



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

LISSANDRA SOUZA QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO DO FUNGO *CARIPIA MONTAGNEI* E DE
AGONISTAS DE PPAR- α NO PROCESSO INFLAMATÓRIO**

**NATAL (RN)
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LISSANDRA SOUZA QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO DO FUNGO *CARIPIA MONTAGNEI* E DE
AGONISTAS DE PPAR- α NO PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora:
Profa. Dr^a. Edda Lisboa Leite

**NATAL (RN)
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA
(PRECISA SER SOLICITADA À BIBLIOTECA)
NO VERSO DA FOLHA DE ROSTO.

AVALIAÇÃO DO EXTRATO DO FUNGO *CARIPIA MONTAGNEI* E DE AGONISTAS
DE PPAR- α NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 27/06/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edda Lisboa Leite
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Suely Ferreira Chavante
Departamento de Bioquímica – UFRN
1º Examinador

Prof^a. Dr^a. Giulianna Paiva Viana de Andrade Souza
Departamento de Bioquímica – FACEX
2º Examinador

A minha orientadora, Edda Lisboa Leite. Pelo incentivo, amizade e por transmitir tanta sabedoria e conhecimento com imensa humildade. Minha imensa gratidão.

A Deus. Eu sei que Ele sempre ajuda e olha por mim...

A minha família. Meus pais, Zélia e Vieira, por terem proporcionado uma vida digna e feliz em suas circunstâncias. Minhas irmãs, Larizza e Lizziane, pelo incentivo e força. Amo muito vocês família!

Ao meu namorado, Gustavo, pelo seu amor, por me entender tão bem, por me apoiar e incentivar sempre. Que mesmo distante demonstra sua presença. Te amo!

As minhas grandes amigas: Katarina, Kaline, Larissa, Roberta, Karla Danielly, Cassandra, Jarine, Cinthia Kaline. Obrigada por existirem e por me apoiarem sempre. Vocês moram no meu coração!

AGRADECIMENTOS

- *A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRN, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.*
- *Aos grandes amigos do Laboratório de Glicobiologia: Marília, Cybelle, Tarciana, Micheline, Leonardo, Maria Emília (Mila), Leila, Júlio César, Joedyson, Marcus, Almino, Adriane e Monique. Sou muito orgulhosa de fazer parte desta equipe. Obrigada pelo apoio e amizade de vocês.*
- *A toda minha turma de mestrado: Ana Cely, Danielle, Ludovico, Rodrigo, Virgínia, Pablo, Juliana, Videany, Micheline, Sérgio e Adriana. Obrigada por tudo! A convivência com vocês foi maravilhosa e com certeza guardo com carinho as lembranças compartilhadas com vocês nesse departamento.*
- *A todos os amigos do departamento, em especial a alguns na qual a convivência foi mais intensa: Cleisyvan, Ana Katarina, Danielle, Gigi, Karla Danielly, Héryka ...*
- *A Prof. Selma Jerônimo e toda equipe do seu laboratório, em especial Glória e Olívia, pela inestimável ajuda nos testes de citotoxicidade e antibiograma.*
- *Aos professores da banca de qualificação Dr. Roberto Dimenstein e Dr. Elizeu Antunes dos Santos do Departamento de Bioquímica da UFRN, pelas valiosas sugestões e correções deste trabalho. Muito obrigada!*
- *A Prof. Iuri Goulart Basseia do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia – UFRN e ao pessoal do Laboratório de Micologia, que me auxiliaram na coleta e identificação dos fungos.*
- *A Prof.(a) Fátima Vitória do Departamento de Química da UFRN, pelo auxílio no espectro de Infravermelho.*
- *A Prof. Rosângela Balaban e a Cristiane do Departamento de Química da UFRN, pela grande ajuda nos espectros de RMN.*
- *A Prof. Maria Teresa Barreto de Oliveira do Departamento de Microbiologia da UFRN pelo auxílio no ensaio de atividade antibacteriana e antifúngica.*
- *Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFRN pelos recursos para a realização deste trabalho.*
- *A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.*

*"Todos os dias quando acordo,
Não tenho mais o tempo que passou
Mas tenho muito tempo...
Temos todo o tempo do mundo..."*

(Renato Russo)

RESUMO

Os fungos tem sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores da indústria farmacológica e alimentar. Dentre os diversos compostos bioativos de natureza polissacarídica presentes nos fungos as glucanas estão entre os mais pesquisados. Estes são polímeros de glucose amplamente distribuídos na natureza e classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica [α , β]. Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição, pertencentes à família de receptores nucleares que se ligam a agonistas específicos e possuem grande importância no controle do processo inflamatório. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química do extrato do fungo *Caripia montagnei*, avaliar seu efeito antiinflamatório e antibacteriano, além de verificar se este efeito acontece via PPAR. *C. montagnei* é constituído de carboidratos ($63.3 \pm 0.73\%$), lipídeos ($21.4 \pm 0.9\%$) e proteínas ($2.2 \pm 0.4\%$). O extrato aquoso resultante do fracionamento desse fungo mostrou ser constituído por carboidratos ($98.7 \pm 0.9\%$) e proteína ($1.3 \pm 0.8\%$). As análises de espectrofotometria de infravermelho e de ressonância magnética nuclear (NMR) demonstraram que o extrato do fungo *C. montagnei* é rico em β -glucanas. Na peritonite induzida por tioglicolato, o extrato de *Caripia montagnei* (50 mg/Kg) conseguiu reduzir o processo inflamatório em $65.5 \pm 0.9\%$, este valor é superior a Wy-14643 ($49.3 \pm 0.65\%$), PFOA ($48.9 \pm 0,69\%$) e clofibrato ($35.2 \pm 0,95\%$), que são agonistas de PPAR- α , e semelhante ao diclofenaco ($81.6 \pm 0,79$). No edema plantar as glucanas de *C. montagnei* (50 mg/Kg) e o L-NAME apresentaram redução do edema de forma semelhante, $91.4 \pm 1.1\%$ e $92,8 \pm 0.9\%$, respectivamente. O óxido nítrico (NO), mediadores da inflamação mostrou que em todos os grupos testados houve redução significativa ($P < 0.001$) dos níveis de nitrato/nitrito quando comparados ao controle positivo. No ensaio de citotoxicidade as glucanas de *C. montagnei* não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 e 40.0 ug/100uL) no período de 4 horas. A atividade antibacteriana (30, 90 e 150 mg/mL) revelou que não houve inibição do crescimento bacteriano. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as glucanas de *Caripia montagnei* possuem um grande potencial de aplicação como antiinflamatório. Este efeito é mediado parcialmente por ativação dos PPARs e por inibição da COX e iNOS.

Palavras-chave: Fungo; Atividade Antiinflamatória; Óxido Nítrico; PPAR, *Caripia montagnei*.

ABSTRACT

The mushrooms have been object of intense research in view of its potential raising of application in different sectors of the pharmacology and alimentary industry. Among diverse bioactive composites of polysaccharides nature that exist in the fungus the glucans are much searched. These are polymers of glucose and classified as the type of glycosidic linking [α , β]. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), transcription factors belonging to the family of nuclear receptors that bind themselves to specific agonists, have shown their importance in controlling the inflammatory process. The aim of this study was to perform a chemical characterization of extract from the mushroom *Caripia montagnei*, assess its antiinflammatory and antibacterial effect and determine if this effect occurs via PPAR. This mushroom is composed of carbohydrates (63.3 \pm 4.1%), lipids (21.4 \pm 0.9%) and proteins (2.2 \pm 0.3%). The aqueous solution resulting from the fractionation contained carbohydrates (98.7 \pm 3.3%) and protein (1.3 \pm 0.25%). Analyses of infrared spectrophotometry and of nuclear magnetic resonance demonstrated that the extract of mushroom *C. montagnei* is rich in β -glucans. In thioglycolate-induced peritonitis, the *C. montagnei* glucans (50 mg/kg) reduced the inflammatory process in 65.5 \pm 5.2% and agonists, pharmacological ligands, for PPAR: Wy-14643 (49.3 \pm 6.1%), PFOA (48.9 \pm 3.8%) and clofibrate in 45.2 \pm 3.2%. Sodium diclofenac showed a reduction of 81.65 \pm 0.6%. In the plantar edema, the glucans from *C. montagnei* (50 mg/kg) and L-NAME reduced the edema to a similar degree 91.4 \pm 0.3% and 92.8 \pm 0.5 %, respectively. In all the groups tested, nitric oxide (NO), an inflammation mediator, showed a significant reduction in the nitrate/nitrite levels when compared to the positive control (P<0.001). The *C. montagnei* glucans did not show cytotoxicity in the concentrations tested (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 μ g/100 μ L). Antibacterial activity demonstrated that, unlike total extract, there was no inhibition of bacterial growth. The *C. montagnei* glucans show great potential for antiinflammatory applications. This effect suggests that it is mediated by PPAR activation and by COX and iNOS inhibition.

Keywords: Fungus; Antiinflammatory Activity; Nitric Oxide; PPAR, *Caripia montagnei*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Composição e estrutura da parede celular de um fungo.....	21
FIGURA 2	Fórmulas estruturais das glucanas.....	22
FIGURA 3	Esquema simplificado do processo inflamatório.....	25
FIGURA 4	Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a vários estímulos, como bradicinina ou acetilcolina.....	27
FIGURA 5	Tipos de PPARs e efeitos sobre a expressão gênica.....	30
FIGURA 6	Estrutura do PPAR, um receptor nuclear.....	32
FIGURA 7	Mecanismo de ação dos PPARs.....	33
FIGURA 8	Fungo <i>Caripia montagnei</i>	37
FIGURA 9	Fluxograma da metodologia.....	40
FIGURA 10	Esquema de obtenção do extrato de <i>C. montagnei</i>	45
FIGURA 11	Esquema do ensaio de edema plantar induzido por carragenana.....	49
FIGURA 12	Esquema de Peritonite Induzida por Tiogicolato.....	51

FIGURA 13 Percentual dos constituintes carboidratos e proteínas do extrato de <i>C. montagnei</i>	56
FIGURA 14 Cromatografia descendente em papel do hidrolisado do extrato de <i>C. montagnei</i> , utilizando como padrão monossacarídeos.....	57
FIGURA 15 Espectro de infravermelho do extrato de <i>Caripia montagnei</i>	59
FIGURA 16 Espectro de R.M.N. (C^{13}) do extrato de <i>Caripia montagnei</i>	61
FIGURA 17-A Espectro de R.M.N. (1H) do extrato de <i>Caripia montagnei</i> -região entre 1.4 a 3.4 ppm.....	63
FIGURA 17-B Espectro de R.M.N. (1H) do extrato de <i>Caripia montagnei</i> -região entre 3.6 a 10.5 ppm.....	64
FIGURA 18 Efeito antiinflamatório dos extratos de <i>C. montagnei</i> no edema plantar induzido por carragenana.....	66
FIGURA 19 Efeito antiinflamatório do extrato de <i>C. montagnei</i> na concentração de 50 mg/Kg e do L-NAME no edema plantar induzido por carragenana.....	67
FIGURA 20 Efeito antiinflamatório do extrato de <i>C. montagnei</i> na concentração de 50 mg/Kg e dos agonistas de PPAR no edema plantar induzido por carragenana.....	68
FIGURA 21 Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos controle. A- Controle negativo (salina) ; B- Controle Positivo (Carragenana – sem tratamento).....	69
FIGURA 22 Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Extrato <i>Caripia montagnei</i> 10 mg/Kg ; B- Extrato <i>Caripia montagnei</i> 30 mg/Kg.....	70

FIGURA 23 Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Extrato *Caripia montagnei* 50 mg/Kg ; B- L-NAME.....70

FIGURA 24 Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Agonista de PPAR Clofibrato ; B- Agonista de PPAR PFOA.....71

FIGURA 25 Atividade antiinflamatória dos extratos de *C. montagnei*, agonistas de PPAR e diclofenaco sódico na peritonite induzida por tioglicolato.....72

FIGURA 26 Atividade antiinflamatória do extrato de *C. montagnei*, 50mg/Kg, e agonistas de PPAR na peritonite induzida por tioglicolato.....73

FIGURA 27 Dosagem dos teores de NO (NO₂/NO₃) no lavado peritoneal de camundongos Swiss com peritonite induzida por tioglicolato, e tratados previamente com os extratos de *C. montagnei*.....74

FIGURA 28 Dosagem dos teores de NO (NO₂/NO₃) no lavado peritoneal de camundongos Swiss com peritonite induzida por tioglicolato, e tratados previamente com os extratos de *C. montagnei* e demais grupos citados.....75

FIGURA 29 Efeito dos extratos de *C. montagnei* sobre a transformação do MTT em formazan em células mononucleares do sangue periférico.....76

FIGURA 30 Atividade antibacteriana do extrato do fungo de *C. montagnei* frente a bactérias do grupo gram-positivo (a) e gram-negativo (b).....77

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 Correlação entre diferentes espécies de fungos e seus alvos terapêuticos.....	19
TABELA 02 Composição centesimal do fungo <i>Caripia montagnei</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

- AINES:** antiinflamatórios não esteroidais
- cNOS:** Óxido nítrico sintetase constitutiva
- COX:** enzima ciclooxigenase
- DBD:** domínio de ligação ao DNA
- EAP:** extrato aquoso de polissacarídeos
- EAPCM:** extrato aquoso de polissacarídeos do fungo *Caripia montagnei*
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- eNOS:** Óxido nítrico sintetase endotelial
- HE:** Hematoxilina e Eosina
- ICAM-1:** Molécula de adesão intracelular 1
- IL-1 β :** Interleucina 1 β
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-8:** Interleucina 8
- iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível
- LBD:** domínio de ligação ao agonista
- L-NAME:** éster metil L-N-nitroarginina
- LPS:** ipopolissacarídeo
- LTB₄:** leucotrieno B₄
- MTT:** brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol)-2,5- difenil tetrazolium
- NF- κ B:** Fator nuclear capa beta
- NK:** célula natural killer
- nNOS:** Óxido nítrico sintase neuronal
- PBS:** Tampão salina fosfato
- PCR:** Proteína C Reativa
- PFOA:** ácido perfluorooctanóico
- PPAR:** Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma
- PPRE:** Elemento responsivo específico ao PPAR
- RXR:** receptor do ácido 9-cis retinóico
- TNF α :** Fator de Necrose Tumoral α
- TXA₂:** Tromboxano A₂
- VCAM-1:** Molécula de adesão de células vasculares 1

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Fungos	17
1.2.	Atividades Farmacológicas das Glucanas fúngicas	19
1.3.	Inflamação	24
1.3.1.	Óxido Nítrico	26
1.3.2.	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR)	28
2.	JUSTIFICATIVA	35
3.	OBJETIVOS	36
4.	MATERIAIS E METÓDOS	37
4.1.	Materiais	37
4.1.1.	Fungo	37
4.1.2.	Animais	38
4.1.3.	Outros Materiais	38
4.1.4.	Aparelhos	39
4.2.	Metodologia	40
4.2.1.	Composição Centesimal	41

4.2.2.	Obtenção do Extrato de <i>Caripia montagnei</i>	44
4.2.3.	Análises Químicas	46
A)	Açúcares Totais	46
B)	Proteínas	46
4.2.4.	Cromatografia Descendente em Papel	46
4.2.5.	Análises Espectrofotométricas	47
4.2.5.1.	Infravermelho	47
4.2.5.2.	Ressonância Magnética Nuclear	47
4.2.6.	Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato de <i>C. montagnei</i> no edema plantar induzido por carragenana	47
4.2.7.	Análises Histológicas	49
4.2.8.	Avaliação do Efeito Antiinflamatório do Extrato de <i>C. montagnei</i> na Peritonite Induzida por Tioglicolato de Sódio	49
4.2.9.	Avaliação dos Teores de Nitrato/Nitrito	51
4.2.10.	Avaliação da Citotoxicidade do Extrato de <i>Caripia montagnei</i>	52
A)	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico	52
B)	Tratamento das células com os extratos	52
4.2.11.	Atividade Antibacteriana	53
4.2.12.	Análises Estatísticas	54

5.	RESULTADOS	55
5.1.	Composição centesimal	55
5.2.	Rendimento da extração aquosa de carboidratos	55
5.3.	Análises químicas do extrato do fungo	56
5.4.	Cromatografia descendente em papel	57
5.5.	Análises Espectrofotométricas	57
5.5.1.	Infravermelho	57
5.5.2.	Ressonância Magnética Nuclear	60
5.6.	Edema plantar induzido por carragenana	65
5.7.	Análises Histológicas	68
5.8.	Peritonite induzida por tioglicolato	71
5.9.	Avaliação dos teores de Nitrato / Nitrito	73
5.10.	Citotoxicidade	75
5.11.	Atividade antibacteriana	76
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÕES	84
8.	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos

Os fungos são um vasto grupo de organismos classificados no reino Fungi. Estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, como os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. Estima-se que existam mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas no mundo, embora, apenas aproximadamente 70.000 tenham sido descritas (CARLILE & WATKINSON, 1996). Ou seja, menos de 5% das espécies possivelmente existentes. Entre as espécies já conhecidas existem várias com grande importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, ácidos orgânicos, fármacos e inúmeros outros produtos. Assim, a busca de novas espécies com distintas propriedades de valor biotecnológico é uma constante.

É difícil definir os fungos, já que é um grupo diverso. No entanto, eles possuem algumas características em comum que os distinguem dos outros seres vivos. Em geral, apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rígidas, ricas em quitina; têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e necessitam de material orgânico para viver. A nutrição dos fungos é feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas por eles produzidas, e que degradam produtos como celulose e amido. Os fungos são eucarióticos, isto é, possui um núcleo típico no interior de suas células, comparável ao das plantas e animais. Reproduzem-se por via sexual ou assexual e, assim, possuem divisões celulares do tipo mitose e meiose.

Os fungos são encontrados nos mais variados ambientes: no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e detritos em geral. Estes microorganismos

desempenham diversas funções, entre elas a degradação da matéria orgânica seja de origem animal ou vegetal. Causam as micoses no homem, animais e plantas, podem destruir alimentos e materiais como madeiras e tecidos, etc. Os fungos têm grande relevância para a medicina, pois algumas espécies produzem substâncias como antibióticos, antioxidantes, antiinflamatórios, esteróides, ácidos orgânicos etc. As pesquisas atuais vêm mostrando uma série de atividades biológicas e farmacológicas que os fungos apresentam. São atividades imunomodulatórias (LIU *et al.*, 1993); antitumorais (CHO *et al.*, 2002); hepatoprotetora (YEUNG, CHIU & OOI, 1994); antiinflamatória, antibacteriana, antioxidante, entre outras, conforme tabela 01.

Os fungos também têm grande valor para a indústria alimentícia, pois alguns deles são comestíveis e agem como fermentadores de alimentos como na produção de vinho, cerveja, pão, queijo etc (REY, 1998).

No Brasil, um país de rica biodiversidade, a busca de novas espécies de fungos deverá produzir resultados extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico.

TABELA 01: Correlação entre diferentes espécies de fungos e seus alvos terapêuticos

	anti-bacteriano	anti-candida	anti-inflamatório	anti-oxidante	anti-tumoral	pressão-sanguínea	moderador da glicemia	cardio-vascular	reduzidor de colesterol	Resposta imune	Tônico Renal	Pulmões / Respiratório	Tônico Nervoso	potencializador sexual	reduzidor de stress
<i>Agaricus brasiliensis</i>					x	x		x		x	x				
<i>Cordyceps sinensis</i>	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Flammulina velutipes</i>					x						x				
<i>Fomes fomentarius</i>	x				x	x									
<i>Ganoderma applanatum</i>	x		x		x									x	
<i>Ganoderma lucidum</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Ganoderma oregonense</i>	x				x				x		x			x	x
<i>Grifola frondosa</i>	x				x	x	x	x			x			x	
<i>Hericium erinaceus</i>	x				x										x
<i>Inonotus obliquus</i>	x				x	x		x			x		x		
<i>Lentinula edodes</i>	x	x			x	x	x	x			x	x	x		x
<i>Phellinus linteus</i>	x		x			x									
<i>Piptoporus betulinus</i>	x		x			x					x				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	x					x	x		x	x					x
<i>Polyporus sulphureus</i>	x														
<i>Polyporus umbellatus</i>	x		x		x	x					x		x	x	
<i>Schizophyllum commune</i>		x			x	x									
<i>Trametes versicolor</i>	x				x	x	x				x	x	x		

Fonte: site: www.fungiperfecti.com

1.2. Atividades farmacológicas de glucanas fúngicas

Os polissacarídeos fúngicos, tanto pertencentes à parede celular assim como, os extracelulares, têm sido investigados por apresentarem uma variedade de respostas biológicas tais como atividade antitumoral, antiinflamatória e imunomoduladora (WASSER, 2002). Dentre os diversos compostos bioativos de natureza polissacarídica presentes nos fungos, as glucanas estão entre os mais pesquisados.

As glucanas são polímeros glicosídicos amplamente distribuídos na natureza e classificadas conforme o tipo de ligação glicosídica α e β da cadeia principal. Nos fungos, estas moléculas participam como componentes menores do citosol, da parede celular e como polissacarídeos excretados ao meio (WILLIAMS, 1997). São poucos os registros sobre as α -glucanas de fungos na literatura. Ao contrário, as β -glucanas são os carboidratos encontrados nos fungos em maiores quantidades.

Na parede celular dos fungos, estes polímeros estão normalmente ligados à proteína, lipídeos e outros carboidratos (Figura 01).

A função específica da glucana na fisiologia do fungo não está completamente esclarecida; entretanto, considera-se que sua principal função estrutural seja auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular (SEVIOUR, STASINOPOULOS, AUER e GIBBS, 1992). Essas características conferem ações biológicas distintas a essas macromoléculas sendo a estrutura química, um fator fundamental para a atividade das glucanas sobre o sistema imunológico (BROWN & GORDON, 2003).

Vários são os efeitos terapêuticos das glucanas sobre os sistemas orgânicos, entre eles temos o efeito antiinflamatório, anti-tumoral e o de prevenir infecções.

Desde a década de 80, as β -glucanas são utilizadas no Japão no tratamento de pacientes com câncer e comercializados com nomes como, Krestin® (*Trametes versicolor*), Lentinan® (*Lentinula edodes*) e Sonifilan® (*Schizophyllum commune*) (MIZUNO, 1999).

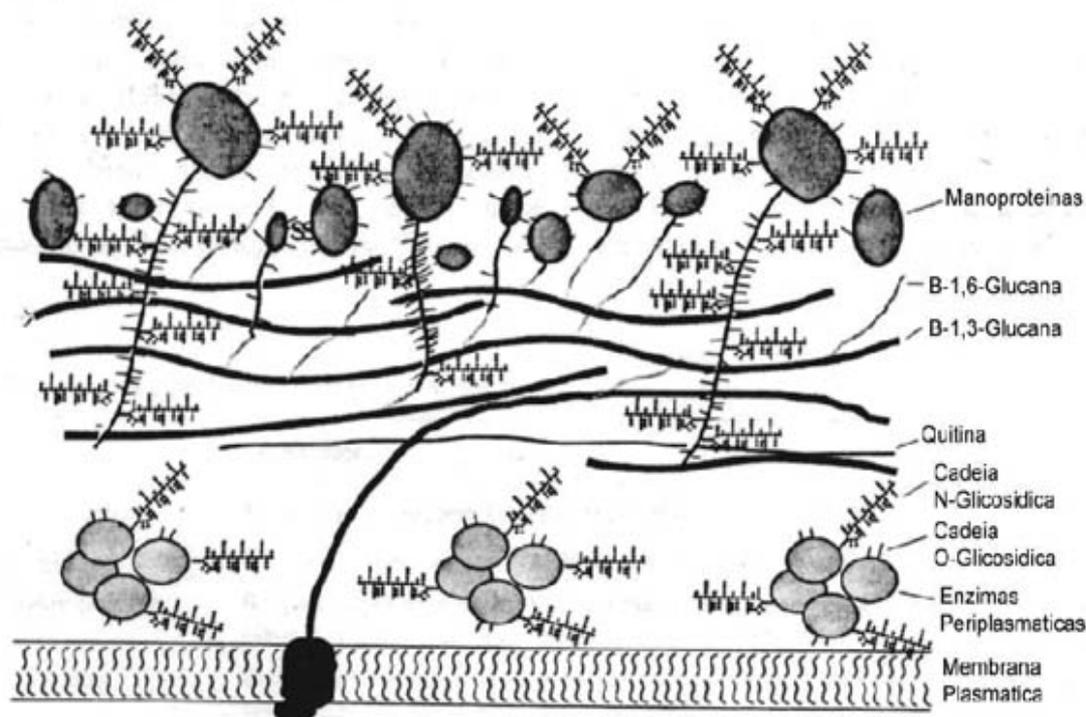


Figura 01: Composição e estrutura da parede celular de um fungo. A parede celular, que está localizada do lado externo da membrana plasmática, consiste de duas camadas. Da camada interna provém firmeza da parede celular, e esta é constituída por glucanas beta-1,3 e beta-1,6 que estão complexadas com quitina. A camada externa consiste de manoproteínas que estão covalentemente ligadas à camada interna de glucanas. Fonte: (<http://www.iq.unesp.br>).

A aplicação terapêutica das glucanas parece depender da estrutura química e da conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças na estrutura básica das β -glucanas resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (COLLEONI-SIRGHIE, FULTON, WHITE, 2003). (Figura 02).

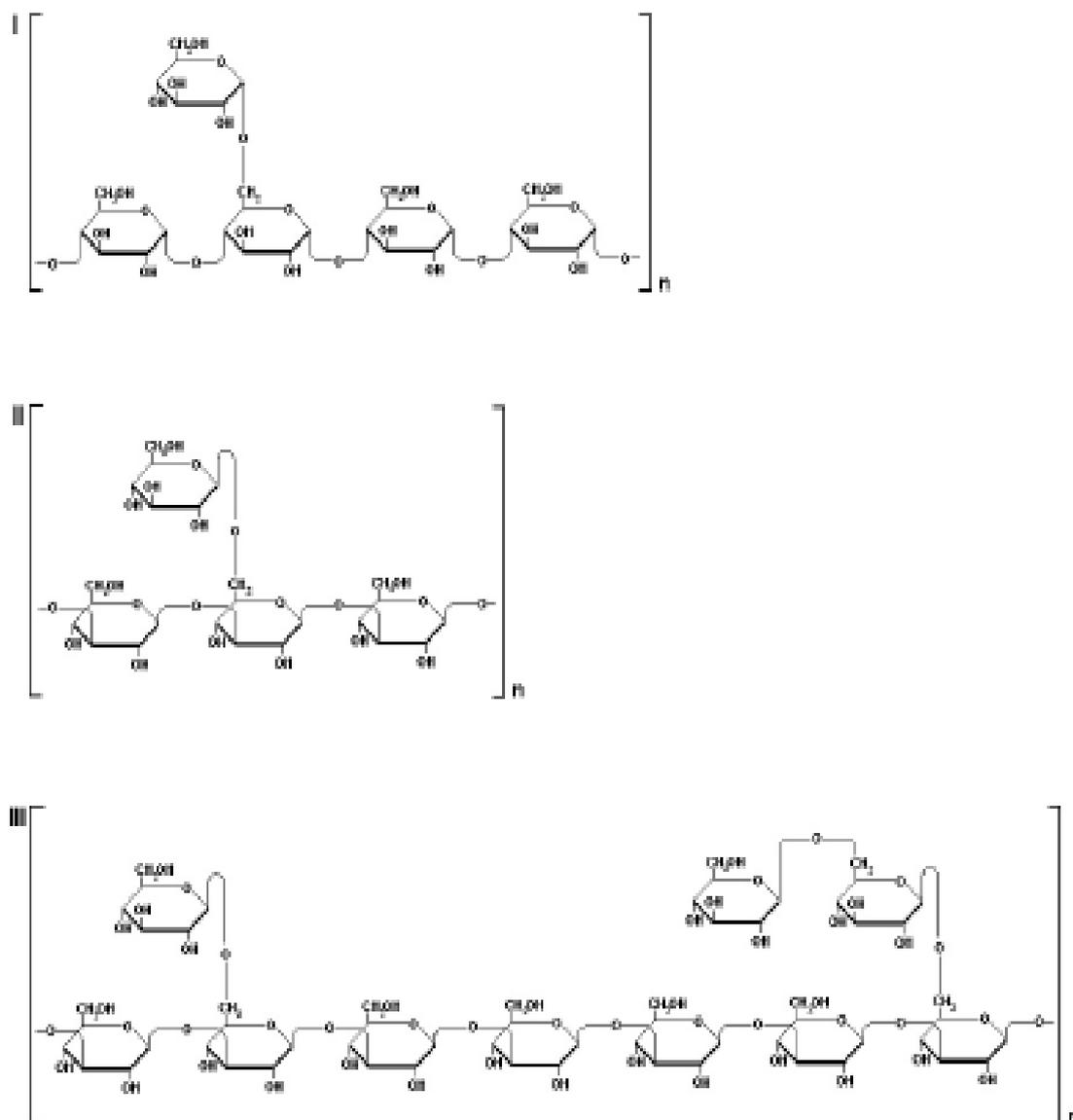


Figura 02: Fórmulas estruturais das glucanas. I) α -(1.4) (1.6) - glucana; II) β -(1.3) (1.6)-glucana, substituída por unidades glucosídicas com frequência variada; III. β - (1 .3)(1 .6)-glucana, substituída por unidades glucosídicas a cada cinco unidades da cadeia principal. Fonte: SILVA, M. L. C. *et al.*

O mecanismo de ação antitumoral das β -glucanas difere daquele envolvido nos tratamentos quimioterápicos convencionais. As glucanas atuam ativando e reforçando as diversas funções imunológicas do hospedeiro, constituindo-se, portanto, em um tratamento do tipo imunoterápico, ativando as células NK (*Natural Killer*), os macrófagos, as células T e a liberação de citocinas/interleucinas assim

como a produção de anticorpos (MIZUNO, 1999). As β -glucanas são reconhecidas pelo sistema imune inato dos vertebrados através de receptores de superfície celular, designado primariamente para o controle de patógenos fúngicos (ADEREM & ULEVITCH, 2000). As β -glucanas reconhecem e se ligam aos receptores de diversas células humanas, principalmente leucócitos, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e NK, como também em receptores de células não-imunes como as endoteliais e os fibroblastos (BROWN & GORDON, 2003).

Recentemente, foram identificados três receptores celulares de β -glucanas: CR3, dectin-1 e lactosilceramida (ZIMMERMAN *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 1999; BROWN & GORDON, 2001; 2003). Os CR3 são receptores celulares responsáveis por diversas atividades *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- α , IFN- γ e IL-6) em células NK, principalmente, na presença de patógenos (ROSS *et al.*, 1999). Os receptores do tipo dectin-1, de monócitos e macrófagos, possuem um ligante para polissacarídeos exógenos e outro ligante co-estimulatório para células T. Alguns estudos demonstraram que esses receptores celulares e também o lactosilceramida de linfócitos reconhecem β -glucanas, principalmente com estrutura do tipo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) (ZIMMERMAN *et al.*, 1998; BROWN & GORDON, 2003).

O maior obstáculo na utilização clínica das β -glucanas é a falta relativa de solubilidade em meio aquoso, limitando a eficiência farmacológica. Estão sendo realizados estudos sobre modificações químicas, levando-se a acreditar em excelentes resultados para estas e novas aplicações (GIESE, BARBOSA E CORRADI DA SILVA, 2003).

O desenvolvimento de estudos científicos que comprovem as atividades biológicas imunomodulatória, antiinflamatória, antitumoral e antiviral das β -glucanas,

é fundamental para relacionar o principal constituinte (β -glucanas) e as suas propriedades medicinais, visando à comprovação da sua eficácia e segurança para uso humano.

1.3. Inflamação

Todos os organismos vivos possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas de inflamação.

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício

Desde a antiguidade, os gregos já a definiam pelos seus sinais e sintomas típicos, considerados sinais cardinais: calor, rubor, tumor e dor.

As causas da inflamação podem ser endógenas e exógenas. As endógenas seriam aquelas derivadas de degenerações ou necroses tissulares e as derivadas de alterações na resposta imunológica (por imunocomplexo ou autoimune). Enquanto as exógenas poderiam ser atribuídas a agentes físicos (calor e frio; eletricidade; radiações; sons e ultra-sons; magnetismo; gravidade; traumas mecânicos e atritos) e agentes químicos (inorgânicos e orgânicos), ou até mesmo agentes biológicos (infecciosos ou parasitários) (PEREIRA E BOGLIOLO, 2000).

Os mecanismos de aparecimento das inflamações são comuns (Figura 03). O agente inflamatório age sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores que ao se ligarem nos receptores existentes nas células da microcirculação e nos

leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício (PEREIRA E BOGLIOLO, 2000).

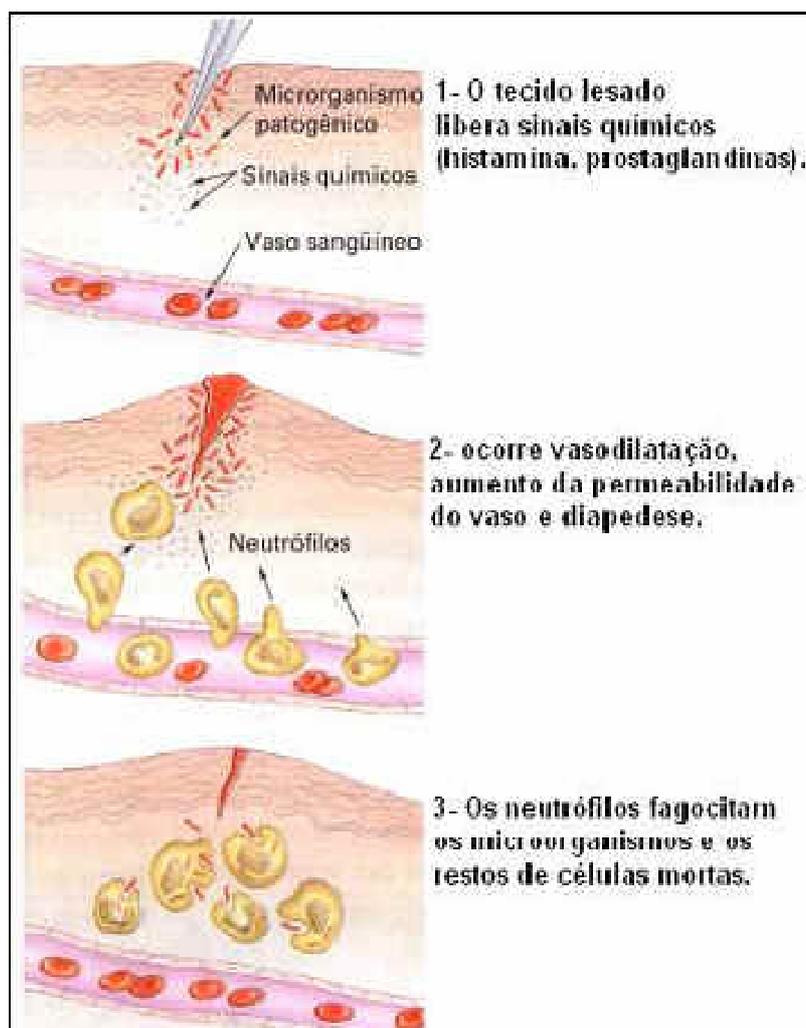


Figura 03: Esquema simplificado do processo inflamatório.
Fonte: site <http://www.afh.bio.br/imune/img/Imune13.jpg>

Cessada a ação do agente inflamatório, reduz-se a liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos.

Um dos principais eventos que ocorrem durante a inflamação é a formação do extravasamento de leucócitos, que envolve uma complexa seqüência de eventos de

adesão e sinalização entre leucócitos e células endoteliais. Antes disso ocorre a expressão de moléculas de adesão como E-selectinas, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1) (FUCHS et al., 2001). Como conseqüência, este evento culmina com a liberação de mediadores da inflamação.

1.3.1. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO), é um mediador inflamatório, sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e certo grupo de neurônios do cérebro. Várias células utilizam a arginina para sintetizar o óxido nítrico (PALMER, 1988). Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS).

Existem três formas de NOS, duas denominadas constitutivas e dependentes do cálcio (cNOS), que são a endotelial e a neuronal, as quais sintetizam NO em condições normais. A outra forma é independente do cálcio (iNOS) a qual não se expressa ou se expressa em baixa quantidade em condições fisiológicas (ADAMS, 1996).

O endotélio usa o óxido nítrico para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, promovendo dilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial (FARREL & BLAKE, 1996).

O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a conseqüente formação

de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (Figura 04).

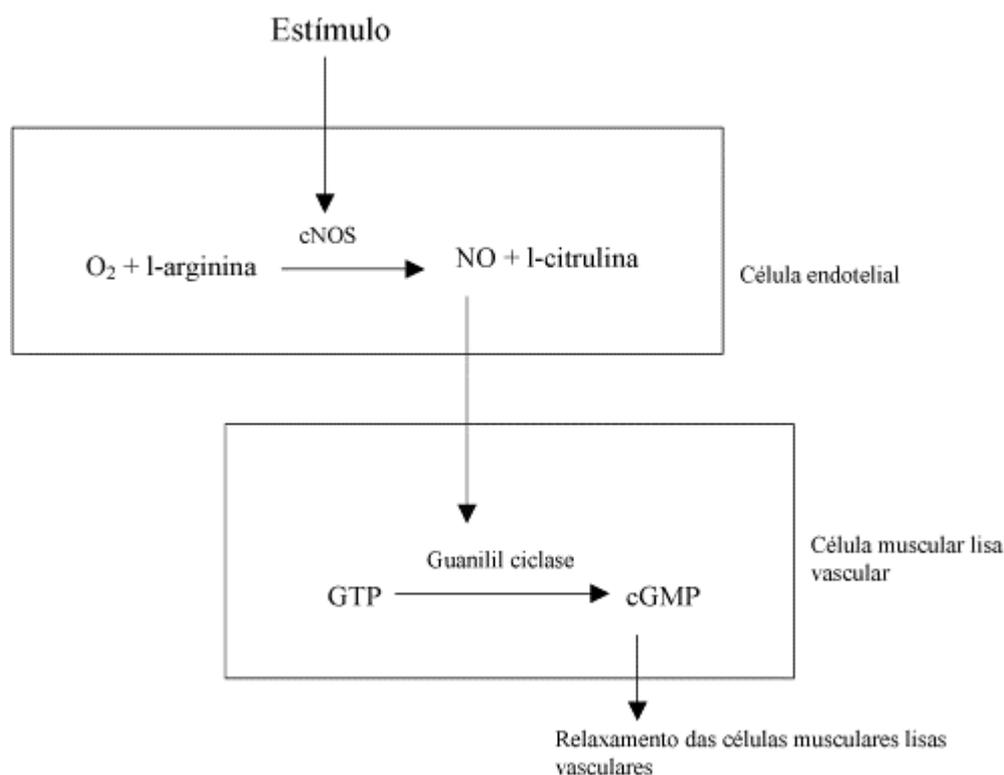


Figura 04: Mecanismo de vasodilatação mediado pelo óxido nítrico (NO), em resposta a vários estímulos, como bradicinina ou acetilcolina. A enzima óxido nítrico-sintase constitutiva (cNOS) utiliza o oxigênio molecular (O₂) e o aminoácido L-arginina para formar o NO. O NO ativa a guanilil ciclase nas células da musculatura lisa vascular, aumentando o nível de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), produzindo relaxamento e vasodilatação.

Os macrófagos, células do sistema imunitário, produzem óxido nítrico como composto nocivo para bactérias, devido à sua capacidade de formar espécies reativas de nitrogênio. Nas reações inflamatórias, o óxido nítrico medeia a ativação de citocinas, mudança na permeabilidade vascular do tecido inflamado, potencializa a ação do TNF- α e interleucina -1 β pelos leucócitos e estimula a atividade angiogênica por monócitos humanos (RALTSON, 1997). Durante o processo inflamatório a iNOS é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos no endotélio e

musculatura lisa vascular de 2 a 4 horas depois da exposição ao agente inflamatório. A iNOS requer síntese protéica para sua expressão e sua atividade persiste por mais de 24 horas (ADAMS, 1996). A indução de iNOS pode ser suprimida pelos glicocorticóides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas (DAVIES, FULTON e HAGEN, 1995).

A expressão da iNOS (induzível) é consequência de uma resposta inflamatória localizada ou difusa de uma infecção ou dano tecidual, isto promove inibição do crescimento de patógenos microbianos. Porém, segundo Salvemini et al. (1996), o NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na reação inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Existem fármacos como o L-NAME (N-arginina metil éster) que atuam inibindo a óxido nítrico sintase e assim promovem redução do processo inflamatório.

1.3.2. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR)

Evidências crescentes têm demonstrado a importância dos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs) no controle de diversos processos biológicos relacionados principalmente ao metabolismo lipídico, homeostase de glicose e ao processo inflamatório (TAVARES, HIRATA E HIRATA, 2007).

Os PPARs são fatores de transcrição, pertencente à família de receptores nucleares que se ligam a agonistas específicos, também conhecidos como ligantes ou ativadores de PPARs. Este grupo de fatores foi descoberto em 1990 por Isseman

& Green que constataram sua existência e assim os denominaram pelo fato de serem ativados por substâncias que induziam a proliferação dos peroxissomas.

Existem três isoformas identificadas: PPAR- α , predominantemente expresso em tecidos em que ocorra catabolismo de ácidos graxos, como fígado, trato gastrointestinal, rins, coração e músculo. PPAR- β , também conhecido como PPAR- δ é expresso em muitos tecidos e o PPAR- γ , também encontrado sob três isoformas: PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 e PPAR- γ 3 (MICHALIK E WAHLI, 1999). (Figura 05)

A ação dos PPARs é dependente do ligante e, esses, por sua vez, podem ser naturais ou endógenos, como os ácidos graxos e seus derivados, ou sintéticos, como as drogas antiinflamatórias, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Os ligantes sintéticos são mais potentes e específicos (BOEHM et al, 1995). Alguns exemplos de agonistas sintéticos de PPAR- α são o clofibrato, ácido perfluorooctanóico (PFOA) e Wy-14643.

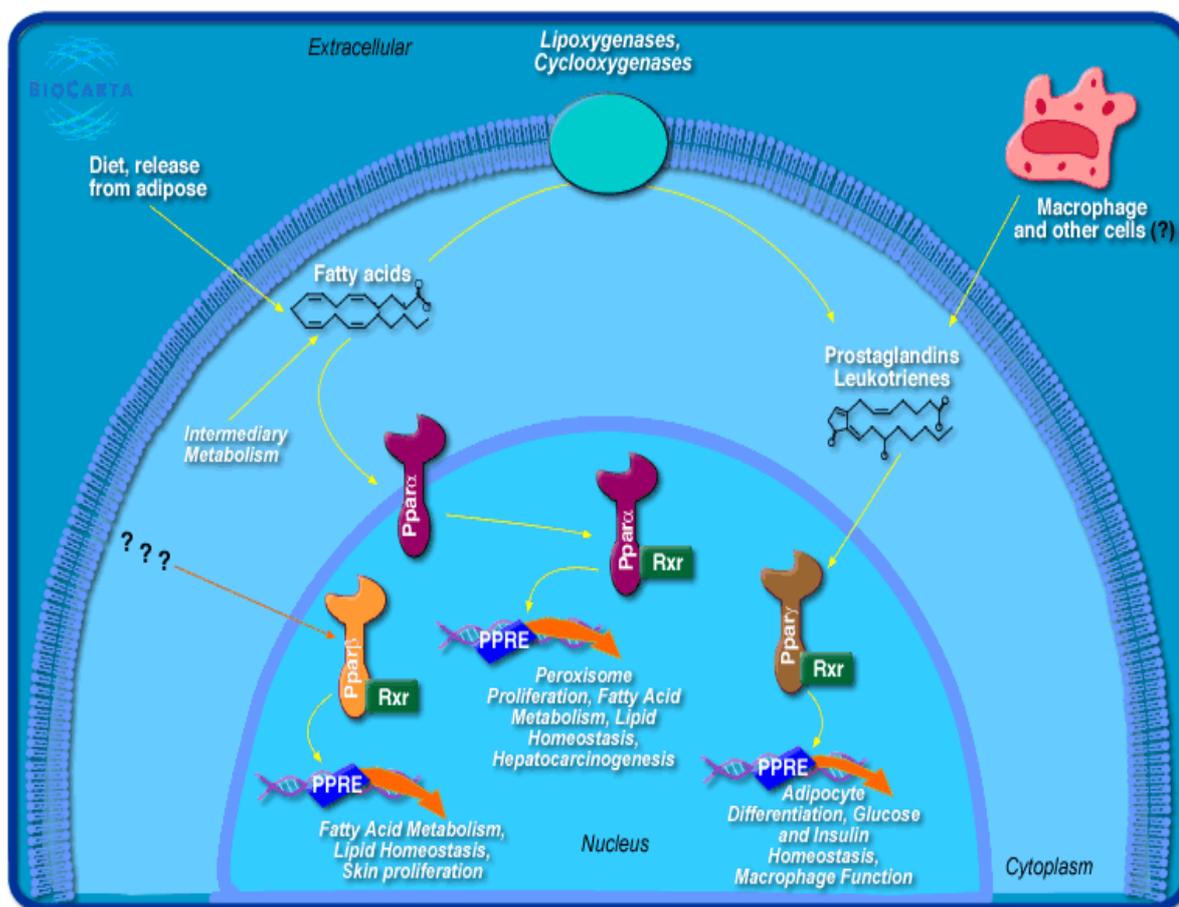


Figura 05: Tipos de PPARs e efeitos sobre a expressão gênica.
 Fonte: http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/m_pparPathway

A família de fatores de transcrição PPARs é foco de muito interesse devido ao seu possível papel na regulação da inflamação e resposta imune. PPAR α e PPAR γ estão implicados na regulação de macrófagos e células endoteliais nas respostas inflamatórias. Os resultados parecem frequentemente depender dos ligantes usados e dos parâmetros inflamatórios que estão sendo mensurados (ROBERT et al., 2002).

A magnitude e características do processo inflamatório são determinadas em parte pela via do tráfico de leucócitos para os locais de injúria e infecção, e este processo depende do controle apropriado da expressão de genes codificando peptídeos quimicamente atraídos e seus receptores (HAMILTON et al., 2007).

A estrutura dos PPARs é constituída por vários domínios funcionais (LAUDET E HANNI, 1992), conforme mostra a figura 06: o domínio A/B (NH₂ terminal), pouco conservado entre as três isoformas de PPARs, cujo estado de fosforilação contribui para a modulação da atividade do PPAR alfa e gama e está localizado próximo ao sítio de ativação transcricional independente de ligante (AF-1); domínio C (ou DBD – DNA *binding domain*) contém os dedos de zinco, que são dois arranjos protéicos constituídos de uma alfa-hélice e uma folha beta-pregueada, mantidas unidas por um íon de zinco na região central, que confere maior estabilidade ao dobramento, permitindo associações firmes quando da ligação aos PPREs (elemento responsivo específico ao PPAR) na região regulatória dos genes responsivos ao PPAR; região D, importante como co-fator, e a região EF (COOH-terminal), a qual possui o domínio LBD (*ligand binding domain*) e o sítio de ativação transcricional dependente do ligante (AF-2) (SCHOONJANS, STAELS e AUWERX, 1996). Os domínios DBD e LBD são as regiões mais conservadas em todos os PPARs.

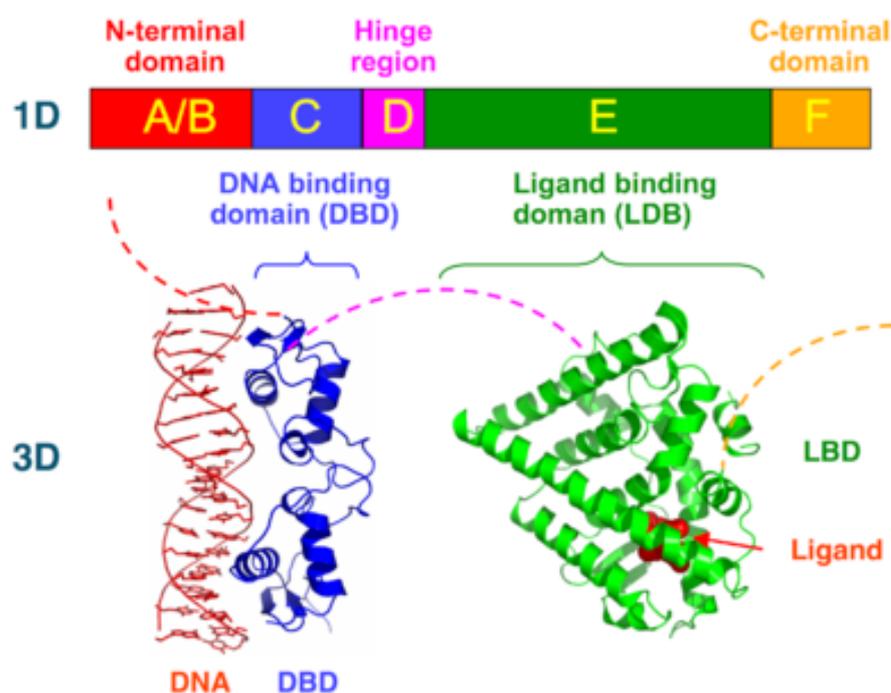


Figura 06: Estrutura do PPAR, um receptor nuclear.
Fonte: Wikipédia

O agonista (ligante) em interação com o PPAR se liga com um fator protéico, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Isto promove a dimerização dos PPARs com os RXR, formando um complexo capaz de se ligar ao PPRE, localizado na região regulatória dos genes que estão sob seu controle transcricional (TAVARES, HIRATA E HIRATA, 2007) (Figura 07). Estes receptores são ativados fisiologicamente em resposta a ácidos graxos poliinsaturados, dentre eles o ácido araquidônico, e seus metabólitos eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), tendo estes um papel chave no processo inflamatório e resposta imune, sendo caracterizados principalmente pela sua distribuição nos tecidos e a função metabólica exercida.

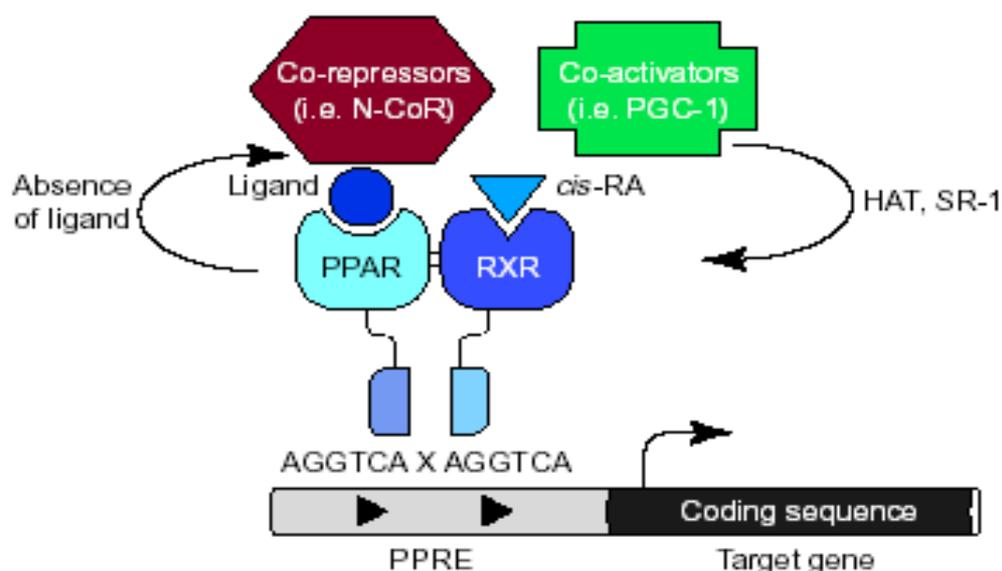


Figura 07: Mecanismo de ação dos PPARs.
Fonte: Trends in Pharmacological Sciences

Pacientes hiperlipidêmicos, tratados com fibratos, que são agonistas de PPAR, tiveram redução de algumas proteínas ligadas ao processo inflamatório, tais como a Proteína Reativa C (PCR), fator de necrose tumoral (TNF)- α e interferon- γ (BOCOS et al, 1995). Os fibratos inibem a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a produção de IL-6 e nos monócitos, reduzem a expressão de IL-2 e TNF α . Fortes evidências confirmam que os PPARs são capazes de inibir o processo inflamatório em alguns tipos de células. Este efeito pode ser mediado por dois mecanismos. Primeiramente os metabólitos de lipídios podem servir como ligantes para os PPARs, talvez ativando enzimas responsáveis neste processo. Isto foi demonstrado através do fato de que o PPAR- α pode estar envolvido no catabolismo de leucotrienos B4 (LTB4) (DEVCHAND et al, 1996), e PPAR- γ induzindo a lipoxigenase. Em segundo lugar os PPARs podem influenciar citocinas induzidas por outros fatores de transcrição com papel mediador no processo inflamatório, como o NF- κ B. Outro fato interessante é

que a ativação de PPAR- γ inibe a transcrição da enzima óxido nítrico sintase induzível, que só se forma durante o processo inflamatório (RICOTE et al, 1998). Outros fármacos com potencial redutor no processo inflamatório também podem ativar os PPARs, agindo como ligantes. Um estudo mostrou que antiinflamatórios não esteróides (AINES), como o diclofenaco sódico (Voltaren®), que é inibidor da ciclooxigenase (COX), ativam os PPAR- γ e PPAR- α em concentrações extremamente altas, maiores que as doses habituais utilizadas para inibir a COX (LEHMANN et al, 1997).

2. JUSTIFICATIVA

O Parque das Dunas de Natal-RN possui 1.172 hectares de mata nativa, sendo parte integrante da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica Brasileira e exerce uma grande importância para a qualidade de vida da população da cidade de Natal. Dotado de rica biodiversidade, este parque abriga diversas espécies conhecidas e desconhecidas de microorganismos, portanto é um local apropriado para a coleta de fungos de interesse biotecnológico.

Caripia montagnei é um fungo nativo do estado do Rio Grande do Norte e não existe nenhum relato de suas propriedades e efeitos biológicos/farmacológicos publicados até o momento, nem mesmo, de outras espécies desse gênero. Por isso, o interesse em pesquisar as características químicas e efeitos farmacológicos desse extrato fúngico, além de verificar se esta ação farmacológica ocorre através da via de transcrição dos PPAR.

3. OBJETIVOS

- Determinar a composição centesimal do fungo *Caripia montagnei*.
- Realizar análises químicas e espectrofotométricas do extrato aquoso de polissacarídeos do fungo *Caripia montagnei* (EAPCM).
- Avaliar o efeito do EAPCM sobre o processo inflamatório.
 - Verificar se o EAPCM atua através da via de transcrição mediada por PPAR
 - Comparar o efeito do EAPCM com agonistas dos PPAR- α .
 - Avaliar a ação do EAPCM e de agonistas de PPAR- α sobre a produção de NO.
- Observar a ação citotóxica do EAPCM em células mononucleares do sangue periférico.
- Avaliar a ação antibacteriana do EAPCM.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Fungo

Várias espécies de fungos foram coletadas no Parque das Dunas em Natal-RN. Os fungos coletados foram lavados e colocados para secagem em estufa e depois submetidos ao processo de extração. Com base no rendimento do procedimento de extração, o fungo *Caripia montagnei* foi o que apresentou maior rendimento e por isso escolhido (Figura 08).



Figura 08: Fungo *Caripia montagnei*

O fungo foi identificado pelo Professor Dr. Iuri Goulart Baseia do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da UFRN.

Este fungo apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Fungi
Filo: Basidiomycota
Classe: Basidiomycetes
Ordem: Stereales
Família: Podoscyphaceae
Gênero: *Caripia*
Espécie: *Caripia montagnei*

4.1.2. Animais

A atividade antiinflamatória do extrato do fungo *C. montagnei* foi avaliada, no modelo de edema plantar utilizando-se ratos da linhagem Wistar com aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 150 - 200g, obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica - UFRN. Para a atividade antiinflamatória através do ensaio de peritonite, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, do biotério do Departamento de Bioquímica - UFRN. Todos os animais utilizados na fase experimental foram mantidos em gaiolas individuais, submetidos a água e dieta *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura constante a 25°C.

4.1.3. Outros Materiais

- Ácido acético, ácido clorídrico, metanol, acetona, etanol, n-butanol, cloreto de sódio, tiosulfato de sódio da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Wy-14643 e Clofibrato da Cayman Chemical (Michigan, EUA)

- Ácido perfluorooctanóico - PFOA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).
- Carragenana Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- Meio RPMI
- Padrões de mono e dissacarídeos: L-fucose, D-xilose, D-glicose, D-galactose, D-manose e ácido D-glucurônico da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

- Ácido sulfúrico e Tioglicolato de sódio da Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Coomassie brilliant blue R 250 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- Piridina Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA).
- Butanol (VETEC)
- Papéis Whatman n.º1 e 3 MM foram obtidos da W & R Balston Ltd. (Maidstone, Inglaterra).

- Bacto-gelatin da Difco Laboratories
- Heparina sódica 5000 UI/mL (Ariston)
- MTT (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA).
- Voltaren (diclofenaco sódico) solução injetável 75 mg/mL (Novartis).

4.1.4. Aparelhos

Além dos aparelhos usuais de laboratório podemos destacar:

- Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Centrifuga refrigerada RC 2-B da Ivan Sorvall Inc. (Norwalk, CO, EUA).

- Espectrofotômetros Varian - Series 634 da Varian Techtron PPTY Ltd. (Springvale, Vico, Austrália) e Hitachi U-2000 (Tóquio, Japão).
- Evaporador rotatório Evapo-Mix da Buchler Instruments (Fort Lee, NJ, EUA).
- Espectrômetro de infravermelho modelo FT1 6PC da Perkin Elmer (EUA).
- Microscópio ótico Nikon Eclipse E200
- Espectrômetro Varian Mercury 200 Magneto Oxford

4.2. Metodologia

ESTRATÉGIA GERAL DE TRABALHO

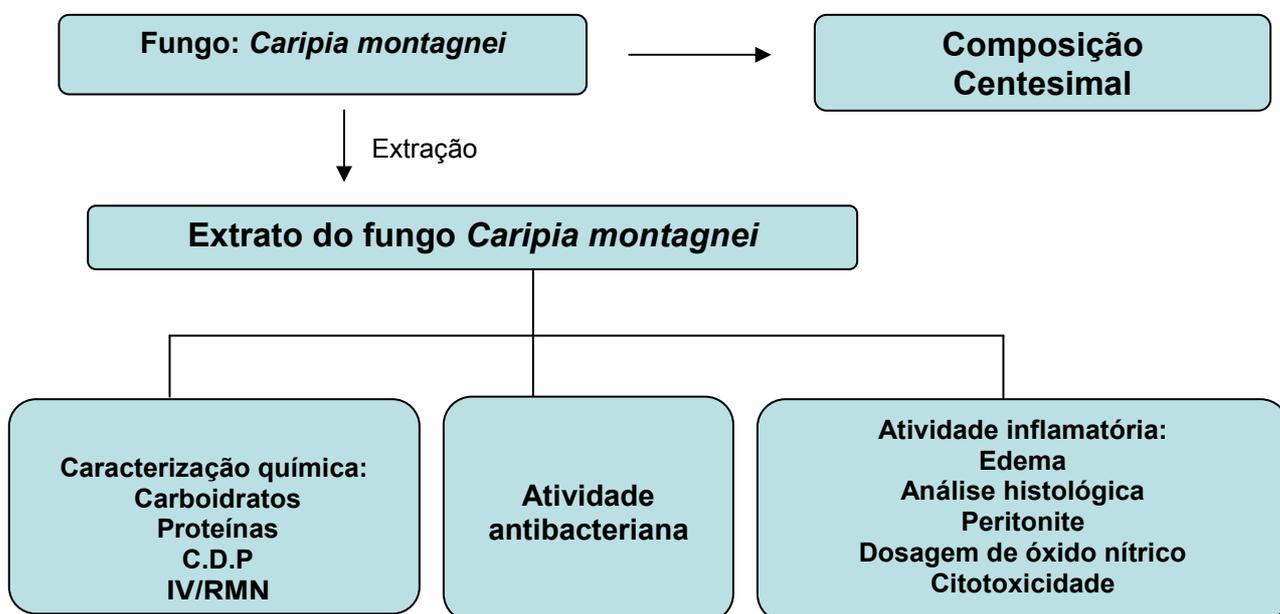


Figura 09: Fluxograma da metodologia. Legenda: C.D.P: cromatografia descendente em papel; IV: infravermelho; RMN: ressonância magnética nuclear.

4.2.1. Composição Centesimal

A determinação da composição centesimal do corpo de frutificação do fungo *Caripia montagnei* foi realizada através dos seguintes procedimentos:

A) Determinação da fração cinza

A fração cinza foi determinada de acordo com o método gravimétrico segundo AOAC (1984) através da incineração da matéria orgânica total. Amostras com 2 g do fungo foram tomadas em triplicata, usando-se cadinhos de porcelana e previamente tarados e o material foi incinerado em bico de Busen até ponto de carvão; a seguir os cadinhos foram colocados em mufla a 550°C até adquirir cor uniforme (esbranquiçada) que vai do cinza ao branco, sem pontos de carvão. Os cadinhos foram retirados da mufla quando a temperatura atingiu 50°C e colocados no dessecador para esfriar e posteriormente foram pesados. A diferença de peso encontrada nas amostras utilizadas após incineração fornece o teor de cinzas.

B) Determinação de Lipídeos

Os lipídeos foram quantificados segundo o método de Blihg & Dyer (1959). Três gramas do fungo em triplicata foram colocadas em erlenmeyer com rolha, sendo adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Em seguida, os erlenmeyers foram arrolhados hermeticamente e

colocados em agitador rotativo (rumbeira) durante 30 minutos. Após esse período foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio a 1,5%, os tubos foram arrolhados novamente e agitados durante 2 minutos e deixados em repouso, para separar as camadas. Foram retirados 13 mL da camada inferior que continha clorofórmio e lipídeos para um tubo cônico de 30 mL com rolha esmerilhada e adicionou-se 1g de sulfato de sódio anidro. O tubo foi arrolhado e agitado para remover os traços de água, o material foi filtrado e 5 mL transferido para um becker de 50 mL previamente pesado e levado à estufa a 105°C até completa evaporação do solvente, depois foi resfriado em dessecador. Os beckers foram pesados e o percentual de lipídeos calculado a partir do teor encontrado nos 5 mL, relacionados com o peso da amostra.

C) Determinação de Proteínas

O teor de proteínas da amostra foi determinado pelo método Semimicro Kjeldahl, descrito pela AOAC (1984), através da dosagem do nitrogênio total. Amostras do fungo em triplicata, de 200 mg de material previamente delipidado e dessecado foram colocados em balão de Kjeldahl de 500 mL e adicionou-se 0,5 g de sulfato de cobre, 1 g de sulfato de sódio e 5 mL de H₂SO₄ PA. Os balões foram levados ao digestor de Kjeldahl até completar mineralização durante aproximadamente 4 horas, fato este caracterizado pela formação de um líquido translúcido de cor verde azulada. Após digestão e resfriamento foram adicionados 10 mL de água destilada ao balão de Kjeldahl, ao qual foi acoplado ao aparelho de destilação. Na mangueira do destilador foi conectado um erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico saturado com 3 gotas do indicador misto. Através do

funil do destilador, foram adicionados ao balão de Kjeldahl 25 mL de NaOH a 40%. Foi destilado aproximadamente um volume de 50 mL, e titulado com H₂SO₄ 0,2 N previamente padronizado. O teor de proteína foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$N = \frac{V \times \text{normalidade} \times \text{fator do ácido} \times 14,01}{\text{g da amostra}}$$

D) Determinação de Fibras

O método utilizado foi o da digestão alcalina e ácida segundo AOAC (1984). Amostras de 2 g do fungo, em triplicata, previamente delipidadas, foram colocadas em béquer de 600 mL, contendo 200 mL de H₂SO₄ a 1,25% fervente e mantido em ebulição por 30 minutos; após esse período o material ainda quente foi filtrado à vácuo sobre papel de filtro comum, o béquer foi lavado com água destilada e a seguir o material foi recolocado no mesmo béquer sendo adicionados 200 mL de NaOH a 1,25% e mantido em ebulição por 30 minutos. Decorrido esse tempo, o material ainda quente foi filtrado a vácuo em cadinhos de Gooch com lã de vidro, previamente pesados, e lavados sucessivamente com água destilada para remover o excesso de base e monitorado com um papel indicador, até completa neutralização. Em seguida o resíduo foi lavado com álcool e éter etílico por duas vezes. Após a secagem à temperatura ambiente, o cadinho foi colocado em estufa a 105°C até peso constante. A variação de peso encontrado fornece a quantidade de fibras da amostra.

E) Determinação de Carboidratos

O teor de carboidratos presente no fungo *C. montagnei* foi obtido por estimativa, através da diferença dos componentes já determinados para um total de 100%, conforme mostra a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Lipídeos} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Fibras} + \% \text{ Cinzas} = X\%$$

$$100\% - X\% = \% \text{ de Carboidratos}$$

4.2.2. Obtenção do extrato do fungo *Caripia montagnei*

A metodologia de extração dos polissacarídeos foi obtida a partir de modificações no método de ALQUINI, 2004. Para obtenção do extrato aquoso, o corpo de frutificação do fungo foi lavado, dessecado a 40°C e posteriormente pulverizado. Para a extração dos polissacarídeos utilizou-se 50g do fungo. Ao pó foram adicionados 2 volumes de acetona 80%, permanecendo a mistura a 25°C por 24 horas. Este procedimento foi repetido por três vezes. Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado adicionou-se 500 mL de água destilada, permanecendo a mistura a 100° C por 3 horas O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 g por 20 minutos, a 25° C) e este último tratado com 2 volumes de etanol. O precipitado obtido (extrato aquoso de polissacarídeos - EAP) foi seco, pulverizado e posteriormente solubilizado em diferentes concentrações (Figura 10).

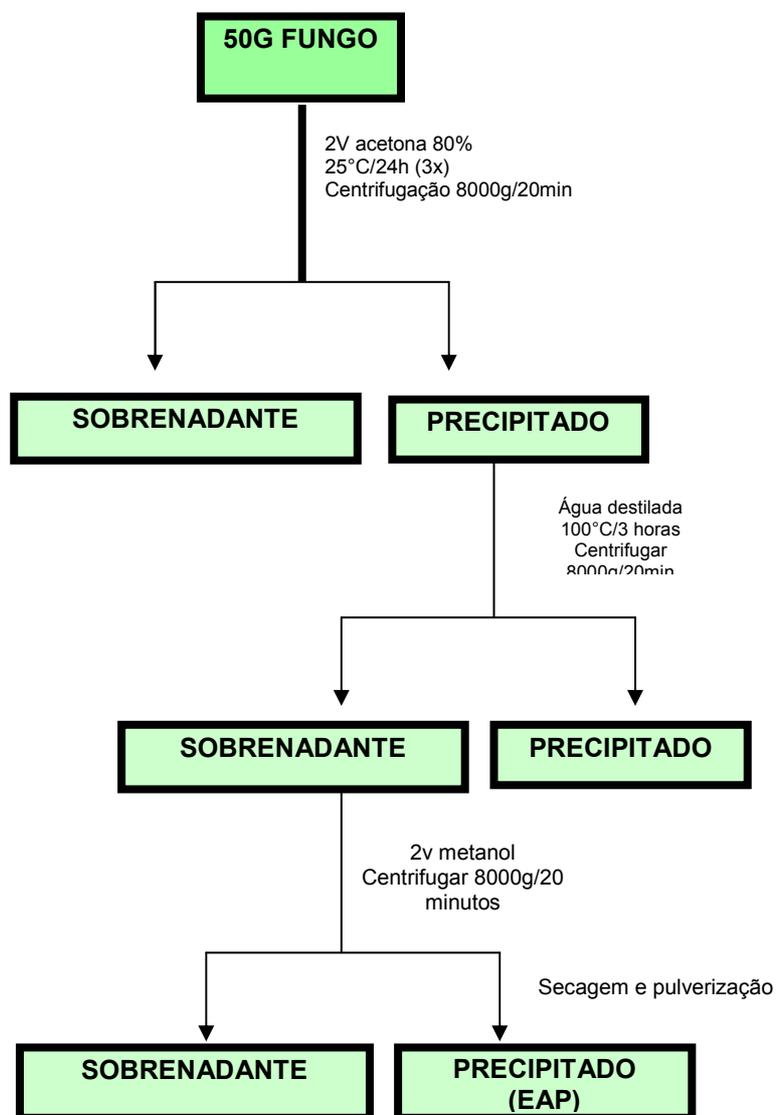


Figura 10: Obtenção do extrato aquoso de polissacarídeos (EAP) de *C. montagnei*.

4.2.3. Análises Químicas

A) Açúcares totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico como previamente descrito por DUBOIS (1956) empregando-se como padrão L-galactose, sendo as leituras realizadas a 490 nm.

B) Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado com o reagente de coomassie blue R segundo o método de Bradford (1976) e a leitura realizada a 595 nm.

4.2.4. Cromatografia Descendente em Papel

O extrato rico em polissacarídeos foi hidrolisado (HCl 2N, 2h, 100°C). Posteriormente o material foi neutralizado, seco e aplicado em papel Whatman N°1. Este foi submetido em cromatografia descendente em papel no seguinte sistema de solvente: Butanol: Piridina: Água (2:3:1,5) v/v/v. Os monossacarídeos foram revelados por redução de prata (TREVELYAN, 1950).

4.2.5. Análises espectrofotométricas

4.2.5.1. Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectômetro FT-IR ABB Bomen modelo MB 104, de 4000 a 400 cm^{-1} . O extrato foi analisado após secagem sob a forma de pastilha de KBr.

4.2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos a 60°C utilizando amostras do extrato dissolvidas em DMSO. As análises de carbono 13 (^{13}C) e os espectros de hidrogênio (^1H) foram realizadas em espectrômetro Varian Mercury 200 Magneto Oxford operando a 200.06 MHz.

4.2.6. Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato de *C. montagnei* no edema plantar induzido por carragenana

Neste experimento, foram formados 8 grupos (n=7):

- Grupo 01: Controle negativo: solução salina
- Grupo 02: Controle positivo (sem tratamento)
- Grupo 03: Animais tratados com extrato de *C. montagnei* a 10m mg/kg
- Grupo 04: Animais tratados com extrato de *C. montagnei* a 30 mg/kg
- Grupo 05: Animais tratados com extrato de *C. montagnei* a 50mg/kg

- Grupo 06: Animais tratados com L-NAME a 60 mg/Kg
- Grupo 07: Animais tratados com Clofibrato a 100 mg/Kg
- Grupo 08: Animais tratados com PFOA a 100 mg/Kg

Os compostos foram pesados, dissolvidos em solução salina e aplicados por via intraperitoneal após anestesia com éter etílico. Os grupos com agonistas de PPAR- α (clofibrato e PFOA) foram dissolvidos em óleo de milho. Os grupos controles foram submetidos ao mesmo procedimento sendo que os animais receberam 500 μ L de solução salina estéril.

Após 30 minutos, novamente os ratos foram anestesiados e realizou-se a medida da espessura da pata direita através de um paquímetro, em seguida a inflamação foi induzida através da aplicação da injeção intraplantar de carragenana 1% (1 mL) na pata direita de todos os ratos, exceto no grupo controle negativo que recebeu solução salina. Logo após este procedimento foi feita nova medição da espessura da pata direita em todos os grupos e isso se repetiu após o intervalo de 1, 2, 3 e 4 horas. Após a quarta hora os ratos foram anestesiados e sacrificados (Figura 11).

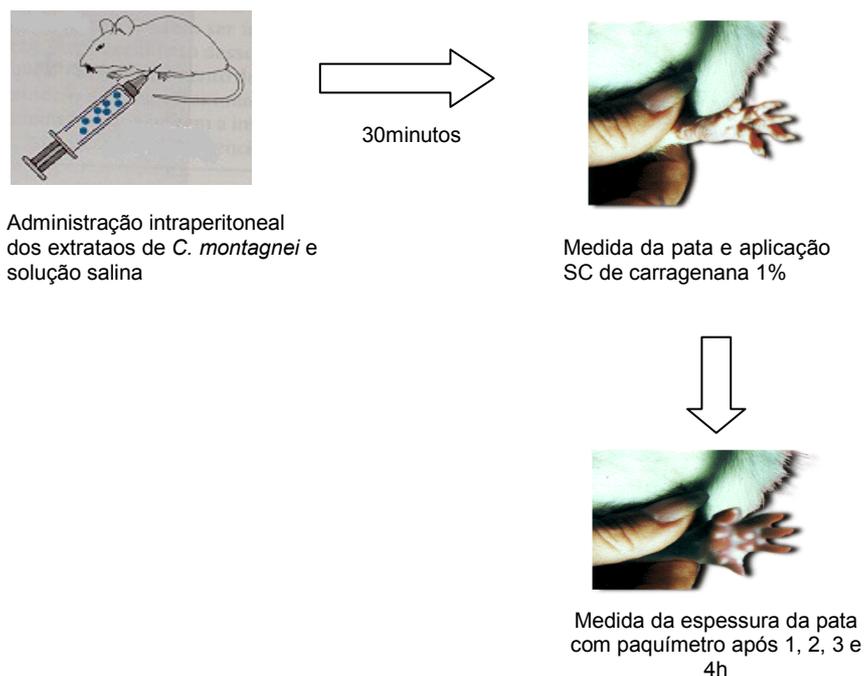


Figura 11: Esquema do ensaio de edema plantar induzido por carragenana

4.2.7. Análises histológicas

Para os exames histológicos, biópsias foram feitas com o tecido retirado da pata após a indução da reação inflamatória. De todos os grupos citados no item 4.2.6. foram retiradas amostras. O tecido foi fixado em formaldeído 10% por 5 dias, embebido em parafina e seccionado. As secções foram coradas em hematoxilina e eosina. (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1995).

4.2.8. Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato de *C. montagnei* na peritonite induzida por tioglicolato de sódio

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss com 2 meses de idade. Os animais foram divididos nos seguintes grupos, cada um contendo 7 animais:

- Grupo 01: solução salina (controle negativo)
- Grupo 02: sem tratamento (controle positivo)
- Grupo 03: Animais tratados com *C. montagnei* 10 mg/kg
- Grupo 04: Animais tratados com *C. montagnei* 30 mg/kg
- Grupo 05: Animais tratados com *C. montagnei* 50 mg/kg
- Grupo 06: Animais tratados com Wy - 14643 100 mg/kg
- Grupo 07: Animais tratados com Clofibrato 100 mg/kg
- Grupo 08: Animais tratados com PFOA 100mg/kg
- Grupo 09: Animais tratados com Diclofenaco sódico 75 mg/Kg

Os compostos foram pesados, dissolvidos em solução salina e aplicados subcutâneamente nos animais. Nos grupos com agonistas de PPAR- α (clofibrato, PFOA, Wy-14643) os compostos foram dissolvidos em óleo de milho. Os grupos controles foram submetidos ao mesmo procedimento sendo que os animais receberam 500 μ L de solução salina estéril.

Após 30 minutos, os animais receberam intraperitonealmente uma injeção contendo 1mL de tioglicolato de sódio 3% conforme metodologia proposta por Xie et al. (2000). O grupo controle negativo recebeu uma injeção de 1mL de solução salina estéril. Os animais foram mantidos com água e dieta *ad libitum*. Três horas após a aplicação do tioglicolato de sódio 3%, os animais foram sacrificados e submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de solução tampão PBS. O líquido peritoneal de cada animal foi coletado e acondicionado em tubos de hemólise contendo EDTA. Posteriormente, os leucócitos presentes no líquido coletado na cavidade peritoneal dos animais foram corados pela solução de Türk e então contados em câmara de Neubauer (Figura 12).

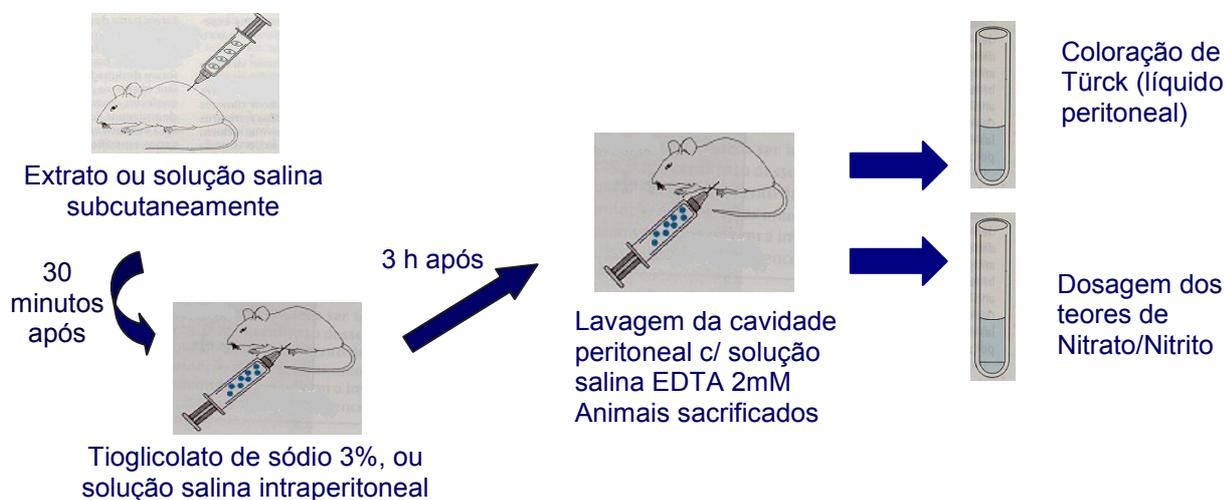


Figura 12: Esquema de Peritonite Induzida por Tioglicolato

4.2.9. Avaliação dos teores de Nitrato / Nitrito

A produção de nitrito e nitrato, um indicador da síntese de NO, foi medida no lavado peritoneal como previamente descrito (CUZZOCREA et al., 1998). A concentração de nitrito foi medida pela reação de Griess. O lavado peritoneal foi centrifugado (3000 g/10 minutos) e a 100 μ L do sobrenadante adicionamos 100 μ L do reagente de Griess. A densidade ótica a 540 nm foi medida usando-se um leitor de ELISA. As concentrações de nitrito foram calculadas comparando-se a densidade ótica das amostras com soluções padrão de nitrito de sódio em solução salina.

4.2.10. Avaliação da citotoxicidade do extrato de *C. montagnei*

A) Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

O sangue venoso foi coletado em presença de heparina, e processado após a coleta. O sangue é diluído com o mesmo volume de solução salina estéril, e então a ele é adicionado phycol-hypaque na proporção de 3 mL para cada 5 mL de sangue heparinizado. Essa mistura foi posteriormente submetida à centrifugação a 1450 g por 30 minutos à temperatura de 25°C. As células mononucleares do sangue periférico foram aspiradas cuidadosamente e transferidas para um novo tubo, sendo as demais porções descartadas.

Às células foram adicionados 20 mL do meio RPMI a 4°C, essa suspensão foi centrifugada a 1400-1600 g por 15 minutos a 4°C, sendo esse procedimento repetido por três vezes. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 2 mL de RPMI. Uma alíquota de 10 µL dessa suspensão é misturada a 40 µL de solução de Turck, corante que possibilita a visualização ao microscópio das células para que sejam contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem das células, uma alíquota da suspensão é retirada e ajustada à concentração de 1×10^6 células/µL com RPMI.

B) Tratamento das células com os extratos

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, contendo 1×10^6 células /poço. As concentrações do extrato do fungo foram preparadas a partir de soluções estoques estéreis, sendo diluídas de forma seriada em meio RPMI-1640, obtendo-se

o volume final de 100 µL em cada poço. Desta forma as concentrações finais foram de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/mL. Posteriormente, foi adicionado o corante MTT, devidamente dissolvido em tampão PBS a 5 mg/mL, sendo filtrado e esterilizado (10 µL de MTT para cada 100 µL de meio). As placas foram mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO₂ na temperatura de 37°C durante 4 e 24 horas. As células vivas têm a propriedade de converter o MTT em um composto de coloração azul, denominado de formazan. Depois de decorrido o tempo necessário para reação, foi adicionado ácido clorídrico/isopropanol em cada poço, com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA a 540 nm (MOSMANN, 1983).

4.2.11. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi testada contra os microorganismos *Escherichia coli* (gram negativo) e *Staphylococcus aureus* (gram positivo).

As bactérias foram colocadas para crescer e incubadas a 37°C por 24 h, e depois plaqueada usando um swab estéril, em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton. Em seguida, adicionou-se discos estéreis de 5 mm de diâmetro que foram previamente embebidos com 20 uL do extrato de *Caripia montagnei* em três concentrações, 30, 90 e 150 mg/mL. Como controle, foi adicionado um disco do antibiótico ciprofloxacino (5µg). O efeito antibactericida do extrato testado contra os microorganismos foi determinado após 24 horas de incubação a 37°C através da medida do halo formado em volta dos discos com régua ou paquímetro.

4.2.12. Análises Estatísticas

Para análises estatísticas dos modelos experimentais de inflamação e citotoxicidade foram utilizados os testes de análise de variância ANOVA com nível de significância de $p < 0,001$ e $p > 0,5$ e Teste de Tukey-Kramer, para determinar que grupos diferem entre os valores obtido para os grupos controle e experimental.

5. RESULTADOS

5.1. Composição centesimal

A composição centesimal do tecido do fungo *Caripia montagnei* pode ser visualizada na tabela 02. Os resultados dessas análises demonstraram alto teor de carboidratos (63,3%) e um baixo teor de proteínas (2,2%).

O teor de lipídios observado para *C. montagnei* foi de 21,4%. Além desses constituintes, os fungos apresentam ainda fenóis e micronutrientes como minerais e vitaminas que não foram quantificados individualmente, pois foge aos objetivos deste trabalho.

TABELA 02: Composição centesimal do fungo *Caripia montagnei*

Componente Químico	Valor (%)
Carboidratos	63,3
Proteínas	2,2
Lipídios	21,4
Fibras	11,2
Cinzas	1,98

5.2. Rendimento da extração aquosa de carboidratos

Para o processo de extração já descrito em 3.2.2. foram utilizados 50 g do tecido fúngico. Após o procedimento total a quantidade obtida foi de 6,7 g, significando um rendimento de 13,4 %.

5.3. Análises químicas do extrato do fungo

As análises químicas realizadas com o extrato de *C. montagnei* demonstraram alto teor de carboidratos (98,7%) e baixo teor de proteínas (1,3%). (Figura 13).

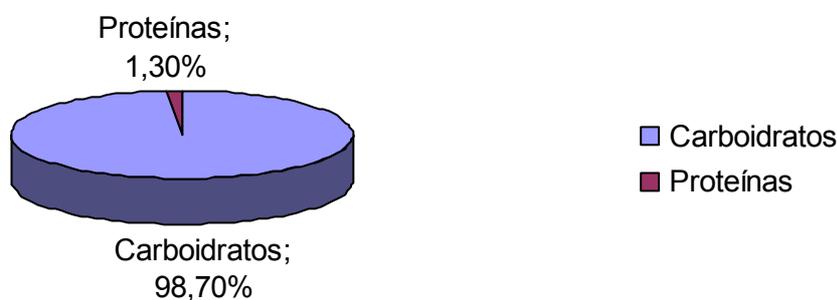


Figura 13: Percentual dos constituintes carboidratos e proteínas do extrato de *C. montagnei*.

5.4. Cromatografia descendente em papel

A cromatografia descendente em papel é uma técnica que objetiva analisar qualitativamente os monossacarídeos constituintes da amostra em estudo. Esta técnica é uma das várias que são utilizadas com o objetivo de elucidar a estrutura química de um composto. A cromatografia foi realizada no sistema de solvente Butanol: Piridina: água (2:3:1,5 v/v/v), conforme já citado em Materiais e Métodos. Foi demonstrado que os polissacarídeos que compõem os extratos de *C. montagnei* são formados por glicose (Figura 14).

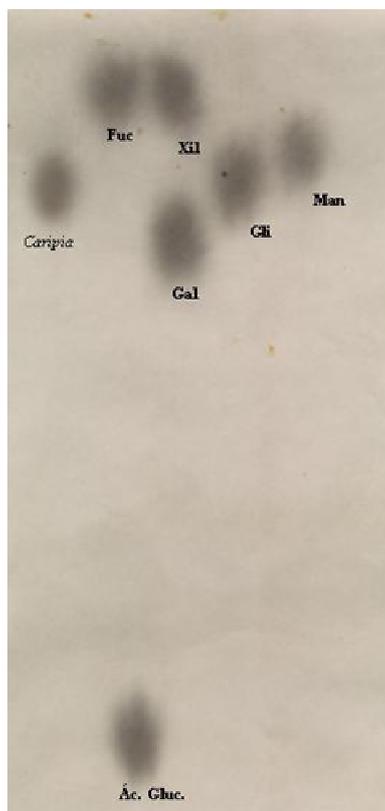


FIGURA 14: Cromatografia descendente em papel do hidrolisado do extrato de *C. montagnei*, utilizando como padrão monossacarídeos. Sistema solvente Butanol: Piridina: água (2:3:1,5 v/v/v). Legenda das siglas na figura: Fuc: fucose; Xil: xilose; Gal: galactose; Gli: glicose; Man: manose; Ac. Gluc: ácido glucurônico.

5.5. Análises espectrofotométricas

5.5.1. Infravermelho

A análise de infravermelho revelou a presença de três bandas importantes (Figura 15). No comprimento de onda 3500 cm^{-1} observa-se sinal característico da presença de hidroxilas no composto. Se este sinal apresenta-se de espessura mais larga, como é o caso, significa que a hidroxila em questão está associada de forma polimérica. O sinal existente na faixa entre $2900\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ significa a presença do grupamento C-H da função orgânica aldeído em deformação axial. A existência de um sinal na faixa de $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ se relaciona com a presença do grupo carbonila

(C=O) da função orgânica de aldeído em deformação axial. Este sinal se apresenta como dublete, podendo indicar a interação com proteínas existentes no composto. Na região entre 1500 cm^{-1} - 750 cm^{-1} verifica-se a presença de sinais que são típicos de polímeros do tipo beta-glucana, como os sinais existentes nos seguintes comprimentos de onda do espectro: 1370 , 1150 , 1110 e 770 cm^{-1} (Figura 15).

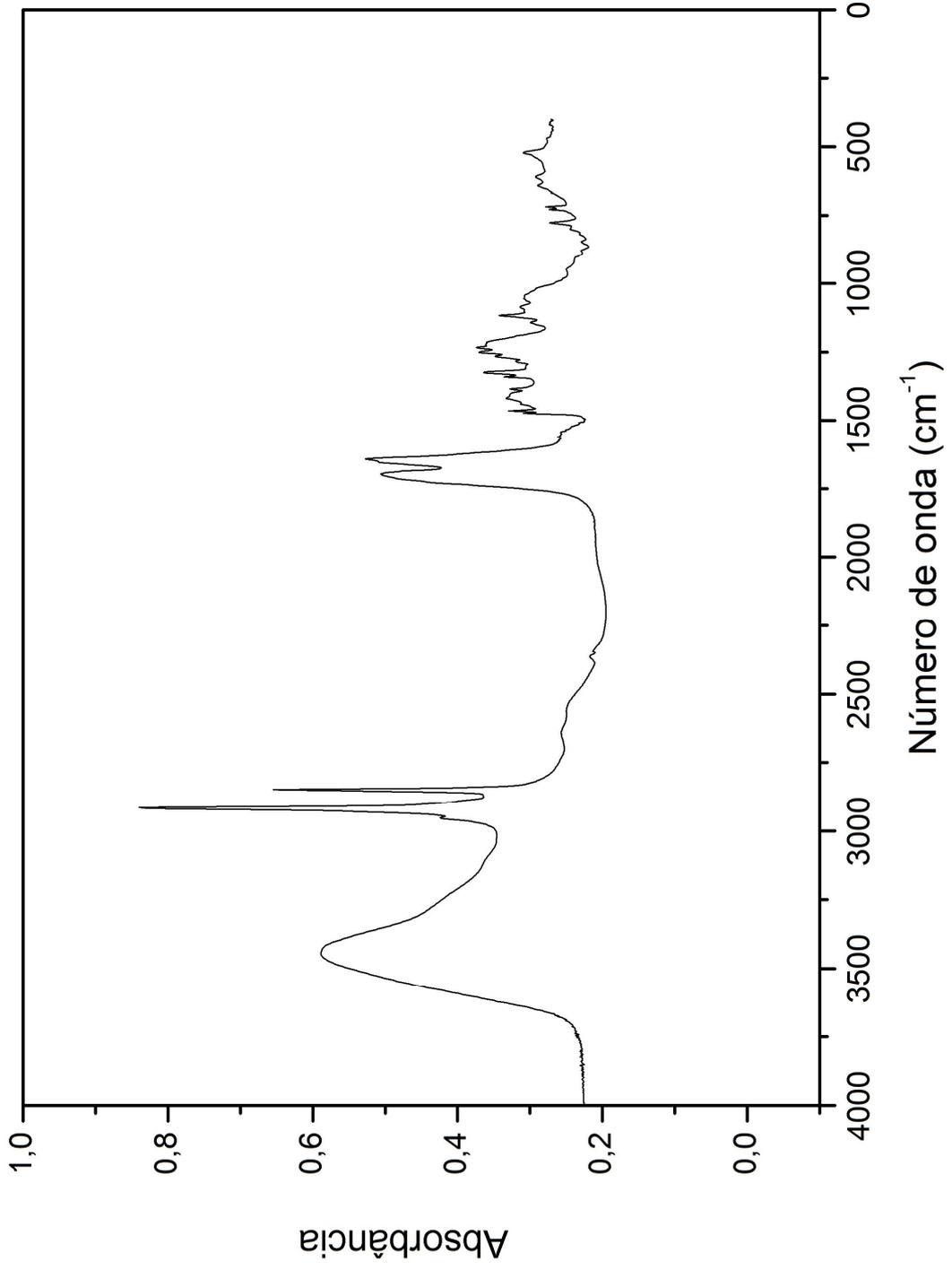


FIGURA 15: Espectro de infravermelho do extrato de *Caripia montagnei*.

5.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN do extrato do fungo *Caripia montagnei* demonstrou a presença de relativa simplicidade, isso se deve ao tipo de polissacarídeo, glucanas, presentes nos fungos.

A figura 16 mostra o espectro de RMN de C^{13} do extrato de *C. montagnei*, podem-se observar sinais entre 60 e 80 ppm típicos da presença de carboidratos em ligação glicosídica de configuração beta (GONZAGA et al., 2005 e YALIN et al., 2005). Observa-se ainda que nesse espectro a presença de sinais na região de 22,7 a 40,0 ppm. Gonzaga et al. (2005) relataram que a presença de sinais entre 20-40 ppm sugere a presença de estrutura do tipo glucana-proteína.

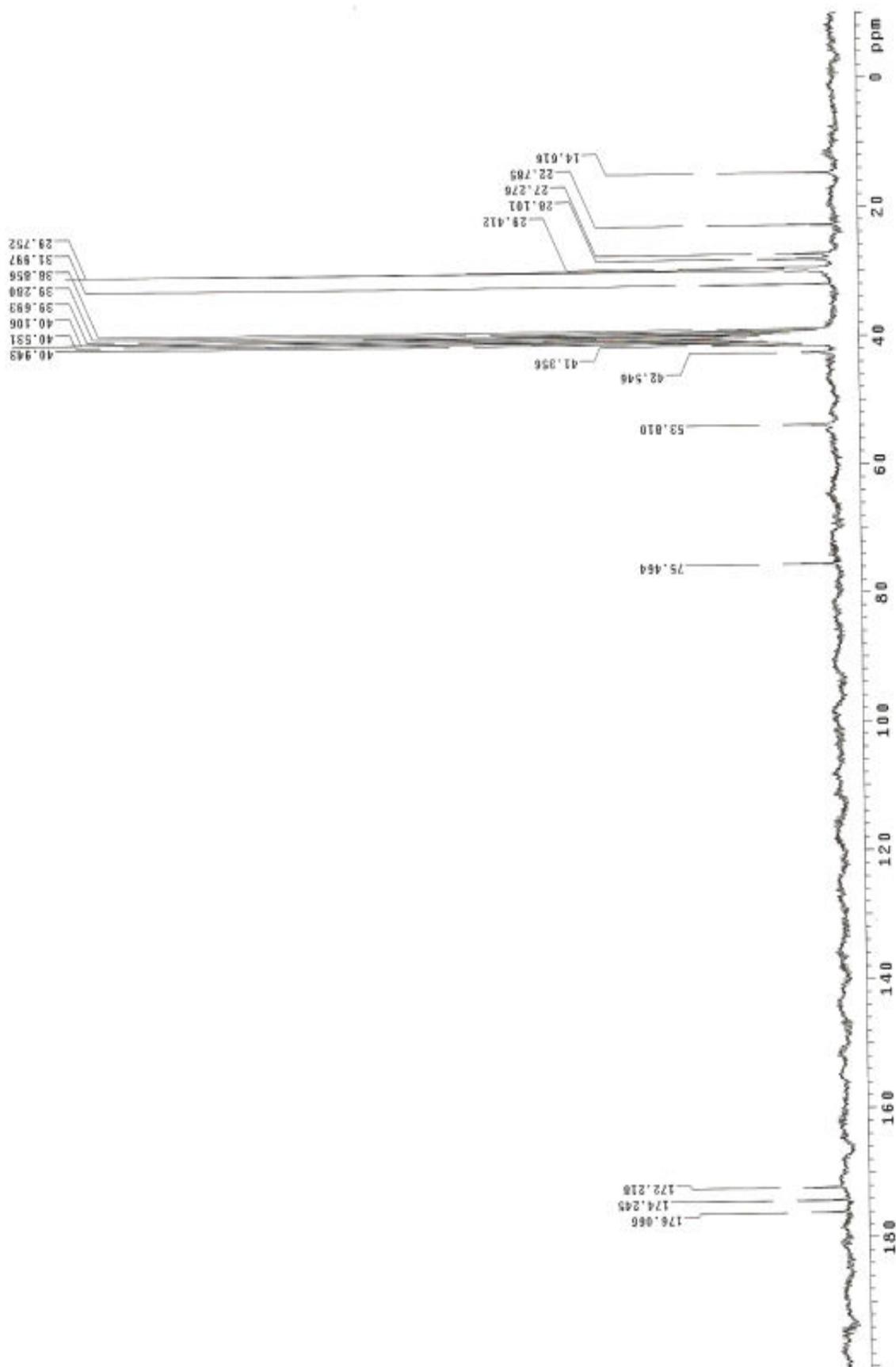


Figura 16: Espectro de R.M.N. (C^{13}) do extrato de *Caripia montagnei*.

O espectro de ^1H do extrato do fungo *C. montagnei* mostra sinais na região anomérica a 4-6 ppm (Figuras 17-A e 17-B). Os sinais existentes entre 4,1 a 4,6 ppm correspondem à presença de β -glucana (GONZAGA et al., 2005, KAWAGISHI et al., 1990). Existe ainda sinais entre 1,4 a 2,5, que segundo Silverstein et al. (1994), estão relacionadas à estrutura glucana-proteína.

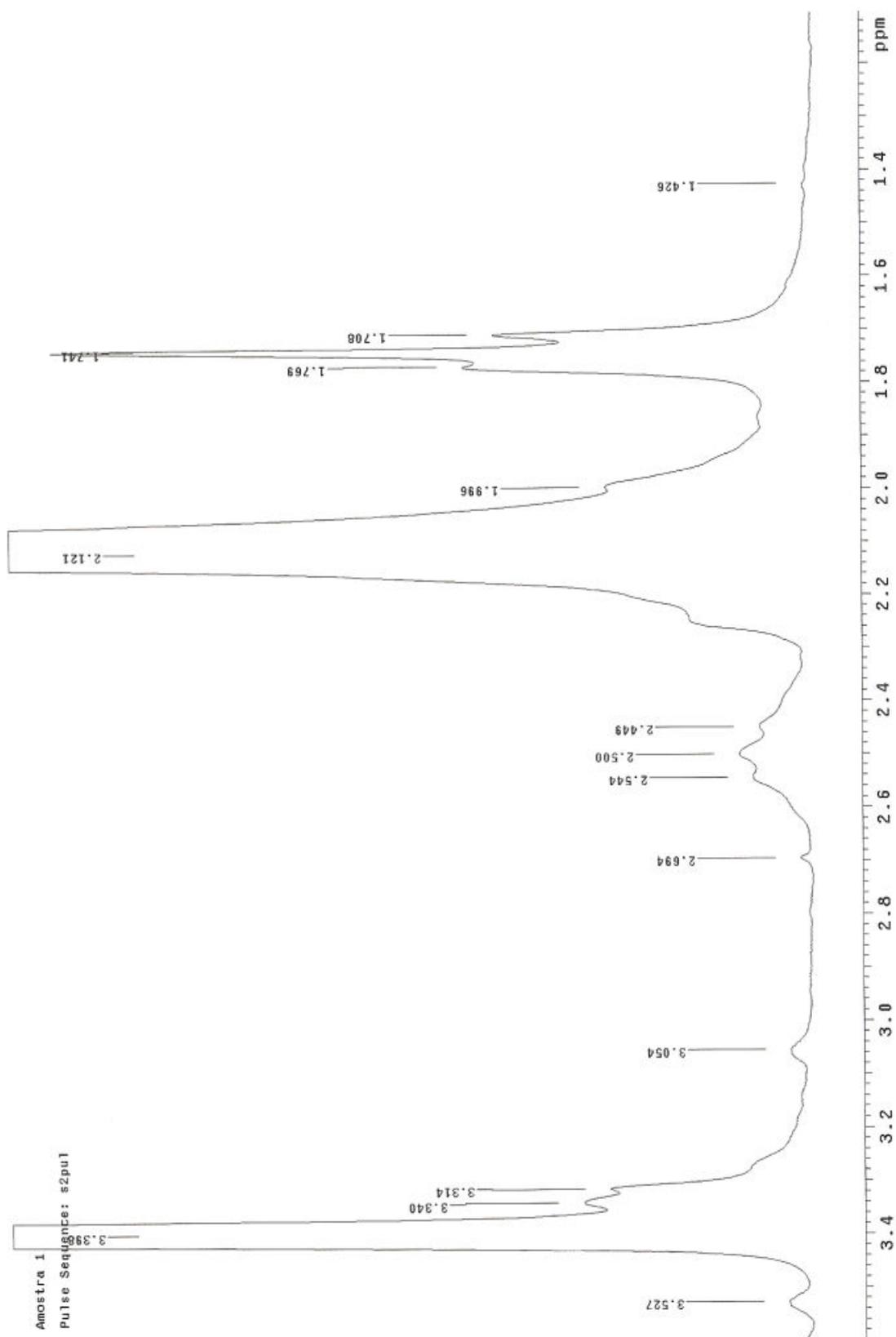


Figura 17: A) Espectro de R.M.N. (^1H) do extrato de *C. montagnei* – região de 1.4 a 3.4 ppm.

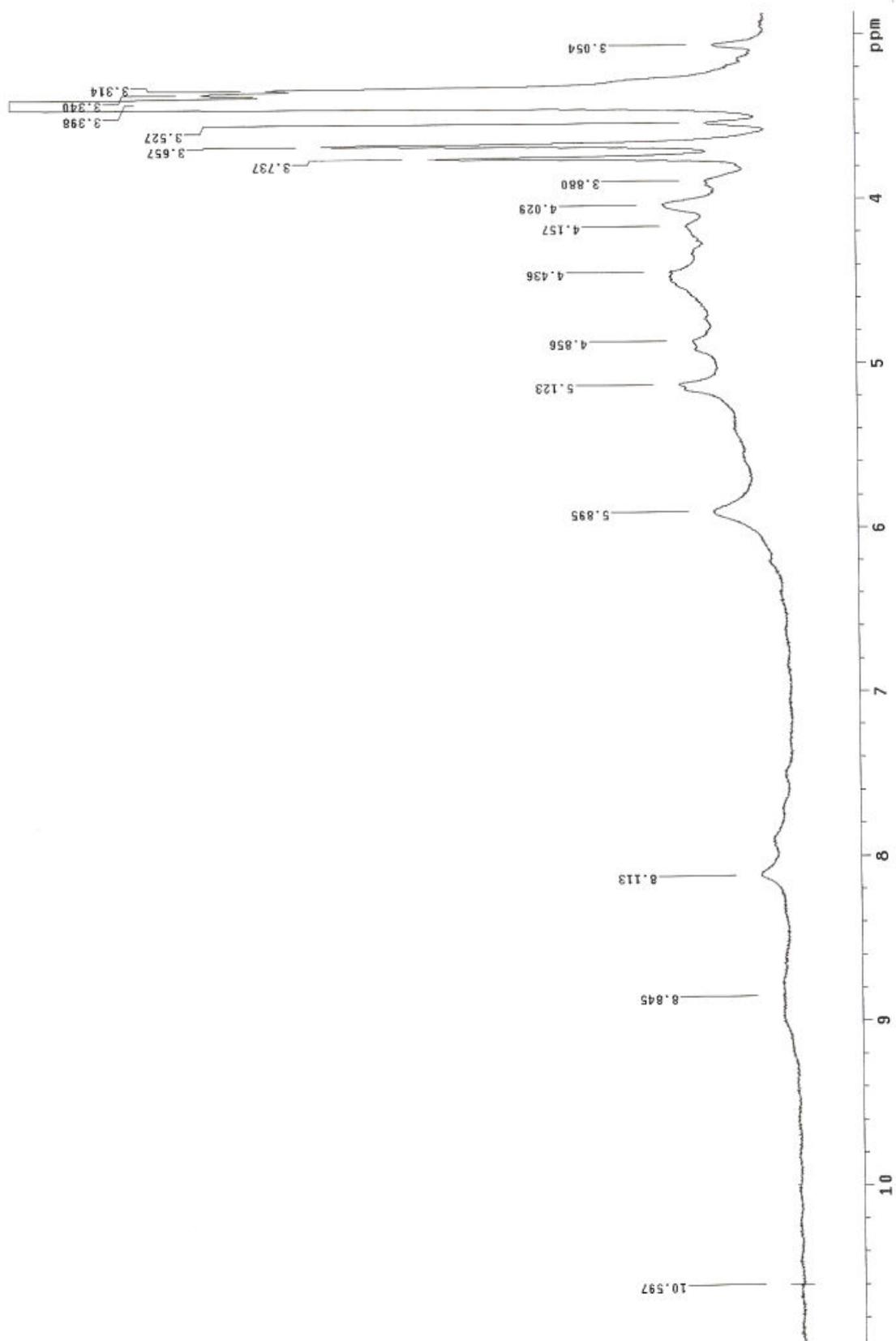


Figura 17: B) Espectro de R.M.N. (^1H) do extrato de *C. montagnei* – região de 3.6 a 10.5 ppm.

5.6. Edema plantar induzido por carragenana

A injeção intraplantar de carragenana é procedimento utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória de compostos em geral.

A ação dos extratos sobre o edema induzido por carragenana foi testada em três diferentes concentrações (10, 30 e 50 mg/kg do animal), em diferentes grupos de animais, conforme já descrito. Outros grupos também foram feitos, como o do L-NAME e os agonistas dos PPARs (clofibrato e PFOA), para comparar o efeito antiinflamatório entre os grupos e verificar se o extrato do fungo em estudo atua ativando os PPARs. Os animais tratados receberam os compostos, por via intraperitoneal, trinta minutos antes da aplicação da carragenana e através da medida da espessura da pata observada antes e após a indução do edema pode-se avaliar o efeito antiinflamatório. O pico inflamatório neste modelo ocorre na segunda hora após indução do edema plantar por carragenana.

Na figura 18, pode-se observar o efeito das três concentrações do extrato de *Caripia montagenei* neste modelo de inflamação. Pode-se inferir que a concentração de 50 mg/Kg foi a que teve o melhor efeito antiinflamatório.

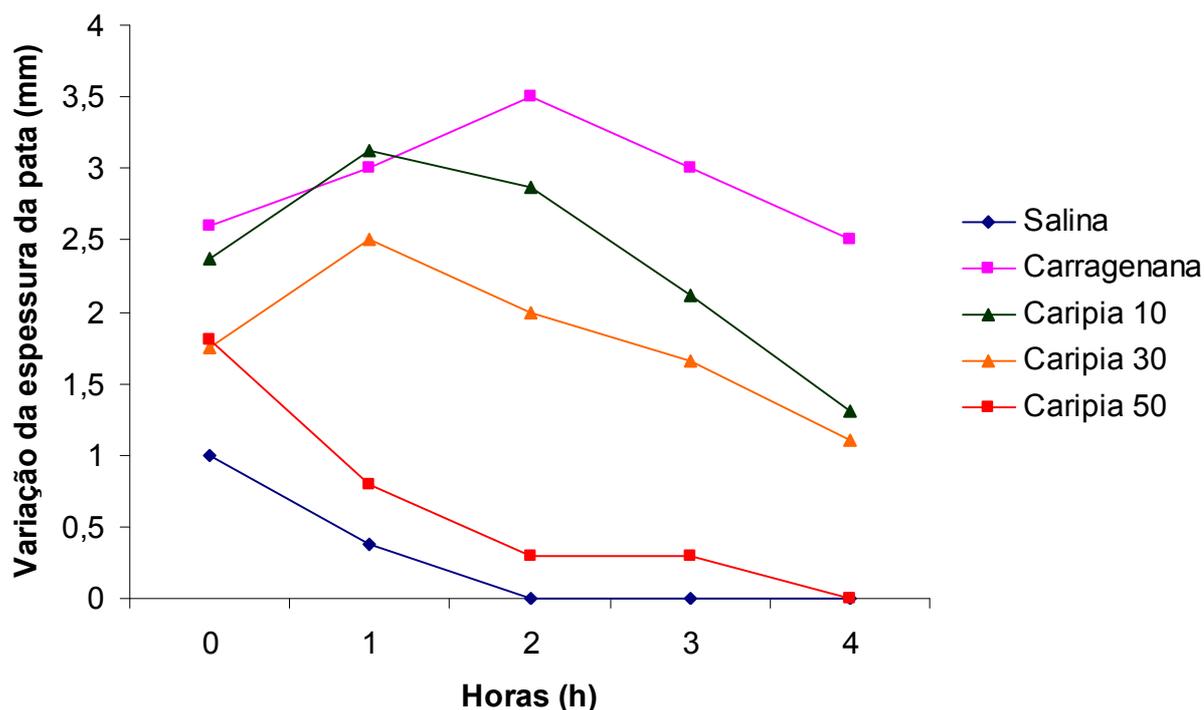


Figura 18: Efeito antiinflamatório dos extratos de *C. montagnei* no edema plantar induzido por carragenana. Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP.

O extrato de *Caripia montagnei* reduziu 73,3% do edema quando aplicados na concentração de 50 mg/kg do peso do animal, logo após a primeira hora de indução do processo inflamatório. Na segunda hora essa redução foi ainda maior, atingindo um valor de 91,4% e já na quarta hora o edema foi totalmente reduzido. Na concentração de 10 mg/kg e 30 mg/Kg, houve uma diminuição de 18% e 42,8%, respectivamente. Assim, pode-se observar que o efeito antiinflamatório do extrato de *C. montagnei* é dose-dependente, pois aumenta o efeito antiinflamatório conforme aumenta a concentração teste.

Comparando o grupo de concentração de 50 mg/Kg do extrato do fungo em teste, que teve o melhor efeito anti-inflamatório, com o grupo do L-NAME, pode-se observar que o extrato de *C. montagnei* revelou um perfil de redução do edema bastante semelhante (Figura 19). Segundo os testes ANOVA e Tukey-Kramer, nos

grupos tratados com L-NAME e na concentração de 50 mg/Kg do extrato de *C. montagnei* houve redução extremamente significativa ($p < 0.001$) do edema quando comparados ao controle positivo.

O L-NAME é um composto com potencial antiinflamatório e atua inibindo a síntese do óxido nítrico, pois inibe a enzima óxido nítrico sintase, enzima essencial para a síntese deste mediador inflamatório. Não houve diferença significativa entre os grupos L-NAME e do extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg, significando que estes grupos têm efeito antiinflamatório equivalentes.

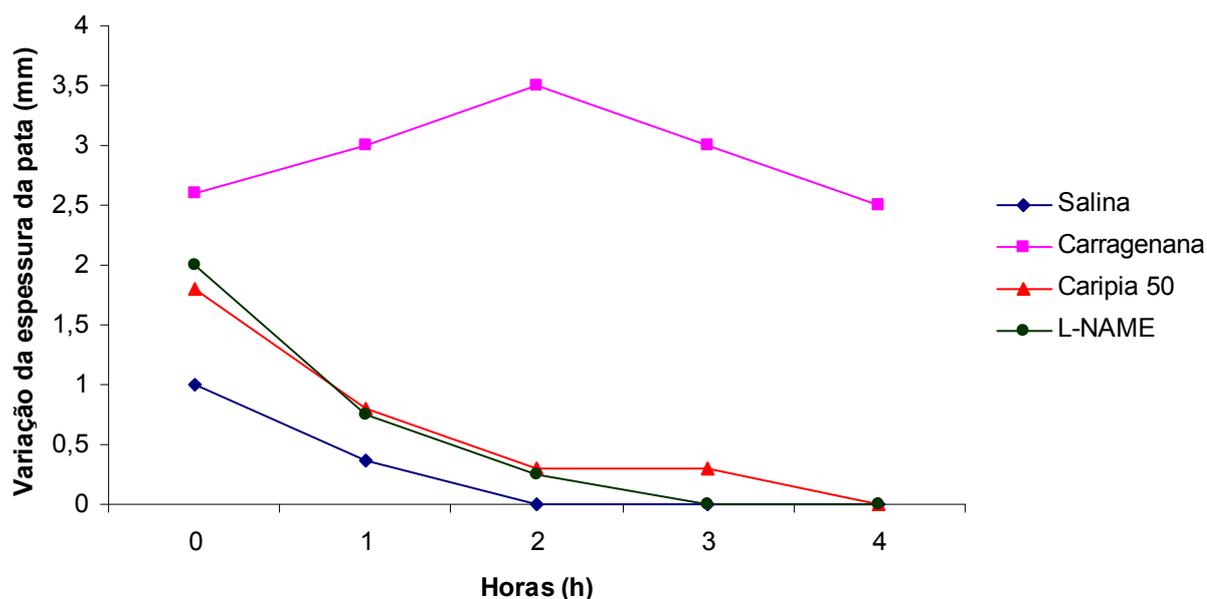


Figura 19: Efeito antiinflamatório do extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg e do L-NAME no edema plantar induzido por carragenana. Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP.

Comparando o efeito antiinflamatório dos agonistas de PPAR- α (PFOA e clofibrato) com o extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg, pode-se observar que estes agonistas possuem também efeito antiinflamatório. O clofibrato reduziu 10,7% enquanto o PFOA reduziu 56,8%, na segunda hora após indução do

edema (Figura 20). Analisando os agonistas de PPAR com os testes estatísticos, ANOVA e Tukey-Kramer, observamos que houve redução significativa ($p < 0.001$) do edema quando comparados ao controle positivo.

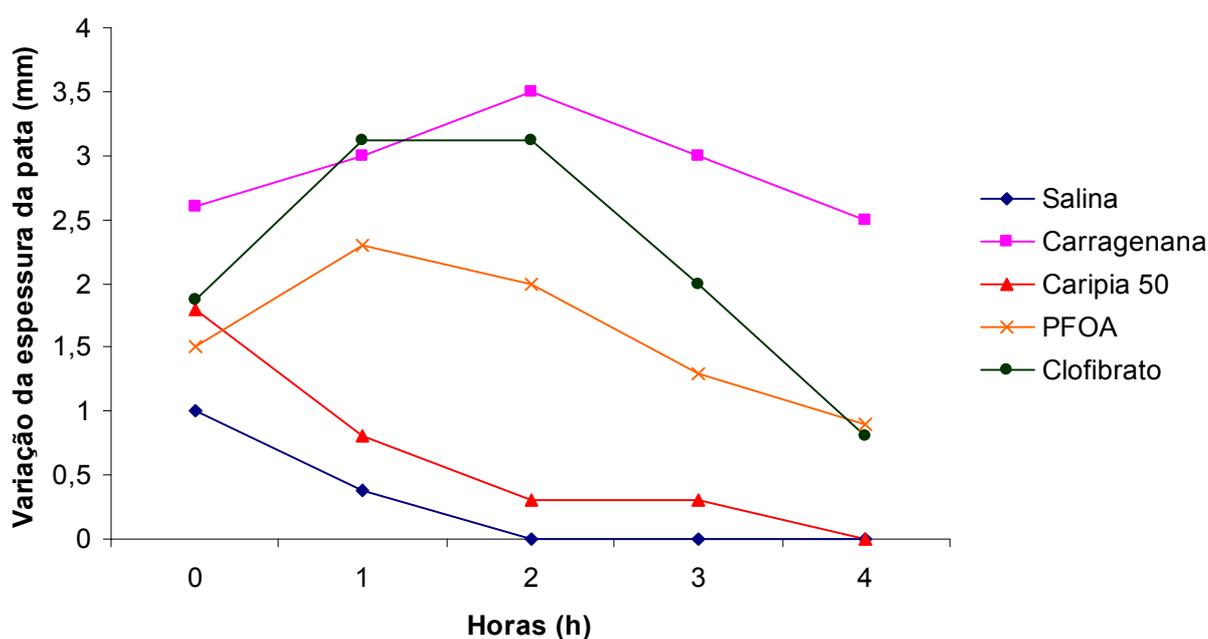
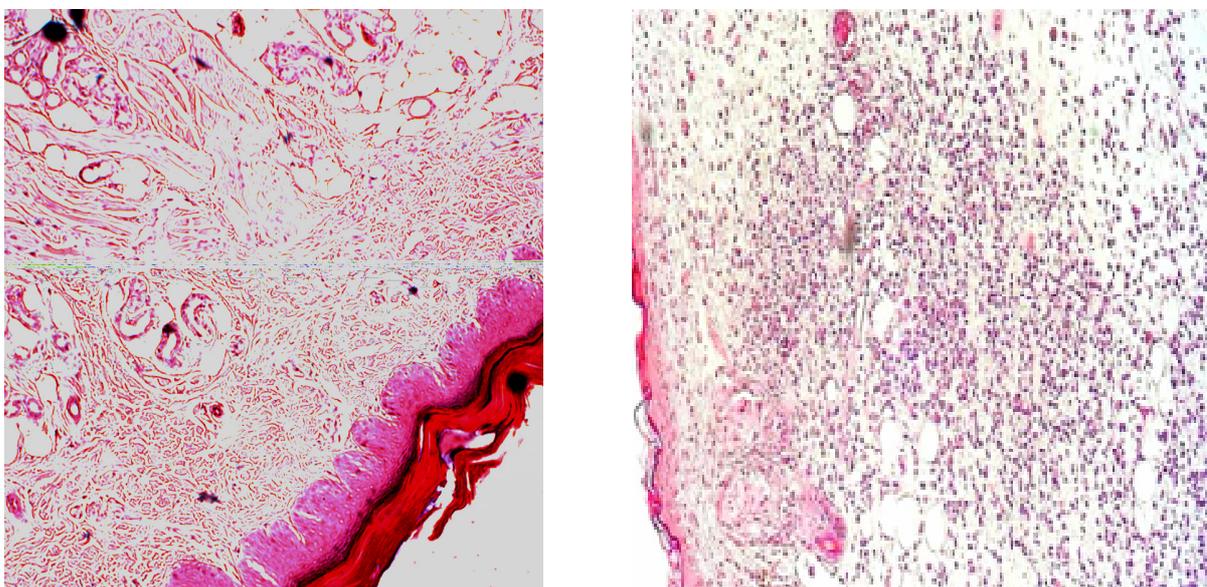


Figura 20: Efeito antiinflamatório do extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg e dos agonistas de PPAR no edema plantar induzido por carragenana. Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP.

5.7. Análises Histológicas

As análises histológicas da pata dos animais demonstraram que aqueles que receberam apenas solução salina (controle negativo) e coradas com HE mostraram ausência de reação inflamatória (Figura 21-A). As lâminas dos animais que foram sensibilizados com carragenana e não foram tratados (controle positivo) apresentaram intenso infiltrado celular, característico de reação inflamatória (Figura 21-B)

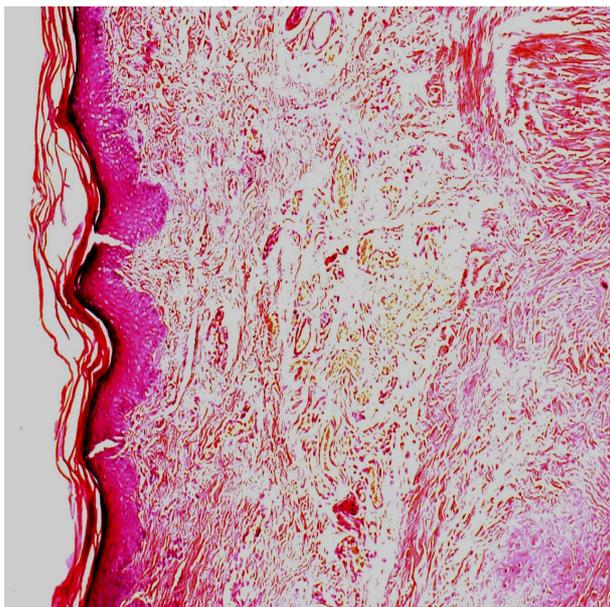
Nas figuras 22, 23 e 24 observam-se os efeitos do extrato de *Caripia montagnei* nos grupos dos animais tratados em concentrações de 10, 30 e 50 mg/kg e nos grupos tratados com L-NAME, clofibrato e PFOA. Pode-se notar que as diferenças histológicas são visíveis, principalmente, quanto ao grau de infiltrado celular do tecido analisado, sendo estas diferenças facilmente constatadas. Pode-se perceber ainda, que a estrutura geral do tecido e o recrutamento de células para o local da inflamação sofreram uma diminuição nas concentrações de 30 e 50 mg/kg do extrato testado, a ação foi mais eficiente na concentração mais alta (Figura 23-A). Em relação aos agonistas de PPAR pode-se observar que ocorreu uma maior redução da quantidade de leucócitos com o PFOA, do que com o clofibrato.



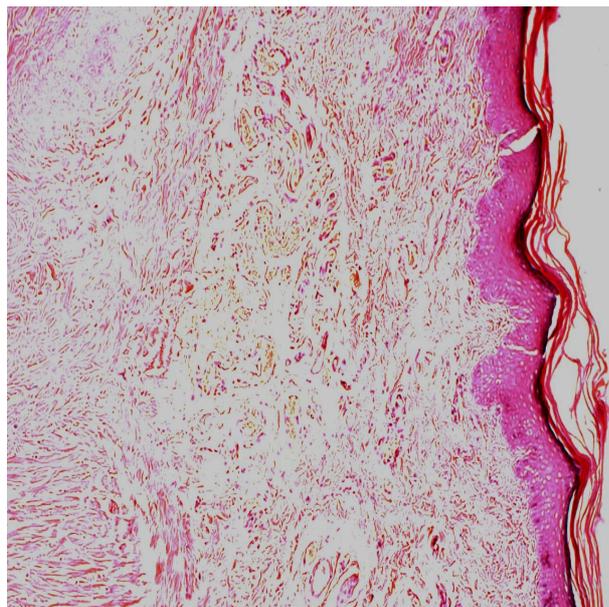
A)

B)

FIGURA 21: Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos controle. A- Controle negativo (salina) ; B- Controle Positivo (Carragenana – sem tratamento).

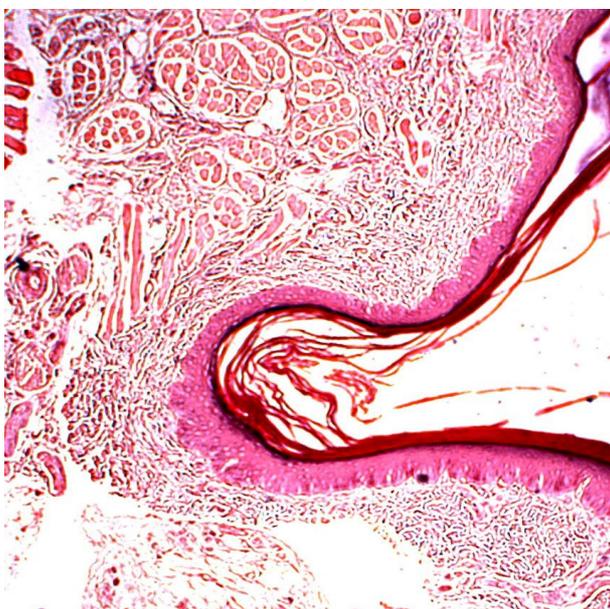


A)

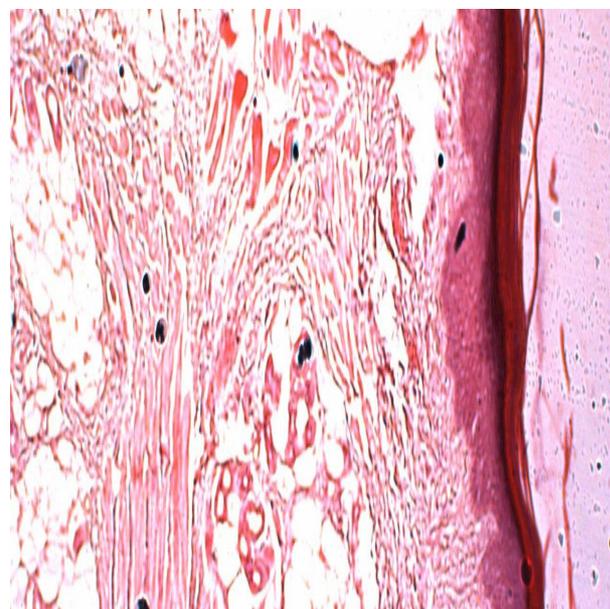


B)

FIGURA 22: Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Extrato *Caripia montagnei* 10 mg/Kg ; B- Extrato *Caripia montagnei* 30 mg/Kg.



A)



B)

FIGURA 23: Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Extrato *Caripia montagnei* 50 mg/Kg ; B- L-NAME.

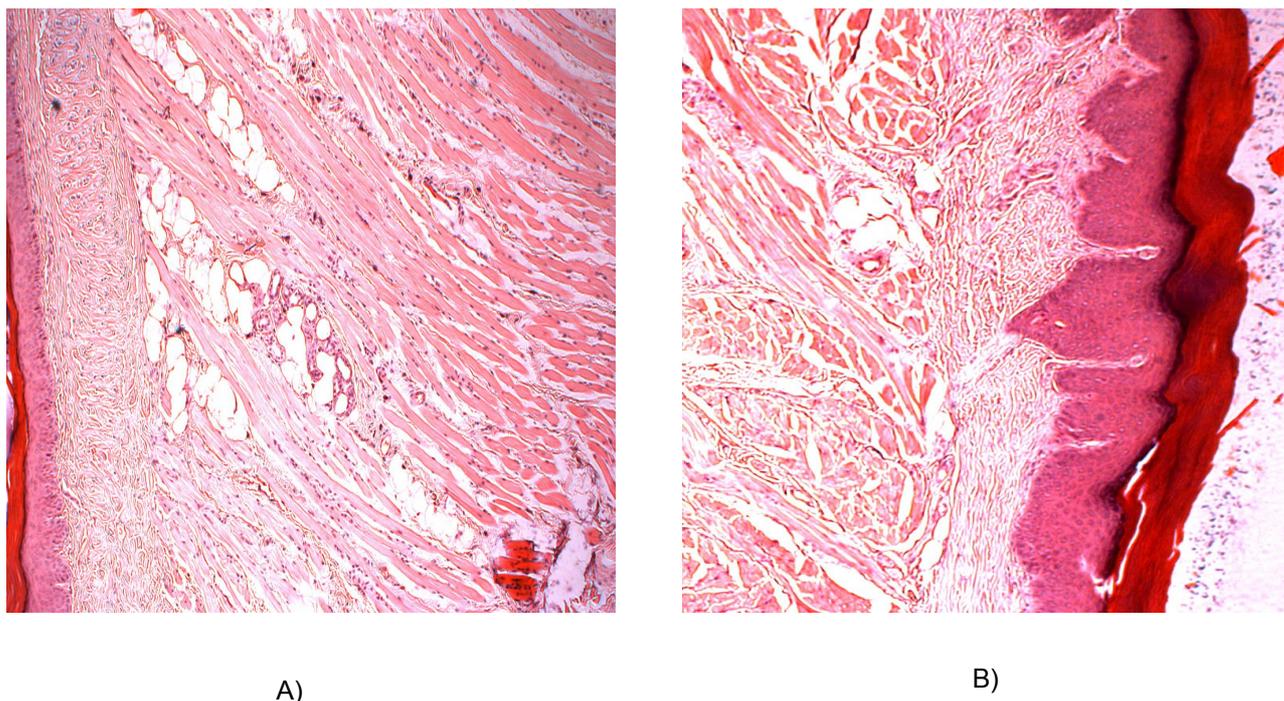


FIGURA 24: Análises histológicas (HEX200) da pata dos grupos: A- Agonista de PPAR, Clofibrato; B- Agonista de PPAR, PFOA.

5.8. Peritonite induzida por tioglicolato

Neste modelo de inflamação pode-se observar o efeito antiinflamatório através da diminuição migratória do número de leucócitos para o sítio da inflamação e do teor de óxido nítrico no lavado peritoneal. Pelos resultados obtidos pode-se observar uma redução de cerca de 70% do número global de leucócitos quando foi administrado o extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg. Para as demais concentrações testadas do extrato, 10 e 30 mg/kg, a redução do processo inflamatório foi de 52,4% e 50,7%, respectivamente. Dessa forma a concentração que teve um melhor efeito antiinflamatório através deste modelo de inflamação também foi a concentração de 50 mg/Kg (Figura 25).

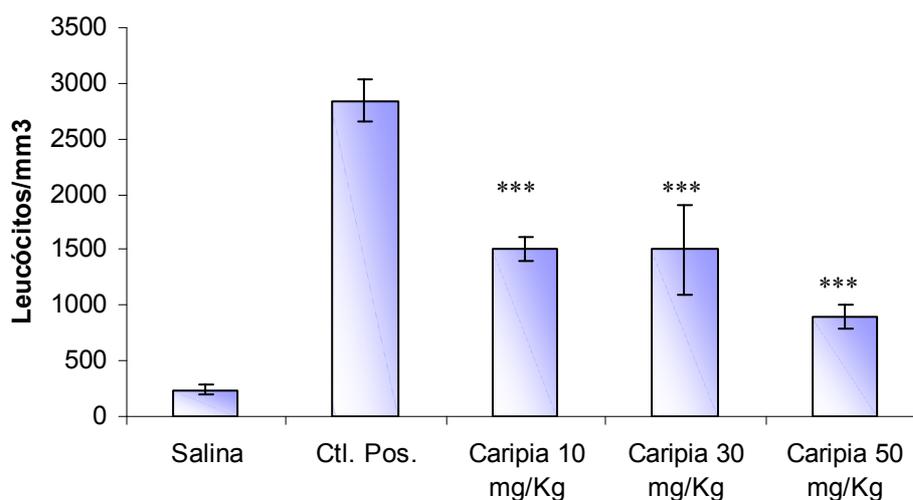


Figura 25: Atividade antiinflamatória dos extratos de *C. montagnei*, agonistas de PPAR e diclofenaco sódico na peritonite induzida por tioglicolato. Controle positivo (sem tratamento – tioglicolato), controle negativo (solução salina). Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP. (*** $p < 0,0001$).

A atividade antiinflamatória é uma das diversas funções atribuídas aos agonistas do PPAR. Então, objetivando ter uma observação sobre o efeito desses compostos frente ao modelo de peritonite e para poder comparar com o extrato de *C. montagnei*, neste experimento realizou-se também, peritonite com os agonistas do PPAR e o diclofenaco sódico, um antiinflamatório já bastante utilizado (Figura 26).

Segundo os testes ANOVA e Tukey-Kramer, em todos os grupos testados houve redução significativa ($p < 0,001$) da quantidade de leucócitos/mm³ quando comparados ao controle positivo.

Os agonistas do PPAR utilizados neste experimento foram: clofibrato, Wy-11643 e PFOA, e a redução do infiltrado leucocitário foi de 49,3%, 48,9 e 35,2%, respectivamente.

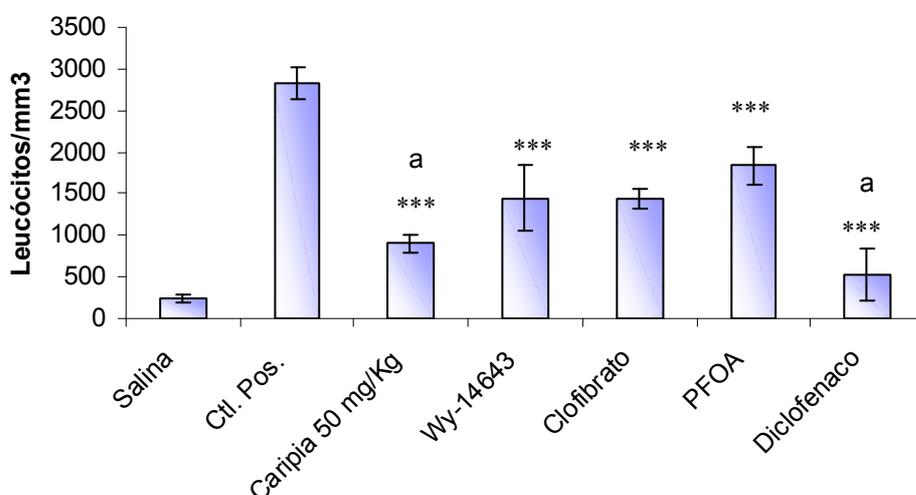


Figura 26: Atividade antiinflamatória do extrato de *C. montagnei*, 50 mg/Kg, e agonistas do PPAR na peritonite induzida por tioglicolato. Controle positivo (tioglicolato de sódio), controle negativo (salina). Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP. (***) $p < 0,0001$ e a: não houve diferença significativa entre os grupos).

O extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg e o diclofenaco sódico (75 mg/Kg), um antiinflamatório inibidor da ciclooxigenase-1, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

5.9. Avaliação dos teores de Nitrito / Nitrito

No modelo de inflamação de peritonite, através da administração de tioglicolato de sódio a 3% injetados nos peritônios dos camundongos, um processo inflamatório é formado e ocorre recrutamento de leucócitos ao local da inflamação. Estas células em resposta ao processo celular liberam uma série de substâncias conhecidas como mediadores da inflamação como as citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico, etc.

Com o lavado peritoneal obtido no processo de peritonite realizou-se a quantificação dos níveis de NO_2/NO_3 . Os teores de nitrito/nitrato produzidos após

administração do tioglicolato e o efeito da administração prévia do extrato de *C. montagnei* na concentração de 10, 30 e 50 mg/ kg podem ser avaliados na figura 27.

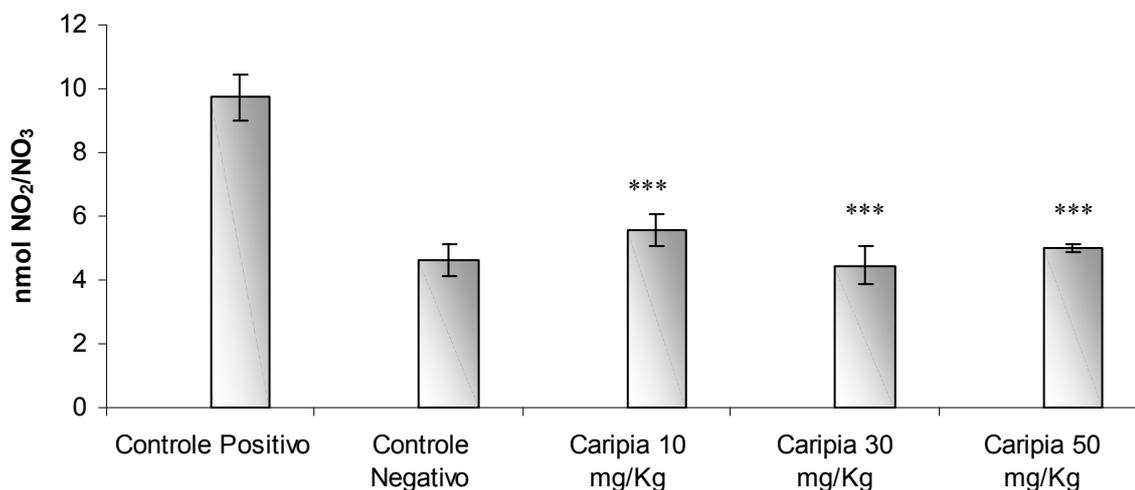


Figura 27: Dosagem dos teores de NO (NO₂/NO₃) no lavado peritoneal de camundongos Swiss com peritonite induzida por tioglicolato, e tratados previamente com os extratos de *C. montagnei*. Controle positivo (tioglicolato), controle negativo (solução salina). Os dados apresentados foram expressos em média \pm DP. (***) $p < 0,001$.

Observa-se que os extratos de *Caripia montagnei* demonstraram redução significativa dos teores de NO₂/NO₃. Esta mesma afirmação pode ser feita para os demais grupos testados (Figura 28).

Segundo os testes ANOVA e Tukey-Kramer, em todos os grupos testados houve redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis nitrato/nitrito quando comparados ao controle positivo.

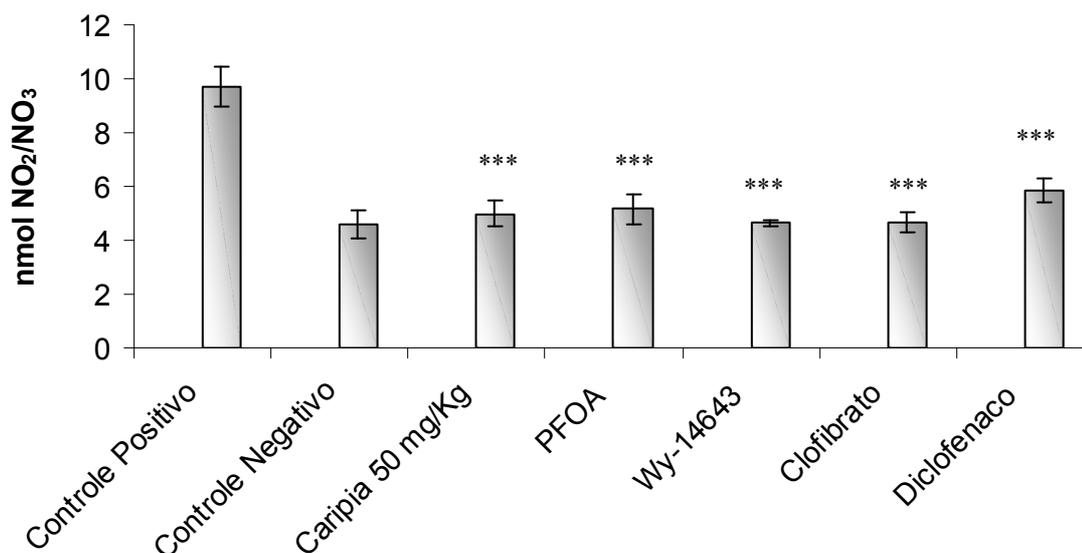


Figura 28: Dosagem dos teores de NO (NO₂/NO₃) no lavado peritoneal de camundongos Swiss com peritonite induzida por tioglicolato, e tratados previamente com os extratos de *C. montagnei* e demais grupos citados. Controle positivo (sem tratamento – tioglicolato), controle negativo (solução salina). Os dados apresentados foram expressos em média ± DP. (***) p < 0,001).

5.10. Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade são baseados na capacidade que as células possuem de converter os sais tetrazolium (MTT), em um composto de coloração azul denominado formazan. Apenas as células vivas possuem essa capacidade (MOSMANN, 1983). A avaliação da transformação do MTT em formazan em células mononucleares do sangue periférico se dá através de leitura em ELISA a 540 nm.

A incubação das células com o extrato de *C. montagnei* por 4 horas e 24 horas revelou que nas concentrações testadas (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 µg/100µL), o extrato do fungo em estudo induziu a proliferação celular quando comparados ao controle no período de 24 horas (Figura 29). Já para o período de 4 horas não houve proliferação celular nem toxicidade relevante.

Os testes ANOVA e Tukey-Kramer revelaram que em todas as concentrações testadas para o intervalo de 4 h, não houve redução significativa ($p < 0,001$) de densidade ótica quando comparados ao controle. Já para o período de 24 h houve diferença extremamente significativa entre os grupos e o controle ($p < 0,001$).

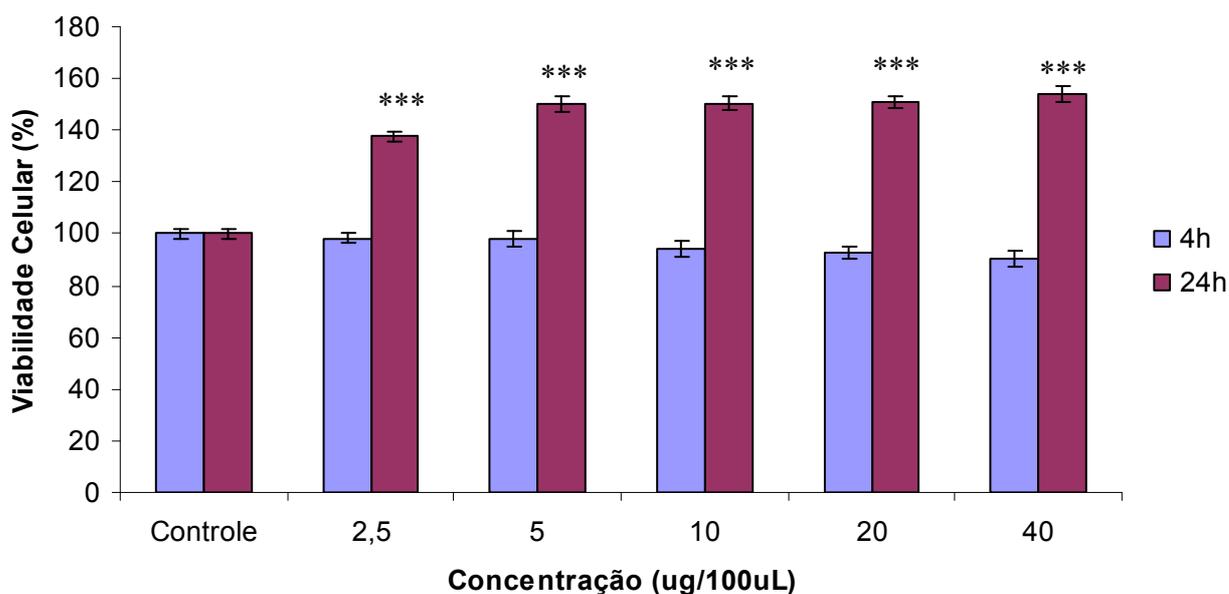
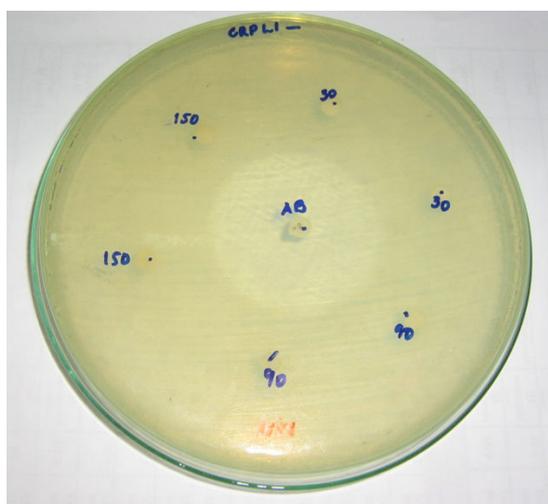


FIGURA 29: Efeito dos extratos de *C. montagnei* sobre a transformação do MTT em formazan em células mononucleares do sangue periférico. Os dados apresentados foram expressos em média \pm SD. . (***) $p < 0,001$, valor estatisticamente significativo em relação ao controle).

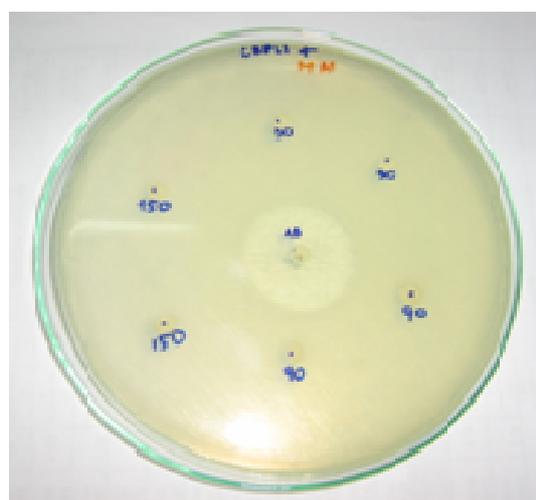
5.11. Atividade antibacteriana

Em relação aos estudos de atividade antibacteriana, verificou-se que as bactérias testadas, *Staphylococcus aureus* (gram positiva) e *Escherichia coli*, (gram negativa) não foram inibidas pelo extrato utilizado, em nenhuma das concentrações testadas (30, 90 e 150 mg/mL). A verificação deste resultado é obtida através da não observação de halos de inibição ao redor dos discos contendo os extratos (Figura

30). Os halos existentes nas placas referem-se ao halo de inibição promovido pelo antibiótico ciprofloxacino que foi utilizado como controle.



a) Gram-negativo (*E. coli*)



b) Gram positivo (*S. aureus*)

Figura 30: Atividade antibacteriana do extrato do fungo de *C. montagnei* frente a bactérias do grupo gram-positivo (a) e gram-negativo (b).

6. DISCUSSÃO

As razões relacionadas ao interesse na pesquisa de fungos variam desde sua utilização na indústria alimentícia até grandes efeitos biológicos e farmacológicos. Várias propriedades já foram atribuídas a estes organismos, tais como: propriedades antiinflamatória, antitumoral, antiviral, antitrombótica, hipolipêmica e antioxidante, atividades essas relacionadas a várias substâncias, como ésteres, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (BRUM, 2005; GUTERREZ et al., 2004; LUIZ et al., 2003).

As β -D-glucanas são polissacarídeos considerados como os principais responsáveis pelas diversas atividades biológicas e farmacológicas atribuídas aos fungos. As β -D-glucanas diferem entre si pelo tipo de ligação e ramificações características que lhes conferem diferentes ações biológicas. Assim, a característica estrutural é fundamental para a ação das β -D-glucanas (BROWN, 2003).

BREENE (1990), analisando a composição centesimal do fungo *Lentinus edodes* observou que esse fungo é composto por 24,6% de proteínas e 44% de carboidratos. A composição centesimal de *Caripia montagnei* revela que este fungo é composto principalmente por carboidratos (63,3%) e lipídeos (21,4). Esse teor de lipídeos é bem superior ao citado por DEMIATE (2003), que afirma ter encontrado um teor de lipídeos de 0,89% no fungo *Agaricus blazei*.

As análises químicas realizadas neste trabalho demonstraram que o extrato aquoso de *Caripia montagnei* é composto prioritariamente por polissacarídeos (98,7%) de unidades de glicose, e um baixo teor protéico (1,3%). Este resultado difere de outros trabalhos realizados em nosso laboratório. Dore et al. (2007), observaram que o fungo *Geastrum saccatum* é composto por uma grande

quantidade de carboidratos (84%); sendo estes carboidratos constituídos de grandes quantidades de glicose e traços de galactose. A presença de proteína no extrato pode significar a existência de complexos glucana–proteínas, que podem ser fundamentais para ação das glucanas. Estudos mostram que as glucanas encontram-se provavelmente ligadas a proteínas, formando um complexo glucana-proteína (LIU, OOI & CHANG, 1997). Isto pode ser visualizado através da análise do espectro de infravermelho e ressonância magnética nuclear do extrato do fungo *C. montagnei*. No espectro de infravermelho observa-se a presença de sinais em forma de dubletes em algumas bandas do espectro que pode estar relacionada à presença de proteínas na amostra. Além disso, o espectro revelou que o extrato em estudo possui grupamentos hidroxilas associados, característicos de composto poliméricos e apresenta grupamento carbonila da função orgânica aldeído. Na região entre 1500 cm^{-1} - 750 cm^{-1} verificam-se a presença de sinais que são típicos de polímeros do tipo beta-glucana, Estes valores são semelhantes aos obtidos anteriormente por GUTIÉRREZ et al., (1996), que trabalhou com glucanas do fungo *Pleutorus*. As análises do espectro de RMN de C^{13} e ^1H do extrato de *C. montagnei*, revelou a presença de sinais que sugerem a presença de estrutura do tipo glucana-proteína e de ligação glicosídica em configuração beta. Estes dados são confirmados aos encontrados em nosso laboratório (DORE et al., 2007) e por outros pesquisadores (GONZAGA et al., 2005; KAWAGISHI et al., 1990; SILVESITEN et al., 1994 e YALIN et al., 2005).

Freitas et al. (2004), observaram que a glucana insolúvel, extraída da parede celular interna do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, quando usada em camundongos por via intraperitoneal, em modelo de sepse abdominal, contribuiu para melhorar a sobrevivência, induziu proteção contra a formação de colônias bacterianas no líquido

peritoneal e aumentou a migração leucocitária. Para avaliar o potencial imunomodulatório do extrato do fungo *C. montagnei* realizou-se a indução da inflamação através de dois modelos, a peritonite induzida por tioglicolato e o edema plantar induzido por carragenana. Nos dois modelos testados pode-se demonstrar que o extrato do fungo *Caripia montagnei* mostrou característica antiinflamatória, por agir diminuindo o número de células recrutadas para o local da inflamação. Em ambos os modelos de inflamação testados o extrato foi administrado em três concentrações, 10, 30 e 50 mg/Kg e a concentração de 50 mg/Kg foi a que gerou melhor efeito antiinflamatório. Esta concentração é inferior à utilizada por NOSÁLÓV et al. (2001), que utilizou glucanas do fungo *Pleurotus ostreatus* e obteve um efeito antiinflamatório somente com 100 mg/Kg.

CUZZOCREA (1997) observou que no edema plantar induzido por zymosan a resposta inflamatória inicial é mediada pelo óxido nítrico e na fase final é mediada por prostaglandinas. No modelo de edema plantar, o extrato de *Caripia montagnei* na concentração de 50 mg/Kg teve um efeito semelhante ao L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, que possui atividade antiinflamatória. Não houve diferença significativa entre esses grupos ($p > 0,05$). Dessa forma, pode-se pensar que o extrato de *Caripia montagnei* pode ter ação antiinflamatória através da via do óxido nítrico já que as curvas-resposta do processo inflamatório foram bastante semelhantes. Esta semelhança entre seus efeitos pode ser observada na análise histológica do tecido removido da pata dos ratos de todos os grupos durante a segunda hora após indução do processo inflamatório (Figura 03).

As diversas propriedades farmacológicas dos agonistas de PPAR- α são alvo de recentes pesquisas no mundo, algumas dessas atividades já têm ação comprovada e são utilizadas na prática clínica como o uso das glitazonas

(Roziglitazona e Pioglitazona) como hipoglicemiantes e dos fibratos (clofibrato, benzafibrato, fenofibrato, etc) como substâncias hipolipemiantes. A ação antiinflamatória dos agonistas vem sendo bastante pesquisada por diversos grupos de pesquisa no mundo. Taylor et al., 2002, analisando o efeito de agonistas de PPARs sobre o processo inflamatório, concluiu que agonistas, como o PFOA, Wy-14643 e clofibrato, tem efeitos *in vivo*, reduzindo o processo inflamatório. Yu-Jui, Wan & Badr (2006), afirmam que a ação antiinflamatória dos agonistas de PPAR é dependente do RXR-alfa, fundamental no mecanismo de ativação dos PPARs. Cuzzocrea et al. (2004), relata que a ação antiinflamatória nos receptores PPAR- α ocorre através da inibição de citocinas, como a IL-6.

Em relação aos agonistas de PPAR utilizados no modelo de edema plantar (Clofibrato e PFOA a 100mg/Kg), podemos afirmar que o extrato de *C. montagnei* na concentração de 50 mg/Kg teve um efeito antiinflamatório superior. Isto pode ser explicado através do mecanismo de ação dos agonistas de PPAR, pois como atuam em nível de núcleo celular, isto requer um tempo maior para a síntese de proteínas essenciais para o efeito antiinflamatório. Pelos resultados obtidos, podemos inferir que as glucanas do extrato de *Caripia montagnei* provavelmente podem ativar o mecanismo de ativação transcricional dos PPARs de forma parcial.

No modelo de peritonite induzida por tioglicolato, todos os grupos testados tiveram uma redução extremamente significativa no nível de leucócitos por mm³, inclusive os grupos de agonistas de PPAR mostrando o potencial dessas substâncias no controle inflamatório. O extrato de *Caripia montagnei* na concentração de 50 mg/Kg teve um ótimo efeito antiinflamatório semelhante ao já conhecido antiinflamatório diclofenaco sódico, pois não houve diferença significativa entre esses grupos ($p > 0,05$). Esses dados sugerem que o extrato de *C. montagnei*

pode agir também inibindo a COX, já que o diclofenaco é um fármaco de ação antiinflamatória que atua inibindo a enzima cicloxigenase, enzima chave para a produção de mediadores do processo inflamatório, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. O óxido nítrico também é um importante mediador do processo inflamatório e a dosagem dos níveis de nitrito/nitrato constitui uma importante ferramenta para avaliação do processo inflamatório. Kim (2006), estudando o fungo *Phelinnus linteus*, verificou que este fungo produziu uma inibição significativa na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS. Através da obtenção do lavado peritoneal no ensaio de peritonite induzida por tioglicolato, pôde-se realizar a dosagem dos níveis de nitrito/nitrato. Em todos os grupos testados houve redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis nitrato/nitrito quando comparados ao controle positivo.

O teste de atividade antibacteriana do extrato do fungo *Caripia montagnei*, mostrou que o extrato não possui efeito sobre bactérias gram positivas ou gram negativas, nas três concentrações testadas (30, 90 e 150 mg/mL). Este resultado difere do estudo de Smania et al., (2007) que estudou o fungo brasileiro *Ganoderma australe* e observou a presença de atividade contra fungos, bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

Com estas informações, pode-se inferir que o extrato obtido do fungo *Caripia montagnei* é rico em polissacarídeos do tipo glucana e possui excelente atividade antiinflamatória na concentração de 50 mg/Kg. O efeito antiinflamatório é superior quando comparado a alguns agonistas de PPAR- α e semelhante ao do L-NAME e diclofenaco sódico, dois fármacos antiinflamatórios, indicando que o extrato do fungo em estudo pode ter efeito antiinflamatório por inibir a iNOS e a COX, e de forma

parcial por agir como agonistas dos PPARs. Trabalhos futuros serão realizados para comprovar essa hipótese.

7. CONCLUSÕES

- A composição centesimal do tecido do fungo *Caripia montagnei* mostrou um teor de 63,3% de carboidratos, seguido de 21,4% de lipídeos, 2,2 % de proteínas, 11,2% de fibras e 1,98% de cinzas.
- As análises químicas, a espectrofotometria de infravermelho e a cromatografia descendente em papel demonstram que o extrato obtido do fungo *Caripia montagnei* é composto por polissacarídeos do tipo β -glucana, constituído por unidades de glicose e associados a porções protéicas.
- Nos modelos de inflamação testados, edema plantar e peritonite, o extrato de *Caripia montagnei* mostrou um excelente efeito antiinflamatório na concentração de 50 mg/Kg.
- A análise dos cortes histológicos da pata direita dos animais utilizados no experimento de edema plantar demonstrou que a diminuição do número de células polimorfonucleares no local da inflamação acompanha a diminuição do edema nos animais que foram tratados com os polissacarídeos de *Caripia montagnei*.
- Os agonistas de PPARs utilizados neste trabalho mostraram redução significativa na capacidade migratória de leucócitos para o local da inflamação no ensaio de peritonite induzida por tioglicolato.
- O efeito antiinflamatório do extrato fúngico de *Caripia montagnei* é superior quando comparado a alguns agonistas de PPAR- α . Desta forma, conclui-se que o extrato do fungo em estudo provavelmente participa de forma parcial no mecanismo de ativação dos PPARs.

- O efeito antiinflamatório extrato fúngico de *Caripia montagnei* é semelhante ao do L-NAME e ao diclofenaco sódico, dois fármacos antiinflamatórios, indicando que o extrato do fungo em estudo pode possuir atividade antiinflamatória por inibir a iNOS e a COX.
- A análise dos teores de nitrato e nitrito no lavado peritoneal obtido no ensaio de peritonite induzida por tioglicolato, revelou que em todos os grupos testados houve redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis nitrato/nitrito quando comparados ao controle positivo.
- Os ensaios de citotoxicidade mostraram que o extrato do fungo *C. montagnei* apresentam a propriedade de induzir a proliferação celular nas concentrações testadas por 24 horas e não promove citotoxicidade significativa no período de 4 horas.
- Nas concentrações testadas nesse estudo, o extrato do fungo *Caripia montagnei* não mostrou atividade antibacteriana para *S. aureus* e *E. coli*.

8. REFERÊNCIAS

- AAOC. Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 14ed.; p. 988-1141. Washington, 1984.
- ADAMS JS, REN SY. Autoregulation of 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis in macrophage mitochondria by nitric oxide. **Endocrinology**, 137(10):4514-7, 1996.
- ADEREM A, ULEVITCH RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, 406:782-7, 2000.
- ALQUINI G, CARBONERO ER, ROSADO FR, COSENTINO C, IACOMINI M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiol Lett.** 15;230(1):47-52, 2004.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J.A. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J. Biochem. Physiol.**, 37: 911-917, 1959.
- BOCOS C, GÖTTLICHER M, GEARING K, BANNER C, ENMARK E, TEBOUL M, CRICKMORE A, GUSTAFSSON JA. Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). **J Steroid Biochem Mol Biol.**, 53(1-6):467-73; 1995.
- BOEHM M., ZHANG L., ZHI L., MCCLURG M., BERGER E., WAGONER M., et al. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. **J Med Chem.**, 38:3146-55, 1995.
- BREENE, W. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. **Journal of Food Production** 53, 883-894, 1990.
- BROW, G.D.; TAYLOR, P.R.; REID, D. M.; WILLMENT, J.A.; WILLIAMS, D.L.; MARTINEZ-POMARES, L.; WONG, S.Y.C.; GORDON, S. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. **J. Exp. Med**, 2002.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, 19: 311- 315, 2003.
- BRUM, I.S. et al. association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and plasma testosterone level in post menopausal women. **J. of the Society for Gynec. Invest.** , 12: 135-141, 2005.
- CARBONERO,E.R.; MONTAI, A.V.; WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp significance as chemotypes. **Phytochemistry**, 61: 681-686, 2002.
- CARLILE, M.J. and WATKINSON, S.C. Classification, Phylogeny and Evolutionary Trends. **The Fungi**, cap. 5, pg 235-241. Academic Press, 3 ed. 1996.
- CHO, J.H.; CHO, S.D.; HU, H.; KIM, S.H.; LEE, S.K.; LEE, Y.S.; KANG, K.S. The roles of ERK 1/2 and p38 MAP kinases in the prevention mechanism of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. **Carcinogenesis** 23, 1164- 1169; 2002.

COLLEONI-SIRGHIE, M., FULTON, D. B. and WHITE, P. J. Structural features of water soluble (1,3) (1,4)- β -D-glucans from high- β -glucan and traditional oat lines. **Carbohydrate Polymers**, 54, 237-249, 2003.

CUZZOCREA S, ZINGARELLI B, CALAPAI G, NAVA F, CAPUTI AP. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**. 60(3):215-20, 1997.

CUZZOCREA S., PAOLA R., MAZZON E., GENOVESE T., MUIÀ C., CENTORRINO T., AND CAPUTI A. P. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha (PPAR- α) in the development of inflammatory bowel disease in mice. **Laboratory Investigation**. 84, 1643–1654, 2004.

DAVIES MG, FULTON GJ, HAGEN PO. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg.**, 82(12):1598-610, 1995.

DEMIATE, I.M & SHIBATA, C.K.R.. Cultivo e Análise da Composição Química do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei* Murril); **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, **9** : 21-32, 2003.

DORE, C.M.P.G., AZEVEDO, T.C.G., SOUZA, M.C.R., REGO, L.A., DANTAS, J.C.M., SILVA, F.R.F., ROCHA, H.A.O., BASEIA, I.G. and LEITE, E.L. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, 7:1160-1169, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SIMTH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FARRELL AJ, BLAKE DR. Nitric oxide. **Ann Rheum Dis**, 55(1):7-20, 1996.

FREITAS, Janaina Cristiana de Oliveira Crispim; MEDEIROS, Aldo da Cunha; SALES, Valéria Soraya de Farias. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cir. Bras.** , São Paulo, v. 19, n. 3, 2004 .

FRUCHART JC, DURIEZ P, STAELS B. Molecular mechanism of action of the fibrates. **J Soc Biol.**;193(1):67-75, 1999.

FUNGI PERFECTI. 11/10/2005. www.fungiperfecti.com

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; CORRADI DA SILVA, M. L. **Rev. Biotechnol. C. Desenvol.** 30:97, 2003.

GONZAGA, M.L.C., RICARDO, N.M.P.S.; HEATLEY, F.; SOARES, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murril, **Carbohydrate Polymers**, 60: 43-49, 2005.

GUTERREZ, Z.R., MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; JORDÃO, B.Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murril in vitro. **Toxicology in vitro**, 18: 301-309, 2004.

GUTIÉRREZ A., PRIETO A., MARTÍNEZ A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**. 281(1):143-54, 1996.

HAMILTON T. A. ¹, NOVOTNY M., DATTA S. PALASH M, HARTUPEE J., JULIE TEBO and LI X. Chemokine and chemoattractant receptor expression: post-transcriptional regulation **Journal of Leukocyte Biology**. 82:213-219, 2007.

ISSEMAN e GREEN S., Activation of a member of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, 347:645–650, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 9ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

JURAJ CULMAN, YI ZHAO, PETER GOHLKE AND THOMAS HERDEGEN. PPAR- γ : therapeutic target for ischemic stroke. **Trends in Pharmacological Sciences**, 28: 244-249, 2007.

KATSUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 408-423, 1998.

KAWAGISHI H, NOMURA A, MIZUNO T, KIMURA A, CHIBA S. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. **Biochim Biophys Acta.**, 20;1034(3):247-52, 1990.

KIM B.C., CHOI J.W., HONG H.Y., LEE S.A., HONG S., PARK E.H., KIM S.J., LIM C.J. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**. 106 (33): 364-371, 2006.

LAUDET V., HANNI C., COLL J. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO.**, 11:1003-13, 1992.

LEHMANN JM, LENHARD JM, OLIVER BB, RINGOLD GM, KLIEWER AS. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Biol Chem**. 272:3406-3410. 1997.

LIU, F.; OOI, V.E., CHANG, S.T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharides extracts. **Life Sciences**, 60:1433-6, 1997.

LIU, W.K.; NG, T.B.; SZE, S.F.; & TSUI, K.W. Activation of peritoneal macrophage by polysaccharides from the mushroom *Coriolus versicolor*. **Immunopharmacology**, 26, 139-146, 1993.

LUIZ, R.C.; JORDÃO, B.Q.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Mechanism of anticlastogenicity of *Agaricus blazei* Murril mushroom organic extracts

in wild type CHO(K₁) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays. **Mutation Research**. 528: 75-79, 2003.

MARX N., SUKHOVA G.K., COLLINS T., LIBBY P., PLUTZKY J. PPAR alpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. **Circulation**, 99:3125-3131, 1999.

MICHALIK L, WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. **Curr Opin Biotechnol.**, 10(6):564-70, 1999.

MIZUNO T. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review) **International Journal of Medicinal Mushrooms** 1: 9-30, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.

NOSÁLOVÁ, V.; BOBEK, P.; ČERNÁ, S.; TVRTINA, G. S. Effects of Pleuran (β-Glucan Isolated from *Pleurotus ostreatus*) on Experimental Colitis in Rats. **Physiol. Res.**, 50: 575-581, 2001.

PALMER LA, JOHNS RA. Hypoxia upregulates inducible (Type II) nitric oxide synthase in an HIF-1 dependent manner in rat pulmonary microvascular but not aortic smooth muscle cells. **Chest**. 114:33S-34S; 1998.

PAPAPETROPOULOS A, ANDREPOULOS S, GO CY, HOQUE A, FUCHS LC, CATRAVAS JD. Regulation of the nitric oxide synthase-nitric oxide-cGMP pathway in rat mesenteric endothelial cells. **J Appl Physiol**. 91:2553-2560; 2001.

PARK, Yong K. et al . Determinação da concentração de beta-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

PEREIRA F.E.L. e BOGLIOLO, L. Livro: Bogliolo Patologia. Capítulo 7 – Inflamações. Editora: Guanabara Koogan. 6ªed. Rio de Janeiro, RJ. 2004

PEREYRA, M.T.; PIETRO, A.; BÉRNABE, M.; LEAL, J.A. Studies of new polysaccharides from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm. **Lichenologist**, 35:177-185, 2003.

RALSTON, S.H. The Michael Mason Prize Essay. Nitric oxide and bone: what a gas! Br. **J. Rheumatol**. 36, 831– 838, 1997.

REY, L. **Dicionário de termos Médicos**, 1998.

RICOTE M, HUANG J, FAJAS L, LI A, WELCH J, NAJIB J, WITZTUM JL, AUWERX J, PALINSKI W, GLASS CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proc**

Natl Acad Sci U S A (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America). 95:7614-7619; 1998.

ROBBINS; P. F., KAWAKAMI; Y. Human tumor antigens recognized by T cells. **Curr Opin Immunol.** 8(5):628-36. 1996.

ROSS GD, VETVICKA V, YAN J, XIA Y, VETVICKOVÁ J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. **Immunopharmacology.** 42:61-74; 1999.

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, BOURDON DM, MARINO MH, MANNING PT, CURRIE MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol.** 118(4):829-38, 1996.

SCHOOJANS K., STAELS B., AUWERX J. Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **J. Lipid Res.**, 37:90725, 1996.

SEVIOUR R. J.; STASINOPOULOS S. J.; AUER D. P. F.; GIBBS P. A. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi, **Critical reviews in biotechnology**, 12,: 279-298, 1992.

SILVA, MARIA DE LOURDES CORRADI DA; MARTINEZ, PAULA FELIPPE; IZELI, NATALY LINO; SILVA, IARA RIBEIRO; VASCONCELOS, ANA FLORA DALBERTO; CARDOSO, MARILSA DE STEFANI; STELUTTI, ROSÂNGELA MARIA; GIESE, ELLEN CRISTINE; BARBOSA, ANELI DE MELO. Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Química Nova**, 29: 85-92, 2006.

SILVERSTEIN, M.R.; BASSLER C. G.; MORRIL C. T. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **Livros Técnicos e Científicos S.A.** Rio de Janeiro. 5ª ed. 1994.

SMANIA, Elza de Fatima Albino et al. Atividade antimicrobiana do australato de metila de *Ganoderma australe*. **Rev. bras. farmacogn.** , João Pessoa, v. 17, n. 1, 2007.

SPECTOR J. Refinement of the croomassie blue method of protein quantification: A simple and linear spectrofotometric assay of 0.5 to 50 mg of protein. **Anal Biochem.** 86:142-146, 1978.

TAVARES V, HIRATA RDC, HIRATA MH. Ação dos PPARs no metabolismo de lipídeos, homeostase da glicose e inflamação. **NewsLab.** 57:128-44; 2003.

TAVARES, V., HIRATA, M.H., HIRATA, R.D.C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq. Brás. Endocrinol Metab.** 51, 526-533; 2007.

TAYLOR B.K., DADIA N., YANG C.B., KRISHNAN S., BADR M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists Inhibit Inflammatory Edema and Hyperalgesia. **Inflammation**. 26 (3):121-127, 2002.

TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. - Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, 166: 444 - 445, 1950.

VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. **Veterinary Research Communications**, 26 (2):111-126, 2002.

WAN Y.Y. and BADR M.Z. Inhibition of Carrageenan-Induced Cutaneous Inflammation by PPAR Agonists is Dependent on Hepatocyte-Specific Retinoid X Receptor Alpha. **PPAR Research**. 96341: 1-6, 2006.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60: 258-74, 2002.

WILLIAMS, D.L. Overview of (1,3)-beta-D-glucan immunobiology. **Mediators Inflamm**. 6:247-250, 1997.

WILLMENT JA, GORDON S, BROWN GD. Characterization of the Human beta-Glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms. **J. Biol. Chem**, 276, 43818-43823, 2001.

www.afh.bio.br/imune/img/imune13.jpg

www.iq.unesp.br

XIE, X. *et al.* - Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides – studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and trestatin a sulfate. **J. Biol. Chem**. v. 275, n. 44, p. 34818-34825, 2000.

YALIN, W.; YUANJIANG, P.; CUIRONG, S. Isolation, purification and structural investigation of a water-soluble polysaccharide from *Solanum lyratum Thunb*, **Intern. Journal of Biological macromolecules**, 36: 241-245, 2005.

YEUNG, J.H.K.; CHIU, L.C.M. & OOI, V.E.C. Effect of polysaccharide peptide on glutathione and protection against paracetamol induced hepatotoxicity in the rat. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 16,723-729; 1994.

ZIMMERMAN JW, LINDERMUTH J, FISH PA, PALACE GP, STEVENSON TT, DEMONG DE. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes, **J Biol Chem**., 273(34):22014-20, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)