

Avaliação da resposta biológica da Lasiodiplodana modificada quimicamente por carboximetilação sobre modelo animal de hiperglicemia

Evaluation of the biological response of Lasiodiplodia chemically modified by carboxymethylation on an animal model of hyperglycemia

André Luis Snak¹, Renan Garcia Michel¹, Luiz Augusto da Silva^{1,2}, Kelly Cristina Nogueira Soares², Carlos Ricardo Maneck Malfatti^{1,2}, Mário Antônio Alves da Cunha³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UNICENTRO), Guarapuava-PR, Brasil. ²Programa de Mestrado Promoção da Saúde (UNIGUIARÁ), Guarapuava-PR, Brasil. ³Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (PPGTP), Pato Branco-PR, Brasil.

André Luis Snak¹
andre.snak@hotmail.com
<https://orcid.org/0009-0003-7862-3312>

Renan Garcia Michel¹
re_nangm@hotmail.com
<https://orcid.org/0009-0006-6071-148X>

Luiz Augusto da Silva^{1,2}
lasilva7@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-6861-6651>

Kelly Cristina Nogueira Soares²
kelly@uniguairaca.edu.br
<https://orcid.org/0000-0003-0624-3989>

Carlos Ricardo Maneck Malfatti^{1,2}
crmalfatti@gmail.com
<http://www.orcid.com/0000-0002-1039-3034>

Mário Antônio Alves da Cunha³
mcunha@utfpr.edu.br
<https://orcid.org/0000-0002-1589-7311>

Resumo: O objetivo deste estudo foi testar em um grupo de animais diabéticos, o efeito da β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana modificada quimicamente por carboximetilação sobre a glicemia sanguínea de ratos diabéticos. Foram utilizados 30 ratos wistar machos. A indução do diabetes foi realizada pela administração de Aloxana Monohidratado, na concentração de 125 mg/kg. De forma sub-crônica, os grupos de animais receberam 5 e 15 mg/kg de β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana produzida pelo fungo Lasiodiplodia theobromae MMPI em cultivo submerso, modificada quimicamente. A duração do respectivo tratamento foi de 28 dias. Foram realizadas análises bioquímicas quantificando os níveis de Colesterol, Triglicerídeos, TGO, TGP, Ureia, Creatinina e Glicose, além da avaliação histológica dos Rins, do Pâncreas e Fígado dos animais. O grau de peroxidação lipídica foi determinado pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados obtidos demonstraram que a Lasiodiplodana Carboximetilada (LC) na concentração de 5 mg/Kg, promoveu ao final do tratamento, uma redução dos níveis de glicose capilar ao jejum de ratos induzidos ao diabetes por aloxana (ALX); o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) não apresentou mudança de comportamento nos grupos tratamento LC5 e LC15 quando comparados ao grupo Controle Salina (CS) e metformina (MET); a LC na concentração de 15 mg/Kg, promoveu redução da perda de peso nos animais diabéticos em 28% quando comparado aos animais diabético salina; a modificação química por carboximetilação da lasiodiplodana, gerou um dano superficial e profundo no tecido hepático nos animais do grupo tratamento de menor concentração; os níveis de creatinina sérica dos animais diabéticos tratados com a LC, demonstraram elevados quando comparados aos do grupo saudável e normais quando comparados ao grupo MET. Em conclusão, a LC mostrou efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por aloxana. A dose de 5 mg/kg reduziu a glicose capilar em jejum e os níveis de TBARS no fígado e rins, mas causou danos hepáticos e reduziu proteínas totais e albumina. A dose de 15 mg/kg diminuiu a perda de peso em 28%, sem impactar significativamente a glicemia ou uréia. A LC apresenta potencial terapêutico, porém sua toxicidade hepática e renal requer atenção em estudos futuros.

Palavras-chave: Hiperglicemia; Antioxidante; Toxicidade hepática; Estresse oxidativo; Modelo animal.

Abstract: The aim of this study was to test the hypoglycemic effect of β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan chemically modified by carboxymethylation in a group of diabetic animals. Thirty male Wistar rats were used. Diabetes was induced by administering Aloxan Monohydrate at a concentration of 125 mg/kg animal weight. Subchronically, the groups of animals received 5 and 15 mg/kg of β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by the fungus Lasiodiplodia theobromae MMPI in submerged culture, chemically modified. The duration of the respective treatment was 28 days. Biochemical analyses were performed to quantify the levels of cholesterol, triglycerides, AST, AST, urea, creatinine and glucose, in addition to histological evaluation of the kidneys, pancreas and liver of the animals. The results obtained demonstrated that LC at a concentration of 5 mg/kg of animal weight promoted, at the end of the treatment, a reduction in fasting capillary glucose levels in rats induced to diabetes by ALX; the OGTT did not show any change in behavior in the LC5 and LC15 treatment groups when compared to the CS and MET groups; LC at a concentration of 15 mg/kg of animal weight promoted a 28% reduction in weight loss in diabetic animals when compared to diabetic saline animals; the chemical modification by carboxymethylation of lasiodiplodan caused superficial and deep damage to the liver tissue in animals in the treatment group with the lowest concentration; the serum creatinine levels of diabetic animals treated with LC were shown to be high when compared to the healthy group and normal when compared to the MET group.

Keywords: Diabetes, Exopolysaccharide, carboxymethylation and Glycemia.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica multifatorial em que os níveis de glicose no sangue se elevam acima dos níveis plasmáticos considerados normais. É considerada uma desordem metabólica de muitas etiologias, resultante de defeitos na secreção de insulina, na sua ação no organismo ou a associação dos mesmos, que compromete o controle glicêmico dos pacientes portadores desta patologia. Os efeitos crônicos do DM incluem danos e falhas em diferentes órgãos do organismo, podendo apresentar sintomas clínicos como poliúria, polidipsia, cegueira, diminuição da sensibilidade da pele e falha renal (WHO, 2024).

Devido ao aumento do número de casos do DM, esta patologia pode ser vista como um problema de saúde pública mundial (WHO, 2024). Nesse sentido, atenção especial tem sido dispensada aos diferentes níveis preventivos do DM. A fim de melhorar a qualidade de vida dos portadores desta patologia, novas alternativas de tratamento e prevenção vem sendo estudadas por diversos grupos de pesquisa (CARVALHO et al, 2021).

Pesquisas realizadas com polissacarídeos revelam que alguns desses polímeros apresentam ações biológicas, como atividade anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti-inflamatória e tem sido descrita como efetiva no tratamento de várias enfermidades, como infecções microbianas, câncer, alterações dos níveis de colesterol e no diabetes (FATIMA e ARORA, 2023; NASCIMENTO, 2010).

Considerando a baixa solubilidade em água da *lasiodiplodana* liofilizada (BARBOSA, 2003), realizou-se a modificação química por carboximetilação para aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade, visando potencializar os efeitos hipoglicemiantes já relatados para essa classe de exopolissacarídeos (EPS) (MIRANDA-NANTES et al., 2011). Este estudo buscou avaliar o efeito hipoglicemiante da LC modificada quimicamente por carboximetilação através do tratamento subcrônico de animais hiperglicêmicos induzido por aloxana (ALX), bem como seus possíveis efeitos tóxicos no fígado e rins, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do DM.

2 METODOLOGIA

2.1. Tipo de Pesquisa

Este estudo consiste em uma pesquisa experimental aplicada.

2.2. Cepa Fúngica

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

2.3. Produção Biotecnológica da *Lasiodiplodana*

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

Inicialmente foi realizada a confecção do inóculo, onde houve a transferência uma alçada de micélio do fungo para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud com cloranfenicol. Após Incubação em estufa bacteriológica a 28 °C por 96 horas, o micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de Sais Minerais de Vogel - VMSS (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L), então cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (150 rpm). Posteriormente a pré-cultura foi homogeneizada em mixer por 30 segundos e o homogeneizado de células foi centrifugado. Para recuperar o micélio, foi adicionada água destilada esterilizada, originando uma solução padrão (inóculo) com absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm (STELUTI; GIESE e PIGGATO, 2004).

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

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

2.4 Modificação Química da *Lasiodiplodana* por Carboximetilação

O processo de carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizado seguindo protocolo descrito por Wang e Zhang (2009) com adaptações. A *lasiodiplodana* (250 mg) foi suspensa em 15 mL de isopropanol à temperatura ambiente e mantida sob agitação por 15 minutos. A seguir foram adicionados lentamente 10 mL de solução de NaOH 30% (m/v) e a mistura foi agitada a 50 °C até completa solubilização da *lasiodiplodana*. Posteriormente foram acrescentados 3 g de ácido cloroacético (suspenso em pequena quantidade de água destilada) sob agitação. A reação foi conduzida por 8 horas a 50 °C. Após o resfriamento da mistura, à temperatura ambiente, a mesma foi neutralizada com solução de HCl (0,5M). A solução resultante foi dialisada contra água destilada por 8 dias com trocas frequentes de água, usando tubos de diálise 1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich. O produto obtido do dialisado (*lasiodiplodana* carboximetilada) foi liofilizado (CUNHA et al., 2012).

2.5 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos, albinos da linhagem Wistar, com 110 dias de idade e 266 ± 15 g de peso, provenientes do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC). Os animais foram acondicionados em gaiolas, sendo 3 animais por caixa, durante todo o processo experimental em local apropriado, em condições de temperatura controlada ($26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e ausente de ruídos, com fotoperíodo 12 horas claro/12 horas escuro, tratados com ração para roedores vendida comercialmente. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todos os experimentos.

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

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

2.6 Indução ao modelo de hiperglicemia experimental

A indução ao modelo de hiperglicemia nos animais foi realizada através da aplicação de aloxana (125 mg/kg - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Para a indução, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas. Após este período realizou-se a pesagem e dosagem da glicemia de cada indivíduo na pré-indução. A aloxana foi diluída em solução salina (0,9%) e administrada por via intraperitoneal (FIGUEIREDO et al., 2022). Visto que a ALX é fotossensível, o preparo da solução foi realizado em ambiente escuro, utilizando frasco âmbar envolvido por papel alumínio para evitar contato com a luz.

A confirmação da instalação do quadro de hiperglicemia foi feita três dias após a administração do agente indutor, sendo realizada a quantificação da glicose plasmática por coleta de sangue via punção caudal, quantificando os valores através de glicosímetro da marca Accu Cheack Advantage®. Todos os animais que apresentaram glicemia superior a 150 mg/dL foram considerados hiperglicêmicos (CARDOSO et al., 2024). Os animais dos grupos controle receberam administração de solução salina (0,9%), por via intraperitoneal, na dose única e equimolar da ALX (FIGUEIREDO et al., 2022; SZKUDELSKI et al., 1998).

2.7. Protocolo Experimental

2.7.1. Administração dos Tratamentos

Os tratamentos foram administrados de forma subcrônica durante 28 dias, via gavagem. A LC foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 15 mg/mL. Para o controle positivo, utilizou-se metformina® na concentração de 5 mg/mL, também diluída em solução salina. Ambos os tratamentos foram administrados diariamente, seguindo os protocolos estabelecidos para cada grupo experimental.

2.7.2. Distribuição dos Grupos

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

Tabela 1: Formação dos Grupos Experimentais.

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

Obs.: A metformina e a LC foram administradas apenas em animais hiperglicêmicos.

2.7.3. Avaliação da Evolução Ponderal

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

2.7.4. Dosagens Glicêmicas

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

2.7.5. Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

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

2.8. Análises bioquímicas

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

2.9. Determinação de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

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

Os tubos preparados foram agitados em vórtex, mantidos em banho de água fervente por 1 hora e posteriormente resfriados em água corrente. Os tubos foram então centrifugados a 1200 rpm por 5 min. e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 535 nm para determinação da quantidade de malonaldeído/g de tecido. Cabe ressaltar que a mensuração de TBARS mede a peroxidação lipídica, detectando não apenas o MDA, mas também outros compostos reativos que interagem com o ácido tiobarbitúrico. Portanto, os resultados refletem a presença de múltiplos produtos da oxidação lipídica.

2.10. Destinação dos Animais

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

2.11. Análises Estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas de Microsoft Office Excel 2007[®] e os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 2010[®]. Inicialmente foi realizada a análise de normalidade das variáveis utilizando teste *Shapiro-Wilk*, e após, foi aplicado o teste de Levene para homogeneidade, os dados se mostraram com distribuição normal, porém, não homogêneos.

Foi realizado ANOVA para medidas repetidas para analisar diferenças temporais, considerando significância

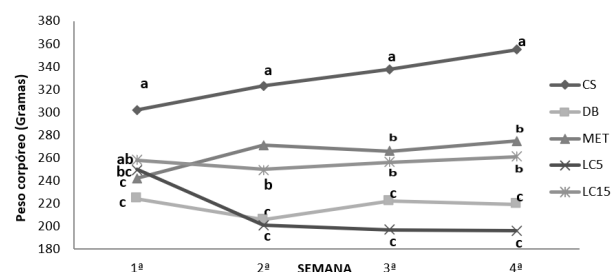
para $p < 0.05$. Para identificar as diferenças significativas foi utilizado o teste de LSD. Para a análise do TOTG, foi realizado Kruskal Wallis já que os resultados não foram normais nem homogêneos. Todos os resultados foram representados como média \pm EP na forma de gráficos ou tabelas. Os gráficos foram elaborados utilizando o software Microsoft Excel[®] (versão 2007).

3 RESULTADOS

3.1. Evolução Ponderal

Os resultados da evolução de peso corpóreo dos animais obtidos semanalmente durante o tratamento subcrônico com a LC, são apresentados na figura 01.

Figura 1: Evolução de peso corpóreo dos animais durante tratamento subcrônico com LC.



Legenda: Controle Saudável (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo Metformina 10 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). (a, b e c) letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos analisados; $p < 0.05$; Teste de Levene; ANOVA one-way). Não foi observado mortes dos animais até fim do período avaliado.

Os animais deste estudo, foram acompanhados semanalmente a fim de avaliar seu desenvolvimento ponderal. Em relação ao peso dos animais, os grupos ao início do experimento apresentavam semelhança estatística. Logo após a indução do modelo de hiperglicemia e início do tratamento, foram identificadas alterações estatisticamente significativas de peso entre os grupos em estudo, como demonstrado pela redução de peso nos grupos DB e MET de 25 e 18% respectivamente, quando comparados ao grupo CS [(CS: $300 \pm 10,3$; MET: $246 \pm 29,8$; DB: $223 \pm 25,7$) ($p < 0.05$)], na 1ª semana de tratamento.

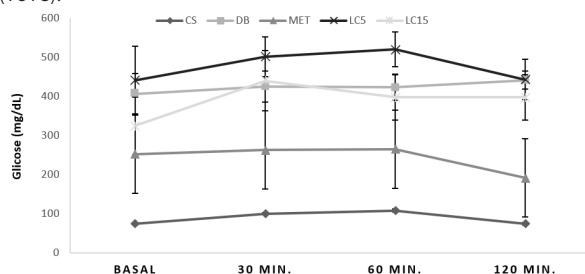
Ao transcorrer a 2ª, 3ª e 4ª semana de tratamento, a medida de peso dos animais entre os grupos permaneceu

semelhante, onde ao final do tratamento, o grupo CS diferiu de todos os outros grupos em estudo, enquanto o grupo MET diferiu somente dos grupos LC5 e DB [(2ª semana: CS: 322,8 ± 11,41; DB: 206,1 ± 23,46; MET: 271,1 ± 34,6; LC5: 201,2 ± 44,17; LC15: 258,8 ± 51,06); (3ª semana: CS: 338,0 ± 12,43; DB: 222,0 ± 27,24; MET: 265,6 ± 34,9; LC5: 196,5 ± 44,4; LC15: 288,2 ± 75,09); (4ª semana: CS: 354,5 ± 5,17; DB: 219,1 ± 29,9; MET: 274,8 ± 41,1; LC5: 196,0 ± 48,1; LC15: 287,5 ± 71,8) ($p < 0.05$)]. O grupo LC15 apresentou semelhança ao grupo MET, porém diferiu estatisticamente do grupo CS [(4ª semana: LC15: 287,5 ± 71,8; MET: 274,8 ± 41,1; CS: 354,5 ± 5,17) ($p < 0.05$)].

3.2. Teste Oral de Tolerância a Glicose

Os dados referentes à resposta da glicemia sanguínea dos animais após estímulo com concentração padrão de glicose são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Evolução da Glicemia no Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).



Legenda: Controle Saudável (CS); Controle Diabético Salina (DB); Controle Positivo - Metformina 5 mg/Kg (MET); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 5 mg/Kg (LC5); Tratamento Lasiodiplodana Carboximetilada 15 mg/Kg (LC15). Os dados foram expressos como média ± epm (Kruskal-Wallis).

O TOTG consistiu em administrar aos animais, uma dose padrão de glicose (1g/kg de peso corpóreo), realizando posteriormente de modo sequencial, dosagens de glicemia capilar nos tempos de 0 (Basal), 30, 60, e 120 minutos (GROSS & NEHME, 2002). O teste foi realizado após 14 dias de tratamento. Os valores médios de todos os pontos da curva foram analisados, demonstrando que a curva de resposta à glicose dos grupos CS e MET são diferentes estatisticamente, porém o grupo MET apresentou os menores valores entre os demais grupos, sendo próximos aos valores do grupo CS, considerados neste estudo como dentro da normalidade [(CS - Basal = 74 ± 2,65; 30 min. = 100 ± 2,38; 60 min. = 108 ± 4,03;

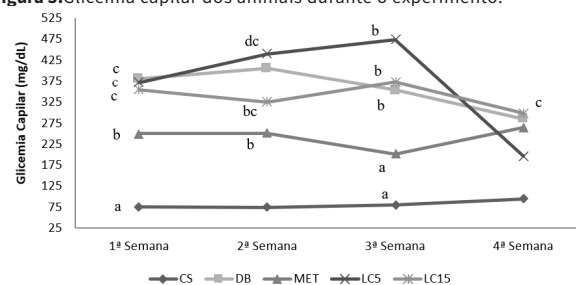
120 min. = 74 ± 3,15), (MET - Basal = 252 ± 87,11; 30 min. = 263 ± 46,36; 60 min. = 264 ± 51,32; 120 min. = 193 ± 55,40); $P < 0.05$].

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

3.3. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

Foi observado uma acentuada hiperglicemia nos animais, onde todos apresentaram média glicêmica superior a 150 mg/dL após 72 horas da administração de ALX. Este quadro se manteve durante o experimento, havendo apenas uma mudança do curso glicêmico no grupo LC5, que ao final do experimento, apresentou uma redução glicêmica significativa (Figura 3).

Figura 3: Glicemia capilar dos animais durante o experimento.



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

Na avaliação da glicemia capilar, houve diferença estatística significativa entre os grupos a partir do 7º dia de

tratamento. Ao final da primeira semana, o grupo CS e MET diferiram entre si e aos demais grupos em estudo, havendo semelhança apenas entre os grupos DB, LC5 e LC15 [(CS: 75,0 ± 3,46; MET: 250,0 ± 50,6; DB: 381,2 ± 32,7; LC5: 372,5 ± 30,3; LC15: 354,5 ± 44,4) ($p < 0.05$)]. Após a segunda semana, o grupo CS continuou diferindo dos demais grupos, ressaltando apenas a semelhança do grupo LC15 em relação ao grupo MET [(CS: 73,8 ± 2,6; DB: 406,0 ± 51,7; MET: 251,0 ± 87,1; LC5: 440,0 ± 58,0; LC15: 325,0 ± 73,8) ($p < 0.05$)].

Ao fim da terceira semana de tratamento, os grupos LC5, LC15 e DB apresentaram semelhança entre si, diferindo

do grupo CS e MET [(LC5: 474,0 ± 7,1; LC15: 373,0 ± 33,1; DB: 354,0 ± 67,7; CS: 80,5 ± 6,3; MET: 201,0 ± 60,7) ($p < 0.05$)].

Ao final da quarta semana, o grupo CS apresentou diferença significativa em relação dos demais grupos; LC5 e LC15 apresentaram semelhança ao grupo MET [(CS: 94,0 ± 14,2; DB: 285,0 ± 16,5; MET: 265,0 ± 29,9; LC5: 196,0 ± 36,9; LC15: 298,0 ± 22,2) ($p < 0.05$)].

Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos (marcadores de função renal e hepática) ao final do tratamento, são apresentados nas Tabela 02 e 03 abaixo.

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

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DB	MET	LC5	LC15
Creatinina (mg/dL)	a0,47 ± 0,02	ab0,54 ± 0,03	b0,62 ± 0,07	b0,62 ± 0,10	b0,64 ± 0,06
Uréia (mg/dL)	a38,0 ± 2,1	b64,1 ± 5,4	c92,3 ± 17,0	d155,7 ± 16,5	c88,6 ± 9,5
AST (UI/L)	a167 ± 27,2	a140 ± 26,7	a171 ± 32,6	b293 ± 10,85	a183 ± 15,7
ALT (UI/L)	a50 ± 3,9	b107 ± 15,2	b116 ± 22,8	c259 ± 11,4	b129 ± 8,7
Prot. Totais (g/dL)	a6,0 ± 0,00	b5,17 ± 0,31	a6,00 ± 0,00	c4,33 ± 0,47	ab5,4 ± 0,22
Albumina (g/dL)	a2,98 ± 0,13	a2,85 ± 0,08	a2,95 ± 0,05	b2,10 ± 0,04	c2,38 ± 0,05

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

Ao final do experimento, foi realizada a dosagem de creatinina e uréia a fim de avaliar a função renal dos animais em estudo. Em relação aos níveis de creatinina, foi evidenciada uma semelhança estatística entre o grupo CS e DB [(CS: 0,47 ± 0,02; DB: 0,54 ± 0,03); $p < 0.05$] e uma diferença estatística entre o grupo CS e os grupos tratamento LC5 e LC15 [(CS: 0,47 ± 0,02; LC5: 0,62 ± 0,10; LC15: 0,64 ± 0,06); $p < 0.05$]. Quando avaliada a concentração de ureia, o grupo CS diferiu significativamente dos grupos DB, LC5 e LC15 [(CS: 38,0 ± 2,1; LC5: 155,7 ± 16,5; LC15: 88,6 ± 9,5); $p < 0.05$]. O grupo LC15 apresentou semelhança estatística com o grupo MET e diferença com o grupo LC5 [(LC15: 88,6 ± 9,5; MET: 92,3 ± 17,0; LC5: 155,7 ± 16,5); $p < 0.05$].

Em relação aos marcadores de lesão hepática, houve um aumento significativo de 75% da atividade de AST no grupo LC5, quando comparado ao grupo CS [(LC5: 293 ± 10,85; CS: 167 ± 27,2); $p < 0.05$], e uma elevação de 71% na atividade quando comparado ao grupo MET [(LC5: 293 ± 10,85; MET: 171 ± 32,6); $p < 0.05$]. Para AST, os grupos LC15, MET, DB e

CS não diferiram estaticamente entre si. Quando avaliada a atividade de ALT, foi evidente a elevação dos valores do grupo LC5, onde o mesmo apresentou uma elevação de 419% de sua atividade quando comparado ao grupo CS [(LC5: 259 ± 11,4; CS: 50 ± 3,9); $p < 0.05$] e uma elevação de 123% na comparação com grupo MET [(LC5: 293 ± 10,85; MET: 116 ± 22,8); $p < 0.05$]. Para ALT o grupo CS diferiu estatisticamente de todos os outros grupos em estudo ($p < 0,05$).

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

Em relação as proteínas totais, o grupo LC5 diferiu estatisticamente de todos os outros grupos em estudo e seus níveis séricos apresentaram uma redução de 28% quando comparado ao grupo CS [(LC5: 4,33 ± 0,47; CS: 6,0 ±

0,00); $p < 0.05$] e de forma semelhante, uma redução de 16% na comparação com o grupo DB [(LC5: $4,33 \pm 0,47$; DB: $5,17 \pm 0,31$); $p < 0.05$]. Ainda em relação as proteínas totais, o grupo tratamento LC15 apresentou semelhança estatística com os grupos MET, DB e CS [(LC15: $5,4 \pm 0,22$; MET: $6,0 \pm 0,00$; DB: $5,17 \pm 0,31$; CS: $6,0 \pm 0,00$); $p < 0.05$].

Quando avaliada as concentrações de albumina sérica nos animais, foi possível evidenciar uma diferença estatística entre os grupos em estudo, onde o LC5 e LC15 diferiram-se entre si e aos demais grupos em estudo, sendo evidente uma redução da concentração de albumina no grupo LC5 de 29% em relação ao grupo CS [(LC5: $2,10 \pm 0,04$; CS: $2,98 \pm 0,13$); ($p < 0,05$)] e de 26% em relação ao grupo DB [(LC5: $2,10 \pm 0,04$; DB: $2,85 \pm 0,08$); $p < 0.05$]. No grupo LC15, de forma semelhante, houve uma redução de 36% da concentração de albumina em relação ao grupo CS [(LC15: $2,39 \pm 0,05$; CS: $2,98 \pm 0,13$); $p < 0.05$] e 16% em relação ao grupo DB [(LC15: $2,38 \pm 0,05$; DB: $2,85 \pm 0,08$); $p < 0.05$].

Em relação as dosagens dos lipídeos, em um estudo de padronização dos valores de parâmetros bioquímicos em ratos realizado por Lima et al. (2014), os níveis normais de colesterol total permaneceram na faixa de $60,68 \pm 6,51$ mg/dL. Em um outro estudo realizado por Dantas et al. (2006), os níveis encontrados permaneceram na faixa de $87 \pm 18,1$ mg/dL. Neste estudo, os valores de colesterol total em animais saudáveis, condizem com o encontrado na literatura, conforme apresentado na Tabela 3.

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

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CS	DB	MET	LC5	LC15
Colesterol (mg/dL)	$67,50 \pm 5,92$	$72,23 \pm 1,73$	$88,67 \pm 8,37$	$74,67 \pm 14,08$	$78,60 \pm 4,70$
Triglicérides (mg/dL)	$a48,00 \pm 3,37$	$ab86,67 \pm 7,99$	$abc116,33 \pm 35,67$	$bc193,30 \pm 66,14$	$c201,60 \pm 3,35$

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

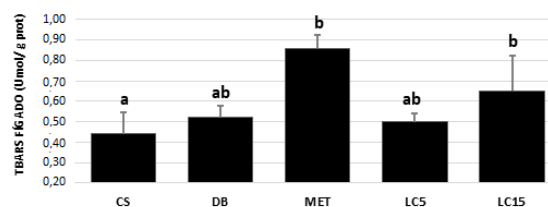
Diferente do colesterol total, quando quantificado os níveis de triglicérides, foi possível identificar a presença da hipertrigliceridemia nos grupos tratamento LC5 e LC15. Na

comparação entre os grupos, houve um aumento significativo de 301% da concentração de triglicérides no grupo LC5 em relação ao grupo CS [(CS: $48,00 \pm 3,37$; LC5: $193,3 \pm 66,14$); $p < 0.05$], no entanto o grupo LC5 apresentou semelhança estatística aos demais grupos. No grupo LC15, houve um aumento significativo de 320% e 80% respectivamente quando comparada aos grupos CS e DB [(CS: $48,00 \pm 3,37$; DB: $86,67 \pm 7,99$; LC15: $201,6 \pm 3,35$); $p < 0.05$].

3.4. Níveis de Peroxidação Lipídica

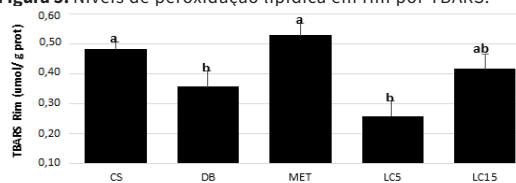
Os resultados dos efeitos da LC na peroxidação lipídica no fígado e rins dos animais hiperglicêmicos induzidos por ALX são apresentados nas Figuras 04 e 05, respectivamente.

Figura 4: Níveis de peroxidação lipídica em fígado por TBARS.



Valores de TBARS para fígado. Dados representam a média \pm epm ($n=30$). (a,b letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos analisados; $p < 0.05$; Teste de Levene; ANOVA para medidas repetidas).

Figura 5: Níveis de peroxidação lipídica em rim por TBARS.



Valores de TBARS para rim. Dados representam a média \pm epm ($n=30$). (a,b, c e d) letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos analisados $p < 0,05$; Teste de Levene; ANOVA para medidas repetidas).

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

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

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

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

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, os grupos de animais em experimentação apresentaram diferenças significativas em relação a diferentes parâmetros avaliados. Em relação à evolução ponderal e estado geral dos animais do grupo DB, foi observado alterações características muito similares ao quadro de hiperglicemia em humanos, que contrasta completamente da evolução dos animais saudáveis. O grupo CS ao longo do experimento, apresentou um bom estado geral, com animais ativos, apetite dentro da normalidade, tônus e reflexos conservados, além do ganho progressivo de peso e manutenção da ingestão hídrica e alimentar. Por outro lado, o comportamento dos animais do grupo DB foi diferente, sendo caracterizado por apatia, alterações da pelagem, odor forte da urina, anorexia, além do comprometimento acentuado e progressivo do estado geral dos animais. Esses achados também estão em consonância com estudos mais recentes,

que reforçam a utilidade de modelos animais induzidos por aloxano ou estreptozotocina para a compreensão das alterações fisiopatológicas associadas à hiperglicemia (Singh et al. 2024; Kottaisamy, 2021; Lerco, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o tratamento com a LC na concentração de 15 mg/Kg (LC15), foi capaz de reduzir a perda de peso nos animais diabéticos em 24%, quando comparados aos animais do grupo DB, podendo ser comparado ao grupo MET, o qual apresentou uma redução de 20% em relação ao grupo DB. Estes dados corroboram para comprovar que a LC em determinada concentração, reduz significativamente a perda de peso nos animais diabéticos, podendo ser comparada a Metformina[®], um agente hipoglicemiante utilizado clinicamente em humanos que possuem o DM tipo 2. Esses resultados ganham relevância frente ao estudo de Pires et al. (2023), que demonstrou que a carboximetilação de polímeros derivados de *Lasiodiplodia theobromae* potencializa suas atividades biológicas, embora sem investigar efeitos sobre peso corporal em modelos diabéticos. Estudos anteriores sobre a *Lasiodiplodana* nativa apontaram efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes, porém também não abordaram alterações ponderais em animais diabéticos (Túrmina et al., 2012; Cunha et al., 2012). Assim, os achados deste trabalho se tornam pioneiros ao evidenciar que a LC15 atenua a perda de peso de forma comparável à metformina, preenchendo uma lacuna importante na literatura.

O grupo LC5 ao final do tratamento apresentou um comportamento totalmente diferente das semanas anteriores, onde os níveis glicêmicos tiveram uma redução de forma abrupta, logo que, o comportamento glicêmico era de constante elevação, surgindo então uma instabilidade da média glicêmica do grupo. Para explicar a redução glicêmica abrupta do grupo LC5 ao final do tratamento, podemos relacionar a mesma com a redução do consumo ração e da ingestão hídrica dos animais, o aumento dos níveis das enzimas hepáticas, a redução dos níveis de proteínas totais e albumina, além da elevação dos marcadores de função renal, o que sugere um agravamento das condições clínicas dos animais induzidos à hiperglicemia por ALX.

Os resultados obtidos neste estudo utilizando a LC, não correspondem aos encontrados em outros trabalhos que

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

De acordo com Patel et al. (2024), ratos Wistar saudáveis apresentaram valores de referência para AST entre aproximadamente 85,7 e 213,3 U/L e para ALT entre 22,7 e 45,6 U/L, com variação conforme sexo e idade. Além disso, a carboximetilação da *Lasiodiplodana theobromae* já demonstrou potencial biológico aprimorado em estudos in vitro, mas não houve investigação prévia sobre seu impacto nas aminotransferases em modelos animais diabéticos (Pires et al., 2023). Esses dados enfatizam a relevância de seu estudo ao revelar diferenças nos níveis de AST e ALT mesmo entre animais saudáveis, e ao trazer à tona lacunas sobre os efeitos da *Lasiodiplodana* carboxilada nesse contexto.

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

Os efeitos negativos da dose de 5 mg/kg de LC ao longo do tempo devem ser melhor investigado. Embora essa dose tenha demonstrado redução significativa da glicose capilar em jejum e dos níveis de TBARS, também foi associada a danos hepáticos, redução de proteínas totais e albumina sérica, além de instabilidade glicêmica no final do tratamento. Esses resultados indicam que, apesar do potencial hipoglicemiante e antioxidante inicial, a dose de 5 mg/kg pode causar efeitos adversos significativos com o uso prolongado.

Para avaliar a função hepática dos animais após o tratamento, foram realizadas dosagens séricas de PT e ALB, onde os resultados obtidos apresentaram variações

significativas. Em estudos avaliando os valores de proteínas séricas em ratos saudáveis da linhagem Wistar, Lima et al. (2014), consideraram a faixa de normalidade para proteínas totais entre $5,75 \pm 0,87$ g/dL e para albumina $2,65 \pm 0,30$ g/dL. Carvalho et al. (2009) em um trabalho sobre o perfil bioquímico de ratos da mesma linhagem encontraram valores médios de proteínas totais de $6,15 \pm 0,07$ e $2,76 \pm 0,27$ para albumina. Ambos os valores vão de encontro com os resultados obtidos dos animais saudáveis deste estudo.

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

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

Após a quantificação dos níveis de albumina sérica, foi identificado uma importante redução nos grupos tratamento LC5 e LC15. Porém a ausência de estudos com a *lasiodiplodana* carboximetilada dificultou uma comparação dos níveis de albumina a outros estudos. Segundo Burt et al. (2011), a redução dos níveis de albumina pode estar relacionada com doenças renais ou hepáticas, desnutrição e infecções crônicas. Neste estudo foi evidente o comprometimento hepático nos animais do grupo tratamento, juntamente com o agravamento do estado geral e nutricional dos animais, o que explica a redução dos níveis séricos de albumina.

Os valores de creatinina quantificados no soro dos animais do grupo CS, condiz com estudos prévios de padronização dos parâmetros de função renal de ratos saudáveis, os quais foram relatados em estudos realizados por Dantas et al. (2006) que identificaram a média dos níveis normais de creatinina em ratos saudáveis ($0,50 \pm 0,07$ mg/dL). Em relação aos grupos tratamento LC5 e LC15, os mesmos não apresentaram um efeito protetor a nível renal, pois diferiram estatisticamente do grupo CS, sendo evidente a elevação de creatinina sérica nestes grupos. Porém não foi possível identificar se esta elevação está relacionada ao modelo de indução ao diabetes ou a substância carboximetilada em estudo.

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

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

A utilidade clínica da ureia depende da determinação em conjunto da creatinina, um marcador que neste

estudo demonstrou normalidade para animais induzidos a hiperglicemia. O nível de ureia serve como um índice preditivo da insuficiência renal sintomática e de desordens hepáticas (GARCIA & KANAAN 2008). Nota-se neste estudo que a ureia teve sua elevação de modo proporcional às enzimas hepáticas, trazendo evidências importantes para comprovar que a LC é capaz de gerar um efeito tóxico a nível hepático, porém não tóxico a nível renal.

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

Os grupos de animais avaliados no presente trabalho não apresentavam hipercolesterolemia. Seus valores de colesterol total não diferiram entre os grupos controles e tratamentos [(CS: $67,50 \pm 5,92$; DB: $72,23 \pm 1,73$; MET: $88,67 \pm 8,37$; LC5: $74,67 \pm 14,08$; LC15: $78,60 \pm 4,70$); $p < 0,05$], mostrando que o efeito hipocolesterolêmico da lasiodiplodana relatado por Túrmina (2012) não é ampliado e nem mantido após o processo de carboximetilação desta molécula.

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

A literatura recente evidencia que exopolissacarídeos apresentam atividade antioxidante relevante, frequentemente avaliada pelo ensaio de TBARS como marcador de peroxidação lipídica. Patel et al. (2024) destacam que a interpretação de parâmetros bioquímicos, como AST e ALT, é essencial para compreender potenciais efeitos hepatoprotetores de compostos bioativos em modelos

animais. Nesse contexto, Pires et al. (2023) demonstraram que a carboximetilação de polissacarídeos derivados de *Lasiodiplodia theobromae* potencializa suas atividades biológicas, embora ainda faltem estudos específicos que explorem sua ação antioxidante em modelos crônicos de diabetes. De forma complementar, Kumar et al. (2025) apontaram que as variações em marcadores de estresse oxidativo dependem da linhagem e da idade dos animais, reforçando a necessidade de padronização metodológica na análise dos níveis de TBARS em pesquisas futuras.

No presente estudo que se avaliou os níveis de TBARS em tecidos após tratamento subcrônico com a lasiodiplodana carboximetilada, foi evidente a redução dos níveis de TBARS na concentração de 5 mg/Kg, efeito contrário ao grupo LC15 (15 mg/Kg) que não apresentou o efeito redutor. As substâncias antioxidantes, presentes nos exopolissacarídeos, podem estar relacionadas a essa queda de peroxidação lipídica, devido à capacidade de reagir com os radicais livres (SHIMIZU, 2004). Outro fator que pode ter influenciado o comportamento distinto dos grupos tratamento, em parte, inclui a modificação química da molécula por carboximetilação e as concentrações utilizadas, pois em pequenas doses (5mg/Kg peso animal), o efeito redutor foi evidenciado, o que não ocorreu em uma concentração maior (15mg/Kg peso animal).

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

5 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a LC apresenta efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por aloxana. A dose de 5 mg/kg reduziu significativamente a glicose capilar em jejum e os níveis de

TBARS no fígado e rins, indicando uma possível atividade antioxidante. No entanto, essa dose também causou danos hepáticos e reduziu os níveis de proteínas totais e albumina sérica. A dose de 15 mg/kg reduziu a perda de peso em 28%, mas não impactou significativamente a glicemia ou os níveis de ureia. Conclui-se que a LC possui potencial terapêutico, mas sua toxicidade hepática e renal requer mais investigações em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, H. et al. Hemoglobin A1C in non-diabetic patients: an independent predictor of coronary artery disease and its severity. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 102, n. 3, p. 225–232, dez. 2013. doi: 10.1016/j.diabres.2013.10.011.
- BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of *Botryosphaeran*: a (1→3-1→6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691–1698, 2003.
- BURT, A. D. et al. MacSween's Pathology of the Liver. 6. ed. Elsevier Health Sciences, 2011.
- CARDOSO, A. R. G. et al. Diabetes Mellitus: diagnóstico, avaliação e tratamento. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 7435–7446, 2024.
- CARVALHO, A. C. et al. Plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes Mellitus: Uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 12873–12894, 2021.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Biologic Activity and Biotechnological Development of Natural Products. **BioMed Research International**, Article ID 971745, 4 p., 2013.
- CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and antiproliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179–1188, 2012.
- DANTAS, J. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165–170, 2006.
- FATIMA, T.; ARORA, N. K. Structural, compositional characterization of novel exopolysaccharide from halotolerant strain of *Pseudomonas entomophila* PE3 and their role in growth promotion of sunflower under saline condition. **Environmental and Experimental Botany**, v. 213, 105418, 2023.
- FREITAS, F. et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

- FIGUEIREDO, A. C. Efeitos da injeção de LPS, da alimentação e da alimentação contaminada na modulação do sistema imune e endócrino de rãs (*Lithobates catesbeianus*). 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
- GARCIA, M. A. T.; KANAAN, S. **Bioquímica Clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.
- GROSS, J. L.; NEHME, M. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, 2002.
- HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, 2008.
- KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 2015. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.045.
- KIHO, T. et al. Polysaccharides in fungi. XXXV: Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1627–1629, 1995.
- KOTTAISAMY, C. P. D.; RAJ, D. S.; MANIYARASAN, S.; ARULKUMARAN, K. S.; SURESH, S. *Experimental animal models for diabetes and its related complications – a review*. **Laboratory Animal Research**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00101-4>
- KUMAR, A. et al. Hematology and serum biochemistry reference values of Sprague Dawley and Wistar rats at different age groups. **Journal of Laboratory Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 15-28, 2025. DOI: <https://doi.org/10.11607/jlas.20109>
- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 135, 2003.
- MIRANDA, C. C. B. O. et al. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 172–177, 2008.
- NASCIMENTO, M. S. Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum*. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.
- PATEL, J. et al. Reference values for clinical chemistry and hematology parameters in Wistar rats at different ages. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1363766, 2024. doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1363766>
- PEREIRA, A. V. S. Sensibilidade a Fungicidas e Adaptabilidade de *Lasiodiplodia theobromae* Patogênico ao Mamão. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- PIRES, A. C. S. et al. Some new insights into the biological activities of carboxymethylated polysaccharides from *Lasiodiplodia theobromae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124505, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124505>
- REIS, J. S. et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, 2008.
- SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 2, p. 181–188, 2004.
- SINGH, M.; SINGH, A.; YADAV, A.; SHARMA, P. *Animal models for type 1 and type 2 diabetes: advantages and limitations*. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, p. 1-14, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1359685>
- SZKUDELSKI, T. et al. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiological Research**, v. 47, p. 343–346, 1998.
- STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*, grown on different carbohydrate carbon source, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480–486, 2004.
- TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological assessment of β -(1→6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14298–14309, 2012. doi: 10.3390/molecules171214298.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42–47, 1956.
- WANG, Z.; ZHANG, J. Abundant indispensable redundancies in cellular metabolic networks. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, p. 23–33, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2021. Results. Institute for Health Metrics and Evaluation. 2024. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>.
- YUAN, C. et al. Evaluation of antioxidant and immune activity of Phellinus ribis glucan in mice. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 581–584, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.015>.