. Q. F. Efeito do extrato aquoso de cabelo de milho (*Zeamays L.*) sobre a excreção renal de água e eletrólitos e pressão arterial em ratos Wistar anestesiados. **Rev. bras. plantas med.** v. 13, n. 4, p. 375-381 2011.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA MACHADO, J. A. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1; Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq.bras. endocrinol. metab**, 52.7: 1096-1105, 2008.

SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILAS-BOAS, L. A.; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Braz. J. Microbiol.** v. 38, p. 259-264, 2007.

SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILAS-BOAS, L. A.; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Braz. J. Microbiol.** v. 38, p. 259–264, 2007.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação**: Visão Laboratorial da Hemostasia Primária e Secundária. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 424.2: 181-188, 2004.

SOLTANIAN, S.; STUYVEN, E.; COX, E.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates, **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, p. 109-138, 2009.

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

STELUTI, R. M. et al. 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.

SYNYTSYA, A. & NOVAK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 792-809, 2013.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiol**, v. 47, p. 343-346, 1998.

TRANQUILAN-ARANILLA, C.; NAGASAWA, N.; BAYQUEN, A.; ROSA, A. D. Synthesis and characterization of carboxymethyl derivatives of kappa-carrageenan. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, p. 1810-1816, 2012.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan (lasiiodiplodan), **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

VASCONCELOS, A. F. et al. 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 medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**. v. 13, p. 42-47, 1956.

WANG Y, YU Y, MAO J. Carboxymethylated  $\beta$ -glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chem.** v. 57, p. 913-915, 2009.

WANG, Z. And Zhang, J. Abundant indispensable redundancies in cellular metabolic networks. **Genome Biol. Evol.**, v. 1, p. 23-33, 2009.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258–74, nov. 2002.

WIATER, A. Biological study on carboxymethylated (13)- $\alpha$ -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1014-1023, 2012.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, p.19-39, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Definition, diagnosis and classification of diabete mellitus and its complications**. Report of a WHO consualation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diabetes**. Nota descritiva, n. 312, Nov. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acesso em: 30 jun. 2013.

WORDL HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Report On Diabetes**. Diabetes Mellitus – epidemiology, 2016. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf?ua=1). Acesso em: 26 jul. 2016.

YUAN, C.et al. Evaluation of antioxidant and immune activity of Phellinusribisglucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581–584, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608015239>>. Acessoem: 1 ago. 2016.

YUN, S. Y.; KIM, S. P.; SONG, D. K. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 541, p.115–121, 2006.

ZHANG, Z.; WANG, X.; MO, X.; QI, H. Degradation and the antioxidant activity of polysaccharide from *Enteromorpha linza*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2084- 2087, 2013.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-1410, 2012.