

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE EXTRATOS DO PERÍDIO DE *Calvatia bicolor* E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

Francielton S. Lima^{1*}, Hugo A.O. Rocha², Iuri G. Baseia³, Monique G.C.F. Alves²

1. Estudante de Graduação em Biomedicina - Centro de Biociências – UFRN

2. Professor e Pesquisador no Departamento de Bioquímica da UFRN

3. Professor e Pesquisador no Departamento de Botânica e Zoologia da UFRN

Resumo

Os macrofungos possuem diversos compostos bioativos como os polissacarídeos, com isso foi verificado o processo de extração e purificação do perídio de *Calvatia bicolor* e suas atividades antioxidantes. O objetivo do trabalho é avaliar metodologias de extração e purificação de biocompostos do perídio de *Calvatia bicolor*, bem como o potencial antioxidante dos extratos. O cogumelo *Calvatia bicolor*, foi coletado em Natal-RN, e submetido a diversos processos de extração com diferentes volumes de NaCl 0,25M (1v, 3v e 5v). Os extratos solúveis em água foram purificados por separação por massa molecular (MM) e precipitação por ácido tricloroacético (TCA), que demonstraram percentual de açúcar entre 22 a 49% e proteínas de 1 a 11%. Já o sulfato foi de 12 a 19%, característica pouco encontrada nos cogumelos. As amostras são heteroglucanas, contendo principalmente glicose, e galactose. As amostras extraídas com 5v de NaCl e purificadas foram as únicas com quantidade razoável de açúcar e com baixo teor de contaminantes. A capacidade antioxidante total de CB5v-TCA e CB5v-MM na concentração de 10 mg/mL foi de 28,13% e 72,83%, respectivamente. O poder redutor, CB5v-TCA e CB5v-MM apresentaram atividade dependente da dose variando de 18% a 52% e 21% a 130%, respectivamente. Assim, CB5v-MM é um possível candidato como um composto antioxidante.

Palavras-chave: Cogumelo; polissacarídeos; purificação.

Apoio financeiro: CNPq; CAPES; UFRN.

Introdução

Os fungos apresentam diversas moléculas com potencial terapêutico, com os polissacarídeos (GIAVASIS, 2014). Diversos estudos realizados previamente pelo nosso grupo observaram que, extratos ricos em polissacarídeos do tipo glucanas, oriundas de cogumelos como *Caripia montagnei*, *Polyporus dermatoporus*, *Scleroderma nitidum*, *Tylophilus ballouii* demonstram diversas ações farmacológicas como a ação antioxidante (CASTRO, 2013; DORE et al., 2014; LIMA et al., 2016), e esta atividade também foi descrita em extratos da gleba de *Calvatia bicolor* (LEÃO et al., 2018). O cogumelo *Calvatia bicolor* é uma espécie pouco estudada, e é observada a distinção entre a gleba e o perídio durante a fase imatura e madura. O objeto de estudo deste trabalho é o perídio da fase madura do *Calvatia bicolor*, e o trabalho propõe metodologias de extração e purificação de biocompostos desse perídio, bem como apresenta informações acerca da composição química dos seus extratos e a avaliação do seu potencial antioxidante.

Metodologia

EXTRAÇÃO: Os cogumelos, coletados no Parque Estadual das Dunas-Natal/RN, foram lavados e os perídios separados das glebas. Os perídios foram submetidos à delipidação com etanol 95% e extração proteolítica (10 g) com 1, 3 ou 5 volumes de NaCl a 0,25 M, sonicação e enzimas Prolav a 60°C por 18 h. As misturas foram centrifugadas e os sobrenadantes misturados a 3 v de metanol ~4°C, overnight. Os precipitados foram secos e identificados como: EB-CB1v, EB-CB3v e EB-CB5v. Os extratos foram solubilizados em água, centrifugados e as partes solúveis em água foram liofilizadas e nomeadas como CB1v, CB3v, CB5v, os quais foram submetidos a dois processos de purificação: separação por massa molecular, com dispositivo com filtro de 3 kDa, e as porções maiores que 3 kDa foram liofilizadas (CB-MM) e separação por precipitação com ácido tricloroacético (TCA) a 90%, a partir do qual os precipitados foram secos (CB-TCA).

CARACTERIZAÇÃO: O teor de açúcares totais, proteínas, e compostos fenólicos foram estimado pelo método fenol-H₂SO₄ (Dubois et al., 1956), Bradford (1976) e Folin Ciocalteu, respectivamente. O percentual de sulfato foi determinado pelo método da gelatina bário (DODGSON e PRICE, 1962) e a relação açúcar/proteína foi determinada a partir dos valores percentuais de açúcares totais e de proteínas. A composição monossacarídica foi determinada em sistema solvente: acetato de etila, piridina e água (8:2:1) por 10 h a 25°C com os padrões utilizados foram: GlcA, Fuc, Gal, Man, Xyl, Glc, Ram, Ara. A eletroforese em gel de agarose foi realizada segundo DIETRICH e DIETRICH, 1976. Foram aplicados 5 µL dos extratos (500 µg) no gel polimerizado em lâmina, e em seguida submetido a uma corrente constante de 110V por 75 min. O gel foi incubado com brometo de cetiltrimetilamônio 0,1% (CTV) por no mínimo 2 h. Então, o gel foi seco e corado em azul de toluidina 0,1%, e em seguida foi descorado em solução de ácido acético 1%, etanol 50% e água 49%, e novamente corado com azul de toluidina e descorado com uma solução de C₂H₃NaO₂ 0,2 M.

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*:

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT): Os microtubos com as amostras (1 mg/mL) e a solução reagente (H_2SO_4 0,6 M; NaH_2PO_4 28 mM e $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 4 mM) foram incubados a 95°C por 90 min. Em seguida, cada solução foi medida a 695nm. A CAT foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/g de amostra).

PODER REDUTOR: As amostras misturadas com soluções de Fe^{+3} a 1%, FeCl_3 III 0,1% e TCA a 10% e então a reação foi medida a 700nm. Quanto maior a absorbância das misturas, maior o poder redutor das amostras, a porcentagem foi correlacionada com o padrão de ácido ascórbico (concentração de 0,05 mg/mL).

Resultados e Discussão

RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO: As massas obtidas nas extrações por digestão proteolítica do perídio de *C. bicolor* foram de 79,75 ± 10,25 mg, 90 ± 11,1 mg e 91 ± 1,4 mg correspondentes aos extratos EB-CB1v, EB-CB3v e EB-CB5v, respectivamente. De acordo com os resultados, em todas as formas de extração realizadas com volumes diferentes de NaCl 0,25 M foram obtidas massas secas semelhantes.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA: Os extratos CB1v, CB3v e CB5v apresentaram percentuais de açúcares entre 8,17% e 14,75%, sendo que a concentração mais alta foi observada no extrato CB1v. O conteúdo de proteínas nos extratos variou de 7% a 9%, com menor percentual do extrato CB5v. As três extrações realizadas resultaram em percentuais semelhantes de compostos fenólicos (0,3% a 0,4%) em CB1v, CB3v e CB5v, sugerindo que o processo de extração foi eficiente na eliminação desses componentes. Quanto a dosagem de sulfato, o maior resultado verificado foi para o CB5v. Foram determinadas relações açúcar/proteína entre 0,94 e 1,85, com a maior relação atribuída ao CB5v. Os resultados demonstram uma melhor relação para o extrato CB5v, visto que o nosso objetivo é a extração de polissacarídeos.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL: É possível verificar que a composição monossacarídica dos extratos é majoritariamente de glicose e galactose. Desta forma, os extratos são constituídos por heteroglucanas como também verificado em outros estudos com cogumelos: QUEIROZ et al., 2010; CASTRO et al., 2013; DORE et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2014, LIMA et al., 2016 e LEÃO et al., 2018.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS EXTRATOS CB1v, CB3v e CB5v: A eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar o resultado da presença de sulfato, percebendo-se um perfil polidisperso e uma metacromasia discreta, que sugere a presença de sulfato nos polissacarídeos. Logo após a descoloração com acetato de sódio 0,2 M, a metacromasia foi mais intensa indicando a presença mais expressiva de carboxilas.

RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO: As massas obtidas na separação por massa molecular (MM) foram de 2,5 mg (62,5%), 2,4 mg (60%) e 3,1 mg (77,5%), já na precipitação com TCA (TCA) foram obtidas 2,5 mg (5%), 3,2 mg (6,4%) e 4,3 mg (8,6%), correspondentes aos extratos CB1v, CB3v e CB5v, respectivamente. Com isso, os melhores rendimentos obtidos em cada forma de purificação foram dos extratos CB5v-MM e CB5v-TCA.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS APÓS SEPARAÇÃO POR MASSA E POR PRECIPITAÇÃO COM TCA: Após a purificação, foi realizado uma nova caracterização, obtendo-se entre 0,98% e 1,17% de proteínas para extratos precipitados com TCA, já o conteúdo de proteínas para os extratos purificados por massa molecular foi entre 8,43% e 11,05% sendo o menor conteúdo de proteínas verificado no extrato CB5v-TCA, confirmando dados obtidos anteriormente por LIMA et al., 2008.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE APÓS PURIFICAÇÃO: Após a purificação com TCA, notou-se o desaparecimento de contaminantes proteicos no gel (regiões com coloração esverdeada), entretanto as amostras purificadas por massa molecular se apresentaram com um perfil semelhante ao anterior à purificação.

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT): As amostras purificadas CB5v-MM e CB5v-TCA, na concentração de 1 mg/mL apresentaram atividade antioxidante total de 79,4 ± 3,9 e 39,5 ± 22,5 mg de ácido ascórbico/g de amostra. Com isso, percebe-se que CB5v-TCA não é capaz de doar elétrons no mesmo nível que CB5v-MM, o qual teve uma grande capacidade de doar elétrons. Diante disso, a CB5v-MM pode ser considerada uma ótima alternativa antioxidante.

PODER REDUTOR: O poder redutor da CB5v-TCA variou de 17,53 a 50,26%, enquanto para CB5v-MM variou de 20,39 a 130%, com as maiores atividades para a CB5v-MM nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL. Nas amostras CB5v-TCA e CB5v-MM em concentrações a partir de 0,25 mg/mL foi notado uma diferença estatística entre o poder redutor desses diferentes extratos. Estudos realizados com *Agrocybe cylindracea* demonstraram resultados com quase 100% de atividade, sendo semelhante com as amostra CB5v-MM, na concentração de 1 mg/mL (ZHAO et al., 2017). Com isso, a CB5v-MM apresentou bons resultados, e por isso pode ser um

candidato para a estabilização de elétrons desemparelhados.

Conclusões

Nossos resultados mostraram que a CB5v-MM é a amostra com os melhores rendimentos, maior composição de carboidratos e atividade antioxidante mais pronunciada. Os resultados de composição monossacarídica dos extratos mostraram glicose e galactose como principais componentes, sendo então heteroglucanas. A respeito da eletroforese, observamos um indício de presença de sulfato e de carboxilas. Nas atividades antioxidantes observou-se que a CB5v-MM é a única com atividades em todos os testes, bem como pode ser uma bom candidato antioxidante, porém ainda são necessários mais estudos a fim de verificar outras atividades biológicas e melhor caracterizar as amostras por outras técnicas.

Referências bibliográficas

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- Cai, M.; Lin, Y.; Luo, Y. L.; Liang, H. H.; Sun, P. L. Extraction, Antimicrobial, and Antioxidant Activities of Crude Polysaccharides from the Wood Ear Medicinal Mushroom *Auricularia auricula-judae* (Higher Basidiomycetes), **International Journal of Medicinal Mushrooms**, p. 591-600, 2015
- CASTRO, A. J. G.; CASTRO, L. S. E. P. W.; SANTOS, M. S. N.; FAUSTINO, M. G. C.; PINHEIRO, T. S.; DORE, C. M. P. G.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 121–129, 2013.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 645–647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 06-110, 1962.
- DORE, C.; ALVES, M.; SANTOS, M.; SOUZA, L. DE; BASEIA, I.; LEITE, E. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of an Extract Rich in Polysaccharides of the Mushroom *Polyporus dermoporus*. **Antioxidants**, v. 3, p. 730–744, 2014.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28(3), p. 350–356, (1956).
- GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 162–173, 2014.
- LEÃO, Liane Emília Viana da Silva. **AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS SOLÚVEIS EM ÁGUA DO COGUMELO *Calvatia bicolor* (LÉV.) KREISEL**. 2018. 60 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- LIMA, A. T. M.; SANTOS, M. N.; SOUZA, L. A. R. DE; PINHEIRO, T. S.; PAIVA, A. A. O.; DORE, C. M. P. G.; COSTA, M. S. S. P.; SANTOS, N. D.; BASEIA, Y. G.; ARAÚJO, R. M.; LEITE, E. L. Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from *Tylopilus ballouii* mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 400–409, 2016.
- LIMA, L. F. O. et al. Production and Characterization of the Exopolysaccharides Produced by *Agaricus brasiliensis* in Submerged Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol** (2008) 151: 283–294.
- NASCIMENTO SANTOS, M. DA S.; MAGALHÃES, J. E. DE M.; WILL CASTRO, L. S. E. P.; PINHEIRO, T. DE S.; SABRY, D. A.; NOBRE, L. T. D. B.; SANTOS LIMA, J. P. M.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Effect of glucans from *Caripia montagnei* mushroom on TNBS-induced colitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2368–2385, 2014.
- NASCIMENTO, M. S.; MAGALHÃES, J. E. M.; PINHEIRO, T. S.; SILVA, T. A. DA; COUTINHO, L. G.; BASEIA, I. G.; LIMA, L. F. A.; LEITE, E. L. Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-inflammatory potential modulate cytokine levels and the expression of nuclear factor KB. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 60–68, 2011.
- QUEIROZ, L. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; CASTRO, A. J. G.; MOURA, M. DE F. V.; BASEIA, I. G.; ARAÚJO, R. M.; BENEVIDES, N. M. B.; LIMA, L. F. A.; LEITE, E. L. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 34–42, 2010.
- Zhao, H., Lan, Y., Liu, H., Zhu, Y., Liu, W., Zhang, J., & Jia, L. Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Polysaccharides from Spent Mushroom Substrates (*Laetiporus sulphureus*) in Acute Alcohol-Induced Mice. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 5863523, 2017