

## Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de um biopolímero extraído do microorganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos *Swiss*

Milka Selestina Primo,<sup>1</sup> Caroline Maria Calliari,<sup>2</sup> Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez,<sup>2</sup> Mariana de Oliveira Mauro,<sup>3</sup> Mário Sérgio Mantovani,<sup>4</sup> Rodrigo Juliano Oliveira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudo em Nutrição e Genética Toxicológica, Departamento de Nutrição, Centro Universitário Filadélfia, Av. Juscelino Kubitschek, 1626, Centro, 86020-000-Londrina-PR, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86055-900, Londrina-PR, Brasil,

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Av. 24<sup>a</sup>, no 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro-SP, Brasil,

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86055-900, Londrina-PR, Brasil,

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal; Coordenadoria de Educação Aberta e a Distância, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Caixa Postal 549, 79070-900, Campo Grande-MS, Brasil.

**RESUMO:** A presente pesquisa avaliou a ação mutagênica e antimutagênica de um biopolímero de glucose extraído da *Agrobacterium radiobacter* (Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter*). O experimento foi realizado com camundongos *Swiss* machos divididos em oito grupos. O tratamento com o biopolímero foi realizado por gavagem em dose única concomitante a uma dose de solução tampão fosfato nos grupos de avaliação da mutagenicidade, ou ao agente indutor de danos no DNA, ciclofosfamida, na concentração de 50 mg/kg (peso corpóreo - *p.c.*), nos grupos de avaliação da antimutagenicidade. Utilizou-se o teste de micronúcleo em sangue periférico e a coleta de sangue foi realizada 24 e 48 h após a aplicação das substâncias-teste. A análise estatística demonstrou que o biopolímero não possui atividade mutagênica e que é efetivo em prevenir danos no DNA. As porcentagens de redução de danos nos grupos de antimutagenicidade foram de 83,9%, 89,1% e 103,1% em 24 h e 101,24%, 98,14% e 120,64% em 48 h para as doses de 75, 150 e 300mg/kg (*p.c.*), respectivamente. A alta porcentagem de redução de danos associada à ausência de efeitos mutagênicos indica, além da atividade quimioprotetora, a possibilidade do biopolímero ser um alimento funcional candidato à utilização como co-adjuvante na quimioterapia para prevenir efeitos colaterais.

**Unitermos:** Curdlana, biopolímero, *Agrobacterium radiobacter*,  $\beta$ -glucana, antimutagenicidade, camundongos *Swiss*.

**ABSTRACT:** "Assessment of mutagenicity and antimutagenicity of a biopolymer extracted from the microorganism *Agrobacterium radiobacter* in mice." This study evaluated the mutagenic and ant mutagenic action of a biopolymer of glucose extracted from *Agrobacterium radiobacter* (Biopolymer of *Agrobacterium radiobacter*). The experiment was conducted with *Swiss* male mice divided into eight groups. Treatment with the biopolymer was performed in a single dose by gavage at a dose of concomitant phosphate buffer groups in the evaluation of mutagenicity, or the agent of inducing DNA damage, cyclophosphamide, the concentration of 50 mg/kg (body weight - *b.w.*), in groups of assessment ant mutagenic. We used the micronucleus test in peripheral blood. The blood sample was held 24 and 48 h after application of the test substances. Statistical analysis showed that the biopolymer has no mutagenic activity and it is effective in preventing damage to DNA. The percentages of damage reduction in groups of ant mutagenic were 83.9%, 89.1% and 103.1% in 24 h and 101.24%, 98.14% and 120.64% at doses of 48 to 75, 150 and 300 mg/kg (*b.w.*) respectively. The high percentage of damage reduction associated with the absence of mutagenic effects indicates the possibility of biopolymer chemoprotection action. It can also be considered a functional food candidate to be used as co-adjutant chemotherapy to prevent side effects.

**Keywords:** Curdlana, biopolymer, *Agrobacterium radiobacter*,  $\beta$ -glucan, antimutagenic, *Swiss* mice

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos foi possível observar uma mudança radical nos hábitos de vida das populações humanas, em especial nos hábitos alimentares (Bleil, 1998). A predominância de alimentos ricos em calorias, gorduras e açúcares, tem conseqüências diretas sobre a obesidade, doenças do coração e desenvolvimento de alguns tipos de câncer, e associados a uma vida mais sedentária, colocam em perigo a saúde humana (Pereira et al., 2003; Cervi et al., 2005; Fortes et al., 2007; Hass et al., 2007).

A etiologia do câncer é bastante complexa (Azevedo & Mendonça 1993; Neves, 2002), e diversos fatores estão envolvidos na gênese da maioria das neoplasias malignas (Wunsch-Filho & Zago, 2005), ou seja, o câncer provavelmente é determinado pela soma e/ou combinação de fatores, e não por um em particular (Rossit et al., 2000). Frente ao grande número de novos casos de câncer de cólon, entende-se que técnicas de prevenção, diagnóstico precoce e investimento em um novo conceito alimentar se fazem necessários.

Uma das alternativas para se produzir alimentos com reduzido teor de gordura é a substituição parcial ou total desta por fibras. A goma curdlana faz parte da família de  $\beta$ -glucanas, que são consideradas pela comunidade científica como fibras não digeridas em humanos, devido à ausência de enzimas capazes de quebrar as ligações glicosídicas presentes nestas (Cunha, 2002; Cunha et al., 2004).

A *Agrobacterium radiobacter* variedade k84 é um microrganismo pertencente à família *Rhizobiaceae* tipicamente encontrada no solo, próximo às raízes de plantas. Esta bactéria, gram negativa, aeróbia, não-patogênica e não formadora de esporos (EPA, 2005), é produtora da goma curdlana (polímero de D-glucose com ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)) (Saudagar & Singhal, 2004), um ingrediente novo na indústria alimentícia. Contudo o consumo desta goma foi aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration*, em quantidade diárias de até 1,814 g/kg, como um aditivo alimentar capaz de acarretar perda de peso por não contribuir com valor calórico em alimentos (Funami et al., 1998; Spicer et al., 1998). Quando hidratada e aquecida, suas partículas imitam a palatabilidade característica de produtos elaborados com gordura. Além disso, a curdlana liga-se à água presente no sistema tornando-a indisponível para a cristalização, diminuindo a absorção de óleo em produtos fritos e a migração de água para a superfície do produto durante a armazenagem (Funami et al., 1998a,b).

Acredita-se que a molécula de  $\beta$ -glucana, e talvez junto a esta pudesse acrescentar a curdlana e/ou o biopolímero em estudo, independentemente de sua origem (cereais, leveduras, fungos e outros) parece demonstrar uma boa atividade antimutagênica (Oliveira et al., 2006, 2007 e 2009). Estudos relatam para esta molécula uma boa atividade antimutagênica, antígenotóxica apesar de alguns

autores indicaram capacidade genotóxica e mutagênica quando a mesma é utilizada em altas concentrações. Os seus efeitos de prevenção de lesão no DNA são bem caracterizados em estudos com ciclofosfamida, metilmetanosulfonato, adramicina, benzopireno dentre outros compostos (Charvatovicová, 1991; Charvatovicová et al., 1998; Slameňová et al., 2003; Tohamy et al., 2003; Angeli et al., 2006; Oliveira et al., 2006, 2007; Angeli et al., 2009a; Angeli et al., 2009b; Oliveira et al., 2009).

Frente a estes relatos ainda é lícito salientar que o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* não pode ser classificado como uma curdlana, visto que suas ligações não foram totalmente descritas e o seu grau de pureza, em relação aos resíduos de glucose, é menor que os 90% encontrados nesta goma.

No entanto, assume-se que o biopolímero em estudo possa ser usado segundo as mesmas recomendações e que possivelmente ofereça aos mesmos benefícios descritos para a curdlana. Porém, diante de escassos relatos na literatura a respeito dos efeitos deste biopolímero sobre a molécula de DNA (possíveis efeitos tóxicos ou preventivos), o presente trabalho estudou os efeitos mutagênicos e antimutagênicos do polissacarídeo extraído do microorganismo *Agrobacterium radiobacter* denominado aqui como biopolímero e que apresenta características de uma fibra solúvel rica em minerais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Agente indutor de danos no DNA

Para a indução de danos no DNA utilizou-se o agente alquilante, de ação indireta, ciclofosfamida (Fosfaseron<sup>®</sup>), na concentração final de 50,0 mg/kg de peso corpóreo (*p.c.*), administrada por via intraperitoneal (*i.p.*), diluída em solução tampão fosfato (PBS), livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , pH 7,4. Este quimioterápico e imunossupressor tem sua ativação realizada principalmente no fígado e os seus metabólitos provocam potente ação mutagênica.

### Agente quimioprotetor

A extração do biopolímero foi realizada a partir do melaço de cana de açúcar utilizado como fonte de carbono para a extração do biopolímero pela *Agrobacterium radiobacter* k84. Esta bactéria foi mantida em meio inclinado manitol-levedura-ágar (1,0% manitol, 0,02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,02%  $\text{MgSO}_4$ , 0,01% NaCl, 0,25% extrato de levedura e 1,5% ágar). O caldo de cultivo composto de melaço de cana de açúcar 4° Brix (concentração definida em testes prévios), 1,2% de extrato de levedura (Cunha, 2002; Cunha et al., 2004) e traços de sais minerais (Phillips & Lawford, 1983) foi utilizado para a preparação do pré-inóculo (48 h) e do inóculo (24 h) da bactéria a 28 °C, 150 rpm. Um novo meio foi inoculado (10% v/v) e mantido em incubadora refrigerada com agitação (TE421, Tecnal) a 28

°C, 150 rpm, durante 120 h para a produção do biopolímero. A biomassa foi separada em centrífuga (Eppendorf 5804R) a 12000xg, 30 min, 4 °C e o biopolímero precipitado do sobrenadante com etanol absoluto frio (3:1 v/v), 24 h, 4 °C. A biomassa e o biopolímero obtidos foram desidratados a 45 °C overnight, pesados e triturados.

As soluções aquosas do biopolímero utilizadas no experimento *in vivo* foram de três diferentes concentrações 75, 150 e 300 mg/kg (*p.c.*) e a administração foi feita por via oral (*v.o.*).

### Caracterização química do biopolímero

Após a obtenção do biopolímero o mesmo passou por etapas de caracterização com o objetivo de quantificar os elementos presentes.

Composição centesimal: a composição centesimal do biopolímero foi determinada utilizando metodologia oficial da AOAC (AOAC, 1995). O conteúdo de carboidratos foi calculado por diferença e confirmado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956).

Fibra alimentar: foi realizada a determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel do biopolímero pelo método enzimático-gravimétrico n° 985.29 da AOAC (1995), utilizando o *kit* Sigma® (TDF 100A) e tampão MES-TRIS.

Minerais: a amostra de biopolímero (0,4 g) foi digerida em 3 mL de solução nitroperclórica (HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub>, 3:1) a 150 °C durante 5 h. Após diluição, a determinação dos minerais da amostra foi realizada por espectrometria de emissão de plasma (ICP-ICAP 61E, Thermo Jarrel Ash Corporation) e a quantificação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, determinada em fotômetro de chama (Micronal).

Monossacarídeos: o biopolímero foi hidrolisado em HCl 2N (biopolímero:HCl, 1:3) a 105 °C, 16 h e a solução obtida foi filtrada, concentrada em evaporador (Tecnal TE-210), ressuspensa em metanol e conduzida à evaporação. Cromatografia de camada delgada foi aplicada para identificação dos monossacarídeos, utilizando glucose (1 mg/mL) como padrão. O eluente utilizado foi clorofórmio:metanol:ácido acético:água [4:4:1:1 (v/v/v/v)]. A revelação foi realizada borrifando solução de anisaldeído:ácido sulfúrico:ácido acético [1:2:100 (v/v/v)] sobre a placa que foi mantida em estufa a 110 °C, 10 min para visualização sob luz ultravioleta de onda curta de 365 nm (Moreira et al., 1998).

### Animais e delineamento experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (n=72), em idade reprodutiva, cerca de 60 dias, com peso médio de 30 g, provenientes do Centro de Estudos em Nutrição e Genética Toxicológica (CENUGEN) do Centro Universitário Filadélfia, Londrina, PR, Brasil. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, em comunidades (nove animais por grupo/caixa) e passaram

por um período mínimo de adaptação correspondente a duas semanas. A luminosidade e temperatura foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 h de claro: 12 h de escuro) com temperatura mantendo-se em torno de 22±2 °C e umidade média de 55±10%. A alimentação foi constituída de água filtrada e ração comercial Nuvilab®, *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais. O tratamento com o biopolímero foi realizado por gavagem (via oral por intubação intragástrica - *v.o.*) em dose única. O grupo controle negativo (Grupo 1) recebeu os solventes da ciclofosfamida e biopolímero. Assim sendo, no primeiro caso, recebeu solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>, pH 7,4, estéril, no volume de 0,1 mL/10 g *p.c.*, *i.p.* Já no segundo caso, água destilada na proporção de 0,1 mL/10g *p.c.*, *v.o.* O grupo controle positivo (Grupo 2) recebeu ciclofosfamida na concentração de 50 mg/kg *p.c.*, *i.p.* e água destilada no volume de 0,1 mL/10 g *p.c.*, *v.o.* Os grupos constituídos para a avaliação da mutagenicidade, Grupos 3, 4 e 5, receberam o biopolímero, obtido de *Agrobacterium radiobacter*, nas doses de 75, 150 e 300 mg/kg *p.c.*, *v.o.*, respectivamente, e uma dose de PBS *i.p.* Os grupos de avaliação da antimutagenicidade, Grupos 6, 7 e 8, receberam o biopolímero *v.o.*, nas doses anteriormente mencionadas, simultaneamente a uma dose de ciclofosfamida *i.p.*

Os grupos experimentais foram submetidos à coleta de sangue periférico, para avaliação de potenciais mutagênico e/ou antimutagênico, pelo teste de micronúcleo em sangue periférico, por meio de punção da veia caudal após 24 e 48 h decorridas do tratamento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL (CEEA n° 50/05; Protocolo 30877/04) e realizado segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA (2004).

### Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para a avaliação do ensaio do micronúcleo (MN) utilizou-se a técnica descrita por Hayashi et al. (1990) com modificações. Para tanto, uma gota de sangue periférico foi depositada em uma lâmina previamente preparada com uma camada formada por 20 µL de Laranja de Acridina (1,0 mg/mL). Cobriu-se a mesma com uma lamínula e estas permaneceram em *freezer* (-20 °C) por um período mínimo de duas semanas. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (Bioval, Modelo L 2000A) com objetiva de 40 vezes, com filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm. Analisou-se 2000 células/animal e a estatística foi realizada por meio do teste de ANOVA/Tukey (*p*<0,001).

## Cálculo da porcentagem de redução de danos

A porcentagem de redução dos danos do agente mutagênico pelo biopolímero obtido de *Agrobacterium radiobacter*, foi calculada por meio da média do número de células com danos observadas no grupo que recebeu o agente indutor de danos (ciclofosfamida - Grupo controle positivo) menos o número de células com danos observadas no grupo que recebeu o tratamento de antimutagenicidade (Grupo biopolímero obtido de *Agrobacterium radiobacter* + ciclofosfamida) x 100, dividido pelo número de células com danos observadas no grupo que recebeu o agente indutor de danos (Grupo controle positivo) menos o número de células com danos no grupo que recebeu PBS (Grupo controle negativo).

O cálculo da porcentagem de redução de danos foi proposto por Waters et al. (1990) e a fórmula encontra-se a seguir:

$$\% \text{ de redução de danos} = \frac{\text{Grupo Controle Positivo} - \text{Grupo biopolímero} + \text{ciclofosfamida}}{\text{Grupo Controle Positivo} - \text{Grupo Controle Negativo}} \times 100$$

## RESULTADOS

### Caracterização química

Após as diferentes etapas de caracterização do biopolímero produzido pelo *Agrobacterium radiobacter* pode-se determinar que o mesmo contenha 35% de carboidrato, 40% de minerais e 15% de proteínas formando um composto de unidades de glucose solúvel e os tipos de ligação presentes não foram determinados.

Os minerais presentes no biopolímero são: fósforo (0,8%), potássio (20,0%), cálcio (0,7%), magnésio (0,6%), cobre (0,001%), zinco (0,006%), manganês (0,02%), sódio (0,12%), ferro (0,06%), cromo (0,0007%), cobalto (0,0004), níquel (0,0002%), chumbo (0,0014%), cádmio (0,0004%) e molibidênio (0,0002%).

### Avaliação mutagênica e antimutagênica

A Tabela 1 apresenta a frequência total e as médias de micronúcleos referentes à avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade em camundongos tratados com biopolímero.

De acordo com a análise estatística, para a experimentação em 24 h após os tratamentos, pode-se verificar que as três diferentes doses do biopolímero, obtido de *Agrobacterium radiobacter*, não possui atividade mutagênica segundo as doses e protocolo utilizados neste experimento. A análise das médias de micronúcleos, dos animais tratados com biopolímero, indica uma variação entre 5,00±2,34 e 6,22±1,86 micronúcleos para a menor e

maior dose testada, respectivamente; e a média do grupo controle foi de 5,11±2,93.

Na avaliação da antimutagenicidade, ou seja, da capacidade de prevenção de danos ao DNA pelo biopolímero frente à exposição do animal à ciclofosfamida, verificou-se que todas as concentrações foram efetivas. A média de micronúcleos no controle positivo foi de 26,44±8,92 e quando analisados os associados verificam-se médias de 8,55±4,10, 7,44±4,45 e 4,44±1,67 micronúcleos para as doses de 75, 150 e 300 mg/kg de biopolímero, respectivamente.

A porcentagem de redução de danos foi de 83,90%; 89,10% e 103,10% para as doses de 75, 150 e 300 mg/kg de biopolímero, respectivamente.

Na análise de 48 h pode-se verificar que as três diferentes doses do biopolímero, continuaram não apresentando atividade mutagênica. A análise da média de micronúcleos, dos animais tratados com biopolímero, indica uma variação entre 4,67±1,41 e 3,78±2,49 micronúcleos para a menor e maior dose, respectivamente; e a média do grupo controle foi de 6,78±1,86.

Na avaliação da antimutagenicidade do biopolímero verificou-se que todas as concentrações continuaram a apresentar-se como efetivas e quimioprotetoras. A média de micronúcleos no controle positivo foi de 25,56±8,78, quando analisados os associados verificam-se médias de micronúcleos de 6,56±2,70, 7,11±2,09 e 3,11±2,08 e porcentagens de redução de danos de 101,24%, 98,14% e 120,64% para as doses de 75, 150 e 300 mg/kg de biopolímero, respectivamente.

## DISCUSSÃO

As populações humanas estão constantemente expostas a carcinógenos e estes em sua grande maioria são mutagênicos. Logo pensar em agentes quimiopreventivos capazes de agir concomitantemente a aqueles seria a melhor estratégia de prevenção do câncer. Todavia é extremamente delicado fazer esta afirmativa visto que os agentes carcinogênicos estão livres no ambiente e o processo de quimioproteção está submerso em fatores dietéticos e/ou farmacológicos (De Flora, 1998) que não necessariamente permeiam o cotidiano das populações.

Atualmente as neoplasias, apesar de ser uma patologia muito estudada, continuam responsáveis pela morte prematura de inúmeras pessoas do setor produtivo da população e por isso torna-se uma importante questão de saúde pública. Assim, a necessidade de aumentar a eficácia de terapias anticânceres assume importância inestimada (Cestari & Zago, 2005). Outro fato que chama a atenção é a necessidade de eventos que possam prevenir a ocorrência destas doenças e uma proposição futura pode ser a reeducação alimentar baseada no incentivo ao consumo de fibras.

A goma curdlana apresenta propriedades químicas similares à fibra β-glucana e o biopolímero,

**Tabela 1.** Frequência absoluta e média de micronúcleos obtidos em sangue periférico de camundongos *Swiss* tratados com biopolímero ou biopolímero simultaneamente ao agente mutagênico, referentes às avaliações de mutagenicidade e antimutagenicidade:

Tratamento (mg/kg, p.c.)	24 horas			48 horas		
	Total MN <sup>1</sup>	Média±DP	%RD	Total MN <sup>1</sup>	Média±D.P.	%RD
Grupo 1	46	5,11±2,93 <sup>a</sup>	-	61	6,78±1,86 <sup>a</sup>	-
Grupo 2	238	26,44±8,92 <sup>b</sup>	-	221	24,56±8,78 <sup>b</sup>	-
Mutagenicidade						
Grupo 3	45	5,00±2,34 <sup>a</sup>	-	42	4,67±1,41 <sup>a</sup>	-
Grupo 4	55	6,11±4,28 <sup>a</sup>	-	43	4,78±1,20 <sup>a</sup>	-
Grupo 5	56	6,22±1,86 <sup>a</sup>	-	34	3,78±2,49 <sup>a</sup>	-
Antimutagenicidade						
Grupo 6	77	8,55±4,1 <sup>a</sup>	83,90	59	6,56±2,70 <sup>a</sup>	101,24
Grupo 7	67	7,44±4,45 <sup>a</sup>	89,10	64	7,11±2,09 <sup>a</sup>	98,14
Grupo 8	40	4,44±1,67 <sup>a</sup>	103,10	28	3,11±2,08 <sup>a</sup>	120,64

Legenda: <sup>1</sup>Total MN - Frequência absoluta de micronúcleos; DP: Desvio Padrão; %RD: Porcentagem de redução de danos; Grupo 1: controle negativo, 0,1 mL de água destilada/10 g de peso corpóreo (p.c.); Grupo 2: controle positivo, Ciclofosfamida na concentração de 50 mg/kg p.c.; Grupos 3, 4 e 5: Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/kg p.c., respectivamente; Grupos 6, 7 e 8: tratamentos simultâneos com Ciclofosfamida (50 mg/kg, p.c.) e Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/kg p.c., respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey;  $p < 0,001$ ).

em estudo, possui características similares a estas duas. No entanto, o biopolímero apesar de ser derivado do mesmo microorganismo da curdlana, apresenta diferenças estruturais, visto que enquanto a goma curdlana apresenta 90% de carboidrato à base de unidades de glicose, unidas por ligações  $\beta(1 \rightarrow 3)$  em uma cadeia linear, este composto apresenta-se insolúvel. Já o biopolímero em questão contém 35% de carboidrato composto por unidades de glicose, 40% de minerais e 15% de proteínas. Devido a esta constituição o biopolímero forma um composto solúvel. Contudo ainda não estão determinados os tipos de ligações existentes entre os resíduos de glicose.

Por possuir características similares as  $\beta$ -glucanas e curdlana este biopolímero foi submetido a testes de mutagenicidade e antimutagenicidade para verificar se o mesmo possui atividades de quimioproteção já descritas para as  $\beta$ -glucanas mesmo sendo conhecidas as diferenças anteriormente ressaltadas.

O presente estudo relatou que o biopolímero possui boa capacidade de prevenir danos no DNA causados por ciclofosfamida quando administrado simultaneamente a este quimioterápico. Além deste fato o composto em teste não apresenta nenhuma atividade mutagênica.

As porcentagens de redução de danos apresentaram uma relação dose-resposta para as avaliações realizadas após 24 h da aplicação dos compostos. No entanto, após 48 h este fato não foi mais verificado. Mesmo esta relação não sendo mantida é notório que para ambos os tempos de análise há uma boa atividade de proteção do DNA por este composto.

Segundo Kada et al. (1982) existem dois tipos de substâncias protetoras do DNA, as que agem por desmutagênese, e aquelas que agem por bioantimutagênese.

As substâncias desmutagênicas são capazes de impedir a ação dos agentes indutores de danos, principalmente por adsorção aos mesmos. Já as bioantimutagênicas, em geral, atuam como moduladoras do reparo e replicação do DNA (Kada & Shimoi, 1987; De Flora, 1998).

Pelo presente estudo não foi possível identificar o modo de ação antimutagênica do biopolímero, visto que o protocolo de tratamento simultâneo pode indicar atividade por desmutagênese e por bioantimutagênese.

Pode-se ainda pensar que a origem do biopolímero poderia influenciar no modo de atividade antimutagênica. No entanto, estudos deste mesmo grupo de pesquisa (Oliveira et al., 2006, 2007, 2009) demonstram que independentemente da origem das  $\beta$ -glucanas, se de cereais ou de leveduras, o modo de ação descrito é similar para estudos *in vitro* e *in vivo*. Nestes estudos foi suposto que as  $\beta$ -glucanas possuem atividade antioxidante e por isso exerçam sua principal atividade quimioprotetora. Outros estudos descrevem também a atividade anticancerígena da  $\beta$ -glucana, e alguns desses polissacarídeos extraídos de fungos têm sido utilizados clinicamente no Japão (Kaneno et al., 1989).

Segundo Chorvatovicová et al. (1998) seria importante também estudar nestas terapias a administração concomitante da  $\beta$ -glucana e do quimioterápico, ciclofosfamida, para que se demonstrasse a possibilidade daquela em diminuir os efeitos adversos da quimioterapia. No entanto, ainda são muito controversos os princípios moleculares e bioquímicos que envolvem a atividade antitumoral, antimutagênica, imunostimulatória e quimiopreventivas das diferentes  $\beta$ -glucanas (Saitô et al., 1991; Kishida et al., 1992; Demleitner et al., 1992).

É sabido que a administração de ciclofosfamida

pode relacionar-se a diferentes efeitos adversos e dentre eles o surgimento de cânceres secundários (Anvisa, 2009) por eventos tais como a produção de radicais livres. Por outro lado, sabe-se que a associação de agentes quimiopreventivos poderá reduzir este risco. Esta proteção pode ser oferecida por agentes de ação quimioprotetora uma vez que estes agem em sua maioria como antioxidante. Porém, esta atividade não diminuiria a ação do agente quimioterápico no combate ao câncer. Esta atuação pode ser inferida com base no estudo de Weijl et al. (1998) que relata que administração de antioxidantes não interfere no efeito antitumoral de drogas antineoplásicas pois estas drogas destroem células cancerosas por meio de mecanismos que não envolvem a ação de radicais livres.

Além dos efeitos juntos aos quimioterápicos, Patchen et al. (1987) relataram efeitos benéficos quando utilizaram  $\beta$ -glucana em animais submetidos à radiação. De acordo com seu estudo, a melhora não se deve somente à regeneração hematopoiética, mas os autores supõem que a  $\beta$ -glucana é capaz de inativar os radicais livres que poderiam causar danos ao organismo em teste, fato este também está descrito no trabalho de Chorvatovicová (1991). Diante deste relato pode-se inferir que a  $\beta$ -glucana teria atividade semelhante a agentes antioxidantes.

O principal grupo de agentes inibidores da carcinogênese é representado por antioxidantes e bloqueadores de radicais livres que são capazes, mesmo presentes em baixas concentrações, de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Maxwell, 1995; Sies, 1999). Estes compostos podem agir por meio da i) prevenção, que se caracteriza pela proteção contra formação das substâncias agressoras; ii) interceptação de radicais livres, os quais uma vez formados iniciam suas atividades de danificação do DNA (Kong & Lillehei, 1998; Santos & Cruz, 2001); e iii) quando a prevenção e interceptação não foram efetivas e os subprodutos da atividade dos radicais livres estão sendo continuamente formados em baixas quantidades, podendo se acumular no organismo, há a necessidade dos mesmos serem encaminhados à excreção pelas enzimas de detoxificação e que ao mesmo tempo os antioxidantes modulem o sistema de reparo de DNA das células que estão sendo atacadas por meio de uma atividade bioantimutagênica.

Os alimentos que possuem agentes antioxidantes constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (Ferrari & Torres, 2002). Para que um alimento seja classificado como funcional ele deve: i) exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, ii) fazer parte da alimentação usual, iii) possuir efeitos positivos obtidos por meio de quantidades não tóxicas que devem persistir mesmo após a suspensão de ingestão e iv) não deve ser utilizado com o intuito de tratar ou curar doenças (Milner, 1999).

Assim, de acordo com a literatura já apresentada e assumindo o biopolímero como um candidato a alimento funcional, considerando suas características de fibra, observa-se que por ser solúvel o biopolímero pode apresentar uma maior eficiência, visto que este fato garante sua fermentação que contribui para o aumento da massa bacteriana e, conseqüentemente, para o aumento do volume das fezes, e leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) que alteram o pH e a microflora intestinal, evitando o crescimento de microorganismos patogênicos e exercendo efeitos fisiológicos benéficos (Assumpção et al., 1999; Grega et al., 2003; Gonçalves et al., 2007; Haas et al., 2007) se administrado por períodos mais longos do que este usado nesta pesquisa. Sendo o biopolímero solúvel em água, resta saber se o mesmo realmente é resistente à hidrólise de enzimas humanas sendo fermentado quase que predominantemente pelas bactérias da microbiota intestinal, estimulando seletivamente a proliferação ou atividade de bactérias desejáveis no cólon, contribuindo assim com a inibição da multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Estudos posteriores poderão contribuir para a adequação do biopolímero como um alimento funcional prebiótico visto que ele possui características em potencial para tal. Se realmente este fato for verificado poder-se-ia apontar o biopolímero com capacidade quimiopreventiva para iniciação de células para o câncer, mas em especial para o câncer de cólon-retal devido suas características de fibra alimentar.

Frente a esta discussão não se pode deixar de considerar que além de ser um composto solúvel e rico em resíduos de glicose, o polissacarídeo utilizado apresenta em sua constituição 40% de minerais como fósforo, potássio, cálcio, cobre, zinco, magnésio, manganês, sódio, ferro, cromo, cobalto, níquel, chumbo, cádmio, molibdênio em diferentes concentrações. A solubilidade em água aqui mencionada pode indicar que o biopolímero alcance mais facilmente o meio intracelular e isso poderia aumentar a sua capacidade quimiopreventiva levando por conseqüência ao aumento da sua porcentagem de redução de danos. Esta característica pode ser a responsável pela maior porcentagem de redução de danos encontrada nesta pesquisa se comparadas a outros trabalhos do mesmo grupo (Oliveira et al., 2006, 2007, 2009). Soma-se ainda a este fato a presença dos micronutrientes que também possuem atividade quimiopreventiva e poderiam auxiliar no aumento da porcentagem de redução de danos.

Como é de conhecimento geral, as vitaminas e minerais possuem um papel fundamental na regulação do organismo, e estes são nutrientes essenciais que exercem importantes funções no metabolismo (Galante et al., 2007). Alguns minerais são reconhecidos como essenciais, mesmo em quantidades tão sutis que ainda não são claramente determinadas. A deficiência de um mineral necessário em quantidades mínimas pode ser igualmente

ou mais prejudicial que a falta de um mineral requerido em quantidades superiores.

Além dos papéis desempenhados pelos macro e microelementos na manutenção do metabolismo celular normal, nas funções dos tecidos e participação de uma infinidade de processos bioquímicos e fisiológicos importantes para a saúde, as evidências científicas demonstram que ingestão de micronutrientes pode prevenir alguns tipos de câncer (Dirienzo, 2001; Silva & Naves, 2001). Assim, há de se considerar a presença destes micronutrientes favorecendo a atividade antimutagênica.

Não obstante é prematura a finalização dos estudos com respeito à atividade mutagênica e antimutagênica do biopolímero bem como sua indicação ou contra-indicação na quimioproteção. Faz-se necessários estudos bioquímicos que demonstrem melhor a estrutura do polissacarídeo em estudo e a sua interação com os agentes indutores de danos ao DNA, a fim de se esclarecer como realmente se efetiva a sua capacidade antimutagênica. Necessita-se, também, de um melhor entendimento de como este polissacarídeo pode interagir com o DNA ou com as enzimas envolvidas na replicação e no reparo do mesmo. No entanto, este estudo mostra-se pioneiro na determinação da ação antimutagênica e quimiopreventiva do biopolímero *Agrobacterium radiobacter*.

## REFERÊNCIAS

- Angeli JP, Ribeiro LR, Gonzaga ML, Soares S de A, Ricardo MP, Tsuboy MS, Stidl R, Knasmuller S, Linhares, RE, Mantovani, MS 2006. Protective effects of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* 22: 285-291.
- Angeli JP, Ribeiro LR, Angeli JL, Mantovani MS 2009a. Protective effects of beta-glucan from barley against benzo[a]pyrene-induced DNA damage in hepatic cell HepG2. *Exp Toxicol Pathol* 61: 83-89.
- Angeli JP, Ribeiro LR, Bellini MF, Mantovani MS 2009b. Beta-glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. *Arch Toxicol* 83: 81-86.
- Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 2009. *Bulário eletrônico: genuxal*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/bularioeletronico>, acessada em outubro de 2009.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist) 1995. Section 32 - Cereal Foods. In: *Official Methods of Analysis*. 16 ed. v.2. Virginia: USA, p.1-12.
- Assumpção IR, Rodrigues M, Barbieri D 1999. Tratamento da retocolite ulcerativa inespecífica em criança com enemas contendo butirato: relato de caso. *Arq Gastroenterol* 36: 238-243.
- Azevedo G, Mendonça S 1993. Câncer na população feminina brasileira. *Rev Saude Publ* 27: 68-75.
- Bleil SI 1998. O padrão alimentar ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. *Rev Cader Debate* 6: 1-25.
- Cervi A, Hermsdorff, HHM, Ribeiro RCL 2005. Tendência da mortalidade por doenças neoplásicas em 10 capitais brasileiras, de 1980 a 2000. *Rev Bras Epidemiol* 8: 407-418.
- Cestari MEW, Zago MMF 2005. A prevenção do câncer e a promoção da saúde: um desafio para o Século XXI. *Rev Bras Eferm* 58: 218-221.
- COBEA 2004. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. Disponível em: [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br), acessada em Ago 2004.
- Cunha MAA 2002. *Produção de goma curdlana pela bactéria Agrobacterium radiobacter k84*. Londrina, 76p. Dissertação de Mestrado - Programa de Mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina.
- Cunha MAA, Santos JC, Gómez RJHC, Silva, SS 2004. Goma curdlana: propriedades e aplicações. *Rev Biotec Cien Desenvol* 33: 55-61.
- Chorvatovicová D 1991. Suppressing effects of glucan on micromuceli induced by Co60 in mice. *Strahlenther Onkol* 167: 612-614.
- Chorvatovicová D, Machová E, Sandula J 1998. Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration. *Mutat Res* 412: 83-89.
- De Flora S 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 402: 151-158.
- Demleitner S, Kraus J, Franz G 1992. Synthesis and antitumor activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. *Carbohydr Res* 226: 247-252.
- Dirienzo D 2001. Produtos de soro de leite, minerais do leite e cálcio lácteo: novas descobertas, benefícios e aplicações. US Dairy Export Council. Disponível em: <http://www.usdec.org>, acessada em Ago 2008.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- EPA (Environmental Protection Agency) 2005. Pesticides: Regulating Pesticides. 26 Jan 2005. Disponível em: <http://www.epa.gov>, acessado em Mar 2005.
- Ferrari CKB, Torres EAFS 2002. Alimentos funcionais: quando a boa nutrição melhora a nossa saúde. *Rev Edu Alimen* 20: 31-34.
- Fortes RC, Recôva VL, Melo AL, Navaes, MRCG 2007. Hábitos dietéticos de pacientes com câncer colorretal em fase pós-operatória. *Rev Bras Cancerol* 53: 277-289.
- Funami T, Yada H, Nakao Y 1998a. Curdlan properties for application in fat mimetics for meat products. *J Food Sci* 64: 283-287.
- Funami T, Yotsuzuka F, Yada H, Nakao Y 1998b. Thermoirreversible characteristics of curdlan gels in a model reduced fat pork sausage. *J Food Sci* 63: 575-579.
- Galante AP, Nogueira, AS, Mari ETL 2007. Biodisponibilidade de minerais. In: Silva SMCS, Mura JP *Tratado de alimentação, nutrição & dietoterapia*. 1ª Ed. São Paulo: Roca, p.153-X155.
- Gonçalves MCR, Costa MJC, Asciti LSR, Diniz MFFM 2007. Fibras dietéticas solúveis e suas funções nas dislipidemias. *Rev Bras Nutr Clin* 22: 167-173.
- Greca FH, Biondo-Simões MLP, Martins VDM, Araújo FH, Milano JB 2003. Os ácidos graxos de cadeia curta na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir* 30: 268-274.

- Haas P, Anton A, Francisco A 2007. Câncer colo retal no Brasil: consumo de grãos integrais como prevenção. *Rev Bras Anal Clin* 39: 231-235.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni, T, Ishidate Jr. M 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245: 245-249.
- Kada T, Inoue T, Namiki N 1982. Environmental desmutagens and antidesmutagens. In: Klekowski EJ (org.). *Environ Mutag Plant Biol*. New York: Praeger, p.137- 151.
- Kada T, Shimoi K 1987. Desmutagens and bio-antimutagens: their modes of action. *Bio Essays* 7: 113-115.
- Kaneno Y, Chihara G, Taguchi T 1989. Activity of lentinan against cancer and AIDS. *Int J Immunother* 4: 203-213.
- Kishida E, Sone Y, Misaki A 1992. Effects of branch distribution and chemical modifications of antitumor (1,3)- $\beta$ -D-glucan. *Carbohydr Polymers* 17: 89-95.
- Kong Q, Lillehei KO 1998. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypotheses* 51: 405-409.
- Maxwell SRJ 1995. Prospects for the use antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.
- Milner JA 1999. Functional foods and health promotion. *J Nutr* 129: 1395-1397.
- Moreira AS, Souza AS, Vendruscolo CT 1998. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia de camada delgada: Metodologia. *Rev Bras Agrociên* 4: 222-224.
- Neves FJ 2002. *Mortalidade por câncer de cólon e reto e perfil de consumo alimentar em capitais brasileiras*. São Paulo, 125p. Dissertação de Mestrado, Programa de Mestrado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- Oliveira RJ, Ribeiro LR, Silva AF, Matuo R, Mantovani MS 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol in vitro* 20: 1225-1233.
- Oliveira RJ, Matuo R, Silva AF, Matiazi HJ, Mantovani MS, Ribeiro LS 2007. Protective effect of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* against SNS damage and cytotoxicity in wildtype (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol in vitro* 21: 41-52.
- Oliveira RJ, Faria MJSS, Silva AF, Kanno TYN, Lourenço ACS, Freiria GA, Matiazi HJ, Ribeiro LR, Mantovani MS 2009. Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Reg Tox Pharm* 53:164-173.
- Patchen ML, D'Alessandro M.M, Brook I, Blakely WF, Mac Vittie TJ 1987. Glucan: mechanisms involved in its radioprotective effect. *J Leukocyte Biol* 42: 95-105.
- Pereira LO, Francisco RP, Lancha-Jr AH 2003. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47: 111-127.
- Phillips KR, Lawford HG 1983. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Can J Microbiol* 29: 1270-1276.
- Rossit A, Nívea DT, Froes C 2000. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Bras Cancerol* 3:26-31.
- Saitô H, Yoshioka Y, Ushara N, Aketagawa J, Tanaka S, Shibata Y 1991. Relationship between conformation and biological response for (1,6)- $\beta$ -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amoebocyte lysate and host-mediated antitumor. *Carbohydr Res* 217: 181-190.
- Santos HS, Cruz WMS 2001. The antioxidant vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. *Rev Bras Cancerol* 47: 303-308.
- Saudagar OS, Singhal RS 2004. Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme. *Carbohydr Polym* 56: 483-488.
- Sies H 1999. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.
- Silva CRM, Naves MMV 2001. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Rev Nutr* 14: 135-143.
- Slamenová D, Lábaj J, Krizková L, Kogan G, Sandula J, Bresgen N, Eckl P 2003. Protective effects of fungal (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Let* 198: 153-160.
- Spicer E, Goldenthal EI, Ikeda T 1998. A toxicological assessment of curdlan. *Food Chem Toxicol* 37: 455-477.
- Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM 2003.  $\beta$ -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adramycin and cisplatin. *Mutat Res* 541: 45-53.
- Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat Res* 238: 57-85.
- Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ 1998. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol* 9: 131-137.
- Wunsch-Filho V, Zago MA 2005. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. *Rev Saude Publ* 39: 490-497.