

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Produção e caracterização de exopolissacarídeos produzidos por *Ganoderma lucidum* e seus estudos toxicológicos¹

Joelma Vianello², Bruna Gazolla Batalha², Camila Guimarães de Almeida³, Herta Stutz Dalla Santa⁴, Michele Munk⁵, Leonara Beatriz Fayer de Almeida³, Vanessa Sovrani⁶, Geovana de Carvalho Oronato³, Luiz Fernando Cappa⁵, Humberto de Mello Brandão⁷, Juliana Carine Gern^{7,8}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “ Estudos de Avaliação de Segurança de Nanoprodutos - 01.14.03.001.02.00”, liderado por Juliana Carine Gern.

²Graduanda em Biomedicina UNIPAC, JF Bolsista CNPq. e-mail: joelmavianello95@outlook.com; brunagazollabatalha@yahoo.com.br

³Pós-graduanda da Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: camilagdealmeida@gmail.com; leonarafayer@gmail.com; geovanaonorato@gmail.com

⁴Professor – Universidade Estadual do Centro Oeste. e-mail: hertastutz@gmail.com

⁵Professor – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora MG. e-mail: mimunkbio@gmail.com; luiz.oliveira@ufff.edu.br

⁶Pós-graduanda – Universidade Estadual do Centro Oeste. e-mail: vanessasovrani@gmail.com

⁷Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: humberto.brandao@embrapa.br; juliana.gern@embrapa.br

⁸Orientador

Resumo: Polissacarídeos fúngicos são conhecidos por suas propriedades imunoestimuladoras. Por tanto, os objetivos deste estudo foram obter o exopolissacarídeo (EPS) purificado e caracterizado de *Ganoderma lucidum* e ainda uma fração majoritária, mais pura. Com as amostras, foram conduzidos testes *in vitro* para estudar as propriedades imunomoduladoras e/ou citotóxicas dos mesmos. **Material e Métodos:** A presente pesquisa foi composta pelas seguintes etapas: fermentação, filtragem, extração, centrifugação, purificação, liofilização, cultivo celular, Espectroscopia Raman, Ensaio de enzima endógena superóxido dismutase (SOD) e ensaio da redução do sal de tetrazólio (MTT). **Conclusão:** A exposição aos EPS bruto e fração por 24 h, não apresentaram toxicidade e aumentaram a proliferação de forma significativa no ensaio de MTT. Enquanto ao ensaio de SOD, as amostras não apresentaram alterações nas atividades ($P > 0,05$), que se mantiveram em torno de 65% a 67%.

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*, exopolissacarídeo, toxicidade

Production and characterization of exopolysaccharides produced by *Ganoderma lucidum* and its toxicological studies

Abstract: Fungal polysaccharides are known for their immunostimulatory properties. Therefore, the objectives of this study were to obtain the purified and characterized exopolysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* and still a more pure fraction. With the samples, *in vitro* tests were conducted to study the immunomodulatory and/or cytotoxic properties of the same. **Material and Methods:** The present research was composed of the following steps: fermentation, filtration, extraction, centrifugation, purification, lyophilization, cell culture, Raman spectroscopy, endogenous enzyme superoxide dismutase (SOD) and tetrazolium salt reduction assay). **Conclusion:** Exposure to crude EPS and fraction for 24h did not show toxicity and increased proliferation significantly in the MTT assay. While the SOD test, the samples did not present alterations in the activities ($P > 0.05$), which remained around 65% to 67%.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, exopolysaccharide, toxicity

Introdução

Muitas vacinas não apresentam eficiência satisfatória, além de algumas não serem tão seguras, pois utilizam o patógeno atenuado, mas não inativado. Para algumas doenças há ainda a falta de vacinas eficazes, principalmente porque estas vacinas não conseguem estimular a reposta imune necessária para a proteção adequada dos rebanhos (Gerdtts et al, 2013).

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

A rica biodiversidade brasileira apresenta diversas matérias-primas para prover a confecção de novas nanoestruturas. Os polissacarídeos produzidos por fungos podem ser uma fonte promissora destas matérias-primas, pois tem características que possibilitam sua utilização na formação de nanoestruturas aplicáveis em formulações vacinais, uma vez que apresentam propriedades biológicas como a imunestimulação (Wasser, 2002; Smiderleb et al, 2013).

Materias e Métodos**PRODUÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO DE *GANODERMA LUCIDUM***

A cepa de *Ganoderma lucidum* foi gentilmente cedida pela empresa Brasmicel. A cepa veio em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar). A partir deste inóculo, o cogumelo foi cultivado em laboratório para a produção do exopolissacarídeo. As pesquisas foram realizadas na Embrapa Gado de Leite, no laboratório de Nanotecnologia e na Universidade Federal de Juiz de Fora, no município de Juiz de Fora.

A presente pesquisa foi composta pelas seguintes etapas:

FERMENTAÇÃO

O meio de crescimento do basidiomiceto *Ganoderma lucidum* é composto de 20 g/L glicose, 3,95 g/L de extrato de levedura, 0,3 g/L de $MgSO_4 \cdot H_2O$, e 0,5 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, a fermentação foi conduzida em *shaker* por aproximadamente uma semana a 30 °C.

FILTRAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

O fermentado foi filtrado, o micélio descartado; e o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador. Após a concentração, foi adicionado à amostra álcool absoluto, numa proporção de 4:1 volume/volume (v/v), para a precipitação do EPS, que posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rotações por minuto (RPM). Posteriormente a amostra dissolvida na solução NaCl 1M foi passada em uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (Sephacryl 300^R). As frações foram recolhidas, dialisadas, concentradas e liofilizadas.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

É uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em poucos segundos, informação química e estrutural de quase qualquer material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação. (SANDULA J et al., 1999)

CULTIVO CELULAR

Para esta etapa foram cultivadas as células da linhagem de macrófagos de *Mus musculus* J774. As células foram cultivadas em sete garrafas de 75 mL, para obter uma quantidade necessária dessas células para a exposição ao polímero.

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Foram utilizadas células da linhagem de macrófagos de *Mus musculus* J774 nos quais serão injetados polímeros (*Ganoderma Lucidum*), que ficarão expostos por aproximadamente uma semana em uma estufa de CO² para verificação de possível toxicidade a estas células.

ANÁLISE DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.

Fez-se ensaios de enzima endógena superóxido dismutase (SOD) e ensaio da redução do sal de tetrazólio (MTT).

Resultados e Discussão

O resultado da imagem espectroscopia Raman está ilustrado e descrito abaixo:

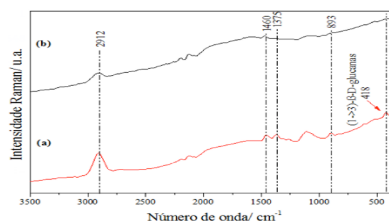


Figura 1. Espectro Raman (a) EPS fração (b) EPS bruto

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Nos espectro Raman do *exopolissacarídeo* bruto e purificado pode ser observada as bandas características do polissacarídeo. Bandas na região de 2912 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 893 cm^{-1} e 418 cm^{-1} podem estar associadas ao estiramento e às ligações químicas de vibração do *exopolissacarídeo*.

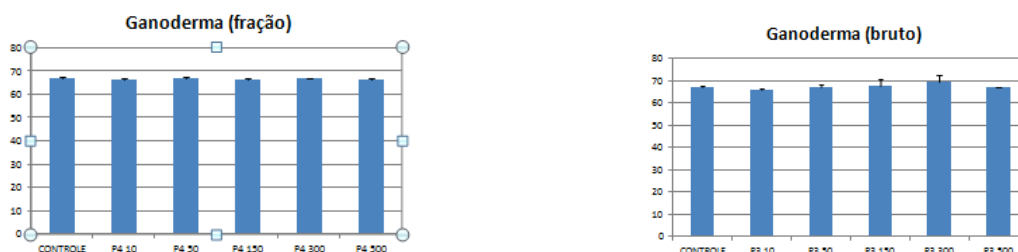


Figura 2 e 3. Resultado ensaio SOD de EPS de (1) *Ganoderma* fração e de (2) *Ganoderma* Bruto

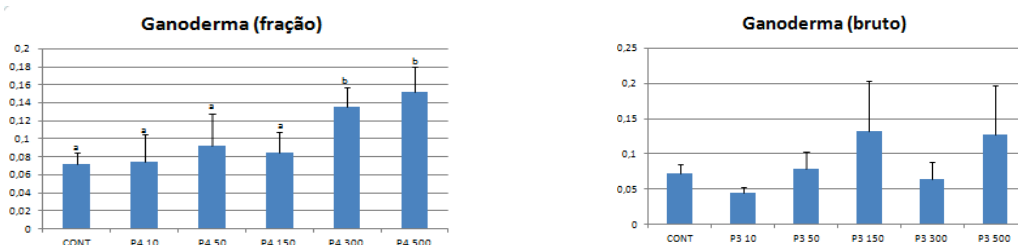


Figura 3 e 5. Resultado ensaio de viabilidade celular MTT de (1) EPS fração e de (2) EPS bruto

Como pode-se observar nas figuras tanto o EPS bruto, quanto as frações não apresentaram efeito citotóxico, inclusive o EPS fração de *Ganoderma lucidum* nas maiores concentrações causou um aumento significativo da proliferação celular, corroborando a literatura sobre as propriedades imunomoduladoras dos mesmos.

Conclusão

Produziu-se, a partir da fermentação de *Ganoderma lucidum*, o exopolissacarídeo EPS que foi parcialmente purificado, obtendo-se uma fração majoritária mais pura, o EPS fração. Estas amostras foram caracterizadas com as técnicas de espectroscopia Raman, que confirmaram que a estrutura dos mesmos correspondia a de polissacarídeos conhecidos como glucanas, que podem apresentar efeitos imunomoduladores.

A exposição aos EPS bruto e fração por 24h, não apresentaram toxicidade e aumentaram a proliferação de forma significativa no ensaio de MTT. Enquanto ao ensaio de SOD, as amostras não apresentaram alterações nas atividades ($P>0,05$), que se mantiveram em torno de 65% a 67%.

Agradecimentos

Juliana Carine Gern , Humberto de Mello Brandão, Bruna Gazolla Batalha, João Vitor Cotrim, Michelle Daiane de Almeida Loures , Geovana De Carvalho Oronato e Camila Guimarães de Almeida.

Referências

GERDTS, V.; MUTWIRI, G.; RICHARDS, J.; DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; POTTER, A. A. **Carrier molecules for use in veterinary vaccines**. Vaccine, v. 31, p. 596– 602, 2013

SANDULA J, KOGOG G, KACURAKOVA, et al . (1999) **Microbiana (1 → 3) -β-D-glucanos, sua preparação, caracterização físico-química e atividade imunomoduladora**. Carbohydr Polym 1999; 38: 247-53

SMIDERLEB, F. R., ALQUINIB, G., TADRA-FEIRB, M.Z., IACOMINI, M., WICHERSC, H. J., VAN GRIENSVENA, L. J. L. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 → 6)-β-d-glucans show

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v. 94, p 91-99. 2013

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 258-274, 2002