

# CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO<sup>1</sup>

Marcele Silva Peixoto<sup>2</sup>, Tátilla Putumujú Santana Mendes<sup>3</sup>, Danyo Maia Lima<sup>4</sup>, Gildomar Lima Valasques Júnior<sup>5</sup>

## RESUMO

Os fungos são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, dentre outras, como participantes de processos biotecnológicos. Os polissacarídeos são biomoléculas complexas e abundantes na biosfera, obtidas a partir do metabolismo primário de fungos e que apresentam importância econômica, sendo alvo de interesse para atividades biológicas. Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo obter e caracterizar polissacarídeos isolados da parede celular do fungo *Pleurotus djamor* CCMB 366 e do fungo *Aspergillus niger* ATTC 1004, como também avaliar as atividades biológicas antinociceptiva e antioxidante do *A. niger*. As melhores condições de extração de polissacarídeos de *P. djamor* foram de 13, 90°C e 180 minutos para pH, temperatura e tempo de extração, respectivamente. Enquanto que para o *A. niger* o ponto de extração ideal foi de 180 minutos para o tempo e 13 para o pH. As análises de espectroscopia indicaram a presença de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) para o *P. djamor* e (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucogalactano no *A. niger*. Os procedimentos para avaliar atividades biológicas mostraram-se dose-dependente na inibição da dor na concentração de 60 mg/kg a partir do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e da ação de sequestro de radicais livres no teste com DPPH (6,4 mg/mL) e ABTS (6,4 mg/mL), podendo, portanto serem aplicados para as finalidades propostas, sendo, contudo, necessário mais estudos para elucidar os mecanismos de ação precisos envolvidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus niger*, fatorial de três níveis, metodologia de superfície de resposta, planejamento experimental, *Pleurotus djamor*, polissacarídeos.

## PARTIAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED IN THE SEMI-ARID NORTHEAST OF BRAZIL

## ABSTRACT

---

<sup>1</sup> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

<sup>2</sup> Discente do curso de Farmácia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campi Jequié

<sup>3</sup> Doutora pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campi Jequié

<sup>4</sup> Docente do curso de Farmácia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campi Jequié

<sup>5</sup> Docente do curso de Farmácia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campi Jequié

Fungi are used in the food and pharmaceutical industries, among others, as participants in biotechnological processes. Polysaccharides are complex and abundant biomolecules in the biosphere, obtained from the primary metabolism of fungi and which are of economic importance, being a target of interest for biological activities. With this in mind, the aim of this study was to obtain and characterize polysaccharides isolated from the cell wall of the fungus *Pleurotus djamor* CCMB 366 and the fungus *Aspergillus niger* ATTC 1004, as well as to evaluate the antinociceptive and antioxidant biological activities of *A. niger*. The best conditions for extracting polysaccharides from *P. djamor* were 13, 90°C and 180 minutes for pH, temperature and extraction time, respectively. While for *A. niger* the optimum extraction point was 180 minutes for time and 13 for pH. Spectroscopy analyses indicated the presence of  $\beta$ -(1→3) glycosidic bonds for *P. djamor* and (1→3)(1→6)- $\beta$ -D-glucogalactan for *A. niger*. The procedures for evaluating biological activities were shown to be dose-dependent in inhibiting pain at a concentration of 60 mg/kg using the acetic acid-induced abdominal writhing test and the free radical scavenging action in the DPPH (6,4 mg/mL) and ABTS (6,4 mg/mL) tests, and could therefore be applied for the purposes proposed, although further studies are needed to elucidate the precise mechanisms of action involved.

**KEYWORDS:** *Aspergillus niger*, three-level factorial, response surface methodology, experimental design, *Pleurotus djamor*, polysaccharides.

## INTRODUÇÃO

Os fungos podem estabelecer relações benéficas com os indivíduos, visto que estão fisiologicamente presentes nas microbiotas, além da sua larga participação em ciclos ecológicos na reciclagem de nutrientes. São também utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, médica, dentre outras, como participantes de processos biotecnológicos, confirmando potencial a ser explorado em pesquisas posteriores (Li *et al.*, 2021; Lim *et al.*, 2020).

Os polissacarídeos são biomoléculas complexas - consistidos por vários monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas em cadeias que variam em grau e em ramificação - e abundantes na biosfera, obtidas a partir do metabolismo primário de fungos e classificadas em semissintéticas e naturais (Rodrigues Barbosa *et al.*, 2020), assim apresentam variadas propriedades biológicas como ação antinociceptiva (Valasques *et al.*, 2014), antioxidante (Maity *et al.*, 2021), entre outras.

Conforme o potencial medicinal de polissacarídeos obtidos de fungos relatados na literatura, este estudo direcionou-se à obtenção e análise da caracterização estrutural dos polissacarídeos potencialmente biotecnológicos da parede celular do fungo comestível *Pleurotus djamor* CCMB 366, fungo filamentoso não tóxico com variedade

de atividades biológicas, utilizando o delineamento experimental Box-Behnken. De igual modo, objetivou-se prospectar a parede celular do fungo filamentosso *Aspergillus niger* ATCC 1004. Nessa perspectiva, propõe-se a otimização da extração de polissacarídeos obtidos da parede celular como também realizar a caracterização parcial química do composto obtido por análise espectrométrica de infravermelho e de ressonância magnética nuclear, assim como avaliar os potenciais antinociceptivo e antioxidante do *A. niger*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O inóculo do fungo *P. djamor* foi realizado meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA) durante 7 dias à temperatura de 28°C, já o *A. niger* foi mantido em BDA durante 5 dias a 30°C.

A partir da biomassa fúngica seca do *P. djamor* foi empregue o planejamento experimental Box-Behnken (Box; Behnken, 1960), analisando a influência da temperatura (°C), do tempo de extração (min) e do pH, na extração dos polissacarídeos de parede celular como variáveis independentes (Valasques *et al.*, 2014). Para o design experimental da atividade antioxidante do *A. niger*, foi aplicado o delineamento fatorial de 3 níveis da metodologia de superfície de resposta com pH e tempo de extração.

Os polissacarídeos dos fungos foram caracterizados com espectrômetro de Infravermelho (IR) com transformadas de Fourier. Para a análise espectroscópica de RMN todos os espectros foram registrados a 343 K, observando <sup>1</sup>H a 500 MHz e <sup>13</sup>C a 125 MHz e usando sonda direta. O tratamento estatístico foi realizado com software Statística® e análise de variância (ANOVA).

O procedimento de atividade antinociceptiva foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal da Bahia, sob protocolo 077/2019. Dessa maneira, foram utilizados camundongos Balb-C machos pesando de 20-30g, assim o efeito antinociceptivo das amostras de polissacarídeos de *A. niger* ATCC 1004 foi realizado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%, pela via intraperitoneal (0,1 mL/10g). A atividade antioxidante foi avaliada utilizando os métodos de sequestro de radical livre DPPH e do radical ABTS+.

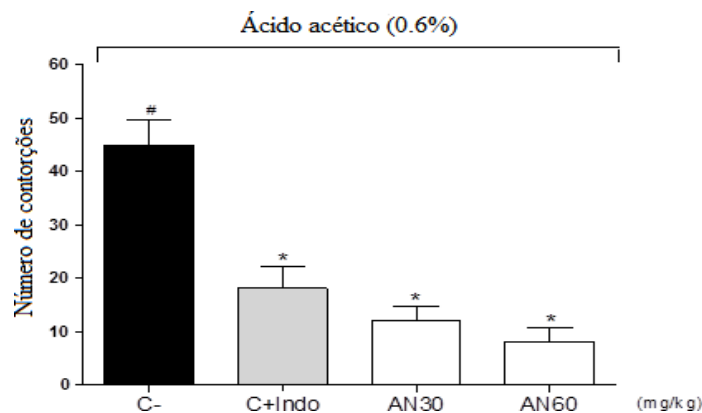
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos das variáveis as condições ideais para a extração de polissacarídeos da parede celular do fungo *P. djamor* tendenciam para valores de 13, 90°C e 180 minutos para pH, temperatura e tempo de extração, respectivamente, sendo o pH a variável que mais influencia no rendimento dos polissacarídeos extraídos da parede celular. As análises de espectroscopia de infravermelho e por ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) para o *P. djamor* foi realizada para identificar os principais grupos funcionais que estão presentes na amostra do polímero, assim os sinais químicos no espectro apresentam características de polissacarídeos, sendo possível a existência de 2 monossacarídeos de ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3).

O planejamento de três níveis foi aplicado para determinar as melhores condições para a extração de polissacarídeos do *A. niger*. O ponto de extração ideal foi de 180 minutos para o tempo e 13 para o pH, a redução de tempo e pH foi diretamente proporcional ao rendimento de polissacarídeo, portanto também diminuiu. As análises de espectroscopia de infravermelho e por ressonância magnética nuclear para o *A. niger*, sugerem a presença do polissacarídeo de ligações  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo o (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucogalactano.

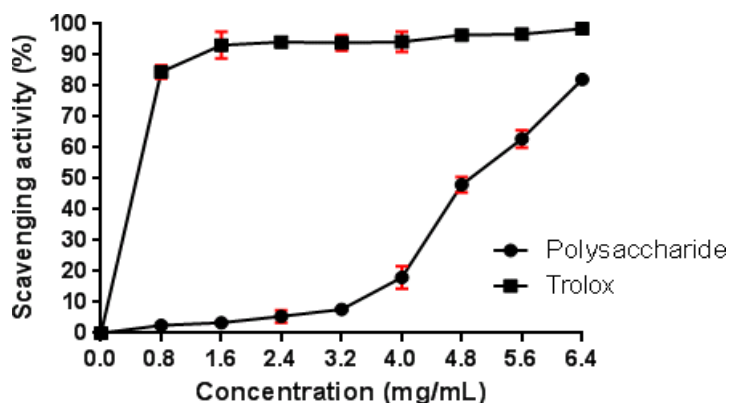
A avaliação da capacidade antinociceptiva revelou-se dose-dependente no grupo controle (C-), reduzido na dose de 60 mg/kg de polissacarídeo. Desse modo, é perceptível o potencial antinociceptivo do polissacarídeo. A atividade de eliminação de radicais livres DPPH e a atividade máxima de eliminação do radical ABTS foi dose-dependente na maior concentração utilizada (6,4mg/ml) atingindo 82,12% e 75,94% de atividade, respectivamente.

**Figura 1:** Avaliação da administração intraperitoneal de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucogalactano de parede celular de *A. niger* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos.



Fonte: Autora

**Figura 2:** Atividade antioxidante do polissacarídeo isolado do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 frente ao radical livre de DPPH (%).



Fonte: Autora

## CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

Neste estudo foram obtidos resultados da otimização da extração de polissacarídeos do fungo filamentoso *Pleurotus djamor* e do *Aspergillus niger*. O rendimento máximo observado foi de pH 13, temperatura de 90°C e 180 minutos de tempo extração para o *P. djamor*, assim como a caracterização parcial do polissacarídeo pelo método de Espectroscopia no Infravermelho e por Ressonância Magnética Nuclear denotaram, por intermédio das vibrações de estiramento, as características das ligações

dos grupos no polissacarídeo, sendo obtido um polissacarídeo do tipo  $\beta$ -(1→3) da parede celular.

Ademais, quanto à otimização do *A. niger*, os pontos ideais de extração foram 180 minutos para o tempo e 13 para o pH. Quanto às atividades biológicas, percebeu-se dose-dependência. A analgesia do polissacarídeo foi observada na maior concentração (60 mg/kg), sendo o número de contorções reduzido (menor que o observado quando utilizado o fármaco padrão indometacina).

O polissacarídeo apresentou potencial em sequestro de radicais livres DPPH e ABTS, mas não em capacidade máxima de atividade antioxidante. Neste contexto, o polissacarídeo produzido por *Aspergillus niger* ATTC 1004 demonstrou ser um produto com aplicação biológica na ação em distúrbios bioquímicos associados ao estresse oxidativo e pode ser utilizado como potencial antinociceptivo e antioxidante. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação precisos envolvidos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Design for Study of quantitative variables Box Behnkee.pdf. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.
2. LI, Yuanning *et al.* A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, v. 31, n. 8, p. 1653- 1665.e5, 2021.
3. LIM, Jolyn Jia Jia *et al.* Fungi.guru: Comparative genomic and transcriptomic resource for the fungi kingdom. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3788–3795, 2020.
4. MAITY, Gajendra Nath; MAITY, Prasenjit; KHATUA, Somanjana; ACHARYA, Krishnendu; DALAI, Sudipta; MONDAL, Soumitra. Structural features and antioxidant activity of a new galactoglucan from edible mushroom *Pleurotus djamor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 743–749, 2021.

5. RODRIGUES BARBOSA, Jhonatas; DOS SANTOS FREITAS, Maurício Madson; DA SILVA MARTINS, Luiza Helena; DE CARVALHO, Raul Nunes. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, n. October 2019, p. 115550, 2020.
6. VALASQUES, Gildomar L.; DE LIMA, Flávia O.; BOFFO, Elisangela F.; SANTOS, Jener D. G.; DA SILVA, Bruno C.; DE ASSIS, Sandra A. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)-β-d-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n. 1, p. 293–299, 2014.

#### AGRADECIMENTOS

