



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

CAROLINA CASTELLO BRANCO OTONI DE MIRANDA

**PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA E AVALIAÇÃO DE
SUAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA, ANTIMUTAGÊNICA,
HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICA**

Londrina
2006

CAROLINA CASTELLO BRANCO OTONI DE MIRANDA

**PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA E AVALIAÇÃO DE
SUAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA, ANTIMUTAGÊNICA,
HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2006

CAROLINA CASTELLO BRANCO OTONI DE MIRANDA

**PRODUÇÃO DE BOTRIOSFERANA E AVALIAÇÃO DE
SUAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA, ANTIMUTAGÊNICA,
HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICA**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Profa. Dra. Cássia Thaís B. Vieira Zaia

Profa. Dra. Maria de Lourdes C. Corradi da
Silva

Londrina, 28 de Julho de 2006.

DEDICATÓRIA

À minha Mãe, maior riqueza que tenho!!
Desculpe por todos os momentos de
ausência, por todos os dias importantes que
não estive ao seu lado para te abraçar. É
muito confortante poder contar com seu
amor. Obrigada por colaborar em mais este
sonho; não canso de admirá-la e sentir muito
orgulho por todo exemplo que você nos
passa. Te adoro !!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Prof^a Dr^a Aneli de Melo Barbosa, um grande exemplo para muitos professores; por toda paciência e esforço dedicados ao meu trabalho. Obrigada por ter me acolhido quando cheguei na UEL e me incentivando a cada novo resultado. Jamais terei como agradecer todo o conhecimento e a amizade que recebi.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e tudo de melhor que recebo em minha vida. Sua eterna misericórdia e benevolência sempre me orientaram para as decisões mais corretas e acalmaram meu espírito nos momentos difíceis.

À minha irmã, Janaína Castello Branco Otoni de Miranda (Naná), por toda amizade e carinho. Um exemplo de força e superação. Te admiro muito !

Ao meu noivo, Christian Fernandes Nantes, por toda a paciência, compreensão e apoio. Passaram-se todos esses anos e você continua sendo acima de tudo, meu amigo, me apoiando e amparando nos momentos mais difíceis e alegres também. Te amo !!

À minha co-orientadora, Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus, agradeço pela ajuda na parte experimental e teórica desta dissertação e por todo conhecimento que recebi.

À Prof^ª Dr^ª Cássia Thaís B. Vieira Zaia, agradeço também pela ajuda no desenvolvimento experimental desta dissertação e pela paciência e dedicação oferecidas.

Ao Dept^o de Biologia Geral e ao Dept^o de Ciências Fisiológicas pela oportunidade e ao Biotério Central pelos animais concedidos.

Ao prof^o Dimas A. M. Zaia do Dept^o de Química e aos bacharelados Ângelo Alexander Torres dos Santos e Rachel Cezar de Andrade Ribeiro do laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo (CIF/CCB/UEL) pela ajuda nas dosagens de ácidos graxos livres.

À Profª Inar Castro do Deptº de Nutrição da Universidade de São Paulo pelo preparo das rações hipercolesterolêmicas.

Ao Profº Drº Robert F. H. Dekker pelas preciosas sugestões que recebi durante o desenvolvimento do trabalho e por todo esforço e meticulosidade na preparação dos artigos.

Aos colegas de laboratório, em especial à Eveline Aparecida I. Fonseca, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

A todos os meus amigos, em especial aos do Mestrado em Biotecnologia, por todos os momentos de descontração, churrascos, macarronadas, filmes, barzinhos; enfim, obrigada pela amizade e pelas risadas.

Ao meu amigo Alexandre Tadachi Morey, à quem tenho muito carinho. Obrigada por todos os bons momentos e pela grande ajuda na impressão da tese.

Ao técnico Nelson Janeiro pela atenção sempre oferecida.

Aos professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia, pelos conhecimentos transmitidos.

À todas as cobaias que participaram do experimento, minha eterna gratidão e respeito.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente neste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À Universidade Estadual de Londrina, por ter me recebido e dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Sonhos

“Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história,

Renovam as forças do ansioso, animam os deprimidos, transformam os inseguros em seres humanos de raro valor.

Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades.”

(Theodore Roosevelt)

MIRANDA, Carolina Castello Branco Otoni. **Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica**. 2006. 166f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Exopolissacarídeos são polímeros de carboidratos secretados por algumas espécies microbianas e conhecidos por apresentarem atividades biológicas como, modificadores da resposta biológica; entre elas, antimutagenicidade e imunomodulação e são utilizados em alguns países nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. O botriosferana é um EPS descrito recentemente como uma β -(1→3);(1→6)-D-glucana, produzido pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. O fungo foi cultivado em glucose com única fonte de carbono e o botriosferana foi utilizado neste trabalho para a avaliação de suas possíveis atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica. Na avaliação das atividades mutagênicas e antimutagênicas, utilizando-se o sistema Teste do Micronúcleo, observou-se que o botriosferana não exerceu efeito mutagênico em camundongos. Os resultados também mostraram, que o botriosferana apresentou atividade antimutagênica, chegando à uma redução de 45, 71 e 78% em eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea; e 45, 78 e 82% de redução em reticulócitos micronucleados no sangue periférico de camundongos, nas doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg p.c./dia. O botriosferana na concentração de 3,0 g/L, também apresentou 48% de redução da glicose plasmática nos ratos ($P < 0,01$), em diabetes melitus tipo I, induzida pela droga estreptozotocina (STZ). Na concentração de 1,5 g/L não exerceu atividade hipoglicemiante, bem como, não foi capaz de desenvolver atividade hipocolesterolêmica na concentração de 3,0 g/L em lipidemia induzida pela dieta com colesterol a 1%, gorduras saturadas 25% e 0,1% de ácido cálcico. Entretanto, os resultados demonstraram que, mesmo o botriosferana, não tendo apresentado diferença estatística significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle positivo; na avaliação da atividade hipocolesterolêmica, apresentou uma tendência à diminuição do colesterol, reduzindo 18% do nível de colesterol total em ratos. Portanto, novos bioensaios deverão ser desenvolvidos, buscando-se aumentar a concentração deste EPS. Com isso, espera-se futuramente, que o botriosferana possa ter aplicações farmacêuticas, como medicamento coadjuvante no tratamento de certas doenças.

Palavras-chave: *Botryosphaeria rhodina*. Botriosferana. Antimutagenicidade. Hipoglicemiante. Hipocolesterolêmico. Teste do Micronúcleo. Estreptozotocina. Diabetes melitus.

MIRANDA, Carolina Castello Branco Otoni. **Produção de botriosferana e avaliação de suas atividades mutagênica, antimutagênica, hipoglicemiante e hipocolesterolêmica**. 2006. 166f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Exopolysaccharides are carbohydrate polymers secreted by some microbial species and known for present biological activities as modifiers of the biological; among them, antimutagenicity and immunomodulation, and are used in some countries in the cosmetics, nutritious and pharmaceutical industries. Botryosphaeran is a EPS, described recently with a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina*. The fungus was cultivated in glucose with only source of carbon and the botryosphaeran was used in this work for the evaluation of possible hypocholesterolemic, hypoglycaemic, antimutagenic and mutagenic activities. In the evaluation of the antimutagenic and mutagenic activities, was used the micronucleus test system, and was observed that the botriosferana didn't exercise mutagenic effect in mice. The results also showed, that the botryosphaeran presented antimutagenic activity, arriving to a reduction of the micronucleus of 45, 71 and 78% in polychromatic erythrocytes of bone marrow; and 45, 78 and 82% of reduction in reticulocytes in peripheral blood of mice, in the doses of 7.5, 15 e 30 mg/kg w.b/day, respectively. The botryosphaeran in the concentration of 3.0 g/L, also presented 48% of reduction of the plasma glucose in the mice (P <0.01), in diabetes melitus type I, induced by the drug streptozotocin (STZ). In the concentration of 1.5 g/L the botryosphaeran didn't exercise hypoglycaemic activity, as well as, was not capable to develop hypocholesterolemic activity in the concentration of 3.0 g/L in lipidemia induced for the diet with cholesterol to 1%, fats saturated 25% and 0.1% of colic acid. However, the results demonstrated that, even the botryosphaeran not having presented significant statistical differences (p>0.05) in relation to the group positive control; in the evaluation of the hypocholesterolemic activity, presented a tendency to the decrease of the cholesterol, reducing 18% of the level of total cholesterol in rats. Therefore, new bioassays should be developed, with the objective of increasing the concentration of this EPS. With that, believes that in the future, the botryosphaeran can have pharmaceutical applications, as coadjuvant of certain diseases.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*. Botryosphaeran. Antimutagenicity. Hypoglycaemic. Hypocholesterolemic. Micronucleus Test. Streptozotocin. Diabetes melitus.

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Composição das dietas hipercolesterolêmica e controle utilizadas no experimento da avaliação da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana.	40
Tabela II – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos, após tratamento com botriosferana por 15 dias.	46
Tabela III – Frequência de reticulócitos micronucleados (MNRETs) em sangue periférico de camundongos, após tratamento com diferentes doses do botriosferana durante 15 dias	47
Tabela IV – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e porcentagem de redução de micronúcleos, em medula óssea de camundongos , após tratamento com botriosferana, por 15 dias	50
Tabela V – Frequência de MNRETs e porcentagem de redução de micronúcleos no sangue periférico de camundongos, após tratamento com diferentes concentrações do botriosferana, durante 15 dias	52
Tabela VI – Concentrações de glicose e colesterol total plasmáticos.	56
Tabela VII – Ganho médio de peso corpóreo e o consumo médio de ração em gramas, proporcionais à 100 g de peso corpóreo de cada animal durante os 15 dias de experimento	59
Tabela VIII – Análise de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos, após 15 dias de tratamento dos ratos com o botriosferana, em experimento de análise hipocolesterolêmica	61
Tabela IX – Efeito do botriosferana no índice aterogênico, na taxa de colesterol HDL pelo colesterol total, e nos níveis de ácidos graxos livres e glicose plasmática, em ratos hipercolesterolêmicos, após 15 dias de tratamento	63
Tabela X – Composição nutricional das dietas controle e hipercolesterolêmica (g/100g) utilizadas na análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ganho de peso dos camundongos após tratamento sub-crônico com botriosferana durante o bioensaio da atividade mutagênica49
- Figura 2** – Células do sangue periférico de camundongo, coradas com laranja de acridina. (A) reticulócito normal, (B) reticulócito micronucleado (MNRET)54
- Figura 3** – Ganho de peso dos camundongos após tratamento sub-crônico com botriosferana durante o bioensaio da atividade antimutagênica55
- Figura 4** – Avaliação do ganho médio de peso, consumo de alimento e peso médio dos fígados, na análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana65

LISTA DE ABREVIATURAS

CP → Ciclofosfamida

EPS → Exopolissacarídeo

HIPER → Dieta hipercolesterolêmica

IP → Injeção intraperitoneal

MN → Micronúcleo

PC → Peso corpóreo

PCE → Eritrócito policromático

PCEMN → Eritrócito policromático micronucleado

RET → Reticulócito

RETMN → Reticulócito micronucleado

STZ → Estreptozotocina

V79 → Células de pulmão de hamster Chinês

CHO → Ovário de hamster Chinês

VMSM → Meio mínimo de Vogel acrescido de sais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE	20
2.2 TESTE DO MICRONÚCLEO	21
2.3 ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA EXERCIDA PELOS EPS FÚNGICOS	23
2.4 ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA EXERCIDA PELOS EPS FÚNGICOS	26
2.5 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE EXERCIDA PELOS EPS FÚNGICOS	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	33
4.2 PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DA β -GLUCANA	33
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	34
4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE	34
4.5 TESTE DO MICRONÚCLEO	35
4.5.1 Teste do micronúcleo na medula óssea	35
4.5.2 Teste do micronúcleo no sangue periférico	36
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE	37
4.7 CÁLCULO PARA REDUÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS	37
4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE	37
4.9 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO BOTRIOSFERANA	39
5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA	41
5.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS	43
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICAS	43

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO BOTRIOSFERANA	46
6.2 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO, DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA.....	48
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DO BOTRIOSFERANA	49
6.4 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS, APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO, DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA	54
6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO BOTRIOSFERANA APÓS ENSAIOS SUB-CRÔNICO	55
6.6 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO CONSUMO DE ALIMENTO E NO GANHO DE PESO DOS RATOS DURANTE ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE	58
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO BOTRIOSFERANA APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO	60
6.8 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO, CONSUMO DE ALIMENTO E PESO DOS FÍGADOS DURANTE ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA.....	65
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	80
Anexo A – Artigo 1	81
Anexo B – Artigo 2	105
Anexo C – Artigo 3	126
Anexo D – Instruções para as publicações	152

I – INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos que estão vinculados à parede celular, perfazendo uma camada limosa, ou também, podem ser secretados no meio de cultivo por vários microrganismos, incluindo-se fungos (GUTIÉRREZ et al., 1996)

Dentre as atividades biológicas atribuídas aos EPS várias vêm sendo estudadas ao longo dos anos por muitos pesquisadores, como: aumento da resistência do hospedeiro a infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasíticas; a prevenção da carcinogênese; a capacidade de atuarem como coadjuvantes na radioterapia; os seus efeitos imunomoduladores, que promovem o aumento da atividade fagocítica e proliferativa do sistema reticuloendotelial; entre outras (SÀNCHEZ-LAMAR et al., 1999).

Os EPS fúngicos mais estudados são os produzidos por basidiomicetos identificados como β -glucanas. As glucanas, além de participarem da parede celular das hifas, freqüentemente são excretadas no meio de cultivo. Entretanto, suas funções ainda não são totalmente conhecidas no metabolismo dos fungos. Parece que participam na degradação da lignina como uma fonte indireta de peróxido de hidrogênio; proporcionam um suporte para a adesão das enzimas extracelulares, contribuem na manutenção do pH adequado para a ação de enzimas ligninolíticas, além de impedirem a desidratação das hifas e além de serem utilizados como moléculas reguladoras de glucose extracelular (KRCMAR et al., 1999).

Embora vários componentes fúngicos estejam ligados às propriedades medicamentosas, as β -glucanas têm atraído maior atenção. O interesse por estes polissacarídeos começou por volta de 1900, quando a capacidade de uma levedura para iniciar complementos séricos do sistema imune foi descrita pela primeira vez (SÀNCHEZ-LAMAR et al., 1999).

A descoberta de uma partícula insolúvel da parede celular de levedura, denominada zymosana foi, subseqüentemente, utilizada para ajudar a definir a via alternativa da ativação do sistema complemento. Em seguida, estudos mostraram que injeções intravenosas de zymosana poderiam ativar o sistema imune, estimulando as respostas protetoras do hospedeiro. Desde que foi descoberta sua atividade estimulatória, a zymosana tem sido a glucana de escolha

de muitos estudos da função imune, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluindo inflamação, fagocitose e migração de células (BROWN; GORDON, 2003).

Sabe-se que as atividades biológicas exercidas pelos EPS estão intimamente relacionadas com a característica estrutural do composto como: arranjo espacial da molécula, massa molecular, tipo de ligação glicosídica e monossacarídeos constituintes da estrutura. Todas essas características estruturais são coordenadas principalmente pela espécie de microrganismo utilizado, assim como pelo seu tipo genético e condições de cultivo, tais como fontes de carbono e nitrogênio, aeração, pH e adição de micronutrientes ao meio (GUTIÉRREZ et al., 1996; ROSADO et al., 2003).

Uma grande vantagem da produção de polissacarídeos microbianos é a possibilidade de se utilizar processos fermentativos com o propósito de obter altas concentrações de produto puro, independente das variações sazonais. Poucos polissacarídeos de origem microbiana têm sido produzidos em escala comercial (com exceção da curdlana, gelana e xantana). Isto é devido à falta de pesquisa da fisiologia de produção e otimização dos processos de produção dos EPS microbianos (SUTHERLAND, 1998).

O *Botryosphaeria rhodina* é um fungo ascomiceto isolado de cancro de eucalipto (Barbosa et al., 1995) e selecionado previamente como ligninolítico por Barbosa e colaboradores em 1996. Este microrganismo é também produtor de um exopolissacarídeo (EPS) descrito por Dekker e Barbosa, em 2002, como uma β -D-glucana.

Em 2003, Barbosa e colaboradores caracterizaram a estrutura do EPS secretado pelo *B. rhodina*, como uma β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucana, a qual foi então denominada de botriosferana. Este EPS é constituído de uma cadeia principal de resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), contém proximadamente 22% de ramificações no carbono 6, as quais são constituídas por resíduos de glucose e gentiobiose (BARBOSA et al., 2003).

Em 2004, Steluti e colaboradores, avaliaram diferentes fontes de carbono para a produção de botriosferana pelo *Botryosphaeria rhodina*. Houve produção do EPS na maioria das fontes estudadas (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melação de cana

de açúcar). Excetuando-se o manitol, todas as glucanas produzidas foram caracterizadas como sendo do tipo β .

Recentemente, em 2005, Corradi da Silva e colaboradores, desenvolveram um estudo comparativo da caracterização estrutural do botriosferana produzido em sacarose ou frutose, como fontes respectivas de carbono. Demonstraram que o grau de ramificação do botriosferana produzido em sacarose foi menor (21%) do que o obtido em frutose (31%), o que provavelmente proporcionará diferentes propriedades reológicas aos respectivos polímeros.

Entretanto, até o presente, não há nenhum estudo científico relatando os possíveis efeitos biológicos promovidos pelo botriosferana, embora se tenha conhecimento de suas características químicas (Barbosa et al., 2003) que apontam possíveis atividades biológicas como: antimutagênica, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, entre outras.

Portanto, este será o enfoque principal deste trabalho de dissertação, fazendo-se necessária uma revisão sobre as principais atividades biológicas relacionadas com os EPS fúngicos, salientando-se principalmente as glucanas com características estruturais semelhantes ao do botriosferana.

II – REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Parte da Revisão da Literatura está apresentada na forma de artigo a ser submetido, cujo título é: Exopolissacarídeos fúngicos - Atividades Biológicas e Bioensaios. Este artigo consta no Apêndice desta Dissertação de Mestrado.

Portanto, a revisão de literatura aqui apresentada é parcial, objetivando-se complementar a apresentada no artigo citado.

2.1 ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

A mutagênese é um processo intrínscico da vida, permitindo a variabilidade genética, imprescindível para haver seleção e, conseqüentemente, para a evolução das espécies e processos adaptativos. Isso é o ciclo da vida; porém, as mudanças devem acontecer lenta e progressivamente. Se o homem promove modificações constantes no meio ambiente, a mutação em excesso pode também levar à extinção da espécie em função da carga de exposição aos agentes mutagênicos. Portanto, os efeitos das mutações podem levar a resultados maléficis na grande maioria das vezes, incluindo malformações, câncer, envelhecimento e morte (ERDTMANN, 2003).

Nesse aspecto, é de fundamental importância avaliar o risco de expor populações a ações mutagênicas provenientes de diferentes compostos, ou ainda, verificar se tais produtos são capazes de uma ação protetora contra diferentes agentes mutagênicos aos quais estamos expostos diariamente, melhorando nossa resposta imunológica e prevenindo a formação de tumores e sua evolução para malignidade (AU et al., 2001).

Investigar a mutagenicidade através de testes *in vitro* ou *in vivo* de curta duração em células de mamíferos, possibilita estimar tanto o potencial gerador de danos genéticos de compostos químicos genotóxicos, como avaliar riscos para a saúde humana, dada à curta distância filogenética existente entre os sistemas pois, sendo o DNA a molécula alvo, todos os organismos que o contêm podem ser utilizados para realização dos testes (AU et al., 2001).

Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que alterações citogenéticas podem resultar de exposições a agentes químicos ou físicos (TUCKER; PRESTON, 1996). Tais ensaios citogenéticos são empregados com sucesso no monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos. As aberrações cromossômicas têm sido de grande importância visto que avaliam a possibilidade de ocorrência de câncer na população (AU et al., 2001). Portanto, testes de mutagenicidade devem ser empregados, rotineiramente, para avaliação do espectro de toxicidade genética de compostos químicos e medicamentos em desenvolvimento (RIBEIRO, 2003). Vários são os modelos propostos por diversas agências reguladoras e governamentais, para avaliar a genotoxicidade; esta avaliação depende da seleção adequada dos testes a serem aplicados.

Embora os testes de mutagenicidade em microrganismos apresentem boa correlação com seu potencial carcinogênico em animais superiores e ofereçam vantagens quanto ao custo e a rapidez, essa associação falha em certos casos. Isso pode ser explicado devido à simplicidade estrutural do microrganismo e da capacidade metabólica do sistema. Ensaios *in vitro* e *in vivo*, capazes de detectar mutações gênicas ou cromossômicas, usando plantas, insetos ou mamíferos, inclusive o homem, produzem resultados mais relevantes (BRUSICK, 1987). Testes em células do sangue periférico, como linfócitos humanos, podem avaliar a indução de mutações e danos cromossômicos através do sistema teste do micronúcleo *in vitro*. Também podem ser utilizadas células de linfoma de ratos, V79 (pulmão de hamster Chinês) ou CHO (ovário de hamster Chinês). Já para os testes *in vivo*, os ensaios mais comuns são do letal dominante, aberrações cromossômicas, micronúcleo e mutações em *locus* específico com roedores, ratos e camundongos (BRUSICK, 1987).

2.2 TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo (MN) foi desenvolvido por Schmid e colaboradores (SCHIMID et al., 1975) e subsequentemente modificado (HEDDLE et al., 1973; HEDDLE; CARRANO, 1977).

O princípio do teste baseia-se em identificar o micronúcleo, que se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os MNs são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando a membrana nuclear é reconstituída ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o MN representa a perda de cromatina em consequência de dano cromossômicos estrutural (fragmento) durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da freqüência de MNs entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética da divisão nuclear, após o dano, for idêntica (FENECH et al., 1997).

O teste do micronúcleo (MN) é um método simples que avalia vários tipos de danos citogenéticos e pode ser empregado como teste para identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agroquímicos ou compostos químicos em geral (KIRSCH-VOLDERS et al., 1997). Além disso, as contínuas inovações introduzidas no protocolo do teste do micronúcleo sinalizam para a ampliação da sua aplicabilidade e o seu uso fazer parte de uma bateria de testes recomendados pelas agências governamentais para o registro dos novos produtos a serem introduzidos no mercado mundial (SALVADORI et al., 2003).

O teste do micronúcleo (MN) foi padronizado para células de medula óssea de roedores, *in vivo*, no entanto, pode ser aplicado em linfócitos de sangue periférico humano, desde que Iskander (1979) e Hogstedt (1984) propuseram soluções para problemas relacionados com a fragilidade das células durante o processamento e confecção das lâminas, modificando-se a hipotonização, permitindo melhor preservação do citoplasma e a conseqüente retenção do MN no interior da célula.

Um outro e principal problema estava na variabilidade da resposta dos linfócitos ao estímulo mitogênico e à presença de células que não tinham passado por um ciclo de divisão e, portanto, não podiam dar origem a MN, refletindo uma análise subestimada da freqüência de danos. Carter em 1967 havia demonstrado que células de camundongo, *in vitro*, tinham citocinese inibida pela

citocalasina B, sem que houvesse bloqueio da mitose. Fenech e Morley (1985) passaram a utilizar este composto para marcar células que passaram por um ciclo de divisão, reduzindo, assim, a limitação do teste do micronúcleo *in vitro* (SALVADORI et al., 2003). A citocalasina B (CtB) é um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (citocinese) (CARTER, 1967).

2.3 ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA EXERCIDA POR EXOPOLISSACARÍDES FÚNGICOS

Certos tipos de cânceres humanos podem ser prevenidos pela identificação de agentes mutagênicos presentes no meio ambiente e pela proteção do homem contra a exposição a esses agentes. O desenvolvimento e o uso de testes adequados para o reconhecimento da atividade mutagênica e ou cancerígena de certas substâncias é, sem dúvida, de grande importância neste contexto. No entanto, há uma série de limitações nesta abordagem, uma vez que muitas substâncias nocivas não ocorrem isoladamente, sendo freqüentemente encontradas em combinação com outros compostos químicos, que podem elevar ou inibir seu efeito mutagênico e/ou carcinogênico (SALVADORI, 1991).

Por outro lado, a eliminação completa do uso de agentes potencialmente mutagênicos pode não ser totalmente possível, dada a sua utilidade em diversas áreas. Não se pode dispensar, por exemplo, a utilização de raios X e radioisótopos em diagnósticos e terapia, o uso de agentes alquilantes imunossupressores em quimioterapia ou, ainda, o de pesticidas na proteção da agricultura. Portanto, a identificação de agentes protetores que possam minimizar os danos causados por tais compostos é um aspecto relevante para as pesquisas futuras, no campo da genética toxicológica (SALVADORI, 1991).

O termo antimutagênico ou antimutágeno foi usado originalmente para descrever agentes que induzem redução da freqüência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo envolvido (WATERS et al., 1990). Nas últimas décadas, tem-se observado uma crescente tendência de estudos de antimutagenicidade e anticarcinogenicidade, a partir de produtos

químicos naturais (KURODA et al., 1992; De FLORA et al., 1998; LIVIEIRO; VON BORSTEL, 1996; MITSCHER et al., 1996). A prevenção do câncer e outras doenças relaciona-se com a inibição da exposição aos agentes mutagênicos/carcinogênicos através de substâncias da dieta ou mesmo fármacos imunomoduladores da resposta biológica que fortalecem os mecanismos de defesa do organismo (De FLORA, 1998).

Os ensaios de curta duração com culturas de células de mamíferos têm sido amplamente utilizados para estudos de antimutagenicidade, sendo essencial estabelecer o mecanismo de ação dos supostos inibidores (De FLORA, 1998). Esses mecanismos são classificados em: desmutagênicos e bioantimutagênicos.

Na desmutagênese, determinados fatores atuam diretamente no agente mutagênico ou em seus precursores, inativando-os antes de sua ação sobre o DNA. Dentre os agentes desmutagênicos conhecidos temos o ácido ascórbico, vitaminas, vários extratos de plantas e aminoácidos como a cisteína. No mecanismo da bioantimutagênese a ação ocorre sobre processos de mutagênese ou de reparo do DNA danificado, levando à redução da frequência de mutações (MORITA et al., 1978; KURODA et al., 1992) entre eles temos o chá verde japonês.

Algumas glucanas, principalmente, aquelas que apresentam ligações glicosídicas do tipo β -(1→3) já foram estudadas em relação aos seus possíveis potenciais antimutagênicos, evidenciando resultados positivos sobre esses compostos.

Em 1996, Chorvatovicová e colaboradores demonstraram o potencial antimutagênico da glucana extraída da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, contra os danos causados pelo uso do quimioterápico ciclofosfamida. Foi constatado que esta glucana apresenta um efeito anticlastogênico, o qual está associado à dose do composto, à sua viscosidade e ao peso molecular da molécula. Quanto menor a viscosidade e o peso molecular da cadeia química da glucana, maior deve ser a dose utilizada no experimento, visto que facilita a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais analisados, aumentando também a absorção da molécula pelas células do organismo.

Em 1998, novamente Chorvatovicová e colaboradores analisaram uma glucana, porém agora extraída do fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Estudaram seu potencial antimutagênico contra a ciclofosfamida, após a

ultrassonicação da molécula de EPS. Confirmaram que a ultrassonicação proporcionou uma diminuição do peso molecular e, conseqüentemente, a passagem pelas células do trato gastrintestinal dos animais foi facilitada, favorecendo um aumento expressivo do potencial antimutagênico da molécula.

Muitos cogumelos tais como *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, entre outros, possuem atividades antimutagênicas, podendo apresentar um efeito importante na saúde, ou mesmo no tratamento de doenças. Isto porque possuem diferentes compostos bioativos com diversas atividades biológicas e, o mais importante, sem nenhuma toxicidade significativa. Entre os compostos bioativos de maior importância nas moléculas destes cogumelos, estão as β -glucanas (MACHADO et al., 2005)

Em 2003, Sugui e colaboradores estudaram o efeito antimutagênico do cogumelo *Lentinula edodes* Berk em camundongos após a exposição destes ao agente alquilante N-etil-N-nitrosuréia (ENU). Mostraram que várias linhagens cultivadas deste cogumelo apresentaram efeito antimutagênico, porém algumas não chegaram a ser significativas. Concluíram que diferentes fatores de cultivo do cogumelo, tais como temperatura, estação do ano, umidade, entre outras, influenciam a estrutura dos componentes do extrato, a quantidade e até mesmo a estrutura química das β -glucanas.

Em 2005, Machado e colaboradores também analisaram o potencial antimutagênico do extrato de *Agaricus blazei*, *in vitro*, contra o agente indutor de danos etil-metano-sulfonato (EMS). Observaram um efeito protetor proporcionado pelos componentes do extrato, possivelmente associado à presença de β -glucanas nele presentes.

Algumas atividades antimutagênicas e conseqüentemente anticarcinogênicas estão associadas à indução de enzimas do biometabolismo da fase II, como a quinona redutase (QR) e a glutathione S-transferase (GST) (SHON; NAM, 2001).

O aumento dos níveis de glutathione na forma oxidada (GSH) é também utilizado para analisar o potencial quimiopreventivo de muitos agentes. Extratos de *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius* e *Agrocybe cylindracea* foram analisados em relação aos seus potenciais antimutagênicos e anticarcinogênicos. Pode-se constatar que estes extratos aumentaram expressivamente o nível de GSH

em células de hepatoma de ratos cultivadas. Também induziram a atividade das enzimas anticarcinogênicas da fase II QR e QST, explicando as atividades antimutagênica e anticarcinogênica dos extratos (SHON; NAM, 2001).

2.4 ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA EXERCIDA PELOS EPS FÚNGICOS

Efeito hipocolesterolêmico é a capacidade que um dado composto tem de reduzir o nível de colesterol do organismo. Este efeito tem sido estudado durante anos, pela medicina tradicional chinesa, nos mais variados alimentos e em extratos de corpos de frutificação de cogumelos. Os principais componentes bioativos presentes nestes extratos e nos alimentos como fibras e cereais são as glucanas com ligações tipo β -(1 \rightarrow 3). Esses alimentos são conhecidos como “alimentos funcionais”, e produzem uma média estimada de vendas na ordem de US\$ 60 bilhões por ano, principalmente em consequência do aumento de consumo relacionado pela importância da dieta na qualidade de vida (HARDY, 2000).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o consumo de fibras solúveis e a redução do risco de doenças coronarianas, devido a redução da concentração de colesterol total no plasma. O mecanismo fisiológico exercido pelas β -glucanas no organismo ainda não está totalmente esclarecido (YANG et al., 2002).

Diferentes hipóteses discutem o efeito proporcionado pelas glucanas; uma estaria relacionada com a absorção e metabolismo de lipídios, prejudicando a absorção do colesterol; outras relacionam o aumento da excreção de ácidos biliares e esteróis. As glucanas seriam capazes de alterar a biossíntese de colesterol ou de acelerar a produção de lipoproteínas pelo fígado. Ocorreria uma produção de ácidos graxos de cadeia curta através da fermentação da fibra no cólon. O aumento da viscosidade promovido pelas glucanas nos conteúdos gastrintestinais contribuiria para a sensação de saciedade e diminuiriam com isso, a necessidade de ingestão de alimentos (CASTRO et al., 2003).

Em 1996, Cheung testou em ratos, o efeito hipocolesterolêmico de β -glucana extraída do corpo de frutificação de *Volvariella volvacea*. Os animais

receberam dieta suplementada com colesterol 2%. O pesquisador constatou que a glucana foi efetiva na redução dos níveis de colesterol total e hepático, colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), triacilglicerol no plasma e diminuiu os níveis de lipídios totais hepático. A β -glucana também aumentou a excreção de ácidos biliares e esteróides neutros pelos ratos.

Em 2002, Yang e colaboradores estudaram um EPS de *Auricularia polytricha*, obtido por fermentação submersa, em hipercolesterolemia induzida, também em ratos, pela dieta com colesterol 1,5%. O EPS reduziu significativamente os níveis de colesterol total e hepático, colesterol LDL e triacilglicerol; porém o mecanismo causado pelo EPS não foi estudado.

Maki e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia de dietas contendo β -glucanas em crianças e adolescentes com hipercolesterolemia familiar moderada. Escolheram, ao acaso, 29 indivíduos entre 6 e 14 anos de idade, os quais ingeriram 3g por dia de glucana comercial extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, durante 4 semanas. Constataram que a glucana reduziu em 22% os níveis de colesterol total e 28% os níveis de colesterol LDL nas crianças e adolescentes analisados, porém o mecanismo de atuação do composto não foi estudado.

2.5 EFEITO HIPOGLICEMIANTE EXERCIDO PELOS EPS FÚNGICOS

Diabetes mellitus é uma desordem crônica caracterizada por anormalidades no metabolismo dos carboidratos, lipídios e lipoproteínas, que não somente leva o indivíduo a um quadro de hiperglicemia, como também causa muitas complicações tais como hiperlipidemia, hipertensão, ateroscleroses e disfunções renais crônicas (LUO et al., 2004).

O controle do diabetes geralmente envolve exercícios, dieta e uso de quimioterápicos como a insulina. Muitos produtos naturais apresentam características hipoglicemiantes, ou seja, a capacidade de reduzir os níveis de glicose plasmática. Esta glicose é aquela que não foi transportada para o interior das células, em função da deficiência de produção do hormônio insulina.

Embora existam diferentes tipos de agentes hipoglicemiantes orais, que atuam apenas em associação com a insulina no tratamento de diabetes mellitus,

nos últimos anos houve um grande aumento da procura por produtos naturais com atividade antidiabética, pelos pacientes. Isto porque a insulina não pode ser utilizada por via oral e o uso contínuo de drogas antidiabéticas sintéticas causam diversos efeitos colaterais e toxicidade a alguns órgãos (YAMAMOTO et al., 2001).

Alguns EPS fúngicos apresentam características hipoglicemiantes e já estão sendo bastante utilizados pela medicina tradicional Chinesa. Os componentes bioativos anti-diabéticos utilizados atualmente pela medicina tradicional incluem: polissacarídeos, terpenóides, flavonóides, esteróis e alcalóides (LI et al., 2004).

Os corpos de frutificação (cogumelos) e fungos entomopatogênicos são também fontes exemplares da medicina natural com atividades anti-diabéticas. Muitas investigações têm focado o estudo para o efeito hipoglicemiante, proporcionado pelos extratos dos corpos de frutificação, ou de micélios de vários fungos comestíveis e/ou medicinais. Dentre estes fungos incluem-se: *Tremella aurantia*, *Cordyceps sinensis* e *Lentinus edodes*.

Lo e colaboradores (2004) relataram que o corpo de frutificação de *Cordyceps* apresenta potencial como alimento funcional para o diabetes induzido pela droga estreptozotocina, em ratos.

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

Luo e colaboradores (2004), analisaram o efeito hipoglicemiante de polissacarídeos extraídos da planta *Lycium barbarum* em diabetes induzida pela droga aloxana, em coelhos. Observaram que após 4 semanas de tratamento, por via oral com os polissacarídeos, os animais apresentaram uma diminuição dos níveis de glicose plasmática de até 14,13 mmol/L, demonstrando portanto, serem estes carboidratos altamente efetivos no tratamento de diabetes. Além de reduzirem a glicose, os polissacarídeos também reduziram os níveis de colesterol total e ainda apresentaram atividades antioxidantes nos animais, diminuindo os danos causados pela droga aloxana no pâncreas.

Hwang e colaboradores (2005) estudaram o efeito de exopolissacarídeos extraídos do fungo *Phellinus baumii* em modelos animais de diabetes tipo 1, induzida pela droga estreptozotocina (STZ). Os ratos receberam EPS durante 14 dias, por via oral, e após este período, houve uma redução de 52,3% dos níveis de glicose plasmática. Além disso, as atividades das enzimas hepáticas aspartato amino-transferase (AST) e alanina amino-transferase (ALT) foram significativamente reduzidas, indicando que o EPS foi capaz de reduzir os danos hepáticos causados pelo diabetes.

Dado ao exposto acima, torna-se necessário uma avaliação genotóxica e de alguns parâmetros bioquímicos; para que, possa-se avaliar se o botriosferana possui atividades antimutagênicas, hipoglicemiantes, entre outras. Estes dados poderão confirmar os resultados obtidos com outros EPS fúngicos de estrutura similar. Portanto, seguem-se os objetivos do presente trabalho.

III – OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir o exopolissacarídeo botriosferana e avaliar as possíveis atividades mutagênica, antimutagênica em camundongos e hipoglicemiante e hipocolesterolêmica em ratos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Produzir o exopolissacarídeo botriosferana através do cultivo do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* sob fermentação submersa, utilizando glucose como única fonte de carbono. Extrair o EPS do meio de cultivo, liofilizá-lo e desenvolver os bioensaios com três diferentes concentrações.
- Avaliar a atividade mutagênica *in vivo* do EPS em tratamentos sub-crônicos, em células da medula óssea e de sangue periférico de camundongos, utilizando o teste do micronúcleo (MN);
- Avaliar a atividade antimutagênica *in vivo* do EPS em células sangüíneas e de medula óssea de camundongos, submetidos à tratamento sub-crônico em relação ao agente mutagênico ciclofosfamida (CPA), utilizando o teste do micronúcleo (MN).
- Avaliar a atividade hipoglicemiante *in vivo* do EPS, em tratamento sub-crônico, após a indução de diabetes mellitus tipo I em ratos, pela droga estreptozotocina.
- Avaliar a atividade hipocolesterolêmica do botriosferana em ratos, em lipidemia induzida pela dieta utilizando-se ensaios sub-crônicos.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O ascomiceto foi cultivado de acordo com Barbosa e colaboradores (2003). O fungo *Botryosphaeria rhodina* foi mantido em meio BDA (Agar batata dextrose) em tubos inclinados à -4° C com transferências sucessivas a cada 3 meses. O inóculo foi preparado a partir do cultivo fúngico em placas de Petri, contendo meio mínimo Vogel acrescido de sais (VMSM), ágar (20 g/L) e glucose (10 g/L) por 120 h à 28° C. Porções do micélio foram transferidas para frascos de Erlenmeyer modificados (125 mL) contendo 25 mL de VMSM e glucose (5 g/L), e cultivado durante 48 horas a 28° C em agitador orbital tipo “shaker” (180 rpm). Os pré-inóculos foram homogeneizados em “Blender” previamente esterelizado durante 30 segundos à velocidade máxima. O homogeinato de células foi então centrifugado, o *pellet* foi ressuspendido, em solução de salina fisiológica esterilizada. Esta solução foi diluída até se obter uma leitura de sua absorvância à 400 nm, entre 0,4 e 0,5. Posteriormente, alíquotas de 1 mL desta solução de inóculo foram transferidas para frascos que continham 25 mL de VMSM e glucose (50 g/L).

4.2 PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DA β -GLUCANA

B. rhodina foi cultivado sobre condições de cultivo submerso em frascos de Erlenmeyer (200 mL) contendo 400 mL de VMSM e glucose (50 g/L) como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 28° C em agitador orbital tipo “Shaker” a 180 rpm por 72 h.

Após 72 h, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 7000 g por 15 minutos e o sobrenadante coletado em banho de gelo, dialisado contra água deionizada por 48 horas. Após a primeira diálise, a solução foi tratada com 3 volumes de etanol absoluto e deixado em câmara fria por 24 horas. Em seguida, o precipitado foi filtrado em papel de filtro. Posteriormente o EPS foi novamente

dialisado contra água deionizada por 48 horas, com várias trocas sucessivas de água. Em seguida, foi ressolubilizado, novamente contra água deionizada, congelado e liofilizado.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Foram preparadas as seguintes soluções de EPS com as respectivas concentrações: 0,75; 1,5 e 3,0 g/L em salina fisiológica. Após a solubilização completa das soluções, estas foram autoclavadas à 120° C, por 20 minutos, e após terem sido resfriadas foram transferidas para recipientes previamente esterelizados com volumes suficientes para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Uma amostra de cada solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Através destas dosagens foram certificadas as concentrações utilizadas durante todo o experimento.

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA A ANÁLISE DE MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE

Camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, pesando entre 27-32 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Paraná – Brasil) foram mantidos individualmente em caixas de polietileno com tampa grande, de acordo com as recomendações do *Canadian Council on Animal Care* [12]. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas), recebendo água e alimento (ração para roedores Nivulab®) *ad libitum* em todo o decorrer do período de tratamento.

O primeiro e o segundo grupo foram denominados respectivamente, de controle negativo e controle positivo, recebendo como tratamento, solução de

salina fisiológica via gavagem. No último dia de tratamento o grupo controle positivo recebeu injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (50 mg/Kg), para induzir os danos celulares e a consequente formação dos micronúcleos.

Os animais dos grupos 3 a 5 receberam EPS via gavagem, nas três diferentes concentrações durante 15 dias para a análise da atividade mutagênica do botriosferana. Isto equivale às doses de 7,5; 15 e 30 mg/Kg de p.c./dia.

Do 6º ao 8º grupo, foi administrado o botriosferana via gavagem durante 15 dias, nas concentrações citadas anteriormente e no 15º dia de tratamento, receberam a injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (50 mg/Kg), uma hora após os animais terem sido tratados com as soluções do EPS, simulando um tratamento simultâneo no ensaio de antimutagenicidade.

Os animais de todos os grupos foram pesados no início e no término de cada tratamento, para se estabelecer uma possível variabilidade no ganho de peso, causado pela administração das diferentes concentrações do botriosferana e com isso avaliar se o EPS em questão era capaz de desenvolver uma função energética nos animais.

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, decorridas 30 horas após o 15º dia de tratamento e coletados o sangue e a medula óssea, onde as células foram analisadas em teste cego, empregando-se o ensaio do micronúcleo.

4.5 TESTE DO MICRONÚCLEO PARA A ANÁLISE DE MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE

4.5.1 Teste do micronúcleo na medula óssea

O teste do micronúcleo na medula óssea foi desenvolvido segundo o protocolo estabelecido por Schimid (1975). As medulas ósseas foram coletadas com a lavagem dos fêmures dos camundongos, com 1 ml de soro bovino fetal (Gibco-Brasil), em tubo de centrifuga contendo 1 ml adicional de soro bovino fetal. A suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada a 800 rpm por 10 minutos e o

sobrenadante foi parcialmente descartado, deixando-se cerca de 0,5 ml de soro bovino fetal para a ressuspensão do *pellet*.

Em seguida foram realizados os esfregaços em lâminas limpas e secas. As preparações foram secas à temperatura ambiente durante 24 horas, sendo então fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. A coloração foi efetuada com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M, pH 6,8) por 8 minutos, 24 horas após a fixação do material.

Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) para a detecção das células micronucleadas e de suas respectivas freqüências de micronúcleos nos diferentes tratamentos efetuados. A análise foi efetuada em microscópio binocular, de luz comum (Nikon), com a objetiva de 100x (imersão) em teste cego, de acordo com os critérios utilizados para análise de micronúcleos (Huber et al., 1983; Titenko-Holland et al., 1997).

4.5.2 Teste do micronúcleo no sangue periférico

No protocolo adotado para a realização do teste do micronúcleo em células do sangue periférico, foram empregadas lâminas pré-coradas com laranja de acridina (HAYASHI et al., 1990).

Após a eutanásia, 5 μL do sangue de cada animal foram colocados no centro da lâmina, previamente corada com laranja de acridina cobrindo-a com uma lamínula de 24 x 40 mm. As lâminas com o material celular foram mantidas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, no escuro, por, no mínimo, 24 horas antes da análise citológica.

A análise citológica das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de barreira amarelo (515 nm), em objetiva de imersão. Foram analisados 1000 reticulócitos por animal tratado e anotadas as freqüências de células micronucleadas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA

Foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas e os desvios padrões para cada grupo de tratamento, aplicando-se, então, os testes de análise de variância (ANOVA) e para os grupos que apresentaram $p < 0,05$ comparados com seus respectivos grupos controles, aplicados o teste de Tukey com o auxílio do programa STATISTICA/6.0 (STATISTICA Inc. Tulsa, USA, 2002).

4.7 CÁLCULO PARA REDUÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS

Utilizando-se a fórmula de avaliação da redução da frequência de micronúcleos proposta por Manoharan e Banerjee (1985) e Waters e colaboradores (1990), pode-se chegar a um valor aritmético da atividade antimutagênica possivelmente exercida pelo botriosferana, nas três concentrações testadas durante o experimento.

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{Frequência MN em A} - \text{Frequência de MN em B}}{\text{Frequência MN em A} - \text{Frequência de MN em C}} \times 100$$

Onde:

A = Grupo tratado com ciclofosfamida (Controle positivo)

B = Grupo tratado com o botriosferana nas diferentes concentrações

C = Grupo tratado com NaCl 0,9% (Controle negativo)

4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA A ANÁLISE DE ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE

Foram utilizados 40 ratos adultos machos da linhagem Wistar, pesando entre 165 e 218 g, obtidos do biotério central da Universidade Estadual de

Londrina- Paraná- Brasil e mantidos em gaiolas individuais, os quais receberam água e alimento (ração para roedores Nivulab®) *ad libitum* durante o decorrer de todo o tratamento.

O primeiro e o segundo grupo foram denominados de controle negativo e controle positivo, respectivamente, que receberam como tratamento, solução de salina fisiológica via *gavage*. Estes foram tratados com 0,4 mL, duas vezes ao dia, durante 15 dias, com intervalo de 12 horas entre os tratamentos.

Todos os animais, com exceção do grupo controle negativo, receberam injeção intramuscular de estreptozotocina (Sigma Chemical Co.) (STZ) dissolvida em solução de tampão citrato (pH 4,5) na dose de 50 mg/Kg de peso corpóreo (BOLKENT et al., 2000). Dois dias após a injeção do agente diabetogênico (STZ) a glicose foi determinada na urina, utilizando-se tiras reativas (Diastix®) e os ratos que apresentaram taxa de glicose na urina, acima de 500 mg/dL, foram incluídos nos grupos dos animais diabéticos.

No 3º e 4º grupos foram administrados o botriosferana via *gavage*, 0,4 mL, duas vezes ao dia, durante todo o decorrer do tratamento, respeitando o mesmo intervalo de aplicações da salina fisiológica. As concentrações utilizadas foram de 1,5 e 3,0 g/L, respectivamente, por terem sido as que apresentaram os melhores resultados no tratamento da análise de antimutagenicidade.

O ganho de peso durante todo o experimento foi analisado em todos os grupos, bem como, o consumo médio de ração, medido em gramas de alimento consumido para cada 100 g de peso corpóreo (g/100 p.c.).

Após o último tratamento, os animais foram colocados em jejum por 16 horas e submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue coletado em tubos heparinizados (Liquemine® 5000 UI) foi centrifugado à 7000 g por 30 minutos para a separação do plasma. Imediatamente após a separação foram desenvolvidas as dosagens de glicose plasmática e colesterol total plasmático, através de kits bioquímicos (Biodiagnóstica®), para a determinação da atividade hipoglicemiante.

4.9 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL E DIETAS PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO BOTRIOSFERANA

O experimento que avaliou a atividade hipocolesterolêmica do botriosferana foi desenvolvido em duas fases que constavam de 15 dias cada uma. Do 1º ao 15º dia os animais receberam dieta suplementada com colesterol 1%, gorduras saturadas 25% e 0,1% de ácido cólico (dieta HIPER) (modificada por Zulet et al., 1999) para a indução da hipercolesterolemia nos ratos.

Do 16º ao 30º dia, os animais continuaram recebendo a dieta e também foi iniciado o tratamento com o botriosferana na concentração de 3,0 g/L via gavagem, recebendo 0,4 ml em cada aplicação e tratados duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas. Neste trabalho foi priorizado o teste de uma única concentração do botriosferana, devido ao custo elevado das rações hipercolesterolêmicas. Portanto, a concentração utilizada foi escolhida devido aos melhores resultados obtidos na avaliação antimutagênica e hipoglicemiante.

O grupo controle negativo recebeu dieta preparada de acordo com AIN93M (REEVES et al., 1993) com 1,5% de amido de milho, sendo substituído pela celulose (dieta controle). Fibras insolúveis como a celulose, não possuem ação hipolipidêmica expressiva e têm sido utilizadas como controles em estudos humanos e animais (ANDERSON et al., 1994). A composição de cada dieta está apresentada na Tabela I.

Tabela I – Composição das dietas hipercolesterolêmica e controle utilizadas no experimento da avaliação da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana.

Ingredientes^a (g/100g)	Dieta Controle^b	Dieta HIPER^c
Caseína	14,00	14,00
DL Metionina	0,18	0,180
Amido de Milho	46,57	29,06
Dextrina	15,50	15,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00
Mistura de Minerais	3,50	3,50
Colina	0,25	0,25
Sacarose	10,00	10,00
Celulose	5,00	_____
BHA (mg)	0,80	5,20
Óleo de Soja	4,00	_____
Óleo de Côco	_____	25,00
Ácido Cólico	_____	0,50
Colesterol	_____	1,00
Total	100,00	100,00

^a Caseína (Sigma C7078), DL-Metionina (Sigma M9500), amido de milho e dextrina (Corn Produtos Brasileiros Ind. Ltda), Misturas de vitaminas e minerais de acordo com Reeves et al., (1993) para animais adultos, colina (Sigma C1629), Celulose (Sigma C6288), BHT(Ionol/ Butilhidroxitolueno/ Synth), Óleo de côco (Sigma C1758), Ácido cólico (Sigma C1129) e colesterol (5-cholesten-3 β -cholon-24-oic acid/ Sigma C3292).

^b Controle: AIN-93M Reeves et al., (1993).

^c HIPER: dieta hipercolesterolêmica modificada por Zullet et al., (1999).

V – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DA
ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO
BOTRIOSFERANA

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO BOTRIOSFERANA

Ratos adultos machos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Londrina – PR), foram colocados em gaiolas individuais durante um período de adaptação de 3 dias. Estes receberam ração para roedores (Nuvilab ®) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C e $55 \pm 10\%$ de umidade relativa, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O experimento constava de 30 animais, que pesavam entre 170 – 192 g sendo divididos em 3 grupos de 10 animais cada. Após o período de adaptação, iniciou-se o desenvolvimento da análise, através da alimentação com as dietas controle, para o grupo controle negativo; ou com a dieta HIPER para o grupo controle positivo e para o grupo teste, durante 15 dias.

Após este período, foi iniciada a segunda fase do experimento, onde os animais além de receberem suas respectivas dietas, passaram também a receber as soluções de salina fisiológica esterilizada (Grupos controles negativo e positivo) e a solução de EPS 3,0 g/L nas quantidades e nos intervalos citados anteriormente.

Após o último tratamento com o botriosferana ou com a solução de salina fisiológica, todos os animais foram colocados em jejum por 16 h e sacrificados por decapitação, e seus fígados foram imediatamente pesados. O sangue foi coletado em tubos heparinizados (Liquemine ®) e centrifugados a 7000 g durante 30 minutos para a separação do plasma. Em seguida foram feitas as dosagens plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, glicose e ácido graxos livres.

O ganho médio de peso de cada grupo foi analisado diariamente, bem como, o consumo médio de ração, que foi determinado em g proporcionais a cada 100 g de peso corpóreo dos animais.

5.1 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS

Colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose foram analisados através de métodos enzimáticos colorimétricos utilizando-se kits de diagnósticos comerciais (Biodiagnóstica ®). Os ácidos graxos livres foram determinados seguindo o método de determinação colorimétrica no plasma (FALHOLT et al., 1973).

O colesterol LDL foi determinado utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - (\text{Triacilglicerídeo} / 5)$$

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS ATIVIDADES HIPOGLICEMIANTE E HIPOCOLESTEROLÊMICA

Na análise da atividade hipoglicemiante e hipocolesterolêmica do botriosferana, foram calculadas as médias das concentrações plasmáticas de cada componente analisado para cada grupo de tratamento, aplicando-se os testes de análise de variância (ANOVA). Para os grupos que apresentaram $p < 0,05$ depois de comparados com seus respectivos grupos controles foram aplicados o teste de Tukey com o auxílio do programa STATISTICA/6.0 (STATISTICA Inc. Tulsa, USA, 2002).

VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme foi salientado na revisão da literatura deste trabalho, muitos EPS microbianos apresentam atividades antimutagênica, hipogliceminante, hipocolesterolêmica, antitumoral, entre outras. Os chineses têm utilizado glucanas de diferentes fontes, no tratamento de diversas doenças e também como coadjuvante, na medicina tradicional, há muitos anos (BORCHERS et al., 1999; YANG et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Entretanto, o mecanismo de ação destes polissacarídeos não está totalmente esclarecido. Pesquisas neste sentido estão em desenvolvimento avaliando os órgãos envolvidos no metabolismo, receptores de membranas, vias de excreção, etc (RICE et al., 2004).

As glucanas do tipo β (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6) normalmente apresentam viscosidade elevada, podendo atuar como espessantes e geleificantes o que favorece o seu uso em alimentos (BRANDENBURG et al., 2003) . O arranjo estrutural das cadeias polissacarídicas destas glucanas também pode adquirir uma conformação em tripla hélice o que, indica, está relacionado com a atividade antitumoral (FALCH et al., 2000).

Considerando-se que o botriosferana foi descrito recentemente, o seu potencial de atividade biológica ainda é desconhecido. Estudos sobre as propriedades reológicas do botriosferana e também de sua conformação estrutural, estão em andamento utilizando-se β -glucanases específicas (GIESE et al., 2006). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de testes de mutagenicidade para que o mesmo possa ser empregado futuramente, tanto em alimentos como em medicamentos, se for o caso.

Estão apresentados a seguir os resultados dos testes das atividades mutagênica e antimutagênica do botriosferana, assim como o da avaliação da atividade hipoglicemiante.

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO BOTRIOSFERANA

Neste teste foi analisado a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs), da medula óssea de camundongos. Estes foram tratados com o botriosferana, enquanto os seus respectivos grupos controle receberam apenas salina fisiológica, durante 15 dias. Os resultados estão apresentados na Tabela II.

Tabela II – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de camundongos, após tratamento com botriosferana por 15 dias.

Tratamento (mg EPS/kg p.c./dia)	Número de PCEs analisados	PCEs com MN / 2000 PCEs	
		Número (média ± SD)	Frequência (%)
Salina Fisiológica	18.000	1,5 ± 1.23	0,07
Botriosferana			
7.5	20.000	2,0 ± 0.87	0,10
15	20.000	1,3 ± 0.95	0,07
30	20.000	1,1 ± 0.71	0,06

Os resultados demonstraram que o botriosferana, nas três concentrações estudadas, não é mutagênico. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos que receberam o EPS e o grupo controle negativo, tratados apenas com solução de salina fisiológica.

Até o presente, nenhum EPS fúngico foi descrito na literatura como sendo um agente mutagênico (MISAKI et al., 1984; SHON; NAM, 2001; MACHADO et al., 2005).

A Tabela III mostra, a frequência de micronúcleos em reticulócitos (MNRETs) analisados no sangue periférico de camundongos. Da mesma forma como o teste anterior, os camundongos receberam as três diferentes concentrações

do botriosferana estudadas, os quais foram comparados com o grupo controle negativo, que recebeu apenas solução de salina fisiológica.

Tabela III – Frequência de reticulócitos micronucleados (MNRETs) em sangue periférico de camundongos, após tratamento com diferentes doses do botriosferana durante 15 dias .

Tratamento (mg EPS/kg p.c./dia)	Número de RETs analisados	RETs com MN / 1000 RETs	
		Número (média ± SD)	Frequência (%)
Salina Fisiológica	9.000	2,4 ± 0.72	0,24
Botriosferana			
7.5	10.000	2,7 ± 1.15	0,27
15	10.000	2,2 ± 1.13	0,22
30	10.000	2,2 ± 0.73	0,22

Os resultados da Tabela III mostram que o botriosferana também não exerceu atividade mutagênica em nenhuma das concentrações estudadas. Isto porque foi baixa a frequência de micronúcleos no sangue periférico, quando comparado ao grupo controle negativo, não tendo apresentado diferença estatística significativa. Estes resultados também estão de acordo como todos os EPS analisados até o presente momento, podendo citar o esquizofilana (KUBALA et al., 2003), o escleroglucana (FALCH et al., 2000) e alguns polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação de fungos (DELMANTO et al., 2001; LIMA et al., 2001).

É importante ressaltar que a maioria dos polissacarídeos citados na literatura, são extratos não purificados, obtidos a partir de corpos de frutificação de fungos, que possuem glucanas com características estruturais similares ao do botriosferana (MACHADO et al., 2005). Alguns citam glucanas isoladas da parede de *Saccharomyces cerevisiae* (MUELLER et al., 2000) ou de *Candida albicans* (TOKUNAKA et al., 2002). São poucos os trabalhos descritos que utilizaram EPS obtidos a partir de cultivos submersos (FALCH et al., 2000; YANG et al., 2002).

Misaki e colaboradores em 1984 analisaram a atividade mutagênica do pestalotana, um EPS extraído do fungo *Pestalotia sp.*, cuja estrutura química é semelhante ao do botriosferana, embora o número de suas ramificações seja maior (37%) do que o do botriosferana (22%) (BARBOSA, et al., 2003). Estes pesquisadores observaram que tanto na forma *in natura* ou após ter suas cadeias laterais modificadas quimicamente, o pestalotana apresentou atividade antimutagênica e antitumoral e não foi mutagênico para os camundongos.

O botriosferana, sendo uma $\beta(1\rightarrow3),(1\rightarrow6)$ glucana, provavelmente não atuaria como uma fonte energética para o camundongo da mesma forma como o amido. Entretanto, um agente mutagênico pode debilitar o animal promovendo caquexia, resultando em perda de peso. Portanto, o peso dos animais durante o ensaio da atividade mutagênica são dados importantes a serem considerados, os quais estão apresentados, a seguir.

6.2 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO, DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA

Poucos trabalhos citam o ganho de peso corpóreo dos animais, durante os experimentos de genotoxicidade com EPS fúngicos. Talvez esta falta de dados, explique a inexistência de diferenças estatísticas entre os grupos controle e os tratamentos com os diferentes polissacarídeos, indicando que as glucanas provavelmente não alteram o ganho de peso dos camundongos, quando realizado o tratamento via *gavage*.

A Figura I mostra o ganho de peso dos camundongos durante o experimento que avaliou a atividade mutagênica do botriosferana. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle negativo, confirmados pelo teste de análise de variância ($p > 0,05$).

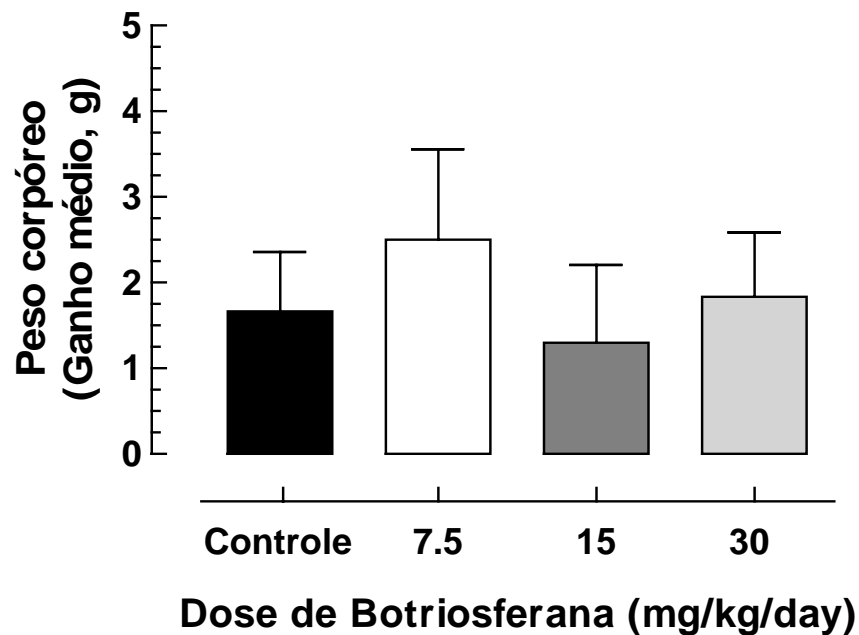


Figura 1 – Ganho de peso dos camundongos após tratamento sub-crônico com botriosferana durante o bioensaio da atividade mutagênica.

Em 2003, Sugui e colaboradores relataram um aumento do consumo de alimento por camundongos durante o tratamento com corpos de frutificação de *Lentinula edodes*, os quais foram triturados e adicionados à dieta basal, em diferentes concentrações: 1; 5 e 10%. Estes pesquisadores concluíram que o aumento do consumo de alimento e o conseqüente ganho de peso dos animais tratados, estavam relacionados à alta palatabilidade da ração, proporcionada pelo pó dos corpos de frutificação adicionados, atraindo os animais ao consumo da ração.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DO BOTRIOSFERANA

A Tabela IV mostra, a freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) analisados na medula de camundongos que receberam o botriosferana e seus respectivos grupos controles.

Tabela IV – Freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e porcentagem de redução de micronúcleos, em medula óssea de camundongos, após tratamento com botriosferana, por 15 dias.

Tratamento (mg EPS/kg p.c./dia)	Número de PCEs analisados	PCEs com MN / 2000 PCEs		Redução (%)
		Número (média ± SD)	Frequência (%)	
Salina Fisiológica	18.000*	1.6 (± 1.23)	0.077 ^(a)	
CP [#]	20.000	43.0 (± 2.83)	2.15 ^(b)	
Botriosferana + CP [#]				
7,5	20.000	24.3 (± 3.02)	1.21 ^{(c)*}	45
15	20.000	13.8 (± 2.74)	0.69 ^{(d)**}	71
30	16.000**	8.7 (± 3.42)	0.54 ^{(d)**}	78

(a, b c e d) são estatisticamente diferentes

* (p <0.05)

[#] Ciclofosfamida (50 mg /kg p.c.) i.p.

** (p <0.001)

Os resultados demonstram o potencial antimutagênico do botriosferana nas três diferentes doses testadas, apresentando diferenças estatísticas significativas em todas as doses em relação ao grupo controle, (p<0,05) para EPS 7,5 e p<0,001) para EPS 15 e 30 mg/kg p.c./dia. As três concentrações também apresentaram diferenças estatísticas entre si, com exceção das concentrações 15 e 30 mg/kg p.c./dia.

Utilizando-se a fórmula de avaliação da redução da frequência de micronúcleos proposta por Manoharan e Banerjee (1985) e Waters e colaboradores (1990) (Ver item 4.7), pode-se constatar uma redução da freqüência de MN, em porcentagem, 45; 71 e 78%, respectivamente, para as doses 7,5; 15 e 30 mg/kg p.c./dia.

Sabe-se que a massa molar influencia inversamente a absorção pelo trato gastrointestinal, podendo diminuir a quantidade de moléculas de EPS na circulação sanguínea, se estas não forem absorvidas na parede do sistema

digestivo, quando administradas via gavagem (CHORVATOVICOVÁ et al., 1998). Porém, a administração via gavagem apresenta diversas vantagens sobre outras rotas de administração, pois diminui alguns efeitos adversos como formação de granulomas, microembolização, inflamação e também promove uma aplicação mais confortável ao animal durante o experimento, diminuindo o estresse causado (CHORVATOVICOVÁ et al., 1996; BORCHERS et al., 1999).

A ciclofosfamida é um agente alquilante, utilizado em quimioterapias, onde após ser metabolizado pelo organismo, produz dois metabólitos: mostarda não-nitrogenada e a acroleína. Estes metabólitos causam a destruição de células tumorais; porém, também induzem a formação de danos celulares em células saudáveis, podendo-se citar como exemplo a formação de células micronucleadas na medula óssea e no sangue periférico. Portanto, a ciclofosfamida é amplamente utilizada como agente indutor de danos celulares no teste do micronúcleo para a avaliação de atividades mutagênicas e/ou antimutagênicas (ANDERSON et al., 1995).

Embora sejam conhecidas poucas teorias sobre a atividade antimutagênica exercida pelos EPS, sabe-se que este potencial está relacionado basicamente à ativação de células do sistema imune, onde os leucócitos possuem um receptor em sua superfície denominado Dectin-1, relacionado exclusivamente com as β -glucanas na ativação de macrófagos (BROWN et al., 2002).

Entretanto, nenhum trabalho até o presente, explica como os EPS são absorvidos para a corrente sanguínea, visto que, estes compostos são “macromoléculas” e não podem ser absorvidos pelas células do trato gastrointestinal. Uma hipótese, seria que possivelmente existiria um transportador específico para as β -glucanas, levando-as até a corrente sanguínea e então sendo capaz de ativar as células do sistema imune. Outra seria que, imunoglobulinas do tipo A (IgA), que são secretadas especificamente nas membranas, entrariam em contato com os EPS no trato gastrointestinal, apresentando parte da molécula da glucana aos leucócitos presentes na circulação sanguínea e desencadeando a resposta imune.

A Tabela V mostra a frequência de reticulócitos micronucleados (MNRETs), analisados no sangue periférico de camundongos que receberam o botriosferana e seus respectivos grupos controles.

Tabela V – Frequência de MNRETs e porcentagem de redução de micronúcleos no sangue periférico de camundongos, após tratamento com diferentes concentrações de botriosferana, durante 15 dias .

Tratamento (mg EPS/kg p.c./dia)	Número de RETs analisados	RETs com MN / 1000 RETs		Redução (%)
		Número (média ± SD)	Frequência (%)	
Salina Fisiológica	9.000*	2,4 (± 0.72)	0,24 ^(a)	
CP [#]	10.000	22,3 (± 1.49)	2,23 ^(b)	
Botriosferana + CP [#]				
7,5	10.000	13,4 (± 2.45)	1,34 ^{(c)*}	45
15	10.000	6,8 (± 2.08)	0,68 ^{(d)**}	78
30	8.000**	4,8 (± 1.85)	0,60 ^{(d)**}	82

(a, b c e d) são estatisticamente diferentes.

* (p <0.05)

[#] Ciclofosfamida (50 mg /kg p.c.) i.p.

** (p <0.001)

Estes dados também confirmam o potencial antimutagênico do botriosferana, nas três diferentes doses estudadas. As diferenças estatísticas foram significativas em todas as doses em relação ao grupo controle (p<0,05) para EPS 7.5 g/L e (p<0,001) para EPS 15 e 30 mg/kg p.c./dia.

As diferentes concentrações também apresentaram diferenças estatísticas entre si, com exceção das concentrações 15 e 30 mg/kg p.c./dia. Utilizando-se a fórmula proposta por Manoharan e Banerjee (1985) e Waters e colaboradores (1990) (item 4.7 deste trabalho), pode-se constatar uma redução da frequência de micronúcleos. Destacando-se a concentração de botriosferana 3,0 mg/kg p.c./dia que promoveu uma redução de 82% na frequência de micronúcleos.

Na avaliação do potencial antimutagênico na medula óssea, o botriosferana apresentou uma redução máxima de 78%, quando comparado ao grupo controle positivo, que recebeu apenas a solução de salina fisiológica e a injeção de ciclofosfamida (Tabela IV).

Quando comparados os dois resultados da redução da frequência das células micronucleadas, observou-se que a redução na medula óssea dos camundongos foi menor do que no sangue periférico. É importante ressaltar que a eutanásia foi realizada 30 horas após a injeção do agente indutor de danos. Sabe-se que no processo de eritroblastose os eritrócitos policromáticos tornam-se maduros após 24 horas e migram para a corrente circulatória (HENRY, 1999), o que explica a diminuição da contagem destas células na medula óssea e favoreceu a análise no sangue periférico. Entretanto, as diferenças estatísticas entre as doses analisadas e o grupo controle positivo, de ambos os tipos de células, foram sempre significativas, apresentando $p < 0,05$ para a concentração de 7.5 e $p < 0,001$ para as concentrações de 15 e 30 mg/kg p.c./dia, tanto na medula óssea quanto no sangue periférico, confirmando o potencial antimutagênico do botriosferana nos dois tecidos estudados.

Comparando-se os dados obtidos sobre a redução da frequência de MN do botriosferana com dados da literatura de outros EPS fúngicos, obtidos por via fermentativa, com composição e estrutura semelhantes, tais como glucana de *S. cerevisiae* com 44% de redução máxima na dose de 100 mg/kg (CHORVATOVICOVÁ et al., 1996); esquizofilana de *Schizophylum commune* com redução das células micronucleadas de até 58% na dose de 100 mg/kg (TOHAMY et al., 2003), pode-se observar que os resultados obtidos neste trabalho são significativos.

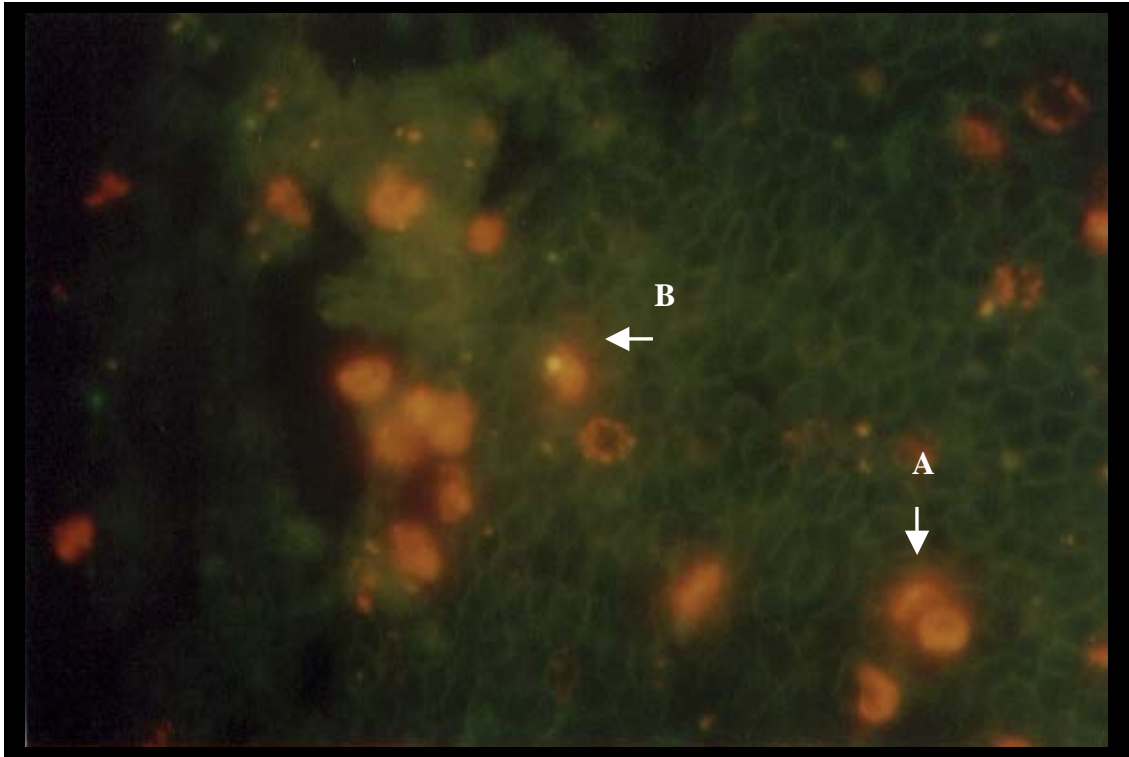


Figura 2 – Células do sangue periférico de camundongo, coradas com laranja de acridina. (A) reticulócito normal, (B) reticulócito micronucleado (MNRET).

6.4 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS, APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO, DURANTE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA

Na avaliação da atividade antimutagênica, a verificação do ganho de peso durante os bioensaios também é um parâmetro importante a ser considerado, visto que a ciclofosfamida é um agente indutor de danos e debilita o animal.

A Figura 3 mostra os resultados sobre a variação do ganho de peso dos camundongos no experimento que avaliou a atividade antimutagênica do botriosferana.

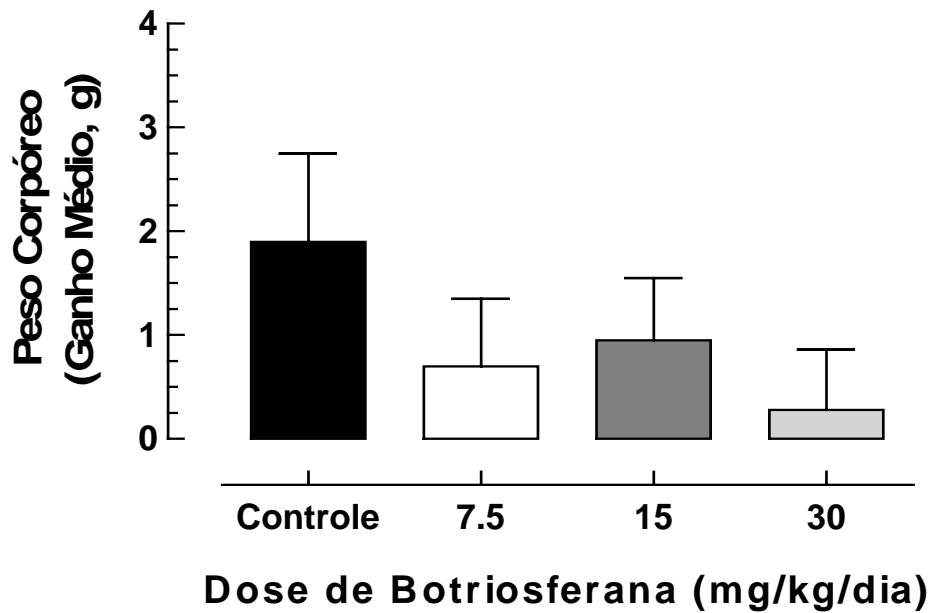


Figura 3 – Ganho de peso dos camundongos após tratamento sub-crônico com botriosferana durante o bioensaio da atividade antimutagênica.

Através da análise estatística observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle e os grupos tratados com botriosferana ($p > 0,05$). Estes resultados confirmam os obtidos por Lima e colaboradores (2001), que avaliaram a atividade antimutagênica de extratos de corpo de frutificação de *Lentinula edodes* e de Chorvatovicová e colaboradores (1998) que avaliaram o efeito antimutagênico de uma glucana extraída de fermentação submersa de *Aspergillus niger*, onde demonstraram que não houve ganho de peso dos camundongos, respectivamente.

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO BOTRIOSFERANA APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO

Agentes hipoglicemiantes são aqueles conhecidos por atuarem na diminuição dos níveis de glicose plasmática que não foram absorvidos pelas células. As drogas hipoglicemiantes podem ser sintéticas como a insulina ou não-sintéticas como os terpenóides, flavonóides, esteróis, entre outras.

Muitas glucanas fúngicas apresentam atividades hipoglicemiantes e vêm sendo utilizadas em alguns países como coadjuvante da insulina no tratamento do diabetes mellitus, por não causarem efeitos colaterais como outras drogas sintéticas (HWANG et al., 2005).

A Tabela VI mostra as concentração em mg/dL de glicose e colesterol plasmáticos. Estes resultados demonstram que em relação ao colesterol plasmático, nenhuma das concentrações de botriosferana estudadas apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle negativo.

Tabela VI – Concentrações de glicose e colesterol total plasmáticos.

Tratamentos	Colesterol total plasmático (mg/dL)	Glicose plasmática (mg/dL)
Salina Fisiológica	79,41	126,81
STZ*	50,71	532,18
EPS (g/L)		
1,5	74,72	443,83
3,0	62,55	254,66 ^a

* Estreptoizotocina

^a Estatisticamente diferente do grupo controle positivo ($p < 0,05$)

Quanto à concentração média de glicose plasmática, pode-se observar que o botriosferana, na concentração de 1,5 g/L, não promoveu redução significativa, apenas 16%, se comparado ao grupo controle positivo, que elevou significativamente o nível de glicose plasmática, em relação aos animais sadios, demonstrando que a metodologia empregada para a indução do diabetes nos animais foi eficaz.

Na concentração de 3,0 g/L, o botriosferana apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle positivo, visto que promoveu uma redução de 48% no nível de glicose plasmática em relação ao grupo controle positivo, no qual os animais não receberam nenhum tratamento.

Quando comparado ao grupo controle negativo, o EPS na dose de 3,0 g/L apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), o que indica que o botriosferana nesta concentração foi eficaz ao controle da doença, apesar de não ter diminuído a glicose plasmática para os níveis desejáveis, porém exerceu alta atividade hipoglicemiante.

O mecanismo de ação promovido pelos EPS fúngicos na redução dos níveis de glicose plasmática ainda não está totalmente esclarecido. Porém, acredita-se que pode estar relacionado à uma atuação corretiva das funções hepáticas e pancreática, diminuindo os níveis das transaminases no fígado e colaborando na produção do hormônio insulina pelas células do pâncreas. Entretanto, ainda se desconhece o mecanismo que desencadeia especificamente esta atuação (KIM et al., 2001).

Devido à alta viscosidade peculiar do botriosferana, a maior concentração possível de solubilização foi 3,0 g/L. Portanto, faz-se necessário um estudo futuro de novas estratégias que viabilizem um aumento da solubilidade deste EPS, e conseqüentemente, o aumento de sua concentração nos ensaios biológicos.

KIHO e colaboradores em 2001 demonstraram que o polissacarídeo extraído de *Cordyceps sinensis* (1500 kDa) apresentou maior atividade hipoglicemiante na sua forma *in natura*, do que quando seu peso molecular foi reduzido na tentativa de aumentar sua solubilidade. Portanto, concentrações maiores do botriosferana poderiam promover maior atividade hipoglicemiante, desde que fosse possível contornar o problema da viscosidade, mantendo-se o peso molecular.

Um EPS isolado de cultivo submerso de *Lentinus edodes*, foi avaliado quanto à atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes mellitus induzida também por estreptozotocina. O experimento teve duração de 7 dias, no qual foram estudadas as concentrações de 50; 100 e 200 mg/kg. Observaram que o EPS reduziu em até 21,2 % o nível de glicose plasmática (YANG et al., 2000).

Kim e colaboradores (2001) também analisaram o efeito hipoglicemiante do EPS extraído do cultivo submerso de *Cordyceps militaris*. Após 14 dias de experimento, os pesquisadores observaram uma redução de 14 % do nível de glicose plasmática.

Cabe salientar que são poucos os trabalhos citados na literatura, nos quais EPS fúngicos tenham sido isolados de cultivos submersos e avaliados quanto

à atividade hipoglicemiante. Considerando-se que o botriosferana é um EPS recém-caracterizado estruturalmente, e de acordo com os resultados aqui obtidos, apresentou um bom desempenho como agente hipoglicemiante (48%). Estes são resultados animadores, que apontam para a continuidade de sua pesquisa, para futuro emprego como medicamento, nutracêutico ou em alimentos, visto que não é mutagênico e possui também significativa atividade antimutagênica.

6.6 INFLUÊNCIA DO BOTRIOSFERANA NO CONSUMO MÉDIO DE ALIMENTO E NO PESO DOS RATOS APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO DURANTE A ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE

A avaliação do consumo médio de alimentos, bem como o ganho médio de peso e a eficiência de conversão de alimentos pelos animais, são dados extremamente pertinentes, quando se avalia parâmetros bioquímicos para evidenciar distúrbios no metabolismo causado pelo diabetes mellitus.

Um dos principais sintomas desta patologia é o aumento do consumo de ração e a diminuição da eficiência de conversão de alimentos, causada pela incompetência das células β do pâncreas em metabolizar os carboidratos ingeridos, diminuindo com isso, o peso corpóreo dos animais (LUO et al., 2004).

A Tabela VII mostra o ganho médio de peso corpóreo e o consumo médio de ração, proporcionais à 100 g de peso corpóreo de cada animal durante os 15 dias do experimento.

Tabela VII – Ganho médio de peso corpóreo e o consumo médio de ração em gramas, proporcionais à 100 g de peso corpóreo de cada animal durante os 15 dias de experimento.

Grupos	Consumo médio de ração (g/dia)	Ganho médio de peso corpóreo (g)	Eficiência de conversão de alimento
Salina Fisiológica	10,78 ^(a)	5,49 ^(a)	0,51 ^(a)
STZ [#]	15,97 ^{(b) *}	1,30 ^{(b) *}	0,08 ^{(b) *}
EPS (g/L)			
1,5	15,96 ^{(b) *}	0,89 ^{(b) *}	0,06 ^{(b) *}
3,0	14,02 ^(c)	2,25 ^(c)	0,16 ^(c)

Estreptozotocina

a,b e c são estatisticamente diferentes

* (P<0,01)

O consumo de alimento do grupo controle positivo aumentou 32,5% (p<0,01) em relação ao grupo controle negativo; enquanto que o ganho de peso do grupo controle negativo que constava apenas de animais sadios foi 76,5% (p<0,01) maior que o grupo dos animais diabéticos que não receberam tratamento (controle positivo).

A taxa de eficiência de conversão de alimentos do grupo controle positivo e do EPS 1,5 g/L foi menor que dos grupos controle negativo e do EPS 3,0 g/L. Estes dados estão de acordo com outros encontrados na literatura científica relacionados com o ganho de peso corpóreo e consumo de alimentos atribuídos à outras glucanas fúngicas com estruturas químicas semelhantes ao do botriosferana como do EPS extraído de *Cordyceps militaris* (KIHO et al., 1993); *Cordyceps sinensis* (KIM et al., 2001).

A concentração de 1,5 g/L apresentou diferenças significativas entre o grupo controle negativo relacionadas com o consumo médio de ração, indicando que os animais doentes que recebiam tratamento com o botriosferana, na menor concentração, consumiram mais alimento. Com isso pode-se concluir que o EPS nesta dose não diminuiu os sintomas do diabetes mellitus.

Os resultados deste experimento também mostraram que os animais diabéticos tanto do grupo controle positivo, quanto do grupo que recebeu a menor concentração do botriosferana, tiveram uma perda de peso considerável, comparada com o grupo controle negativo; este sintoma está provavelmente relacionado com o diabetes mellitus. Portanto, o EPS na concentração de 1,5 g/L, não foi capaz de diminuir o sintoma de perda de peso causado pela doença.

O botriosferana, na concentração de 3,0 g/L promoveu um aumento à resposta do diabetes mellitus se comparado com a concentração de 1,5 g/L, houve uma diferença significativa quanto ao ganho de peso corpóreo visto que os animais diminuíram os sintomas de caquexia (Tabela VII).

6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA DO BOTRIOSFERANA APÓS TRATAMENTO SUB-CRÔNICO

O colesterol é um esteróide sintetizado a partir do acetil CoA e atua como intermediário metabólico para outros ésteróides, ácidos biliares e vitamina D. A concentração elevada do colesterol no soro tem sido associada ao metabolismo e doenças coronarianas. A determinação do colesterol total faz parte do perfil lipídico do sangue, bem como, dos triglicerídeos, e as frações lipídicas, constituem um importante dado diagnóstico, uma vez que podem representar o risco do desenvolvimento de doenças coronarianas e cardiocirculatórias (CHEUNG, 1996).

Sabe-se que muitas glucanas fúngicas apresentam atividades hipocolesterolêmicas. Neste trabalho, este efeito foi analisado em ratos que tiveram um aumento da colesterolemia induzida pela dieta de gorduras saturadas (25%), colesterol (1%) e ácido cólico (0,1%). Este modelo experimental mostrou-se eficaz para a indução da hipercolesterolemia nos animais, visto que o colesterol total e o colesterol LDL do grupo controle positivo apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle negativo, que era composto de animais que recebiam a dieta controle (Tabela VIII).

A Tabela VIII mostra as concentrações plasmáticas (mg/dl) de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos, em ratos com

hipercolesterolemia induzida pela dieta e tratados com o botriosferana por 15 dias, na concentração de 3,0 g/L.

Tabela VIII – Análise de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos em mg/dL, após 15 dias de tratamento dos ratos com o botriosferana, em experimento de análise hipocolesterolêmica.

Grupos	Colesterol Total (média ± SD)	Colesterol LDL (média ± SD)	Colesterol HDL (média ± SD)	Triglicerídeos (média ± SD)
Controle	69,15 ^(a) ±5,34	13,19 ^(a) ±2,65	31,43 ±7,47	122,65 ±8,59
HIPER	137,51 ^(b) ±6,72	77,91 ^(b) 3,52	37,27 ±5,92	111,71 ±9,27
EPS 3,0 g/L	111,95 ^(b) ±7,36	56,85 ^(b) ±4,01	35,14 ±4,31	99,82 ±8,89

*(p<0,05) em relação ao grupo controle negativo

a e b são estatisticamente diferentes

Os dados da Tabela VIII indicam que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) das concentrações de colesterol total e das frações, bem como, do triglicerídeos, do grupo teste em relação ao grupo controle positivo. Portanto, o botriosferana na concentração de 3,0 g/L não exerceu efeito hipocolesterolêmico nos animais, embora tenha promovido uma diminuição de 18,6% do nível de colesterol total e 27,03 % do nível de colesterol LDL.

Os valores também mostram que as concentrações de triglicerídeos e colesterol HDL, não se diferiram em nenhum dos grupos, levando à conclusão de que a ração não alterou estes componentes na circulação sanguínea.

Recentemente, alguns autores analisaram o efeito de dietas contendo hidrocolóides, como as gomas guar, xantana e amido de milho pré-gelatinizado, em ratos hipercolesterolêmicos. Foi observado que estas glucanas, também não promoveram diminuição do colesterol sérico e triglicerídeos em ratos hipercolesterolêmicos. Entretanto, os autores enfatizaram que experimentos compatíveis com concentrações do consumo humano, devem ser desenvolvidos, antes de ser descartado o uso de determinados compostos como ingredientes de alimentos nutracêuticos ou funcionais (CASTRO et al., 2003). Portanto, novos experimentos com concentrações maiores de botriosferana devem ser aconselhados.

Um estudo hipocolesterolêmico de β -glucanas extraídas de fibras moídas de cevada em ratos, com colesterol aumentado pela dieta, foram avaliadas as concentrações de 2,3; 4,6 e 6,9g de glucana para cada 100 g de ração ingerida pelos animais. Após duas semanas, constataram que ocorreu uma diminuição dos níveis lipídicos nos ratos e também um aumento da viscosidade dos conteúdos gastrointestinais. Os autores sugeriram que a atividade hipocolesterolêmica exercida por estas β -glucanas provavelmente, estaria associada ao aumento da viscosidade promovida por este polissacarídeo, dificultando a absorção de frações lipídicas pela dieta (DANIELSON et al., 1997).

Embora o trabalho não tenha apresentado o consumo médio de ração por dia, sabe-se que ratos da linhagem Wistar costumam ingerir, em média, 15g de ração por dia. Portanto, fazendo-se a correlação, chega-se a um valor de 340; 690 e 1030 mg de glucana ingerida por dia.

Na avaliação da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana, os animais ingeriam 2,4 mg deste EPS por dia. Portanto, esta quantidade aplicada aos animais era muito inferior às citadas na literatura em experimentos com outras glucanas fúngicas. Provavelmente, concentrações superiores do botriosferana poderiam proporcionar um efeito mais eficiente na diminuição do colesterol sanguíneo dos animais.

O mecanismo exercido pelas β -glucanas no desenvolvimento de tais atividades não está totalmente esclarecido e ainda resta margem para uma série de dúvidas entre os pesquisadores. Talvez a principal dúvida esteja concentrada no fato das glucanas serem macromoléculas e não serem absorvidas pelo organismo. Um possível processo de digestão das β -glucanas levariam-nas à degradação em monômeros de glucose, que por sua vez, não seriam capazes de desenvolver, por si só, efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicemiante. Portanto, o modo de atuação destas moléculas no plasma, ainda é motivo de estudos.

Um hipótese bastante defendida para o efeito hipocolesterolêmico exercido pelas β -glucanas, seria o fato de elas promoverem um aumento da viscosidade no intestino delgado, prejudicando a absorção de colesterol e triglicerídeos, o que promoveria uma diminuição das atividades das enzimas digestivas, e conseqüentemente, uma diminuição do aumento dos lipídeos pelo organismo (WANG et al., 1996).

Uma outra hipótese sobre a diminuição do colesterol total e do colesterol LDL atribuída às β -glucanas, estaria relacionada à regulação positiva da atividade da enzima colesterol 7 α -hidroxilase. Esta enzima participa da regulação da via na qual o colesterol é convertido em ácidos biliares (BRENNAN; CLEARY, 2005).

A Tabela IX mostra o efeito do botriosferana no índice aterogênico e na taxa de colesterol HDL sobre o colesterol total. Estes índices indicam a propensão ao desenvolvimento de doenças coronarianas, que podem ser desencadeadas pelo aumento de lipídeos. Também estão citados os dados das concentrações de ácidos graxos livres e glicose plasmática em mg/dl.

Tabela IX – Efeito do botriosferana no índice aterogênico, na taxa de colesterol HDL pelo colesterol total, e nos níveis de ácidos graxos livres e glicose plasmática, em ratos hipercolesterolêmicos, após 15 dias de tratamento.

<i>Grupos</i>	Índice Aterogênico (média \pm SD)	HDL/Colesterol Total (média \pm SD)	Ácidos Graxos livres (μ moles/dl) (média \pm SD)	Glicose (mg/dl) (média \pm SD)
Controle (-)	1,20 ^(a) \pm 0,21	0,45 \pm 0,02	265,76 ^(a) \pm 19,42	106,97 \pm 9,36
Controle (+)	2,69 ^{(b)*} \pm 0,13	0,27 \pm 0,05	314,09 ^{(b)*} \pm 20,13	82,71 \pm 7,89
EPS 3,0 g/L	2,19 ^{(b)*} \pm 0,17	0,31 \pm 0,07	313,86 ^{(b)*} \pm 22,17	74,37 \pm 7,12

*($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo
a e b são estatisticamente diferentes

Os resultados da Tabela IX mostram que o botriosferana na concentração analisada não se diferenciou estatisticamente do grupo controle positivo em relação ao índice aterogênico, não diminuindo, portanto, o risco de doenças coronarianas nos animais. Nenhum dos grupos analisados apresentaram diferenças estatísticas entre si em relação à taxa de colesterol HDL/colesterol total e no nível de ácidos graxos livres e glicose. Portanto, a dieta não induziu o diabetes mellitus tipo 2 nos animais, pois não houve diferença estatística na concentração de glicose plasmática em nenhum dos grupos analisados.

Certas hipóteses defendem que as β -glucanas aumentariam a produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino delgado, ocorreria uma

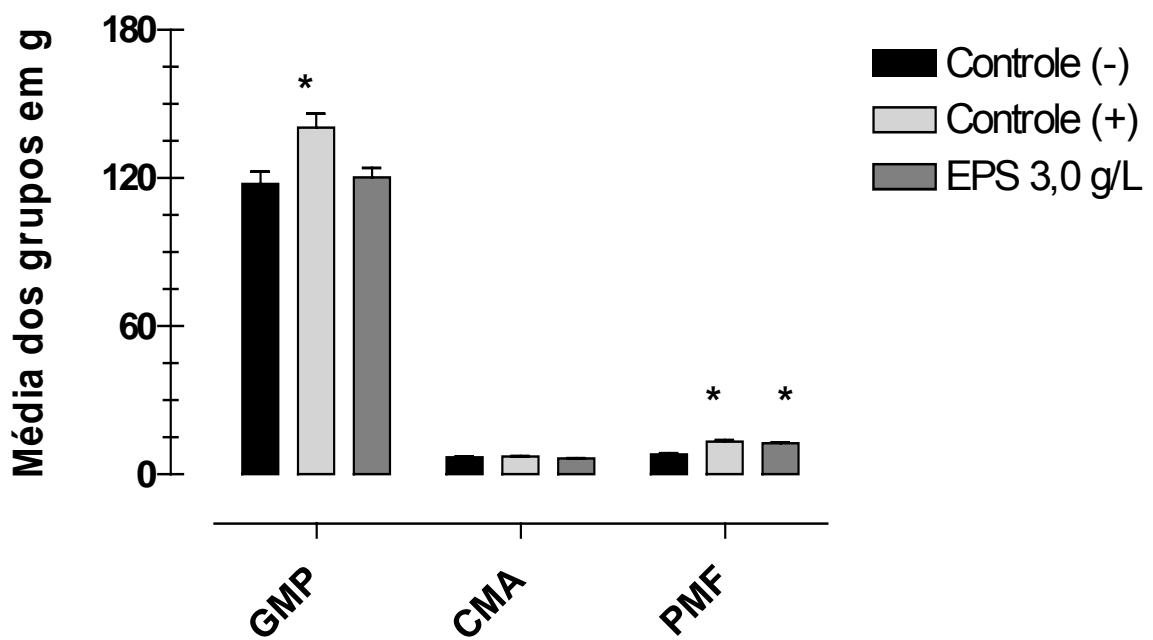
inibição da produção do colesterol LDL devido a limitação à oxidação de lipídeos. A excreção urinária de malondialdeído (MDA) é proporcional à peroxidação de lipídeos endógenos. Alguns autores estudaram o consumo de extratos de aveia enriquecida com β -glucanas de 1 à 10%, relacionando-as com o aumento da excreção de MDA em homens e mulheres. Eles observaram que a excreção de MDA foi inversamente proporcional ao aumento do consumo dos extratos de aveia, confirmando a hipótese de que estes extratos inibem a peroxidação de lipídeos endógenos pela redução do MDA. Porém, o estudo também concluiu que este efeito não estava associado às β -glucanas presentes no extrato, pois o aumento da excreção de MDA não foi proporcional ao aumento do conteúdo de β -glucanas presentes na aveia (HALLFRISCH et al., 1997).

Poucos trabalhos relatam o estudo de efeitos hipocolesterolêmicos em β -glucanas produzidas através de fermentação submersa de fungos. Recentemente, pesquisadores analisaram o efeito hipolipidêmico de um EPS extraído de cultivo submerso do fungo *Auricularia polytricha*, em ratos Sprague-Dawley, com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Os animais receberam o EPS na doses de 50; 75 e 100 mg/kg de peso corpóreo. Após duas semanas de tratamento, observaram uma forte diminuição do nível de colesterol total e colesterol LDL, chegando a 70% de diminuição para a maior dose. Os autores concluíram que este efeito estava, possivelmente, ligado à inibição da formação de micelas no intestino delgado, bem como com a alteração das características físicas na mucosa intestinal dos ratos (YANG et al., 2002).

Neste estudo com o botriosferana foram utilizados ratos da linhagem Wistar. Alguns trabalhos sugerem que esta não seja a linhagem mais apropriada para modelos experimentais de hipercolesterolemia. Ratos da linhagem Sprague-Dawley, costumam ser mais utilizados no desenvolvimento destes modelos experimentais, por apresentarem características no metabolismo dos lipídeos mais similares aos humanos (CHEUNG et al., 1996). Provavelmente, esta seja uma das razões pelas quais a dieta não promoveu o aumento dos triglicérides no soro dos animais (Tabela VIII).

6.8 EFEITO DO BOTRIOSFERANA NO GANHO DE PESO, CONSUMO DE ALIMENTO E PESO DOS FÍGADOS APÓS AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOCOLESTEROLÊMICA

A Figura 4 mostra, o efeito do botriosferana no peso dos fígados dos ratos, o consumo médio de ração (determinado por 100 g de peso corpóreo dos animais) e ganho médio de peso dos ratos hipercolesterolêmicos, após 15 dias de tratamento com o EPS.



* $p < 0,05$

GMP: Ganho médio de peso dos animais

CMA: Consumo médio de alimentos g/100g p.c./dia

PMF: Peso médio dos Fígados

Figura 4 – Avaliação do ganho médio de peso, consumo de alimento e peso médio dos fígados, na análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana.

Os resultados da Figura 4 mostram que o botriosferana na concentração analisada diminuiu o ganho de peso dos animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica, quando comparado com o grupo controle positivo ($p > 0,05$) e não apresentou diferenças estatísticas, em relação ao grupo controle negativo (animais normais). Provavelmente, as diferenças entre o ganho de peso dos animais poderiam ser explicadas pela tendência de diminuição do colesterol

causada pelo botriosferana. O EPS talvez fosse capaz de desenvolver uma matriz de polissacarídeos que aprisionaria algumas enzimas digestivas, não deixando com que o alimento fosse metabolizado.

O aumento do ganho de peso dos animais do grupo controle positivo pode ser explicado, devido ao alto valor calórico da dieta hipercolesterolêmica (492 Kcal), quando comparado com a dieta controle (361 Kcal). A Tabela X mostra a composição nutricional das dietas controle e hipercolesterolêmica (g/100g).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre o consumo médio de ração no grupo controle positivo, quando comparado ao grupo testado com o EPS (Figura 4). Resultados similares foram encontrados durante a avaliação do EPS de *Auricularia polytricha* (YANG et al., 2002).

Tabela X – Composição nutricional das dietas controle e hipercolesterolêmica (g/100g) utilizadas na análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana.

Nutrientes	Controle	HYPER
Umidade	7,5±0,4	5,3±0,1
Proteínas	13,2±0,3	13,5±0,2
Carboidratos	67,4	54,4
Lipídios	4,3±0,2	24,5±0,3
Ac. Graxos monoinsaturados	35,4±0,10	1,8±0,01
Ac Graxos polinsaturados	58,4±0,17	6,9±0,03
Ac graxos graxos saturados	4,7±0,02	91,2±0,03
16:1	11,0±0,02	_____
18:1	24,3±0,04	6,92±0,03
20:1	0,21±0,01	_____
18:2	53,3±0,17	1,82±0,01
18:3	5,11±0,00	_____
6:0	_____	0,30±0,01
8:0	_____	7,06±0,15
10:0	_____	5,81±0,05
12:0	_____	48,1±0,07
14:0	0,07±0,01	18,2±0,10

16:0	0,10±0,01	9,01±0,04
17:0		
18:0	3,53±0,01	2,78±0,02
20:0	0,38±0,01	
22:0	0,46±0,01	
24:0	0,16±0,01	
Não identificados	1,38±0,16	
Cinzas	2,9±0,1	2,3±0,02
Fibras	4,7	0,0
Energia (Kcal)	361,1	492,1

O peso médio dos fígados dos animais indica que o EPS na concentração de 3,0 g/L não apresentou diferença estatística do grupo que recebia apenas a ração HYPER (controle positivo). Estes dois grupos se diferenciaram estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle negativo, que apresentou uma média menor dos pesos dos fígados.

Tanto o grupo controle positivo quanto o grupo tratado com o botriosferana, apresentaram um aspecto diferenciado do órgão, em cor e textura. Esta diferença provavelmente está associada ao aumento da lipidemia, que conseqüentemente, aumentou a demanda do fígado para a produção de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, demonstrando esta diferença no aspecto do órgão. Com isso, novamente, pode-se confirmar que a dieta utilizada durante o experimento foi eficaz para a indução da hipercolesterolemia nos animais.

O botriosferana é um exopolissacarídeo recentemente descrito que possui atividades promissoras, conforme demonstrado neste trabalho. Foi a sua caracterização química prévia que indicou o desenvolvimento deste atual estudo, que por sua vez abre novas perspectivas para novos ensaios biológicos e importantes aplicações em diferentes áreas da ciência.

VII - CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- O botriosferana não foi considerado mutagênico em nenhuma das concentrações testadas, tanto no sangue periférico, quanto na medula óssea de camundongos, após tratamento sub-crônico;
- Nas três diferentes concentrações (0,75; 1,5 e 3,0 g/L) o botriosferana reduziu 45, 71 e 78 %, respectivamente, a frequência de células micronucleadas na medula óssea e 45, 78 e 82 %, respectivamente no sangue periférico.
- O botriosferana não demonstrou função energética, visto que em todas as concentrações estudadas, os camundongos não ganharam peso, tanto nos testes de atividade mutagênica como antimutagênica;
- Somente na concentração de 3,0 g/L do botriosferana exerceu atividade hipoglicemiante, reduzindo em 48% o nível de glicose plasmática;
- Na concentração de 3,0 g/L o botriosferana não desenvolveu atividade hipocolesterolêmica.
- Portanto, com base em todos os resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que o exopolissacarídeo botriosferana tem propriedades importantes tais como ausência de mutagenicidade, atividades antimutagênicas, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicas, que apontam para o desenvolvimento de novos bioensaios.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks, **Mutation Research**, v. 330, p. 115 – 181, 1995.

ANDERSON, J. W.; JONES, A. E.; RIDDELL-MASON, S. Ten different dietary fibres have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 78-83, 1994.

AU, W.W.; BADARY, O.A.; HEO, M.Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupancy of medicine**, v. 16, p. 345-357, 2001.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. *In vivo* decolorization of poly R-478 as a method for screening lignolytic microorganisms for use in bioremediation. **Proc 4th Pacific Rim Biotechnology Conference**, Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E.. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**. v..23, p. 93-96, 1996

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; CORRADI DA SILVA, M.L.C. 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.

BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; TABAKOGLU-OGUZ, A.; OZSOY-SACAN, Ö. Effects of chard extract on, pancreatic B-cell in STZ-diabetic rats: a morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 251-259, 2000.

BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors, and immunity. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221 p. 281 – 293, 1999.

BRANDENBURG, K.; ANDRÄ, J.; MÜLLER, M.; KOCH, M.H.J.; GARIDEL, P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2477-2489, 2003.

BRENNAN, C. S.; CLEARY, L. J. The potential use of cereal (1→3,1→4)-β-D-glucans as functional food ingredients. **Journal of Cereal Science**, v. 42, p. 1-13, 2005.

BRONZETTI, G. Antimutagens in food. **Trends in Food**, v. 5, p. 390-395, 1994.

BROWN, G. D.; TAYLOR, P. R.; REID, D. M.; WILLMENT, J. A.; WILLIAMS, D. L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S. Y. C.; GORDON, S. Dectin-1 is a major β-glucan receptor on macrophages, **Journal of Entomology and Microbiology**, v.196, p. 407 – 412, 2002.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.

BRUSICK, D. **Principles of genetic toxicology**, 2nd edition, Plenum Press, New York, 1987.

CARTER, S.B. Effects of cytochalasin on mammalian cells. **Nature**, v. 213, p. 261-264, 1967.

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

CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutrition Research**, v. 16, p. 1953-1957, 1996.

CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. **Mutation Research**, v. 412, p. 83-89, 1998.

CHORVATOVICOVÁ, D.; MACHOVÁ, E.; SANDULA, J. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclofosfamide induced mutagenicity. **Mutation Research**, v. 371, p. 115-120, 1996.

CORRADI DA SILVA, M.L.; IZELI, M.L.; MARTINEZ, P.F.; SILVA, I.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; CARDOSO, M.S.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, G.V.J. Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)-β-D-glucans (botriosferans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 10-17, 2005.

DANIELSON, A. D.; NEWMAN R. K.; NEWMAN, W.; BERANDIELLI, J G. Lipid levels and digesta viscosity of rats fed a high-fiber barley milling graction. **Nutrition Research**, v. 17, p. 515-522, 1997.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 285-306, 1998.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 28, p. 81-88, 2002.

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M. ; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research** v. 496, p. 15-21, 2001.

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.

EDRTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: **Genética toxicológica** (SILVA, J.; ERDTMANN, B.), editora Alcance, Porto Alegre RS, 2003.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L; STOKKE, B. T. The cytokine stimulanting activity of (1→3)-β-D-glucans is dependente on the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 587-596, 2000.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fat acids in plasma. **Clinical Chemistry Acta**, v. 40, p. 105-111, 1973

FENECH, M. The advantages and disavantagen of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Researc**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. MORLEY, A.A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 223-246, 1985.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultures mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A. and MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleorotus*. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

HALLFRISCH, J.; SCHOLFIELD, D. J.; BEHALL, K. M. Diets containing soluble oat extracts reduce urinary malondialdehyde in moderately hypercholesterolemic men and women. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 8, p. 497-501, 1997.

HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, v.16, p. 688-689, 2000.

HAYASHI, M, MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T., ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HEDDLE, J.A.; CARRANO A.V. The DNA content of micronuclei induced In mouse bone marrow by X-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mutation Research**, v. 44, p. 63-69, 1977.

HEDDLE J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v 37, p. 43-54, 1973.

HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. São Paulo: editora Manole, 18^o edição, 1999.

HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: a method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutation Research**, v. 130, p. 63-72, 1984.

HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. **Mutation Research**, v. 111, p. 185-193, 1983.

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

ISKANDER, O. An improved method for the detection of micronuclei in human lymphocytes. **Stain Technology**, v. 54, p. 221-223, 1979.

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

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

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

KIRSCH-VOLDERS, M. The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes, **Mutation Research**, v. 392, Especial Issue (1-2), 1997.

KRCMAR, P., NOVOTNY, C., MARAIS, M. and JOSELEAU, J. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, p. 61-64, 1999.

KUBALA, L.; RUZICKOVA, J.; NICKOVA, K.; SANDULA, J.; CIZ, M.; LOJEK, A. The effect of (1→3)-β-D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leucocytes in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2835-2840, 2003.

KURODA, Y. JAIN, A.K. TEZUKA, H. KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

LI, W.L.; ZHENG, H.C.; BUKURU, J.; DE KIMPE, N. Natural medicines used in the tradicional Chinese system for therapy of diabetes melittus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; SUGUI, M.M.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutation Research**, v. 496, p. 23-32, 2001.

LIVIEIRO, L.; VON BORSTEL, R.C. The mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutation Research**, 350, p. 287-293, 1996.

LO, H.C.; TU, S.T.; LIN, K.C.; LIN, S.C. The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. **Life Sciences**, v. 74, p. 2897-2908, 2004.

LUO, Q.; YIZHONG, C.; YAN, J.; SUN, M. CORKE, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. **Life Sciences**, v. 76, p. 137-149, 2004.

MACHADO, M.P.; FILHO, E.R.; TEREZAN, A.P.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenic of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 523-539, 2005.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. β -carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, **Cell Biology International Reports**, v. 9, p. 783 – 789, 1985.

MAKI, K.C.; DAVIDSON, M.H.; INGRAM, K.A.; VEITH, P.E.; BELL, M.; GUGGEN, E. Lipid responses to consumption of a beta-glucan containing ready-to-eat cereal in children and adolescents with mild-to-moderate primary hypercholesterolemia. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1527-1535, 2003.

MISAKI, A.; KAWAGUCHI, K.; MIYAJI, H.; NAGAE, H.; HOKKOKU, S.; KARUTA, M.; SASAKI, T. Structure of pestalotan, a highly branched (1→3)- β -D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrate Research**, v.129, p. 209-227, 1984.

MITSCHER, L.A. TELIKEPALLI, H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D.M. Natural antimutagenic agents. **Mutation Research**, v. 350, p. 143-154, 1996.

MORITA, K.; HARA, M.; KADA, T. Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from aminoacids. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1235-1238, 1978.

MULLER, A.; RAPTIS, J.; RICE, P.; KALBFLEISCH, J.H.; STOUT, R.D.; ENSLEY, H.E.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)-β-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. **Glycobiology**, v. 10, p. 339-346, 2000.

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

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MCWILLIAN, A.A. The guide to the care and use of experimental animals. v. 1, Canada: **Canadian Council on Animal Care**, 1993.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, **Food and Chemical of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, L. R., TAKAHASHI, C. S., EDRTMAN, B., OLIVEIRA, S. V., COSTA, C. T. A. Inter-laboratory calibration program for the mouse micronucleus test. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16, p. 631-638, 2003.

RICE, P.J.; LOCKHART, B.E.; BARKER, L.A.; ADAMS, E.L.; ENSLEY, H.E.; WILLIAMS, D.L. Pharmacokinetics of fungal (1→3)-β-D-glucan following intravenous administration in rats. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1209-1215, 2004.

ROSADO, F. R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E. R.; COSTA, S. M. G.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production submerged cultures of *Pleorotus ostreato-roseus*, and *Pleorotus ostreatus* "Florida". **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 230-237, 2003.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: **Mutagênese Ambiental** (Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K.) Editora ULBRA, Canoas RS, 2003.

SALVADORI, D.M.F. **Avaliação do potencial anticlastogênico do β-caroteno em mamíferos**. São Paulo, 1991, 117p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

SÀNCHEZ-LAMAR, A.; FIORE, M.; CUNDARI, E.; RICORDY, R.; COZZI, R.; SALVIA, R. *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract: cytotoxic, genotoxic and antimutagenic effects in the CHO cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 161, p. 231-239, 1999.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHON, Y.H.; NAM, K.S. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 103-109, 2001.

SHON, M.Y.; KIM, T.H.; SUNG, N.J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baunii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. **Food Chemistry**, v. 82, p. 593-597, 2003.

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

STATISTICA for Windows v. 6, v. II. (2002). **Tulsa, OK, USA: Statsoft.**

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

SUGUI, M.M.; ALVES DE LIMA, P.L.; DELMANTO, R.D.; EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. **Food and chemical toxicology**, v. 41, p. 555- 560, 2003.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, v. 338, p. 85 – 95, 1997.

- TOHAMY, A.A.; EL-GHOR, A.A.; EL-NAHAS, S.M. NOSHY, M.M. β -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. **Mutation Research**, v. 541, p. 45-53, 2003.
- TOKUNAKA, K.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; MIURA, N.N.; YADOMAE, T. Application of *Candida* solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 59-67, 2002.
- TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J.; Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- WANG, L.; BEHR, S. R.; NEWMAN, R. K. NEWMAN, W. Comparative cholesterol-lowering effects of barley β -glucan and barley oil in golden syrian hamsters. **Nutrition Research**, v. 17, p. 77-88, 1996.
- WATERS, M. D.; BRADY, A. L; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E.. Antimutagenicity profiles for some model compounds, **Mutation Research**, v. 238, p. 57 – 85, 1990.
- YANG, B.K.; HA, J.Y.; JEONG, S.C.; JEON, Y.J.; RA, K.S.; DAS, S.; YUN, J.W.; SONG, C.H. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1319-1325, 2002.
- YAMAMOTO, Y.; NAKAZAKI, H.; YOKOI, T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. **Life Sciences**, v. 70, p. 471-482, 2001.
- ZHANG, W.; YANG, J.; CHEN, J.; HOU, Y.; HAN, X. Immunomodulatory and antitumor effects of an exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumor-bearing mice, **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 42, p. 9 – 15, 2005.
- ZULET, M.A.; BARBER, A.; GARCIN, H.; HIGGUERET, P.; MARTINEZ, J.A. Alternations in carbohydrate and lipid metabolism induced by a diet rich in coconut oil and cholesterol in a rat model. **Journal of American College of Nutrition**, v. 18, p. 36-42, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo 1: “Exopolissacarídeos fúngicos: Propriedades biológicas, farmacêuticas e bioensaios”, a ser submetido ao periódico Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

ANEXO A –

Artigo 1: “Exopolissacarídeos fúngicos: Propriedades biológicas, farmacêuticas e bioensaios”.

(Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE; Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990. Londrina-Paraná, Brasil)

Exopolissacarídeos fúngicos:

Propriedades biológicas, farmacêuticas e bioensaios

Carolina Castello Branco Otoni de Miranda

Graduada em Biomedicina, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara-SP

Especialista em Bioquímica Aplicada, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

Mestranda em Biotecnologia do Programa de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina – PR

carolina.castello@gmail.com

Aneli de Melo Barbosa

Farmacêutica-Bioquímica, Dra em Bioquímica (UFPR)

Pós-doutora em Biotecnologia (Murdoch University, Perth- WA, Austrália)

Professora Associado C do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia -CCE Universidade Estadual de Londrina – PR

aneli@uel.br

Ilce Mara de Syllos Cólus

Bióloga, Dra. em Ciências, Área de concentração Genética (FMRP-USP)

Pós-doutora em Mutagênese (Faculty of Medicine of Leiden – The Netherlands)

Professora Associado C do Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – PR

colus@uel.br

Exopolissacarídeos fúngicos: propriedades biológicas, farmacêuticas e bioensaios

RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos secretados no meio de cultivo e podem ser produzidos tanto por fungos como por bactérias. Dentre os EPS fúngicos as D-Glucanas possuem várias e importantes propriedades químicas, atividades biológicas e farmacêuticas, que favorecem suas aplicações em alimentos, medicamentos e também caracterizam-nas como imunocêuticas. Para que as D-glucanas fúngicas possam ser empregadas em quaisquer dos campos citados, há necessidade de serem avaliadas através de diferentes ensaios biológicos. No presente trabalho foram revisadas as principais propriedades biológicas e farmacêuticas das D-glucanas produzidas por fungos, bem como os respectivos ensaios biológicos que têm sido desenvolvidos com estes EPS. Também foram incluídos os polissacarídeos extraídos de corpos de frutificação de fungos e as principais diferenças químico-estruturais e espaciais que influenciam nas suas propriedades.

Fungal exopolysaccharides: biological and pharmaceutical properties and bioassays

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are polymers of carbohydrates secreted in the culture medium, and can be produced by fungi as well as bacteria. Among the fungal EPS are the D-glucans that possess several and important chemical, biological and pharmaceutical properties, which promote their applications in food, medicine, and also characterize them as immunocuticals. In order that the fungal D-glucans can be employed in any of quoted fields, they need to be evaluated through biological assays. In this work we reviewed the main biological activities of fungal D-glucans as well as the respective biological assays developed with these EPS. Also included are the polysaccharides extracted from fungal fruiting bodies, and the chemical and spacial structural differences that influences their properties.

Introdução

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares produzidos por fungos, bactérias e algumas algas, os quais são encontrados ligados à superfície ou são excretados para o meio extracelular, na forma de limo (SUTHERLAND, 1998).

Os EPS fúngicos mais estudados são produzidos por basidiomicetos identificados como β -glucanas. As glucanas além de participarem da parede celular das hifas, freqüentemente são excretadas no meio de cultivo. Entretanto, suas funções ainda não são totalmente conhecidas no metabolismo dos fungos (KRCMAR et al., 1999).

Muitos fungos como por exemplo: *Sclerotium glucanicum*, *Schizophyllum commune*, *Botrytis cinerea*, entre outros, são conhecidos por conter D-glucanas com ligações tipo $\beta(1\rightarrow3)$ como os maiores componentes dos seus EPS. Muitas β -glucanas como a esquizofilana produzida pelo *Schizophyllum commune* e lentinana, pelo *Lentinula edodes*, têm recebido mais atenção no campo da imunoterapia do câncer, devido às suas acentuadas atividades antitumor (MISAKI et al, 1984).

Os EPS fúngicos também possuem atividades moduladoras do sistema imune, como efeitos antiinflamatórios, aumento das células de defesa do organismo, entre muitas outras (BROW; GORDON, 2003).

Sabe-se que as atividades biológicas dos EPS fúngicos estão intimamente ligadas às diferenças químicas entre eles, tais como: tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação, composição monossacarídica e massa molecular; porém, a correlação de sua estrutura com seus efeitos antitumorais e imunomoduladores, ainda não foram completamente explorados, exceto pela

dependência de sua massa molecular; isso se deve à existência de poucas pesquisas sobre o assunto (MISAKI et al., 1984; GUTIÉRREZ et al., 1996).

Muitos fungos produtores de EPS respondem diretamente a fatores ambientais; sendo que, para muitos, a fonte de carbono determina tanto a quantidade de EPS formado, como também a sua qualidade. Além da fonte de carbono, outros parâmetros interferem na produção de EPS fúngicos, como: fontes de nitrogênio, aeração, agitação, microelementos, adição de anti-espumantes e fatores de crescimento como: vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros (YANG, 2002; HWANG, 1998; ROSADO et al., 2003).

Atualmente poucos polissacarídeos de origem microbiana são produzidos em escala comercial, dentre eles estão a curdlana, gelana e a xantana. Isto se deve à falta de pesquisa sobre a fisiologia de produção e também otimização dos processos de produção dos EPS microbianos (SUTHERLAND, 1998), além da dificuldade para realização dos bioensaios necessários para a liberação do uso (ANDERSON et al., 1995, DELMANTO et al., 2001).

Os mecanismos de biossíntese dos EPS ainda não foram totalmente esclarecidos, sendo esse um assunto ainda bastante contraditório entre os autores. Porém, pelo pouco que se conhece, sabe-se que este mecanismo está bastante correlacionado com o tipo genético do fungo, pH do meio e as diferentes fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no processo fermentativo (SHINGEL, 2004).

Madi e colaboradores (1959) analisaram a influência do pH do meio de cultivo na produção do EPS pululana e evidenciaram que, quando o pH inicial estava relativamente baixo (pH 2,5), a síntese de pululana era inibida e a de glucana insolúvel, um segundo EPS produzido pelo *Aureobasidium pullulans*, era estimulada;

entretanto, o pH ideal do meio para estimular a biossíntese do pululana estava na faixa entre 5,5 a 7,5.

Carolan e colaboradores (1976) estudaram a acidificação do meio em culturas de *A. pullulans*. Estes pesquisadores observaram que a síntese de ATP nas células desse fungo era realizada através da via das pentoses-fosfato. Experimentos com glucose marcada com isótopo radioativo mostraram que o carbono 1 da glucose era transformado em dióxido de carbono, promovendo uma rápida queda de pH do meio no início da fermentação. A metabolização dos açúcares era seguida pela formação de etanol, sendo que a oxidação do etanol também contribuía para a diminuição do pH. Em seguida, o pH era recuperado nos estágios finais da fermentação, provavelmente devido a um aumento da transferência da quantidade de oxigênio dissolvido.

Em 1983, Carolan e colaboradores propuseram a seguinte ordem de eventos bioquímicos que precedem a síntese do pululana: (i) conjugação do resíduo de D-glucose com uma molécula de lipídio mediada pelo UDPG (difosfato de uridina-glucose), através de uma ponte fosfodiéster; (ii) uma segunda transferência dos resíduos de D-glucose do UDPG resultando em uma isomaltose ligada ao lipídio; (iii) reação da isomaltose ligada ao lipídio com uma molécula de glucose, formando um resíduo de isopanose que é polimerizado formando a cadeia do pululana.

Kai e colaboradores, em 2003 estudaram o mecanismo da biossíntese de polissacarídeos ramificados de *Pestalotiopsis microspora*, que apresentava a cadeia principal com ligações tipo β -(1 \rightarrow 3). Este estudo foi feito com a marcação dos diferentes carbonos da cadeia principal do EPS e também da glucose do meio de cultura, para que, em seguida, fossem analisados por ressonância magnética nuclear de ^{13}C . Através desta análise, os autores sugeriram que na via de Embden-

Meyerhof-Parnas, a isomerização do gliceraldeído-3-fosfato em diidroxicetona-1-fosfato seguida pela neoglicogênese ocorria consideravelmente.

Propriedades biológicas e farmacêuticas de alguns exopolissacarídeos fúngicos.

As β -glucanas são componentes dos EPS produzidos por vários fungos. Em geral, estudos *in vitro* têm sugerido que as β -glucanas com alto valor de MM (massa molecular) podem ativar diretamente leucócitos, estimulando efeitos fagocíticos, citotóxicos e atividades antimicrobianas. Além disso, estes carboidratos também podem estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas como IL-8 (interleucinas 8) , IL-6, IL-1 β e TNF- α (fator de necrose tumoral - α) (CZOP; KAY, 1991). A estimulação por β -glucanas também aumenta a habilidade dos macrófagos em reconhecer e retirar células apoptóticas (FADOK et al., 2000).

O EPS denominado lentinana, produzido pelo fungo *Lentinula edodes*, possui atividade antitumor, particularmente em sarcoma 180 implantado em ratos e tem sido utilizado na medicina Japonesa e Chinesa há muitos anos. Clinicamente, o lentinana foi comprovadamente efetivo no tratamento de câncer colo-retal, quando associado à agentes quimioterápicos (NING et al., 2003).

O EPS pululana é talvez o EPS mais estudado biologicamente, por apresentar muitas atividades ligadas aos seus componentes. O pululana é uma α -glucana, solúvel em água, produzido pelo *Aureobasidium pullulans*, que forma soluções aquosas viscosas estáveis na presença da maioria dos cátions, porém não forma géis (SUTHERLAND, 1998).

Alguns químicos japoneses têm estudado a eficiência de injeções intravenosas do pululana com diferentes valores de MM. Constataram que quando a MM não excedia 15 kDa, o tempo de meia-vida deste polímero era muito curto, resultando em um aumento do esforço dos rins. A administração de injeções intravenosas contendo o polímero com MM acima de 150 kDa, provocava um indesejável aumento da pressão sangüínea, levando-os a concluir que a MM correta para a aplicação intravenosa estava em torno de 60 kDa (SHINGEL, 2004).

O pululana exibe alta afinidade pelo fígado e é efetivamente endocitado pelas células do parênquima hepático. Ao mesmo tempo, não exerce atividade mutagênica, carcinogênica ou toxicológica (KIMOTO et al., 1997).

Em 2002, Suginoshita e colaboradores estudaram o alvo de interferons- β (IFN- β) no fígado; constataram que quando o pululana era conjugado com um resíduo quelante, o dietilenotriaminopentacético (DTPA) e com o IFN- β , era mais eficaz no tratamento de hepatite C crônica e também diminuía os efeitos colaterais das drogas utilizadas atualmente.

O esquizofilana (SPG) é uma glucana com ligações β -(1 \rightarrow 3) secretado pelo fungo *Schizophyllum commune*. Este EPS tem sido utilizado desde 1986 como uma droga anticancerígena no Japão e sua eficácia clínica foi observada em pacientes com câncer de pulmão, cervical e gástrico. O efeito antitumor é mediado pelo hospedeiro e acredita-se estar correlacionado com a ativação de macrófagos e linfócitos T, assim como o aumento na produção de interferons (AZUMA; JOLLES, 1987).

Hamazaki e colaboradores (1980) estudaram os efeitos da SPG como imunopotenciador em câncer cervical uterino de pacientes tratadas com radiação, em comparação com um grupo controle que foi tratado somente com radioterapia,

onde constataram que as pacientes tratadas com SPG e radiação tiveram uma taxa de sobrevivência relativa de três anos a mais, do que as pacientes tratadas somente com radiação.

Em 1992, Matsuyama e colaboradores avaliaram o efeito protetor do SPG contra infecções causadas por *Streptococcus* sp. e *Pasteurella piscicida* em peixes marinhos. O estudo sugeriu que o SPG aumentou a resistência em peixes marinhos a infecções promovidas por *Streptococcus* sp., porém não teve efeito contra as causadas por *P. piscicida*.

O EPS pestalotana trata-se de uma D-glucana tipo $\beta(1\rightarrow3)$ com ramificações $\beta(1\rightarrow6)$, insolúvel em água após ter sido isolado do meio de cultivo de *Pestalotia* sp., filtrada e desidratada. Existem poucos estudos sobre a atividade biológica deste EPS, porém, sabe-se que, muitas glucanas com esta característica estrutural apresentam atividades antitumorais (MISAKI et al., 1984).

Misaki e colaboradores (1984) estudaram a estrutura química desta β -glucana e constataram que o pestalotana apresenta uma moderada atividade antitumor; porém, quando este EPS foi submetido à modificação química da cadeia lateral o potencial antitumor aumentou consideravelmente.

O escleroglucana é uma D-glucana tipo $\beta(1\rightarrow3)$ com ramificações em $\beta(1\rightarrow6)$, produzido pelo fungo *Sclerotium gluconicum*; assim como outras β -glucanas, apresenta também atividade antitumor (BLUHM et al., 1982). Este EPS tem demonstrado efeitos imunoestimuladores tanto in vivo como in vitro e têm sido reportados efeitos antitumor, anti-bacteriano e anti-viral, além de estimular a coagulação e a cicatrização de feridas (FALCH et al., 2000).

Propriedades biológicas e farmacêuticas de polissacarídeos extraídos de corpos de frutificação de fungos

Extratos de corpos de frutificação de muitas espécies fúngicas têm sido utilizados na medicina por possuírem propriedades antimutagênicas. Dentre os componentes relacionados com esta atividade biológica dos extratos, têm sido salientados os polissacarídeos constituintes dos corpos de frutificação dos fungos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*, que demonstraram efeitos antimutagênicos e antigenotóxicos (LIMA et al., 2001; DELMANTO et al., 2001)

O cogumelo *Agaricus blazei* é nativo do Brasil e é popularmente conhecido no Japão como “Himematsutake”. Estudos com frações isoladas do corpo de frutificação deste cogumelo mostraram que muitas destas frações exibem atividades antimutagênicas, anticarcinogênicas e imunomoduladoras (ITOH et al., 1994; OSAKI et al., 1994).

Chen e colaboradores em 2004 constataram que extratos de *Agaricus blazei* co-injetados com a vacina de DNA do HbcAg (core do vírus da hepatite C) aumentaram a resposta imune celular e humoral ao vírus, melhorando a resposta aos anticorpos específicos.

Delmanto e colaboradores (2001) investigaram efeitos antimutagênicos em diferentes linhagens dos extratos de *Agaricus blazei in vivo* e verificaram que algumas linhagens apresentaram efeitos antimutagênicos na clastogenicidade induzida pela ciclofosfamida.

Tabela 1. Características de alguns exopolissacarídeos e polissacarídeos fúngicos e suas respectivas propriedades biológicas e farmacêuticas

Fungo^(a)/ Corpo de frutificação^(b)	Ligações Glicosídicas	Propriedades	Referência
<i>Schizophyllum commune</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antitumoral	Yanaki et al., 1983
<i>Agaricus blazei</i> ^(b)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antitumoral	Shimura et al., 1983
<i>Pestalotia sp. 815</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antitumoral	Misaki et al., 1984
<i>Aureobasidium pullulans</i> ^(a)	$\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$	Imunomoduladora	Kaneko et al., 1989
<i>Laetisaria arvalis</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$	Antitumoral	Aouadi et al., 1991
<i>Schizophyllum commune</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Imunomoduladora	Ding et al., 2000
<i>Sclerotium glucanicum</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Imunomoduladora	Falch et al., 2000
<i>Agaricus blazei</i> ^(b)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antimutagenicidade	Delmanto et al., 2001
<i>Agaricus blazei</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antimutagenicidade	Menoli et al., 2001
<i>Schizophyllum commune</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antimutagenicidade	Tohamy et al., 2003
<i>Aspergillus spp.</i> ^(a)	$\beta(1\rightarrow3)$	Imunomoduladora	Ishibashi et al., 2004
<i>Lentinula edodes</i> ^(b)	$\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow6)$	Antigenotoxicidade	Miyaji et al., 2004

Bioensaios de mutagenicidade

A mutagênese é um processo intrínseco da vida, permitindo a variabilidade genética, imprescindível para haver seleção e, conseqüentemente, para a evolução das espécies e processos adaptativos (BORCHERS et al., 1999).

Mutações em excesso podem também levar à extinção da espécie em função da carga de exposição aos agentes mutagênicos. Portanto, os efeitos das mutações podem levar a resultados maléficos na grande maioria das vezes, incluindo má formações, câncer, envelhecimento precoce e morte (AU et al., 2001).

Investigar a mutagenicidade através de testes in vitro ou in vivo em células de mamíferos possibilita estimar tanto o potencial gerador de danos genéticos de compostos químicos genotóxicos, como também avaliar o risco para a saúde humana, dada a curta distância filogenética existente entre os sistemas (BUSK; SJÖSTRÖM, 1984).

A avaliação da mutagenicidade/ genotoxicidade de um determinado composto envolve diferentes tipos de interações deste agente com o DNA e seus respectivos efeitos. Entre os diferentes ensaios, podemos citar a observação de aductos no DNA, que avalia a capacidade de ligação entre o composto e o material genético; o ensaio do Cometa, onde se estima a capacidade do agente em causar lesões primárias no DNA; as mutações cromossômicas e o teste do micronúcleo que avaliam a capacidade do compostos em quebrar o DNA (ANTUNES, 1997).

As mutações podem ser detectadas utilizando-se microorganismos, bem como células de mamíferos ou de plantas. Testes em células do sangue periférico, como linfócitos humanos, podem avaliar a indução de mutações e danos cromossômicos através do sistema teste do micronúcleo e de aberrações cromossômicas in vitro. Também podem ser utilizadas células de linfoma de ratos,

V79 (pulmão de hamster Chinês) ou CHO (ovário de hamster Chinês) (BRUSICK; AULETTA, 1985).

Para testes in vivo, os ensaios mais comuns são do letal dominante, aberrações cromossômicas, micronúcleo, e mutações em loci específicos com roedores, ratos e camundongos (BRUSICK; AULETTA, 1985).

Bioensaios de Antimutagenicidade

O termo antimutagênico foi usado originalmente para descrever agentes que reduzem a frequência de mutações espontâneas ou induzidas (WATERS et al., 1990).

A prevenção do câncer e de outras doenças está relacionada com a inibição da exposição aos agentes mutagênicos/carcinogênicos através de substâncias da dieta ou fármacos imunomoduladores da resposta biológica que fortalecem os mecanismos de defesa do organismo (DE FLORA, 1998).

É essencial estabelecer o mecanismo de ação dos supostos agentes. Esses mecanismos são classificados em desmutagênicos e bioantimutagênicos (DE FLORA et al., 1992; MITSCHER et al., 1996).

Na desmutagênese, determinados fatores atuam diretamente no agente mutagênico ou seus precursores, inativando-os antes de sua ação sobre o DNA. Dentre os agentes mutagênicos conhecidos podem ser citados o ácido ascórbico, vitaminas, vários extratos de plantas e aminoácidos como a cisteína (MORITA et al., 1978).

No mecanismo da bioantimutagênese a ação ocorre sobre processos de mutagênese, ou de reparo do DNA danificado, levando à redução da frequência de mutações; entre eles, temos o chá verde japonês (KURODA et al., 1992).

Gebhart (1992) relatou que o modo de aplicação dos antimutagênicos em relação à exposição das células-alvo ao clastógeno, é uma das maiores incertezas dos estudos de antimutagenicidade. A escolha e variações dos regimes de tratamento, embora dependentes do tipo de agente e de características de sensibilidade celular, abrem espaço para um grande número de pesquisas que identifiquem os mecanismos nos processos antimutagênicos.

Segundo MALUF E ERDTMANN (2003), o uso diário de antimutágenos e anticarcinógenos futuramente será o procedimento mais efetivo para prevenir o câncer e as doenças genéticas humanas.

Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) é amplamente aceito como um teste de triagem para avaliação de anomalias cromossômicas. Foi primeiramente descrito por Schmid e colaboradores em 1975. Os MNs são estruturas que se originam de fragmentos cromatídicos ou cromossômicos, ou ainda de cromossomos inteiros que não foram incorporados aos núcleos das células filhas, durante a divisão celular (CARRANO; NATARAJAN, 1988).

SCHIMID et al. (1975) estabeleceram o teste do micronúcleo (MN) em células de medula óssea de camundongos in vivo, sendo sua versão in vitro (HEDDLE, 1976), utilizando cultura de linfócitos periféricos humanos, proposta como um teste para a detecção de agentes carcinogênicos. Em linfócitos do sangue periférico humano, Iskander (1979) e Hogstedt (1984) propuseram soluções para problemas relacionados com a fragilidade das células durante o processamento e confecção das lâminas e em 1985, Fenech e Morley introduziram a técnica de obtenção de células binucleadas, que permite a análise de MN formados na primeira

divisão celular após o tratamento com o agente a ser testado, o que permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas quando comparada à análise de células mononucleadas (FENECH, 1997).

Para a realização do teste do Micronúcleo *in vivo* os tipos celulares mais frequentemente empregados são aqueles do sistema hematopoiético, isto é, linfócitos periféricos e eritrócitos (TUCKER; PRESTON, 1996). Os eritrócitos jovens, quando corados com Giemsa, são chamados policromáticos (PCEs), corando-se em azul devido ao seu alto conteúdo de RNA. Os micronúcleos são avaliados em eritrócitos imaturos (eritrócitos policromáticos – PCE). Estas células permanecem na medula óssea cerca de 12 a 24 h e, posteriormente, passam para a circulação onde ficam por um período de tempo semelhante. Gradualmente, vão amadurecendo até se transformarem em eritrócitos normocromáticos (NCE), que se diferenciam dos PCEs, devido ao seu baixo conteúdo de RNA, o que os deixa com uma coloração diferente. Os NCEs permanecem na circulação por aproximadamente um mês (MAVOURNIN et al., 1990).

Teste de Mutação Reversa (Teste de Ames)

O teste de mutação reversa que utiliza bactérias é eficiente para detectar uma grande variedade de compostos mutagênicos. A maioria das linhagens bacterianas utilizadas no teste apresentam características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações (VARGAS et al., 1988).

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. Tais linhagens são construídas para detectar mutações tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA.

O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada (MARRON; AMES, 1983).

Durante vários anos Ames e colaboradores testaram centenas de substâncias químicas diferentes e observaram uma correlação maior que 90% entre mutagenicidade e carcinogenicidade das substâncias testadas. Subseqüentemente, descobriram que muitos destes carcinógenos são metabolizados para derivados fortemente mutagênicos em células eucariontes. Assim, adicionaram uma fração microsomal de fígado de rato a seus sistemas de ensaio, numa tentativa de detectar a mutagenicidade de derivados metabólicos das substâncias sob teste. Este acoplamento do sistema microsomal ampliou consideravelmente a utilidade do sistema (KURODA et al., 1992).

Ensaio imunológico

São utilizados para determinar se um composto possui ou não atividade imunomoduladora, através de sua capacidade de aumentar a produção de anticorpos do sistema imune. A detecção dos anticorpos é realizada pelo teste ELISA, analisando-se o aumento de IL-8 e TNF- α , principalmente (GEE, 1994).

O método ELISA detecta a presença de anticorpo em um soro com o auxílio de uma reação enzimática. Adsorve-se o antígeno na placa de poliestireno. O soro teste é adicionado na placa, permitindo que os anticorpos específicos liguem-se aos antígenos. Após o período de incubação, a placa é lavada para retirar os anticorpos não ligados. Para detectar os anticorpos ligados a antígenos é utilizado um conjugado (anticorpo anti-imunoglobulina ligado quimicamente a uma enzima). Em seguida, é adicionado um substrato cromogênico para detectar a presença da

ligação antígeno-anticorpo. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de anticorpos presentes no soro (GEE, 1994).

Tabela 2. Ensaios biológicos desenvolvidos com exopolissacarídeos fúngicos e com polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação.

EPS fúngico _(a) / Corpo de Frutificação _(b)	Com Modificação Química	Parâmetros Avaliados	Concentrações estudadas (mg/kg)	Resultados obtidos	Referência
Esquizofilana _(a)	Sim	Atividade antitumor	10 (diferentes amostras sonicadas)	Aumento da atividade antitumor	Yanaki et al., 1983
Pestalotana _(a)	Sim	Atividade antitumor	1 a 50	Aumento da atividade antitumor	Misaki et al., 1984
Escleroglucana _(a)	Sim	Atividade antitumor	0,2 a 5	Aumento da atividade antitumor	Aouadi et al., 1991
Pululana	Não	Estudo do potencial de toxicidade e mutagenicidade	500 a 5000	Não revelou toxicidade e mutagenicidade	Kimoto et al., 1997
Esquizofilana _(a)	não	Diminuição dos níveis de radicais livres in vitro	0,043 a 0,807	Efeito antioxidante em linhagens celulares de camundongos	Tsiapali et al., 2001
β -glucana (Sigma, USA)	Não	Inibição da genotoxicidade da ciclofosfamida, adriamicina e cisplatina	100	Inibição da genotoxicidade dos três compostos analisados	Tohamy, et al., 2003
Agaricus blazei Murril _(b)	Não	Aumento da resposta imunológica na hepatite B	0,005 a 0,04	Aumento da eficácia de vacinas de DNA, contra hepatite B	Chen et al., 2004

Considerações finais

Investigações constantes sobre EPS fúngicos certamente irão fornecer explicações sobre a sua biossíntese, fisiologia de produção e suas funções não somente para o próprio microrganismo como para seu emprego pelo homem. A obtenção de novos EPS, e as explicações precisas sobre o seu mecanismo e potencial de ação devem ser estimulados, visto que estes poderão ser utilizados tanto isoladamente como coadjuvantes em terapias. Pesquisas em paralelo sobre a detecção das propriedades biológicas dos novos EPS como por exemplo, atividades genotóxicas, toxicológicas; ou propriedades farmacêuticas como atividades hipoglicemiante, antitumoral ou hipocolesterolêmica, que proporcionarão a aprovação por agências governamentais e, conseqüentemente, suas aplicações nas áreas de alimentos e farmacêutica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo auxílio financeiro ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia-CCE, da Universidade Estadual de Londrina, e a bolsa de mestrado concedida à Carolina Castello Branco O. de Miranda.

Referências

- ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY P. B. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, v. 330, p. 115-181, 1995.
- ANTUNES, L. M. G. Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. Ribeirão Preto, 1997. 97p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- AOUADI, S.; HEYRAUD, A.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; KRAUS J.; FRANZ, G. Structure and properties of an extracellular polysaccharide from *Laetisaria arvalis*. Evaluation of its antitumour activity. **Carbohydrate polymers**, v.16, p. 155-165, 1991.
- AU, W. W.; BADARY, O. A.; HEO, M. Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupancy of Medicine**, v. 16, p. 345-357, 2001.
- AZUMA, I.; JOLLÈS, G. Immunostimulants. **Japan Scientific Societies**, Tokyo, p. 41-56, 1987.
- BLUHM, T. L.; DESLANDES, Y.; MARCHESSAULT, R. M.; PÉREZ, S.; RINAUDO, M. Solid-state and solution conformation of scleroglucan. **Carbohydrate Research**, v. 100, p. 117-130, 1982.
- BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, E. Mushrooms, tumors, and immunity. **Mushrooms and Immunity**, v. 221, p. 281-293, 1999.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311-315, 2003.
- BRUSICK, D.; AULETTA, A. Developmental status of bioassays in genetic toxicology A report of Phase II of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 153, p.1-10, 1985.
- BUSK, L.; SJÖSTRÖM, B. Effects of vitamin A on cyclophosphamide mutagenicity *in vitro* (AMES test) and *in vivo* (mouse micronucleus test). **Food Chemical Toxicology**, v. 22, p. 725-730, 1984.
- CAROLAN, G.; CATLEY, B. J.; MCDUGAL, F. J. The location of tetrasaccharide units in pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 114, p. 237-243, 1983.
- CAROLAN, G.; CATLEY, B. J.; KELLY, P. J. Ethanol production during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. **Biochemical Society Transactions**, v. 4, p. 1021-1022, 1976.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, v. 204, p. 379-406, 1988

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 403-409, 2004.

CZOP, J. K.; KAY, J. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 1511-1520, 1991.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 285-306, 1998.

DE FLORA, S.; BRONZETTI, G.; SOBELS, F. H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. **Mutation Research**, v. 267, p. 153-155, 1992.

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M. ; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. v. 496, p. 15-21, 2001.

DING, Y.; ALKAN, S. S. BASCHANG, G.; DEFAYE, J. Synthesis of the HSA-conjugate of the S-linked thiomimetic of the branched tetrasaccharide repeating unit of the immunostimulant polysaccharide, schizophyllan. Evaluation as potential immunomodulator. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 71-76, 2000.

FADOK, V. A.; BRATTON, D.L.; ROSE, D.M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. Isolation and characterization of beta-glucan receptors on human mononuclear phagocytes. **Nature**, v. 405, p. 85-90, 2000.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L; STOKKE, B. T. The cytokine stimulant activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 587-596, 2000.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios.**, v. 43, p. 223-246, 1985.

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 211-220, 1992.

GEE A. P. Immunologically based methods for the elimination of tumor cells from autologous stem cell grafts. **Immunomethods**, v. 5, p. 232-242, 1994.

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A. and MARTÍNEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v. 281, p. 143-154, 1996.

HAMAZAKI, Y.; KURAMOTO, M.; OKAMURA, K.; YAJIMA, A.; SUZUKI, M. Immunotherapy of uterine cervical cancer by administration of schizophyllan (SPG). **Internacional journal of immunopharmacology**, v.2, issue 3, p. 173-174, 1980.

HEDDLE, J. A. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: Evans, H. J. and Lloyd, D. C. (Eds.), **Mutation-Induced Chromosome Damage to Man**, Edinburgh University Press, pp. 191-200, 1976.

HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: a method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutation Research**, v. 130, p. 63-72, 1984.

ISHIBASHI, K-I.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, H.; TANAKA, S. OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucan. **Immunology and Medical Microbiology**, p. 1-12, 2004.

ISKANDER, O. An improved method for the detection of micronucleus in human lymphocytes. **Stain Technology**, v. 54, p. 221-223, 1979.

ITOH, H.; ITO, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murril (Himematsutake) on Meth A fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. **Japan Journal Pharmacology**, v. 2, p. 265-271, 1994.

KAI, A.; KIKAWA, M.; HATANAKA, K.; MATSUZAKI, K.; MIMURA, T.; KANEKO, Y. Biosynthesis of hetero-polysaccharides as carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 381-383, 2003.

KANEKO, Y.; CHIBARA, G.; TAGUCHI, T. Activity of lentinan against cancer and AIDS. **International Journal of Immunotherapy**, v. 4, p. 203-213, 1989.

KIMOTO, T.; SHIBUYA, T.; SHIOBARA, S. Safety studies of a novel starch, pullulan: chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. **Food and chemical toxicology**, v. 35, p. 323-329, 1997.

KRCMAR, P.; NOVOTNY, C.; MARAIS, M.; JOSELEAU, J. Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, p.61-64, 1999.

KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.

LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutation Research**, v. 496, p. 23-32, 2001.

MADI, N.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme et Biophysica Acta**, v. 36, p. 309-316, 1959.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. In: **Genética Toxicológica**. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Porto Alegre: Editora Alcance, 424 pp, 2003.

MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R. E. P.; YANO, T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture**, v. 101, p. 197-203, 1992.

MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 239, p. 29-80, 1990.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v. 496, p. 5-13, 2001.

MISAKI, A.; KAWAGUCHI, K.; MIYAJI, H.; NAGAE, H.; HOKKOKU, S.; KARUTA, M.; SASAKI, T. Structure of pestalotan, a highly branched (1→3)-β-D-glucan elaborated by *Pestalotia* sp. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrate Research**, v.129, p. 209-227, 1984.

MITSCHER, L. A.; TELIKEPALLI, H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D. M. Natural antimutagenic agents. **Mutation Research**, v. 350, p. 143-154, 1996.

MIYAJI, C.K.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CÓLUS, I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27(1), p.108-114, 2004.

MORITA, K.; HARA, M.; KADA, T. Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from aminoacids. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1235-1238, 1978.

NING, J.; ZHANG, W.; YI, Y.; YANG, G.; ZHIKUI, W.; YI, J; KONG, F. Synthesis of β-(1→6)-branched β-(1→3)glucohexanose and its analogues containing an α-(1→3) linked bond with antitumor activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2193-2203, 2003.

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*. **Yakugaku-Zasshi**, v. 5, p. 342-350, 1994.

ROSADO, F. R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E. R.; COSTA, S. M. G.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production submerged cultures of *Pleurotus ostreato-roseus*, and *Pleurotus ostreatus* "Florida". **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 230-237, 2003.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHIMURA, K.; ITO, H.; HIBASAMI, H. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. **Japan Journal Pharmacology**, v. 2, p. 403-408, 1983.

SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 447-460, 2004.

SUGINOSHITA, Y.; TABATA, Y.; MATSUMURA, T.; TODA, Y.; NABESHIMA, M.; MORIYASU, F.; IKADA, Y.; CHIBA, T. Liver targeting of human interferon- β with pullulan based on metal coordination. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 75-88, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

TOHAMY, A. A.; EL-GHOR, A. A.; EL-NAHAS, S. M.; NOSHY, M. M. β -glucans inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. **Mutation Research**, v. 541, p. 45-53, 2003.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Glucans exhibit weak antioxidant, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 393-402, 2001.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Analysis of Mutagenicity of Waters Under the Influence of Petrochemical Industrial Complexes by Ames Test (*Salmonella / microsome*). **Revista Brasileira de Genética**, v. 11, p. 505-518, 1998.

YANAKI, T.; ITO, W.; TABATA, K.; KOJIMA, T.; NORISUYE, T.; TAKANO, N.; FUJITA, H. Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. **Biophysical chemistry**, v. 17, p. 337-342, 1983.

YANG, F. C.; HWANG, S. Y. Nutritional studies on submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Tunghai journal**, v. 39, p. 1-10, 1998.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, p. 57-85, 1990.

ANEXO B

Artigo 2: “Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic activity”

ANEXO B –

Artigo 2: “Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic activity”

Botryosphaeran: A new fungal exopolysaccharide presenting antimutagenic activity

Carolina C.B.O. Miranda ^a, Ilce M. S. Cólus ^b, Robert F. H. Dekker ^a, Aneli M. Barbosa ^{a*}

^aDeptº de Bioquímica e Biotecnologia- CCE,

^bDeptº de Biologia Geral - CCB,

Universidade Estadual de Londrina,

C.P. 6001,

C.E.P. 86051-990, Londrina-PR,

Brazil

* Corresponding author. Tel.: 55-43-3371-4270; fax: 55-43-3371-42--; E-mail: aneli@uel.br

Abstract

Exopolysaccharides (EPS) are biopolymers produced by microbial species and possess unusual properties known to modify biological responses, among them antimutagenicity and immunomodulation. Botryosphaeran, a newly described fungal (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina*, was administered orally to mice at three doses (7.5, 15 and 30 mg/kgb.w./day) over 15 days, and found to be non-mutagenic by the micronucleus test in bone marrow and peripheral blood. Botryosphaeran administered at doses of 15 and 30 mg EPS/kgb.w. decreased significantly ($p < 0.001$) the clastogenic effect of cyclophosphamide-induced micronucleus formation resulting in a reduction of the frequency of micronucleated cells of 78 and 82 % in polychromatic erythrocytes of bone marrow, and reticulocytes in peripheral blood, respectively. The protective effect was concentration dependent, and strong antimutagenic activity was exerted at low EPS doses. Variance analysis (ANOVA) showed no significant differences ($p > 0.05$) among the median body weights of the groups of mice treated with botryosphaeran during experiments evaluating mutagenic activity and antimutagenicity of botryosphaeran. This is the first report on the biological activity attributed to botryosphaeran.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*; Botryosphaeran; Cyclophosphamide; Mouse; Antimutagenicity; Micronucleus test; Oral administration

1. Introduction

Exopolysaccharides (EPS) are carbohydrate macromolecules secreted into the culture media by many microorganisms including the fungi. The biological activities attributed to EPS have been actively studied over the years and include: host resistance to bacterial, viral, fungal and parasitic infections; inhibition of tumor growth and prevention of carcinogenesis; as a coadjuvant in radiotherapy; and the immunomodulatory effects that increase the phagocytic and proliferative activity of the reticuloendothelial system among others [1-2]. Despite the wealth of knowledge regarding the effects of EPS and their therapeutic potential, the molecular mechanisms and cellular receptors which mediate these responses are still not well understood [3].

The most studied fungal EPS are those produced by the basidiomycetes, mostly ligninolytic, and identified as non-cellulosic β -glucans with various linkages, but chiefly of the (1 \rightarrow 3)- β -glucosidic type [4]. The β -glucans besides participating in the composition of the fungal cell wall are also frequently excreted into the culture media when cultured in liquid medium. However, the functions of the β -glucans are not well understood in fungal metabolism. Studies on ligninolytic basidiomycetes indicate that the β -glucans often constitute a sheath around the fungal hyphae that protects against desiccation and free radical damage by reactive oxygen species. They are further thought to play a role in lignin degradation by providing an indirect source for hydrogen peroxide through extracellular glucose generated and regulated through the specific enzymatic hydrolysis of the β -glucan itself, and as a matrix for the immobilization of secreted enzymes [5].

The ascomycete *Botryosphaeria rhodina* is an endophytic fungus isolated from a stem canker on an eucalypt tree [6] and shown to be ligninolytic [7]. This fungal isolate produced an EPS described as a β -D-glucan [8] and structurally characterized as a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan, and named botryosphaeran [9]. Botryosphaeran consists of a main chain comprising glucose residues linked through β (1 \rightarrow 3) bonds with approximately 22 % ramification at carbon 6 consisting of branches of glucose and gentiobiose residues [9].

Until now, only studies on the microbial physiology of botryosphaeran production [10], and some structural characteristics of the botryosphaerans produced by *B. rhodina* when grown on

different carbohydrate substrates, have been reported [10, 11]. It is important when assessing new compounds for potential biomedical applications that they be first screened for mutagenic activity, as this property causes cellular damage [12]. The objective of this work, therefore, was to evaluate the mutagenic activity of botryosphaeran *in vivo* using mice to establish its possible biotechnological applications as a health product. We report herein for the first time the possible biological effects of botryosphaeran in relation to its protective effect of cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and growth conditions

Botryosphaeria rhodina isolate MAMB-05 was cultivated according to Barbosa et al., [7]. The fungus was maintained on potato agar dextrose slants at 4 °C with successive transfers every 3 months. Pre-inoculum was prepared from fungal mycelial mats on agar plates (Vogel minimal salts medium (VMSM; [13]), 20 g/L agar and 10 g/L glucose), and transferred to liquid medium (VMSM and 5 g/L glucose) in Erlenmeyer flasks and grown at 28 °C in an orbital Shaker (180 rpm) for 120 h. Working under aseptic conditions, the pre-inoculum obtained was homogenized in a blender for 30 s (max. speed) and the mycelium recovered by centrifugation (1,250 x g/15 min) and suspended in sterile isotonic saline solution. The suspension was diluted to an A_{400} of 0.4 - 0.5, and 1-ml aliquots used to inoculate Erlenmeyer flasks containing VMSM and glucose (50 g/L). The cultures were left to grow for 72 h at 28 °C in an orbital Shaker (180 rpm).

2.2. Production and determination of botryosphaeran

After 72 h of cultivation, the flasks were harvested by centrifugation (1,250 x g/15 min) to remove mycelium, and the supernatant collected and dialyzed (48 h) against several changes of de-ionized water. The dialyzate was then treated with 3 volumes of absolute ethanol and left at 4 °C for 24 h. The precipitated material (botryosphaeran) was filtered off, re-dissolved in water, and dialyzed against de-ionized water (48 h). The dialyzate was lyophilized and the dried material (EPS) stored at -20 °C.

2.3. Preparation of botryosphaeran solutions and analyses

Stock solutions of botryosphaeran were prepared of the following concentrations: 0.75, 1.5 and 3.0 g/L in isotonic saline solution and autoclaved at 121 °C for 20 min, and used for biological assay. Aliquots of each EPS solution were reserved for the determination of reducing sugars and total sugars by the methods of Somogyi [14], and Dubois et al [15], respectively, to confirm the concentrations used during the animal experiments.

2.4. Treatment with cyclophosphamide

Cyclophosphamide (CP, Sigma) was used to induce mutagenicity, and was administered at a final dose of 50 mg/kg of mouse body weight (b.w.). CP was diluted in de-ionized water and administered once to the animals through intraperitoneal injection (i.p.).

2.5. Experimental design for mutagenicity and anti-mutagenicity

Swiss adult mice weighing 27-32 g were obtained from the mouse breeding colony at Universidade Estadual de Londrina, and maintained individually in polyethylene cages under controlled conditions of temperature (23 ± 2 °C), relative humidity (50 ± 10 %), a 12-h light-dark cycle, and with *ad-libitum* access to a special rodent diet (*Nuvilab*, Apucarana-PR, Brazil) and water.

The animals were randomized into 8 groups each of 10 animals (5 males and 5 females). The first and the second groups were used respectively, as the negative and positive controls, with each animal receiving a placebo comprising only isotonic saline solution as treatment. On the final day of treatment, the positive control group received CP (50 mg/kg) by i.p. to induce mutagenicity and subsequent formation of micronucleus. Animals of groups 3 to 5 each received equal doses of EPS administered by gavage at three different doses: 7.5, 15 and 30 mg botryosphaeran/kg/b.w./day over 15 days for the analysis of mutagenic activity of botryosphaeran. In groups 6 to 8, botryosphaeran was administered by gavage over 15 days at the same doses as groups 3 to 5, but on the 15th day of treatment, received an intraperitoneal injection of CP (50 mg/kg). The CP injection was applied 1 h after the animals were treated with the EPS solutions, thus simulating a simultaneous treatment in the antimutagenicity assay.

Animals of all the groups were weighed at the beginning and at the end of each treatment to evaluate possible variations in body weight caused by the administration of botryosphaeran, and to evaluate if the EPS was capable of serving as an energy source. All animals were sacrificed 30 h after the 15th day of treatment, and peripheral blood taken and bone marrow collected for the micronucleus tests.

2.6. *Micronucleus test*

2.6.1. *Micronucleus test in bone marrow cells*

Genotoxic effects were evaluated by the micronucleus (MN) test in mouse bone marrow cells according to the protocol of Schmid [16]. After the animals were sacrificed, both femurs were immediately removed and the bone marrow washed out with 1 ml of fetal bovine serum into centrifuge tubes containing 1 ml of fetal bovine serum. The cellular suspension was mixed and centrifuged at 350 g/10 min, and the supernatant discarded. The pellet (bone marrow cells) was mixed with 0.5 ml of fetal bovine serum and a small aliquot applied to a glass slide and smeared. After the smears had dried (24 h at ambient temperature), they were fixed in methanol for 10 min, and then stained with 5 % (w/v) Giemsa diluted in 0.06 M phosphate buffer (Na_2HPO_4 and KH_2PO_4) pH 6.8 for 8 min. For each animal, 2 slides were prepared each of one femur and used for scoring. From each slide, 1000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were scored for the presence of micronuclei under oil immersion at 100x magnification using a binocular light microscope [17-18], and the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in 2000 PCEs recorded for each animal.

2.6.2. *Micronucleus test in peripheral blood*

The micronucleus test in mouse peripheral blood was conducted according to the method described by Hayashi et al. [19] using slides previously stained with acridine orange. Before euthanasia, 5 μL of venous blood taken from the tail of each animal was collected and placed on a set of slides with coverslips, and maintained at -20 °C before analysis. Cytological analyses were evaluated using a fluorescent microscope with the combination of a blue excitation (488 nm) and a yellow to orange (515 nm) barrier filter (100x oil-immersion objective). The number of

micronucleated reticulocytes (MNRETs) analyzed in 1000 reticulocytes (RETs) was recorded for each animal.

2.7. Calculation for reduction of the micronucleus frequency

The reduction in the frequency of MN after treatment with botryosphaeran was calculated according to Manoharan and Banerjee [20] and Waters et al. [21], using the equation:

$$\text{Reduction (\%)} = \left(\frac{\text{Frequency of MN in A} - \text{Frequency of MN in B}}{\text{Frequency of MN in A} - \text{Frequency of MN in C}} \right) \times 100$$

where A is the group treated with CP (positive control), B the group treated with botryosphaeran solutions plus CP, and C the group treated with isotonic saline (negative control).

2.8. Statistical analysis

The frequencies of the micronucleated PCEs and RETs and the median body weights were calculated for each treatment group. All results are expressed as the mean \pm SD. Data from mutagenicity and anti-mutagenicity activities, and median body weights were analyzed by one-way ANOVA, and significant differences ($p < 0.05$) between means determined by Tukey's test [22].

3. Results

The results of the analysis of the micronucleus frequency in PCEs of bone marrow, and RETs of peripheral blood of mice treated with botryosphaeran for 15 days and their respective control groups are presented in Tables 1 and 2. The data showed that there was no significant statistical difference among the MN frequencies observed in the groups that received EPS, and in the animals of the negative control group treated only with isotonic solution, indicating that this EPS was not mutagenic in bone marrow PCEs nor in peripheral blood RETs of the mice.

Variance analysis (ANOVA) showed no significant difference among the median body weights of the groups of mice treated with EPS and the negative control group ($p > 0.05$) during experiments evaluating mutagenic activity of botryosphaeran (data not shown).

The MN frequencies in bone marrow PCEs and in peripheral blood RETs of mice that received botryosphaeran plus CP, and their respective control groups, are shown in Tables 3 and 4, respectively. The results demonstrate the antimutagenic potential of botryosphaeran at the three doses examined. The MNPCEs frequencies presented significant statistical differences at all of the dose levels examined in relation to the positive control group ($p < 0.05$) for 7.5 mg EPS /kg b.w. per day, and ($p < 0.001$) for 15 and 30 mg EPS /kg b.w. per day. The smallest dose presented statistical differences among the other two doses (15 and 30 mg/kg b.w. per day). Reductions in the MN frequency of 45, 71 and 78 %, respectively, were observed for botryosphaeran doses of 7.5, 15 and 30 mg EPS/kg b.w./day (Table 3).

Data in Table 4 also confirmed the antimutagenic potential of botryosphaeran in peripheral blood RETs at the three EPS doses examined. The statistical differences were significant for all of the doses of EPS in relation to the positive control group ($p < 0.05$) for EPS 7.5 mg/kg b.w. per day, and ($p < 0.001$) for EPS 15 and 30 mg/kg b.w. per day. Botryosphaeran doses of 15 and 30 mg/kg b.w. per day presented statistical differences in relation to the dose of 7.5 mg/kg b.w. per day. Similarly, reductions in the MN frequencies induced by CP (Table 4) resulted in a slightly higher value (82 %) at a dose of 30 mg botryosphaeran/kg b.w. per day.

Variance analysis (ANOVA) again showed (results not presented) that there was no statistical difference in the median body weights of the groups of mice treated with EPS and the positive control group ($p > 0.05$) in evaluating the antimutagenic activity of botryosphaeran.

4. Discussion

Many microbial polysaccharides present biological activities and some in their *in situ* form as mushrooms have been used in traditional Chinese and Japanese medicines for centuries in treating human diseases [4]. The mechanism of action of these carbohydrate polymers, however, is not clearly understood in spite of the knowledge of their activities as biological response modifiers [23]. The

protective activity of these polysaccharides is mediated through the stimulation of the immune system, possibly due to immunological host-mediated mechanisms involving the action of various immunocompetent cells [4]. It is thought that the β -glucans exert their effects by activating cells of the immune system through their binding to surface receptors, for example, the C-type lectin-like Dectin-1 receptor on leukocytes recognizes $\beta(1\rightarrow3)$ - and $\beta(1\rightarrow6)$ - linked glucans [3]. Dectin-1 is expressed on phagocytic cells, including macrophages and neutrophils, and mediates both the internalization (signal transduction) and cellular responses to β -glucans through unique mechanisms [24].

The present study demonstrated that botryosphaeran produced by *B. rhodina* did not present mutagenic activity *in vivo* in mice after administration by gavage over a 15 day period. These findings were in agreement with those reported for other fungal EPS including schizophyllan and scleroglucan [25], and some polysaccharides extracted from mushrooms [26, 27]. The fact that botryosphaeran did not present clastogenic or aneugenic damage in the mice, suggests that its use should be safe by oral administration. It is important to mention that most of the polysaccharides possessing biological activities reported in the literature were used as crude extracts and were not purified beforehand. Many of these polysaccharides were obtained from sources such as mushrooms that contain β -glucans [28-30] with similar structural characteristics to botryosphaeran. Some studies have also involved isolated glucans from the cell wall of yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* [31] and *Candida albicans* [32], but few studies have been reported for EPS arising from submerged fermentation [33, 34], as is the case with botryosphaeran.

Cyclophosphamide is an alkylating agent used as chemotherapy in treating cancers [35]. It also induces cellular damage in micronucleus formation in bone marrow cells and peripheral blood cells. Consequently, CP has been used as a cytostatic agent to induce cellular damage in the micronucleus test for evaluating mutagenic and antimutagenic activities [35]. It is thought that the role of microbial polysaccharides in preventing mutagenesis in CP-induced genotoxicity is due to their scavenging of the reactive hydroxyl groups on metabolites of CP, and this represents one of the most promising approaches in antimutagenesis and anticarcinogenesis [36]. Botryosphaeran exercised strong potential antimutagenic action in relation to the genotoxicity of CP resulting in the reduction of frequencies of 78 and 82 % of micronucleated cells in the RETs of peripheral blood, and 71 and 78 %

of micronucleated PCEs of bone marrow cells when administered at doses of 15 and 30 mg/kg b.w. per day, respectively, confirming the potential antimutagenic activity of botryosphaeran in mice.

On comparing the reduction in the MN frequency obtained for botryosphaeran with literature reports of other fungal β -glucans obtained by fermentation with a similar composition and structure (e.g., at doses of 100 mg EPS/kg b.w., the β -glucans from *S. cerevisiae* [31], *Aspergillus niger* [37] and *Grifola frondosa* [38] resulted in maximum reductions of 44 % and 58 %, respectively), it is obvious that the results obtained with botryosphaeran were significant, and interestingly occurred at lower EPS doses. The antimutagenic activity of pestalotan, an extracted EPS from the fungus *Pestalotia* sp., has been evaluated *in vivo* [34]. In its native form, and where the side branching chains were chemically modified, pestalotan was shown not to be mutagenic and presented antimutagenic and antitumor activities in mice. The chemical structure of pestalotan is not dissimilar to botryosphaeran, although its degree of branching was somewhat higher than botryosphaeran (37 % compared to 22 % [9]).

The method of administrating EPS by gavage presents several advantages over other administrative routes, as it reduces some adverse effects such as the formation of granulomas, microembolization and inflammation, but also promotes a more comfortable situation for the animal by reducing stress [39]. An obstacle to the clinical utilization of β -glucans is their relatively high molecular weight, and in general, poor solubility in aqueous solutions. This can lead to their inactivity when administered orally because of reduced amounts of the EPS in blood circulation [31]. To overcome this drawback, ultrasonication is often necessary to solubilize these EPS [33], or water-soluble derivatives of EPS are often prepared by derivatization through carboxymethylation or sulfation [33, 40].

It is unlikely that botryosphaeran, through its complex structure, would act as an energy source for the mouse, as its digestive system would need to produce enzymes to specifically hydrolyze the β 1 \rightarrow 3)- and β (1 \rightarrow 6)- glucosidic bonds to digest botryosphaeran. As far as the authors are aware, enzymes of this type are unknown in animal systems (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>). A mutagenic agent, however, can weaken an animal promoting cachexia and resulting in weight loss. Therefore, an evaluation in body weight changes of the animals during a study for mutagenic and antimutagenic

activities is an important parameter. The work reported herein demonstrated there was no significant statistical differences in the experimental treatments for assessing mutagenic and antimutagenic activities in relation to the body weight of the animals, thus indicating that botryosphaeran did not serve as an energy source. These results were furthermore corroborated by the findings of other studies that evaluated antimutagenic activity, e.g., extracts of the mushroom body of *Lentinula edodes* [41], and a glucan extracted from the fermentation broth of *C. albicans* [32]. Both studies demonstrated that these glucans did not influence body weight gains in mice.

In conclusion, we have described for the first time the biological activity exercised by the exopolysaccharide botryosphaeran, and demonstrated that the EPS produced by *B. rhodina*, was not mutagenic. Furthermore, botryosphaeran exhibited antimutagenic activity against the *in vivo* DNA-damaging effect of CP leading to a reduction of cyclophosphamide-induced MN frequencies in bone marrow and peripheral blood of mice. Botryosphaeran thus possesses some promising biological activities as demonstrated by this work, and this will open new perspectives for its biological activities and applications. Studies in progress in our laboratory have indicated that botryosphaeran is effective in promoting hypoglycemia and hypocholesterolemia in rats (unpublished data), and when sulfated exhibited strong anticoagulant activity (unpublished data).

5. Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (Brazil), and Fundação Araucária do Paraná (Brazil) for financial support. C.C.B.O. de Miranda thanks CAPES for a post-graduate scholarship, and R.F.H. Dekker acknowledges CNPq (Brazil) for a senior research Fellowship.

6. References

- [1] Y. H. Shon, K. S. Nam. Antimutagenic and induction of carcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, *J. Ethnopharm.* 77 (2001) 103 – 109.
- [2] G. D. Brown, S. Gordon. Fungal β -glucans and mammalian immunity, *Immunity* 19 (2003) 311 – 315.

- [3] J. Herre, J. A. Willment, S. Gordon, G. D. Brown. *The Role of Dectin-1 in Antifungal Immunity*, *Crit. Rev. Immunol.* 24 (2004) 193–203.
- [4] S. P. Wasser, M. Y. Didukh. *Mushroom polysaccharides in human health care*, in: S. K. Deshmukh, M. K. Rai (Eds.), *Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life*, Science Publ. Inc., Enfield (NH), USA, 2005, pp. 289–328.
- [5] P. Krcmar, C. Novotny, M. F. Marais, J. P. Joselau. *Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin-degrading fungus Phlebia radiata in liquid culture*, *Int. J. Biol. Macromol.* 24 (1999) 61 – 64.
- [6] A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, I. Kurtböke, G. E. Hardy. In-vivo decolorization of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation, Proc. 4th Pacific Rim Biotechnol. Conf., Melbourne, Australia, 1995, pp. 88-90.
- [7] A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, G. E. Hardy. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478, *Lett. Appl. Microbiol.* 23 (1996) 93-96.
- [8] R. F. H. Dekker, A. M. Barbosa. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp., *Enz. Microb. Technol.* 28 (2001) 81–88.
- [9] A. M. Barbosa, R. M. Steluti, R. F. H. Dekker, M. S. Cardoso, M. L. Corradi da Silva. Structural characterization of botryosphaeran: a (1→3;1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp., *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1691-1698.
- [10] R. M. Steluti, E. C. Giese, M. M. Piggato, A. F. G. Sumiya, L. G. Covizzi, A. E. Job, M. S. Cardoso, M. L. Corradi da Silva, R. F. H. Dekker, A. M. Barbosa. Comparison of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features, *J. Basic Microbiol.* 44 (2004) 480–486.
- [11] M. L. Corradi da Silva, N. L. Izeli, P. F. Martinez, I. R. Silva, C. J. L. Constantino, M. S. Cardoso, A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, G. V. J. da Silva. Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study, *Carbohydr. Polym.* 61 (2005) 10–17.
- [12] M. Kirsch-Volders. Towards a validation of the micronucleus test, *Mutation Res.* 392 (1997) 1 – 4.
- [13] H. J. Vogel. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*, *Genetic Bull.* 60 (1956) 42.
- [14] M. A. Somogyi. A new reagent for determination of sugars, *J. Biol. Chem.* 160 (1945) 61 – 68.

- [15] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Reber, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350 – 356.
- [16] W. Schmid. The micronucleous test, *Mutation Res.* 31 (1975) 9 – 15.
- [17] R. Huber, S. Streng, M. Bauchinger. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry, *Mutation Res.* 111 (1983) 185-193.
- [18] N. Titenko-Holland, G. Windham, P. Kolachana, F. Reinisch, S. Parvatham, A. M. Osorio, M. T. Smith. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of malathion-exposed workers, *Mutation Res.* 338 (1997) 85 – 95.
- [19] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, Jr. M Ishidate. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.* 245 (1990) 245 – 249.
- [20] K. Manoharan, M. R. Banerjee. β -carotene reduces sister chromatid exchange induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, *Cell Biol. Int. Rpts.* 9 (1985) 783 – 789.
- [21] M. D. Waters, A. L. Brady, H. F. Stack, H. E. Brockman. Antimutagenicity profiles for some model compounds, *Mutation Res.* 238 (1990) 57 – 85.
- [22] STATISTICA for Windows v. 6, v. II. (2001). Tulsa, OK, USA: Statsoft.
- [23] J. A. Bohn, J. N. BeMiller. (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydr. Polym.* 28 (1995) 3–14.
- [24] J. Herre, S. Gordon, G. D. Brown. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages, *Mol. Immunol.* 40 (2004) 869–876.
- [25] A. Mueller, J. Raptis, P. J. Rice, J. H. Kalbfleisch, R. D. Stout, H. E. Ensley, W. Browder, D. L. Williams. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line, *Glycobiology* 10 (2000) 339 – 346.
- [26] C. K. Miyaji, B. Q. Jordão, L. R. Ribeiro, A. F. Eira, I. M. S. Cólus. Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the comet assay, *Gen. Mol. Biol.* 27 (2004) 108 – 114.
- [27] M. P. Machado, E. R. Filho, A. P. Terezan, L. R. Ribeiro, M. S. Mantovani. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined *in vitro* by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay, *Toxicology in vitro* 19 (2005) 533 – 539.
- [28] P. L. A. de Lima, R. D. Delmanto, M. M. Sugui, A. F. da Eira, D. M. F. Salvadori, G. Speit, L. R. Ribeiro. *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo*, *Mutation Res.* 496 (2001) 23 – 22.

- [29] L. Chen, H. J. Shao, Y. B. Su. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murril extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses, *Int. Immunopharmacol.* 4 (2004) 403 – 409.
- [30] R. D. Delmanto, P. L. A. de Lima, M. M. Sugui, A. F. da Eira, D. M. F. Salvadori, G. Speit, L. R. Ribeiro. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide, *Mutation Res.* 496 (2001) 15 – 21.
- [31] D. Chorvatovičová, E. Machová, J. Šandula. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide-induced mutagenicity, *Mutation Res.* 371 (1996) 115 – 120.
- [32] K. Tokunaka, N. Ohno, Y. Adachi, N. N. Miura, T. Yadomae. Application of *Candida* solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 59 – 67.
- [33] D. Chorvatovičová, E. Machová, J. Šandula. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration, *Mutation Res.* 412 (1998) 83 – 89.
- [34] A. Misaki, K. Kawaguchi, H. Miyaji, H. Nagae, S. Hokkoku, M. Kakuta, T. Sasaki. Structure of pestalotan, a highly branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan elaborated by *Pestalotia sp.* 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains, *Carbohydr. Res.* 129 (1984) 209 – 227.
- [35] D. Anderson, J. B. Bishop, R. C. Garner, P. Ostrosky-Wegman, P. B. Selby. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks, *Mutation Res.* 330 (1995) 115 – 181.
- [36] D. Chorvatovičová, E. Machová, J. Šandula, G. Kogan. Protective effect of the yeast glucomannan against cyclophosphamide-induced mutagenicity, *Mutation Res.* 444 (1999) 117–122.
- [37] K. I. Ishibashi, N. N. Miura, Y. Adachi, H. Tamura, S. Tanaka, N. Ohno. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan, *FEMS Immunol. Med. Microb.* 93 (2004) 12-25.
- [38] B. C. Lee, J. T. Bae, H. B. Pyo, T. B. Choe, S. W. Kim, H. J. Hwang, J. W. Yun. Biological activities of the polysaccharide produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa*, *Enz. Microb. Technol.* 32(2003) 574 – 581.
- [39] J. Šandula, G. Kogan, M. Kacuráková, E. Machová. Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity, *Carbohydr. Polym.* 38 (1999) 247 – 253.
- [40] T. Yanaki, W. Ito, K. Tabata, T. Kojima, T. Norisuye, N. Takano, H. Fujita. Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophylan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution, *Biophys. Chem.* 17 (1983) 337 – 342.

- [41] M. M. Sugui, P. L. Alves de Lima, R. D. Delmanto, A. F. da Eira, D. M. F. Salvadori, L. R. Ribeiro. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages, Food Chem. Toxicol. 41 (2003) 555 – 560.

Table 1. Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in bone marrow of mice treated orally with different doses of botryosphaeran for 15 days.

Treatment (mg EPS/kg b.w./day)	Number of PCEs analyzed	PCEs with MN / 2000 PCEs	
		Number (mean \pm SD)	Frequency (%)
Isotonic saline	18,000	1.5 \pm 1.23	0.07
Botryosphaeran			
7.5	20,000	2.0 \pm 0.87	0.10
15	20,000	1.3 \pm 0.95	0.07
30	20,000	1.1 \pm 0.71	0.06

Table 2. Frequency of micronucleated reticulocytes (MNRET) in peripheral blood of mice treated orally with different doses of botryosphaeran for 15 days.

Treatment (mg EPS/kg b.w./day)	Number of RETs analyzed	RETs with MN / 1000 RETs	
		Number (mean \pm SD)	Frequency (%)
Isotonic saline	9,000	2.4 \pm 0.72	0.24
Botryosphaeran			
7.5	10,000	2.7 \pm 1.15	0.27
15	10,000	2.2 \pm 1.13	0.22
30	10,000	2.2 \pm 0.73	0.22

Table 3. Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and reduction of micronucleated cells in bone marrow of mice treated orally with different doses of botryosphaeran plus cyclophosphamide after sub-chronic treatment.

Treatment (mg EPS/kg b.w./day)	Number of PCEs analyzed	PCEs with MN / 2000 PCEs		Reduction (%)
		Number (mean \pm SD)	Frequency (%)	
Isotonic saline	18,000*	1.6 (\pm 1.23)	0.077 ^(a)	
CP [#]	20,000	43.0 (\pm 2.83)	2.15 ^(b)	
Botryosphaeran + CP [#]				
7.5	20,000	24.3 (\pm 3.02)	1.21 ^{(c)*}	45
15	20,000	13.8 (\pm 2.74)	0.69 ^{(d)**}	71
30	16,000**	8.7 (\pm 3.42)	0.54 ^{(d)**}	78

(a, b c and d) are statistically different

* (p <0.05)

[#] Cyclophosphamide (50 mg /kg b.w.) by i.p.

** (p <0.001)

Table 4. Frequency of micro-nucleated reticulocytes (MNRET) and reduction of micro-nucleated cells in peripheral blood of mice treated orally with different doses of botryosphaeran plus cyclophosphamide after sub-chronic treatment.

Treatment (mg EPS/kg b.w./day)	Number of RETs analyzed	RETs with MN / 1000 RETs		Reduction (%)
		Number (mean ± SD)	Frequency (%)	
Isotonic saline	9,000*	2.4 (± 0.72)	0.24 ^(a)	
CP [#]	10,000	22.3 (± 1.49)	2.23 ^(b)	
Botryosphaeran + CP [#]				
7.5	10,000	13.4 (± 2.45)	1.34 ^{(c)*}	45
15	10,000	6.8 (± 2.08)	0.68 ^{(d)**}	78
30	8,000**	4.8 (± 1.85)	0.60 ^{(d)**}	82

(a, b c and d) are statistically different

* (p <0.05)

[#] Cyclophosphamide (50 mg /kg b.w.) by i.p.

** (p <0.001)

ANEXO C

Artigo 3: “Avaliação do potencial hipoglicemiante e hipocolesterolêmico do botriosferana em ratos”

ANEXO C –

Artigo 3: “Avaliação do potencial hipoglicemiante e hipocolesterolêmico do botriosferana em ratos”

**Avaliação do potencial hipoglicemiante e hipocolesterolêmico do
botriosferana em ratos.**

Carolina C.B.O. Miranda ^a, Cássia T. B. V. Zaia ^b, Robert F. H. Dekker ^a, Aneli M. Barbosa ^{a*}

^a Dept^o de Bioquímica e Biotecnologia- CCE,

^b Dept^o de Ciências Fisiológicas - CCB,

Universidade Estadual de Londrina,

C.P. 6001,

C.E.P. 86051-990, Londrina-PR,

Brazil

* Corresponding author. Tel.: 55-43-3371-4270; fax: 55-43-3371-42--; E-mail: aneli@uel.br

RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos secretados por muitos microrganismos, incluindo fungos. O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* é produtor de um EPS caracterizado previamente com uma β -(1 \rightarrow 3);(1 \rightarrow 6)-D-glucana. Foi relatado recentemente que o botriosferana não possui ação mutagênica e exerce forte atividade antimutagênica em células de camundongos. Neste estudo foram analisadas as atividades hipoglicemiante em diabetes melitus tipo I, induzido pela droga estreptozotocina (STZ); e a atividade hipocolesterolêmica, em lipidemia induzida pela dieta. Os bioensaios foram realizados em ratos Wistar, que recebiam o botriosferana nas concentrações de 1,5 e 3,0 g/L para a análise da atividade hipoglicemiante e 3,0 g/L para a atividade hipocolesterolêmica, durante 15 dias. Os resultados demonstraram que o botriosferana exerceu atividade hipoglicemiante somente na concentração de 3,0 g/L ($P < 0,01$) e apresentou uma tendência hipocolesterolêmica aos animais, diminuindo 18% do nível de colesterol total e 27% do nível de colesterol LDL, porém não se diferenciou estatisticamente do grupo controle positivo. Acredita-se que em concentrações mais elevadas, o botriosferana possa atuar como um agente hipocolesterolêmico e até mesmo, aumentar sua atividade hipoglicemiante podendo, no futuro, ter aplicabilidades farmacêuticas.

1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos são polímeros de carboidratos, secretados por muitos microrganismos, incluindo-se algas, bactérias, plantas e fungos (SUTHERLAND, 1998). Entre os mais estudados destacam-se os que possuem ligações tipo β -(1 \rightarrow 3), por apresentarem segundo a literatura científica, atividades imunomoduladoras, antitumorais, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicas (YANG et al., 2002; CHEUNG, 1996).

O *Botryosphaeria rhodina* é um fungo ascomiceto isolado de cancro de eucalipto (Barbosa et al., 1995) e selecionado previamente como ligninolítico por Barbosa e colaboradores em 1996. Este microrganismo é também produtor de um exopolissacarídeo (EPS) descrito por Dekker e Barbosa, em 2004, como uma β -D-glucana.

Recentemente a estrutura do EPS secretado pelo *B. rhodina* foi caracterizada, como uma β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucana, a qual foi então denominada de botriosferana. Este EPS é constituído de uma cadeia principal de resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3), contém aproximadamente 22% de ramificações no carbono 6, as quais são constituídas por resíduos de glucose e gentiobiose (Barbosa et al., 2003).

Em 2004, Steluti e colaboradores, avaliaram diferentes fontes de carbono para a produção de botriosferana pelo *Botryosphaeria rhodina*. Houve produção do EPS na maioria das fontes estudadas (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melão de cana de açúcar), excetuando-se o manitol, todas as glucanas produzidas foram caracterizadas como sendo do tipo β .

Recentemente foram realizados testes de citotoxicidade com o botriosferana em camundongos, onde constatou-se, que este EPS não é mutagênico em células de camundongos. O estudo também mostrou que o botriosferana foi capaz de desenvolver um forte efeito antimutagênico, chegando a 82% de redução da frequência de danos causados pelo agente alquilante ciclofosfamida, em células do sangue periférico de camundongos (dados não publicados).

Mesmo sabendo-se que o botriosferana trata-se de uma β -glucana e que como muitas já apresentadas na literatura científica pode apresentar efeitos na diminuição de lipídeos e glucose plasmática, até o presente, não houve nenhum estudo relatando os possíveis efeitos hipocolesterolêmicos e hipoglicemiantes atribuídos a este EPS.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho é investigar tais atividades, abrindo com isso, expectativas para novas pesquisas com este promissor EPS, para que no futuro, possa-se avaliar a possível aplicabilidade deste composto na indústria farmacêutica como coadjuvante para o tratamento de algumas patologias.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e condições de cultivo

O ascomiceto foi cultivado de acordo com Barbosa e colaboradores (2003). O fungo *Botryosphaeria rhodina* foi mantido em meio BDA (Agar batata dextrose) em tubos inclinados à -4° C com transferências sucessivas a cada 3 meses. O inóculo foi preparado a partir do cultivo fúngico em placas de Petri, contendo meio mínimo Vogel acrescido de sais (VMSM), ágar (20 g/L) e glucose (10 g/L) por 120 h à 28° C. Porções do micélio foram transferidas para frascos de Erlenmeyer modificados (125 mL) contendo 25 mL de VMSM a glucose (5 g/L), e cultivado durante 48 horas à 28° C em agitador orbital tipo “shaker” (180 rpm). Os pré-inóculos foram homogeneizados em “Blender” previamente esterilizado durante 30 segundos à velocidade máxima. O homogenato de células foi então centrifugado, o *pellet* foi ressuspensionado, em solução de salina fisiológica esterilizada. Esta solução foi diluída até se obter uma leitura de sua absorvância a 400 nm, entre 0,4 e 0,5. Posteriormente, alíquotas de 1 mL desta solução de inóculo foram transferidas para frascos que continham 25 mL de VMSM e glucose (50 g/L).

2.2 Produção e determinação da β -glucana

B. rhodina foi cultivado sobre condições de cultivo submerso em frascos de Erlenmeyer (200 mL) contendo 400 mL de VMSM e glucose (50 g/L) como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas à 28° C em agitador orbital tipo “Shaker” a 180 rpm por 72 h.

Após 72 h, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante coletado em banho de gelo, dialisado contra água deionizada por 48 horas. Após a primeira diálise, a solução foi tratada com 3 volumes de etanol absoluto e deixado em câmara fria por 24 horas. Em seguida, o precipitado foi filtrado em papel de filtro. Posteriormente o EPS foi novamente dialisado contra água deionizada por 48 horas, com várias trocas sucessivas de água. Em seguida, foi ressolubilizado, novamente contra água deionizada, congelado e liofilizado.

2.3 Preparo das soluções

Foram preparadas as soluções de EPS com as concentrações de 1,5 e 3,0 g/L em salina fisiológica. Após a solubilização completa das soluções, estas foram autoclavadas à 120° C, por 20 minutos, e após terem sido resfriadas foram transferidas para recipientes previamente esterilizados com volumes suficientes para o desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Uma amostra de cada solução foi reservada para as determinações de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) e de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois et al.,1956). Através destas dosagens foram certificadas as concentrações utilizadas durante todo o experimento.

2.4 Animal Experimental

Ratos adultos machos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (Londrina – PR), foram colocados em gaiolas individuais durante um período e adaptação de 3 dias. Estes receberão ração para roedores (Nuvilab ®) e água ad libitum. Os animais eram mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C e $55 \pm 10\%$ de umidade, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais pesavam entre 170 – 192 g e foram divididos em 3 grupos de 10 animais cada para análise da atividade hipocolesterolêmica e 4 grupos de 10 animais cada para análise da atividade hipoglicemiante

2.5 Protocolo experimental para a análise de atividade hipoglicemiante

Após o período de adaptação iniciou-se os experimentos para análise da atividade hipoglicemiante do botriosferana. O primeiro e o segundo grupo foram denominados de controle negativo e controle positivo, respectivamente, que receberam como tratamento, solução de salina fisiológica via gavagem. Estes foram tratados duas vezes ao dia, durante 15 dias, com intervalo de 12 horas entre os tratamentos.

Todos os animais, com exceção do grupo controle negativo, receberam injeção intramuscular de estreptozotocina (Sigma Chemical Co.) (STZ) dissolvida em solução de tampão citrato de sódio (pH 4,5) na dose de 50 mg/Kg de peso corpóreo (Bolkent et al., 2000). Dois dias após a injeção do agente diabetogênico (STZ) a glicose foi determinada na urina, utilizando-se tiras reativas (Diastix[®]) e os ratos que apresentaram taxa de glicose na urina, acima de 500 mg/dL, foram incluídos nos grupos dos animais diabéticos.

No 3^o e 4^o grupos foram administrados o botriosferana via *gavage* duas vezes ao dia, durante todo o decorrer do tratamento, respeitando o mesmo intervalo de aplicações do EPS. As concentrações utilizadas foram de 1,5 e 3,0 g/L, respectivamente, por terem sido as que apresentaram os melhores resultados no tratamento da análise de antimutagenicidade.

O ganho de peso durante todo o experimento foi analisado em todos os grupos, bem como, o consumo médio de ração, medido em gramas de alimento consumido para cada 100 g de peso corpóreo (g/100 p.c.).

Após o último tratamento, os animais foram colocados em jejum por 16 horas e submetidos à eutanásia. O sangue coletado em tubos heparinizados (Liquemine[®] 5000 UI) foi centrifugado à 3000 rpm por 30 minutos para a separação do plasma. Imediatamente após a separação foram desenvolvidas as dosagens de glicose plasmática e colesterol total plasmático, através de kits bioquímicos (Biodiagnóstica[®]), para a determinação da atividade hipoglicemiante.

2.6 Desenvolvimento experimental e dietas para a análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana

O presente estudo foi desenvolvido em duas fases que constavam de 15 dias cada uma. Do 1^o ao 15^o os animais receberam dieta suplementada com colesterol 1%, gorduras saturadas 25% e 0,1% de ácido cólico (dieta hipercolesterolêmica) para a indução da lipidemia nos

ratos. Do 16º ao 30º dia, os animais continuaram recebendo a dieta e também iniciou-se o tratamento com o botriosferana na concentração de 3,0 g/L via gavagem, recebendo 0,4 ml em cada aplicação e tratados duas vezes ao dia. Neste trabalho priorizamos testar uma única concentração do botriosferana, devido ao alto custo na preparação das rações hipercolesterolêmicas. Portanto, a concentração utilizada foi escolhida por ter apresentado os melhores resultados na avaliação antimutagênica (dados não publicados) e hipoglicemiante.

O grupo controle negativo recebeu dieta preparada de acordo com AIN93M (REEVES et al., 1993) com 1,5% de amido de milho sendo substituído pela celulose (dieta controle). Fibras insolúveis com a celulose, não possuem ação hipolipidêmica expressiva e têm sido utilizadas como controles em estudos humanos e animais (ANDERSON et al., 1994). A composição de cada dieta está apresentada na Tabela I.

2.7 Protocolos experimentais para análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana

Após o período de adaptação dos animais, iniciou-se o desenvolvimento da análise, através da alimentação com as dietas controle, para o grupo controle negativo e com a dieta HIPER para o grupo controle positivo e para o grupo teste, durante 15 dias. Após este período, deu-se início a segunda fase do experimento, onde os animais além de receberem suas respectivas dietas, passaram também a receber as soluções de salina fisiológica esterilizada (Grupos controles negativo e positivo) e a solução de EPS 3,0 g/L nas quantidades e nos intervalos citados anteriormente.

Após o último tratamento com o botriosferana ou com a solução de salina fisiológica, todos os animais foram colocados em jejum por 16 h e sacrificados por decapitação, e seus fígados foram imediatamente pesados. O sangue foi coletado em tubos heparinizados (Liquemine®) e centrifugados a 3000 rpm durante 30 minutos para a separação do plasma. Em seguida foram feitas as dosagens plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídeos, glicose e ácido graxos livres.

O ganho médio de peso de cada grupo foi analisado diariamente, bem como, o consumo médio de ração, que foi determinado em g proporcionais a cada 100g de peso corpóreo dos animais.

2.9 Determinações Plasmáticas

Colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose foram analisados através métodos enzimáticos colorimétricos utilizando-se kits de diagnósticos comerciais (Biodiagnóstica ®). Os ácidos graxos livres foram determinados seguindo o método de determinação colorimétrica no plasma (FALHOLT et al., 1973).

O colesterol LDL foi determinado utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - (\text{Triacilglicerídeo} / 5)$$

3.0 Análises estatísticas

Foram calculadas as médias das concentrações plasmáticas de cada componente analisado e os respectivos desvios padrões para cada grupo de tratamento, aplicando-se os testes de análise de variância (ANOVA). Para os grupos que apresentaram $p < 0,05$ depois de comparados com seus respectivos grupos controles, foram aplicados o teste de Tukey utilizando o programa STATISTICA/6.0 (STATISTICA Inc. Tulsa, USA, 2002).

4. Resultados

4.1 Análise da atividade hipoglicemiante do botriosferana

O efeito da administração de botriosferana durante 15 dias nos ratos está apresentado na Tabela II mostrando as concentração em mg/dL de glicose e colesterol plasmáticos. Estes resultados demonstram que em relação ao colesterol plasmático, nenhuma das concentrações de botriosferana estudadas apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle negativo.

Quanto à concentração média de glicose plasmática, pode-se observar que o botriosferana, na concentração de 1,5 g/L, não promoveu redução significativa, apenas 16%, se comparado ao grupo controle positivo, que elevou significativamente o nível de glicose

plasmática, em relação aos animais sadios, demonstrando que a metodologia empregada para a indução do diabetes nos animais foi eficaz.

Na concentração de 3,0 g/L, o botriosferana apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle positivo, visto que promoveu uma redução de 48% no nível de glicose plasmática em relação ao grupo controle positivo, no qual os animais não receberam nenhum tratamento.

Quando comparado ao grupo controle negativo, o EPS na dose de 3,0 g/L não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), o que indica que o botriosferana nesta concentração foi eficaz ao controle da doença. Apesar de não ter diminuído a glicose plasmática para os níveis desejáveis, foi capaz de exercer alta atividade hipoglicemiante.

A avaliação do consumo médio de alimentos, bem como o ganho médio de peso e a eficiência de conversão de alimentos pelos animais, são dados extremamente pertinentes, quando se avalia parâmetros bioquímicos para evidenciar distúrbios no metabolismo causado pelo diabetes mellitus.

A Tabela III mostra o ganho médio de peso corpóreo e o consumo médio de ração, proporcionais a 100 g de peso corpóreo de cada animal durante os 15 dias do experimento. O consumo de alimento do grupo controle positivo aumentou 32,5% ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle negativo; enquanto que o ganho de peso do grupo controle negativo que constava apenas de animais sadios foi 76,5% ($p < 0,01$) maior que o grupo dos animais diabéticos que não receberam tratamento (controle positivo).

A taxa de eficiência de conversão de alimentos do grupo controle positivo e do EPS 1,5 g/L foi menor que dos grupos controle negativo e do EPS 3,0 g/L (Tabela IV). A concentração de 1,5 g/L apresentou diferenças significativas entre o grupo controle negativo relacionadas com o consumo médio de ração, indicando que os animais doentes que recebiam tratamento com o botriosferana, na menor concentração, consumiram mais alimento. Com isso pode-se concluir que o EPS nesta dose não diminuiu os sintomas do diabetes mellitus.

Os resultados deste experimento também mostraram que os animais diabéticos tanto do grupo controle positivo, quanto do grupo que recebeu a menor concentração do botriosferana, tiveram uma perda de peso considerável, comparada com o grupo controle negativo, este sintoma está provavelmente relacionado com o diabetes mellitus. Portanto, o EPS na concentração de 1,5 g/L, não foi capaz de diminuir o sintoma de perda de peso causado pela doença.

O botriosferana na concentração de 3,0 g/L, não foi capaz de diminuir totalmente os sintomas da doença, pois apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo

controle negativo. Entretanto, é importante salientar que, o EPS na maior concentração analisada, foi capaz de diminuir o consumo médio de alimentos pelos animais, aumentou o ganho médio de peso corpóreo e também promoveu em aumento na taxa de conversão de alimentos, quando comparado aos grupos controle positivo e ao grupo EPS 1,5 g/L, mostrando que teve um desempenho positivo ao controle do diabetes mellitus, diminuindo os sintomas de caquexia da doença.

4.2 Análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana

A Tabela V mostra as concentrações plasmáticas (mg/dl) de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos, em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta e tratados com o botriosferana por 15 dias, na concentração de 3,0 g/L.

Através da tabela, podemos observar que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) das concentrações de colesterol total e das frações, bem como, do triglicerídeos, em relação ao grupo controle positivo. Portanto o botriosferana na concentração de 3,0 g/L não foi capaz de exercer um efeito hipocolesterolêmico nos animais, mesmo tendo diminuído em 18,6% o nível de colesterol total e 27,03 % o nível de colesterol LDL.

Os dados nos mostram também que as concentrações de triglicerídeos e colesterol HDL, não se diferiram em nenhum dos grupos, onde concluímos que a ração não alterou estes componentes na circulação sanguínea.

A Tabela VI mostra o efeito do botriosferana no índice aterogênico e na taxa de colesterol HDL sobre o colesterol total. Estes índices indicam a propensão ao desenvolvimento de doenças coronarianas, que podem ser desencadeadas pelo aumento de lipídeos. Em adição, também são oferecidos os dados das concentrações de ácidos graxos livres e glicose plasmática em mg/dl.

Os resultados mostram que, o botriosferana na concentração analisada não se diferenciou estatisticamente do grupo controle positivo em relação ao índice aterogênico, não diminuindo, portanto, o risco de doenças coronarianas nos animais. Nenhum dos grupos analisados apresentaram diferenças estatísticas entre si em relação à taxa de colesterol HDL/colesterol total e no nível de ácidos graxos livres. Pode-se concluir também que a dieta não induziu o diabetes mellitus tipo 2 nos animais, pois não houve diferença estatística na concentração de glicose plasmática em nenhum dos grupos analisados.

A Figura 1, mostra o efeito do botriosferana no peso dos fígados dos ratos; o consumo médio de ração (determinado por 100 g de peso corpóreo dos animais) e ganho de peso dos ratos hipercolesterolêmicos, após 15 dias de tratamento com o EPS.

Através destes resultados, podemos constatar que o botriosferana na concentração analisada não foi capaz de se diferenciar estatisticamente do grupo controle positivo ($p > 0,05$) e apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle negativo (animais normais), sendo que este último apresentou o peso do órgão inferior aos outros dois grupos.

Tanto o grupo controle positivo quanto o grupo tratado com o botriosferana, apresentaram um aspecto diferenciado do órgão, em cor e textura. Esta diferença provavelmente está associada ao aumento da lipidemia, que conseqüentemente aumentou a demanda do fígado para a produção de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, causando esta diferença no aspecto do órgão. Com isso, novamente pode-se confirmar que a dieta utilizada durante o experimento foi eficaz para a indução da hipercolesterolemia nos animais.

Os resultados também mostram que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em nenhum dos grupos analisados, em relação ao consumo médio de ração e ao ganho médio de peso corpóreo.

5- Discussão

Muitas glucanas fúngicas apresentam atividades hipoglicemiantes e vem sendo utilizadas em alguns países como coadjuvante da insulina no tratamento do diabetes mellitus, por não causarem efeitos colaterais como outras drogas sintéticas (HWANG et al., 2005). Da mesma maneira, muitos exopolissacarídeos fúngicos já foram analisados, quanto ao seu potencial hipocolesterolêmico; onde apresentaram resultados satisfatórios na diminuição da lipidemia causada pela dieta (YANG et al., 2002).

No presente estudo, foram avaliados os potenciais hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicos do exopolissacarídeo secretado pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, produzido em glucose como única fonte de carbono.

O modelo experimental da avaliação do efeito hipoglicemiante, constava de ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzido pelo droga Estreptozotocina. Este medicamento, trata-se de

um antibiótico antineoplásico derivado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, que costuma ser utilizado principalmente no tratamento de tumores pancreáticos, por causar a necrose das células β das ilhotas de Langherans (HWANG, 2005).

Através dos resultados apresentados na Tabela II, pode-se constatar que o modelo experimental em questão foi eficaz, pois causou um aumento superior a quatro vezes da concentração de glicose plasmática do grupo controle positivo em relação ao grupo controle negativo.

Somente o botriosferana na concentração de 3,0 g/L exerceu efeito hipoglicemiante, reduzindo em 48% o nível de glicose plasmática, quando comparado ao grupo controle positivo. Na concentração de 1,5 g/L, o botriosferana não apresentou diferença estatística significativa, mesmo tendo reduzido em 16% o nível de glicose plasmática em relação ao grupo controle positivo (Tabela II).

Muitos autores defendem que as β -glucanas, por possuírem atividades antioxidantes, diminuem os danos causados pelos agentes diabetogênicos no fígado diminuindo as concentrações de algumas enzimas hepáticas, como a alanina transaminase (ALT) e a aspartato transaminase (AST). As β -glucanas também seriam capazes de diminuir os danos causados pelos agentes diabetogênicos no pâncreas e com isso, a produção de insulina aumenta e os sintomas da doença tornam-se mais estáveis (HWANG et al., 2005; LUO et al., 2004).

Uma excelente forma de explicar se realmente esta teoria é verdadeira é desenvolver estudos com diferentes modelos experimentais, com a aplicação de botriosferana antes da injeção de estreptozotocina e a subsequente quantificação de insulina na corrente sanguínea e a análise histológica do pâncreas e fígado. Com isso poderá ser possível avaliar se a β -glucana realmente é capaz de diminuir os danos causados pelo agente diabetogênico nos pâncreas.

Embora existam diferentes tipos de agentes hipoglicemiantes orais, que atuam apenas em associação com a insulina no tratamento de diabetes mellitus, nos últimos anos houve um grande aumento da procura por produtos naturais com atividade antidiabética, pelos pacientes. Isto porque a insulina não pode ser utilizada por via oral e o uso contínuo de drogas antidiabéticas sintéticas causam diversos efeitos colaterais e toxicidade a alguns órgãos (YAMAMOTO et al., 2001).

Devido à alta viscosidade peculiar do botriosferana, a maior concentração possível de solubilização foi 3,0 g/L. Portanto, faz-se necessário um estudo futuro de novas estratégias que viabilizem um aumento da solubilidade deste EPS, e conseqüentemente, o aumento de sua

concentração nos ensaios biológicos. Acredita-se que em concentração mais elevadas, possa-se obter um aumento da atividade hipoglicemiante exercida por este exopolissacarídeo.

Um EPS isolado de cultivo submerso de *Lentinus edodes*, foi avaliado quanto à atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes mellitus induzida também por estreptozotocina. O experimento teve duração de 7 dias, no qual foram estudadas as concentrações de 50; 100 e 200 mg/kg. Os pesquisadores observaram que o EPS reduziu em até 21,2 % o nível de glicose plasmática (YANG et al., 2000).

Kim e colaboradores (2001) também analisaram o efeito hipoglicemiante do EPS extraído do cultivo submerso de *Cordyceps militaris*. Após 14 dias de experimento, os pesquisadores observaram uma redução de 14 % do nível de glicose plasmática.

Cabe salientar que são poucos os trabalhos citados na literatura, nos quais EPS fúngicos tenham sido isolados de cultivos submersos e avaliados quanto à atividade hipoglicemiante.

Um dos principais sintomas do diabetes mellitus é o aumento do consumo de ração e a diminuição da eficiência de conversão de alimentos, causada pela incompetência das células β do pâncreas em metabolizar os carboidratos ingeridos, diminuindo com isso, o peso corpóreo dos animais (LUO et al., 2004).

O botriosferana, na concentração de 3,0 g/L promoveu um aumento à resposta do diabetes mellitus se comparado com a concentração de 1,5 g/L, isto havendo uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quanto ao ganho de peso corpóreo. Com isso, é possível concluir que os animais diminuíram os sintomas de caquexia causado pela doença (Tabela III).

A taxa de eficiência de conversão de alimentos do grupo controle positivo e do EPS 1,5 g/L foi menor que dos grupos controle negativo e do EPS 3,0 g/L (Tabela IV). Estes dados estão de acordo com outros encontrados na literatura científica relacionados com o ganho de peso corpóreo e consumo de alimentos atribuídos à outras glucanas fúngicas com estruturas químicas semelhantes ao do botriosferana como do EPS extraído de *Cordyceps militaris* (KIHO et al., 1993); *Cordyceps sinensis* (KIM et al., 2001).

Com todos estes resultados apresentados, durante a análise da atividade hipoglicemiante, pode-se observar que este efeito exercido pelo botriosferana foi bastante satisfatório, quando comparada com outros trabalhos, visto que a dose utilizada nos experimentos ainda é bastante baixa. Portanto, novas perspectivas em relação a futuros testes surgiram através de todos estes resultados, para que se possa analisar maiores doses do exopolissacarídeo, como coadjuvante da insulina para o tratamento de diabetes mellitus.

O colesterol é um esteróide sintetizado a partir do acetil CoA e atua como intermediário metabólico para outros ésteróides, ácidos biliares e vitamina D. A concentração elevada do colesterol no soro tem sido associada ao metabolismo e doenças coronarianas. A determinação do colesterol total faz parte do perfil lipídico do sangue, bem como, dos triglicerídeos, e as frações lipídicas, constitui um importante dado diagnóstico, uma vez que pode representar o risco do desenvolvimento de doenças coronarianas e cardiocirculatórias (CHEUNG, 1996).

Sabe-se que muitas glucanas fúngicas apresentam atividades hipocolesterolêmicas. Neste trabalho, este efeito foi analisado em ratos que tiveram um aumento da colesterolemia induzida pela dieta de gorduras saturadas (25%), colesterol (1%) e ácido cólico (0,1%). Este modelo experimental mostrou-se eficaz para a indução da hipercolesterolemia nos animais, visto que o colesterol total e o colesterol LDL do grupo controle positivo apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle negativo, que era composto de animais que recebiam a dieta controle.

O botriosferana na concentração de 3,0 g/L, não apresentou diferenças estatísticas entre o grupo controle positivo ($p > 0,05$). Apesar da redução do colesterol total ter sido de 18,6%, quando analisado a média do grupo durante a análise de variância (ANOVA), constatou-se que o botriosferana não pode ser considerado hipocolesterolêmico nesta concentração.

Recentemente, autores analisaram o efeito de dietas contendo hidrocolóides, como as gomas guar, xantana e amido de milho pré-gelatinizado, em ratos hipercolesterolêmicos. Foi observado que estas glucanas, também não apresentaram efeitos na diminuição de colesterol sérico e triglicerídeos em ratos hipercolesterolêmicos. Porém os autores concluem que, o desenvolvimento de experimentos que utilizem concentrações compatíveis com o consumo humano, devem ser desenvolvidos, antes de descartar o uso de determinados compostos como ingredientes de alimentos nutracêuticos ou funcionais (CASTRO et al., 2003).

Foi analisado o estudo hipocolesterolêmico de β -glucanas extraídas de fibras moídas de cevada em ratos com colesterol aumentado pela dieta. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram β -glucanas nas concentrações de 2,3; 4,6 e 6,9g para cada 100 de ração ingerida pelos animais. Após duas semanas, constataram que ocorreu uma diminuição dos níveis lipídicos nos ratos e também um aumento da viscosidade dos conteúdos gastrointestinais. Os autores sugerem portanto, que a capacidade hipocolesterolêmica exercidas por estas β -glucanas, provavelmente está associada com o aumento da viscosidade promovida pelo

composto, dificultando com isso a absorção de frações lipídicas pela dieta (DANIELSON et al., 1997). Mesmo o trabalho não tendo apresentado o consumo médio de ração por dia, sabe-se que ratos da linhagem Wistar costumam ingerir em média 15g de ração por dia. Portanto, fazendo a correlação, chegamos a um valor de 340; 690 e 1030 mg de glucana ingerida por dia.

Em nosso experimento, os animais ingeriam 2,4 mg de botriosferana por dia. Portanto, esta quantidade de EPS aplicada aos animais era bastante inferior às encontradas em experimentos com outras glucanas fúngicas. Provavelmente, em concentrações superiores do botriosferana, possamos obter um efeito satisfatório na diminuição do colesterol sanguíneo dos animais.

O mecanismo exercido pelas β -glucanas no desenvolvimento de tais atividades não está totalmente esclarecido e ainda resta margem para uma série de dúvidas entre os pesquisadores. Talvez a principal dúvida esteja concentrada em que, as glucanas são macromoléculas e até onde sabe-se, estas não são absorvidas pelo organismo, sendo que um possível processo de digestão das β -glucanas levaria-las na decomposição em monômeros de glucose, que também não seriam capazes de desenvolver, por si só, efeitos como hipocolesterolêmico e hipoglicemiante. Portanto, a maneira como estas moléculas causam os efeitos no plasma, ainda é motivo de muita discussão.

Um hipótese bastante defendida para o efeito hipocolesterolêmico exercido pelas β -glucanas, seria pelas estas promovem um aumento da viscosidade no intestino delgado e com isso a absorção de colesterol e triglicérides fica prejudicada e também causa uma diminuição das atividades das enzimas digestivas, conseqüentemente, diminuindo o aumento dos lipídeos pelo organismo (WANG et al., 1996).

Alguns autores sugerem que a diminuição do colesterol total de do colesterol LDL atribuídas às β -glucanas estaria relacionada com a regulação positiva da atividade da enzima colesterol 7 α -hidroxilase. Esta enzima está associada com a regulação da via na qual o colesterol é convertido em ácidos biliares (BRENNAN; CLEARY, 2005).

A Tabela VI mostra que não houve diferença entre o nível de ácidos graxos do grupo tratado com o EPS e o grupo controle positivo; enquanto que a Figura 1, mostra que não ocorreu diferença significativa em relação ao peso dos fígados dos animais. Portanto pode-se observar que o botriosferana não foi eficaz a estes dois parâmetros analisados.

Existem hipóteses que defendem que as β -glucanas aumentariam a produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino delgado e com isso, ocorreria uma inibição da produção do

colesterol LDL por limitar a oxidação de lipídeos. A excreção urinária de malondialdeído (MDA) é proporcional à peroxidação de lipídeos endógenos. Portanto, autores estudaram o consumo de extratos de aveia enriquecida com β -glucanas à 1 e 10%, relacionando com o aumento da excreção de MDA em homens e mulheres. Eles observaram que a excreção de MDA foi inversamente proporcional ao aumento do consumo dos extratos de aveia, confirmando a hipótese que estes extratos inibem a peroxidação de lipídeos endógenos pela redução do MDA. Porém o estudo também concluiu que este efeito não estava associado às β -glucanas presentes no extrato, pois o aumento da excreção de MDA não foi proporcional ao aumento do conteúdo de β -glucanas presentes na aveia (HALLFRISCH et al., 1997).

Poucos trabalhos relatam o estudo de efeitos hipocolesterolêmicos em β -glucanas produzidas através de fermentação submersa de fungos. Recentemente, pesquisadores analisaram o efeito hipolipidêmico de um EPS extraído de cultivo submerso do fungos *Auricularia polytricha* em ratos Sprague-Dawley com hipercolesterolemia induzida pela dieta. Os animais receberam o EPS na doses de 50; 75 e 100 mg/kg de peso corpóreo e após duas semanas de tratamento observaram uma forte diminuição do nível de colesterol total e colesterol LDL, chegando a 70% de diminuição para a maior dose. Os autores concluem que este efeito estaria possivelmente ligado com a inibição da formação de micelas no intestino delgado e com a alteração das características físicas na mucosa intestinal dos ratos (YANG et al., 2002).

Em nosso estudo, foram utilizados ratos da linhagem Wistar. Alguns trabalhos sugerem que esta não seja a linhagem mais apropriada para modelos experimentais de hipercolesterolemia. Ratos da linhagem Sprague-Dawley, costumam ser mais utilizados no desenvolvimento destes modelos experimentais por apresentarem características no metabolismo dos lipídeos mais similares aos humanos (CHEUNG et al., 1996). Provavelmente isto explica a razão pela qual a dieta não promoveu o aumento dos triglicerídeos no soro dos animais (Tabela IX).

Em nosso trabalho, ocorreu alteração no ganho médio de peso corpóreo dos grupo tratado com o EPS comparado com o grupo controle positivo que recebia apenas a dieta HIPER. Não foi observado diferenças estatísticas entre o consumo médio de ração no grupo positivo quando comparado ao grupo testado com o EPS (Figura 1). Resultados similares foram encontrados durante a avaliação do EPS de *Auricularia polytricha* (YANG et al., 2002).

Portanto, através de todos os resultados discutidos acima, observa-se que o botriosferana na concentração de 3,0 g/L não exerceu atividade hipocolesterolêmica nos animais. Entretanto, estudos utilizando concentrações maiores do composto deverão ser desenvolvidos, antes de concluir que este EPS não apresenta potencial como ingrediente nutracêutico no tratamento de hiperlipidemias.

Análises da reologia do EPS e o desenvolvimento de moléculas de botriosferana sulfatadas estão em desenvolvimento neste laboratório, buscando-se a diminuição da viscosidade e o conseqüente aumento da dose do composto. Com isso, espera-se resultados promissores em futuros bioensaios.

5 – Referências

ANDERSON, J. W.; JONES, A. E.; RIDDELL-MASON, S. Ten different dietary fibres have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 78-83, 1994.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. *In vivo* decolorization of poly R-478 as a method for screening lignolytic microorganisms for use in bioremediation. **Proc 4th Pacific Rim Biotechnology Conference**, Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E.. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**. v..23, p. 93-96, 1996

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; CORRADI DA SILVA, M.L.C. 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.

BRENNAN, C. S.; CLEARY, L. J. The potential use of cereal (1→3,1→4)-α-D-glucans as functional food ingredients. **Journal of Cereal Science**, v. 42, p. 1-13, 2005.

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

CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutration research**, v. 16, p. 1953-1957, 1996.

DANIELSON, A. D.; NEWMAN R. K.; NEWMAN, W.; BERANDIELLI, J G. Lipid levels and digesta viscosity of rats fed a high-fiber barley milling graction. **Nutrition Research**, v. 17, p. 515-522, 1997.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.

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.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fat acids in plasma. **Clin. Chim. Acta**, v. 40, p. 105-111, 1973

HALLFRISCH, J.; SCHOLFIELD, D. J.; BEHALL, K. M. Diets containing soluble oat extracts reduce urinary malondialdehyde in moderately hypercholesterolemic men and women. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 8, p. 497-501, 1997.

HWANG, H.J.; KIM, S.W.; LIM, J.M.; JOO, J.H.; KIM, H.O.; KIM, H.M.; YUN, J.W. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharide produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life sciences**, in press, 2005.

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

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

LUO, Q.; YIZHONG, C.; YAN, J.; SUN, M. CORKE, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruti extracts from *Lycium barbarum*. **Life sciences**, v. 76, p. 137-149, 2004.

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

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, **Food and Chemical of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

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

STATISTICA for Windows v.6, v.II. (2001). Tulsa, OK, USA: **Statsoft**.

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

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

WANG, L.; BEHR, S. R.; NEWMAN, R. K. NEWMAN, W. Comparative cholesterol-lowering effects of barley β -glucan and barley oil in golden syrian hamsters. **Nutrition Research**, v. 17, p. 77-88, 1997.

YANG, B.K.; HA, J.Y.; JEONG, S.C.; JEON, Y.J.; RA, K.S.; DAS, S.; YUN, J.W.; SONG, C.H. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from submerged mycelial culture of *Auricularia polytricha* in rats. **Biotechnology letters**, v. 24, p. 1319-1325, 2002.

YAMAMOTO, Y.; NAKAZAKI, H.; YOKOI, T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. **Life sciences**, v. 70, p. 471-482, 2001.

Tabela 1. Composição das dietas utilizadas no experimento de análise hipocolesterolêmica do botriosferana.

Ingredientes^a (g/100g)	Controle^b	HIPER^c
Caseína	14,00	14,00
DL Metionina	0,18	0,180
Amido de Milho	46,57	29,06
Dextrina	15,50	15,50
Mistura de Vitaminas	1,00	1,00
Mistura de Minerais	3,50	3,50
Colina	0,25	0,25
Sacarose	10,00	10,00
Celulose	5,00	_____
BHA (mg)	0,80	5,20
Óleo de Soja	4,00	_____
Óleo de Côco	_____	25,00
Ácido Cólico	_____	0,50
Colesterol	_____	1,00
Total	100,00	100,00

^a Caseína (Sigma C7078), DL-Metionina (Sigma M9500), amido de milho e dextrina (Corn Produtos Brasileiros Ind. Ltda), Misturas de vitaminas e minerais de acordo com Reeves et al., (1993) para animais adultos, colina (Sigma C1629), Celulose (Sigma C6288), BHT(Ionol/ Butilhidroxitolueno/ Synth), Óleo de côco (Sigma C1758), Ácido cólico (Sigma C1129) e colesterol (5-cholesten-3 β -cholon-24-oic acid/ Sigma C3292).

^b Controle: AIN-93M Reeves et al., (1993).

^c HIPER: dieta hipercolesterolêmica modificada por Zullet et al., (1999).

Tabela II, Concentrações de glicose e colesterol total plasmáticos.

Grupos	Colesterol total plasmático (mg/dl)	Glicose plasmática (mg/dl)
Controle (-)	79,41	126,81 ^(a)
Controle (+)	50,71	532,18 ^{(b)**}
EPS 1,5 g/L	74,72	443,83 ^{(b)**}
EPS 3,0 g/L	62,55	254,66 ^{(c)*}

* (p<0,01) em relação ao grupo controle negativo; ** (p<0,001) em relação ao grupo controle positivo;

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si

Tabela III - Ganho médio de peso corpóreo e o consumo médio de ração em gramas, proporcionais à 100 g de peso corpóreo de cada animal durante os 15 dias de experimento.

Grupos	Consumo médio de ração (g/100 p.c./dia)	Ganho médio de peso corpóreo (g/dia)	Eficiência de conversão de alimento
Controle (-)	10,78 ^(a)	5,49 ^(a)	0,51 ^(a)
Controle (+)	15,97 ^{(b)*}	1,30 ^{(b)*}	0,08 ^{(b)**}
EPS 1,5 g/L	15,96 ^{(b)*}	0,89 ^{(b)*}	0,06 ^{(b)**}
EPS 3,0 g/L	14,02 ^{(c)*, **}	2,25 ^{(c)*, **}	0,16 ^{(c)*, **}

* (p<0,05) em relação ao grupo controle negativo; ** (p<0,01) em relação ao grupo controle positivo

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Tabela IV – Análise de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e Triglicerídeos após 15 dias de tratamento com o botriosferana, em experimento de análise hipocolesterolêmica.

Grupos	Colesterol Total (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)	Colesterol HDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
Controle (-)	69,15 ^(a)	13,19 ^(a)	31,43	122,65
Controle (+)	137,51 ^(b)	77,91 ^(b)	37,27	111,71
EPS 3,0 g/L	111,95 ^(b)	56,85 ^(b)	35,14	99,82

*(p<0,05) em relação ao grupo controle negativo

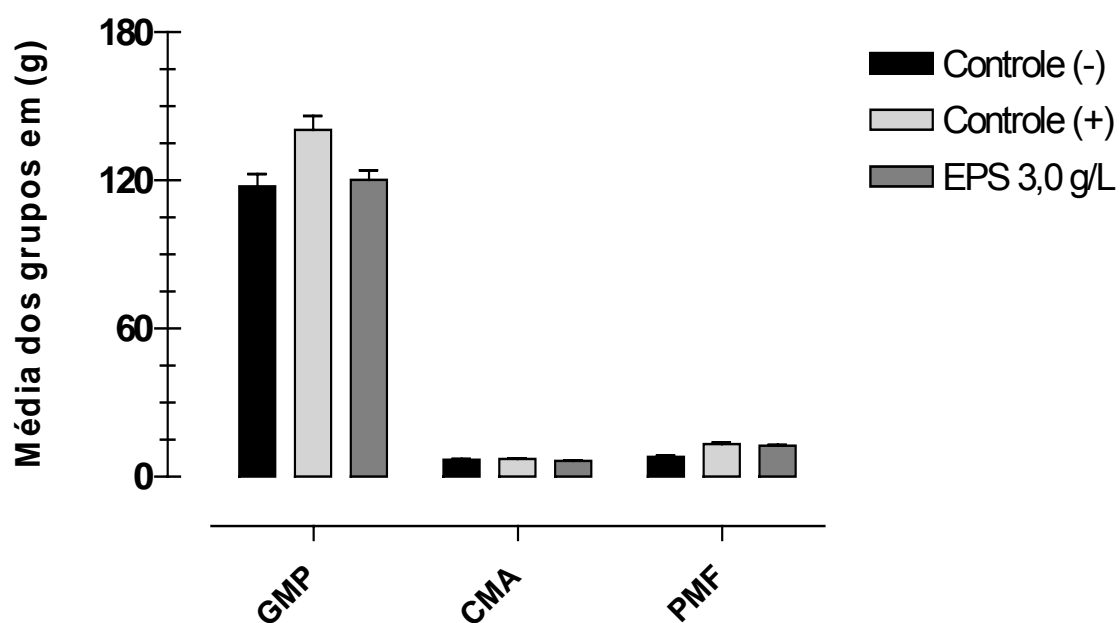
Letras iguais não diferem estatisticamente entre si

Tabela V – Efeito do botriosferana no índice aterogênico, na taxa de colesterol HDL pelo colesterol total, e nos níveis de ácidos graxos livres e glicose plasmática, em ratos hipercolesterolêmicos, após 15 dias de tratamento.

Grupos	Índice Aterogênico	HDL/Colesterol Total	Ácidos Graxos livres (moles/dl)	Glicose (mg/dl)
Controle (-)	1,20 ^(a)	0,45	265,76 ^(a)	106,97
Controle (+)	2,69 ^{(b)*}	0,27	314,09 ^{(b)*}	82,71
EPS 3,0 g/L	2,19 ^{(b)*}	0,31	313,86 ^{(b)*}	74,37

*(p<0,05) em relação ao grupo controle negativo

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si



GMP: Ganho médio de peso dos animais

CMA: Consumo médio de alimentos g/100g p.c./dia

PF: Peso dos Fígados

Figura 1: Avaliação do ganho de peso, consumo de alimento e peso dos fígados durante análise da atividade hipocolesterolêmica do botriosferana.

ANEXO D

**Instruções para preparação e submissão dos artigos científicos
para os periódicos: *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas;*
Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental
*Mutagenesis; Life Scienses***

ANEXO D –

Instruções para preparação e submissão dos artigos científicos para os periódicos: *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis; Life Scienses.*



ISSN 1516-9332 *printed version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Manuscripts' form and presentation](#)
- [The sending of manuscripts](#)

The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences/Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (RBCF) accepts for publication **Original Papers** applicable to the fields of Pharmaceutical Sciences; **Reviews and Current Comment Articles**, which are published under the Editorial Board invitation to recognized experts or when they are spontaneously submitted by the authors in the form of abstracts to have their importance evaluated. A critical vision of the subject with insertions of results of previous works in the field in relation to the state of the art in the country must be included; **Short Communications** reporting new methods and previews of works on researches of outstanding importance in which originality justify a quick publication. A maximum of 2000 words excluding tables, figures and references is an acceptable limit. One table, one figure and ten references may be added, and **Book Reviews** of the latest editions, prepared by specialists invited by the Editorial Board. **Thematic Supplements** as well as those related to scientific meetings can be published under the Editorial Board agreement.

Manuscripts can be submitted by either Brazilian or foreign

specialists written in one of the following languages: Portuguese, English or Spanish. A manuscript is accepted with the understanding that the material has not been previously published, except in abstract form, and that it is not simultaneously under consideration by any other journal. All manuscripts submitted to Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences / Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas that follow the **instructions to authors** are subject to peer review by two or more independent, anonymous referees chosen by the Scientific Editor. Additional opinions are sought by the Scientific Editor when there are substantial differences between reviewers. After being reviewed all manuscripts are forwarded to the Editorial Board for a final decision. Rejected manuscripts may be resubmitted for consideration without any reference to the previous submission as a new manuscript after being properly and significantly restructured. If revision is necessary, the authors are asked to resubmit the dated, revised manuscript incorporating the suggestions and recommendations of the referees within two months. Revisions not received within two months from the date of notice will have its process canceled. All revisions must be accompanied with a letter detailing the changes made to the original document; changes should also be indicated directly on the manuscript. Revisions may be re-reviewed at the discretion of the Scientific Editor. Papers accepted for publication will have their copyright assigned to the REVISTA. A copyright transfer form will be sent to the authors for signature together with the final proof of the paper.

The Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences edited trimestrally by the School of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, giving priority to the publication of Original Articles of Pharmaceutical Sciences. It also publishes short communications, Technical Notes and Book Reviews. By request of the Editorial Board Review Articles will be accepted for publication. Also these articles can be previously submitted in abstract form to evaluate the interest in publishing them. The provision of up-to-date information on the latest advanced areas of Pharmaceutical Sciences is one of the main services that RBCFUSP offers to its readers. Contributions written by foreign specialists are also accepted.

Manuscripts' form and presentation

STRUCTURE

Title Page: This should include the manuscript full title (it must be brief providing exact information of the contents), authors' full names, institutional affiliations (University, College, Department). Give as a foot-note the name, full address including E-mail of the corresponding author identified with an asterisk.

Summary: On a separate page, provide a summary of not more than 200 words. It must be structured and consist of four parts. Each part of the structured summary should concisely and specifically describe the objectives of the study, techniques used, the essential results and what the

authors concluded from the results.

Uniterms: These should be strictly related to the contents and limited to 6 (six).

Introduction: This should state briefly and clearly the objectives of the investigation with reference to previous works. Extensive review of the literature should be avoided and substitute for references of recent publications where such reviews may be found.

Material and Methods: These should be described in sufficient detail that the work can be reproduced. Procedures and techniques readily available in the literature require only a citation of the original source, except when they are substantially modified. Reports of experimental studies on humans and animals must certify that the research received prior approval by the appropriate institutional review body (Committee of Bioethics).

Results and Discussion: Results must be presented concisely and in logical order. Where possible use figures or tables to present data rather than text. When appropriate give the range, standard deviation and indicate the significances of differences between numerical values obtained. Discussion should interpret the results and assess their significance in relation to previous work in the field. Speculation not warranted by actual data should be avoided. Presenting those items separately is optional.

Conclusions: These must be drawn from the text and restricted to the limits of data obtained

Abstract in Portuguese: It should be preceded by the title in

Portuguese. This should follow the same content of the summary presented in English. Members of the Editorial Board can kindly assist those authors not fluent in the Portuguese language.

Uniterms in Portuguese: must follow uniterms in English.

Acknowledgments: These should be typed in a special paragraph under separate heading preceding the section of References. They should be kept to a minimum consistent with the requirements of courtesy and disclosure.

References: They should be prepared and listed according to The Brazilian Association of Technical Standards (ABNT.NBR 6023). Entries should be arranged in alphabetical order by author at the end of the paper. All authors' names should be given. "Accuracy of reference data is the responsibility of the author". For research and examples see the site www.bcq.usp.br.

PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be sent in three copies, in an official/regular sheet of paper (30-36 lines, double spaced) in the Word for Windows program or preferentially on line via <http://www.rbcf.br>. All submissions must be accompanied with a letter signed by the authors. RBCF requires that the accepted final corrected copy of each manuscript be submitted electronically (on micro floppy disk or via <http://www.rbcf.br>). Traditional paper version is also accepted.

Sending of manuscripts

Impressed manuscripts should be sent to the address
bellow:

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/*Brazilian
Journal of Pharmaceutical Sciences*

Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das
Químicas/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 950

Caixa Postal 66083

05315-970 - São Paulo - SP - Brasil

Contato telefônico: Fone: (011) 3091.3804 FAX: (011)
3097.8627

E-mail: rbcf@edu.usp.br

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Guide for Authors

Types of Articles

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) **Research papers**- papers reporting results of original, fundamental research. (II) **Short communications** of up to 5 printed pages. (III) **Rapids** - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) **Current issues** are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited **Mini-reviews** of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the *Reviews* section are invited papers in the series **Reflections in Mutation Research**, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. **Special issues**, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

On-line Submission. Authors are encouraged to submit their manuscript on-line. Via the "Authors Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Once the uploading is done, the system generates an Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. It is crucial that all graphical and tabular elements be placed within the text, so that the file suitable for reviewing. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by E-mail, and no paper correspondence is necessary. Note that compuscripts are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary.

If traditional submission is preferred articles should be submitted in triplicate (one original and two copies, and three set of original illustrations), together with an electronic version on disk, to one of the Editors (see below for addresses).

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original work and that it has not been published or submitted for publication elsewhere. It also implies the transfer of the Copyright from the author to the publisher. **General arrangement of papers.** Papers should be in English, typewritten, and double-spaced. Final versions should be accompanied by a diskette (see 'Electronic manuscripts' below). They should include **key words** (3-6 words or short phrases) and an **abstract** of up to 300 words. The Introduction should summarize the research problem and the pertinent findings. The text may be divided into sections such as Materials and methods, Results, Discussion, etc. All main sections should be numbered. In papers mentioning chemicals, authors are requested to include *CAS registry numbers*.

Preparation of text. Each manuscript should have a separate title page which includes only the title, authors' full names and complete addresses of academic or professional affiliations; the author to whom proofs and correspondence should be addressed should be indicated by an asterisk and a **telephone/fax number and e-mail address** included.

Preparation of illustrations. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>

Colour illustrations. Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. Polaroid prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g. Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only.

Tables should be typed with double line spacing and should have a heading.

References. Only papers using the numbered reference system will be accepted, i.e. references are numbered by order of citation in the text. Journal titles should be abbreviated to conform with the Chemical Abstracts Bibliographic Guide for Authors and Editors 1974.

Examples:

[1] B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.* 31 (1975) 347-363.[2] L. Ehrenberg, C.A. Wachtmeister. Safety precautions in work with mutagenic and carcinogenic chemicals, in: B.J. Kilbey, M.S. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam, 1977, pp. 401-410.

Nomenclature. Authors are requested to adopt the nomenclature system for human gene mutations recommended by the HUGO MDI Nomenclature Working Group. Guidelines for this system can be found at <http://journals.wiley.com/1059-7794/nomenclature.html>.

Proofs. When a manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are automatically sent to the corresponding author. Only printer's errors may be corrected, no changes in or additions to the edited manuscript will be accepted. To return corrected proofs by courier service, please send to: Log-in Department, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints. 25 offprints of each article are sent to the author(s) free of charge. Additional offprints can be ordered by the author(s). Offprint requests after publication will be subject to an extra charge.

Information. For enquiries relating to the submission of articles, please visit Elsevier's Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and to set-up e-mail alerts to inform you when the status of your article has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

All questions arising after acceptance of a manuscript, especially those relating to proofs, publication and reprints, should be directed to the publishers, Margaret Browne at Elsevier Science Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland; Tel: +353 61 709657; Fax: +353 61 709109, Email: m.browne@elsevier.com.

ADDRESSES FOR SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

For manuscripts originating from the Americas:

Dr. M. Shelby, N.I.E.H.S., PO Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709, USA, Fax: (1) 919 541 4634, E-mail: shelby@niehs.nih.gov

For manuscripts originating from Europe, Africa, Australasia:

Dr. R.A. Baan, WHO - International Agency for Research on Cancer (IARC), Unit of Carcinogen Identification and Evaluation, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon cedx 08, FRANCE, Tel: (33) 4 7273 8659, Fax: (33) 4 7273 8319, E-mail: baan@iarc.fr

For manuscripts originating from Asia:

Prof. H. Hayatsu, Shujitsu University, 1-6-1 Nishigawara, Okayama 703-8516, JAPAN, Fax: (81) 86 271 8257, E-mail: hayatsu@shujitsu.ac.jp

SPECIAL ISSUE COORDINATOR

Dr. David Kirkland, Covance Laboratories Ltd, Otley Road, Harrogate, North Yorkshire, HG3 1PY, United Kingdom, Tel: (44) 1423 848 401, Fax: (44) 1423 848 983, E-mail: david.kirkland@covance.com

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: www.healthinternetwork.net

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting "Public Access Policy"

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at NIHauthorrequest@elsevier.com that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Language Polishing. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Guide for Authors**LIFE SCIENCES**

GUIDE FOR AUTHORS

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Articles must be submitted electronically using the Elsevier Editorial System (EES). EES is a web-based system with full online submission, review and status update capabilities. EES allows you to upload files directly from your computer. You may access EES at <http://www.ees.elsevier.com/lfs/> If you are using EES for the first time, you must register before you submit a paper. To do so, please click on "Submit Paper", then "Not Yet Registered", to begin the registration process.

EES SUBMISSION HELP

Contact Elsevier at authorsupport@elsevier.com

For other inquiries, contact the Editorial Office: C.K. Kisthardt, Managing Editor, Life Sciences, 655 N. Alvernon Way, #119, Tucson, AZ 85711 USA. Phone: +520-321-7778; Fax: +520-321-7781; Email: lifesci@email.arizona.edu

IMPORTANT INFORMATION

1. Submission of a paper will be held to imply that the manuscript contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere.
2. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out.
3. It is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.
4. Conflict of Interest? Full Disclosure: In addition to complete contact/address of employer/institutional affiliation for all authors, all other relationships that may be perceived to potentially conflict the objectivity of any author must be fully disclosed in a footnote to the manuscript.

Natural Products Guideline

Manuscripts involving natural products should advance identification of active compounds responsible for novel observations and actions of a significant nature. Studies that fail to do so are likely to be rejected without review. All authors are encouraged to conduct studies with purified agents. All active agents must be adequately characterized. When an extract is used as a convenient source of an active agent, authors should state what the active component is and report the quantity or concentration used in the experiment. Identification should include chemical name (CAS registry number, EU number, etc), as well as common name where appropriate and the source of the chemical or agent studied.

Antioxidants blocking the effects of oxidative stress may be rejected if multiple reports of similar effects for other antioxidants have already been reported in the literature. When a compound that is an antioxidant has selective and specific actions, authors should consider alternative mechanisms rather than repeating characterization of antioxidant actions that may not be causally related, and will do little to advance our understanding of underlying mechanisms.

Suggested Referees: To expedite the review process, authors must submit names of 4-6 individuals who are qualified to review their work. Include the email address of each potential referee, as much contact information as possible, and why you feel this person is competent to review your work. In our effort to enhance global perspective and communication of science, these individuals should be associated with institutions from as many different regions as possible (Europe, North America, Asia, etc.). Exception: Symposium submissions which have been previously reviewed and approved by their Organizing Committee.

FORMATTING INSTRUCTIONS

1. Prepare the text in Microsoft Word in order to prevent conversion errors.
2. Format the manuscript as a double-spaced document with no paragraph indents.
3. Use the word-processor's word-wrap feature. Use hard returns only at the end of paragraphs.
4. Do not italicize common Latin terms (i.e., *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, *ad libitum*).

ORGANIZATION OF THE MANUSCRIPT

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case.
2. Name(s) and institutional affiliation(s) of the author(s); each author must have a complete address including city/state/country.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. Abstract of not more than 250 words.
5. Three or more key words for indexing purposes.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Figures, Figure Legends and Tables. Placement of figures and tables will be determined by the printer at the time of publication; do not indicate where they appear in the text. Upload figures and tables where indicated on the Attach Files page of EES. Legends are considered part of the manuscript and should appear following References.

Reproduction of Color Photographs: The publisher now offers the ability to publish your color artwork on the Web (e.g. Science Direct and other sites) at no additional cost?regardless of whether the artwork appears in color or black & white in print. For cost of color reproduction in print, you will receive information from Elsevier after receipt of your accepted article. For information on the preparation of electronic artwork, please see www.authors.elsevier.com/artwork
Funding Acknowledgment must appear under the Acknowledgment heading.

References: References may contain only published works and papers in press. Manuscripts submitted but not yet accepted, unpublished observations and personal communications may be acknowledged (in parentheses) in the text (including year).

Text citations

- Single author (Smith, 2003)
- Two authors (Smith and Thompson, 2003)
- Three or more authors (Smith et al., 2003) (N.B.: note period after et al.)
- Multiple references (Smith et al., 2003; Jones et al., 2003) (N.B.: note semicolon)
- Same author(s), same year (Smith and Thompson, 2000a,b,c)
- Same author(s), different years (Smith et al., 1999, 2001)

List of References

List references alphabetically. Include the full title of the article referred to, capitalizing only the initial letter of the title. Spell out all words in journal titles. Sample references:

Journal articles: Dawson, T.M., Snyder, S.H., 1991. Epidemiology of heart failure. *Journal of Neuroscience* 14(2), 5147-5149.

Books: Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. MacMillan, New York (Chapter 4)

Articles or chapters in edited books:

Cooper, C.J., Landzberg, M.J., Anderson, T.J., Jaffe, E.A. 1995. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis. In: Levi, R. (Ed.), *Biochemistry Basics*. Biopub Inc., New York, pp. 96-103.

Conferences: Angers, S., Salahpour, A., Bouvier, M., 2001. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. In: Nagao, T., Urushidani, T., Yamamura, H.I. (Eds.) *The Third International Symposium on Membrane Receptors, Signal Transduction and Drug Action*, Yokohama, Japan, March 25-26, 2000. *Life Sciences* 68(19/20), 2243-2250.

When the manuscript has been reviewed, revised if necessary and accepted:

COPYRIGHT AGREEMENT AND OFFPRINT ORDER FORM

A Transfer of Copyright Agreement and an Offprint Order Form will be sent to the corresponding author by Elsevier at the time the article begins the final production process.

AUTHOR PROOFS

Author proofs will be sent in .pdf format to the corresponding author. Return corrections to the publisher in one communication. Once your corrections have been submitted, it is not possible to incorporate later changes. Our goal is to publish articles in *Life Sciences* as quickly as possible, thus we request return of corrections to proofs within 24 hours of receipt.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.