

Tatiana Rodrigues Alexandre

Estudo do Potencial anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* do Ergosterol isolado do Basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

SÃO PAULO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Alexandre, Tatiana Rodrigues.

Estudo do Potencial anti-*Leishmania* e anti- *Trypanosoma cruzi* do Ergosterol isolado do Basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus* / Tatiana Rodrigues Alexandre. – 2015.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2015.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

1. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia. 2. *Leishmania infantum*/parasitologia. 3. Ergosterol/química. 4. *Pleurotus*/ isolamento & purificação.

SES/CCD/CD-321/2015

RESUMO

Considerando a necessidade de novos tratamentos para doenças negligenciadas como a leishmaniose visceral e a doença de Chagas, o presente trabalho realizou o fracionamento do basidiomiceto comestível *Pleurotus salmoneostramineus* na busca por substâncias potencialmente antiparasitárias. Dentre as frações ativas, foi isolado um composto denominado ergosterol, o qual apresentou atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi*. O ergosterol foi ativo contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, com valor de Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) de 125 µM e de 129 µM contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O estudo da citotoxicidade em células de mamífero resultou em um valor de CE₅₀ de 619 µM. Seu mecanismo de ação em tripomastigotas resultou uma rápida permeabilização da membrana plasmática, com a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, levando o parasito à morte. Apesar disso, não se verificou aumento de espécies reativas de oxigênio no parasito, demonstrando que seu mecanismo de ação não envolve a indução de estresse oxidativo. A seleção de metabólitos secundários antiparasitários presentes na natureza pode fornecer futuros protótipos para o desenho de novos fármacos para doenças negligenciadas.

Palavras Chave: Ergosterol, *Pleurotus salmoneostramineus*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, mecanismo de ação.

ABSTRACT

Considering the need for new treatments for neglected diseases as visceral leishmaniasis and Chagas disease, in this work we fractionated the edible mushroom *Pleurotus salmoneostramineus* in the search for potential antiparasitic compounds. Among the active fractions, it was isolated the ergosterol, which showed anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* activities. The ergosterol was active against intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) infantum* and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, with 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) values of 125 µM and 129 µM, respectively. The cytotoxicity in mammalian cells resulted in an IC₅₀ value of 619 µM. Its mechanism of action in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes resulted in permeabilization of the plasma membrane, as well as depolarization of mitochondrial membrane potential, leading to parasite death. Nevertheless, there was no increase in reactive oxygen species, demonstrating that its mechanism of action does not involve the induction of oxidative stress in the parasite. The selection of antiparasitic secondary metabolites present in nature can provide future prototypes for the design of new drugs for neglected diseases.

Key Words: Ergosterol, *Pleurotus salmoneostramineus*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, mechanism of action.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CE ₉₉	Concentração efetiva 99%
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CPS	Coluna <i>Pleurotus salmoneostramineus</i>
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCCP	Carbonilcianuro p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IC 95%	Intervalo de Confiança 95%
IS	Índice de seletividade
LLC-MK2	<i>Rhesus Monkey Kidney Cells</i> – ATCC CCL 7
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitros
MS	Ministério da Saúde
M -199	Meio 199
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolio
na	Não ativo
nd	Não determinado
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salina (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
RPMI (1640)	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
WHO	<i>World Health Organization</i>
v/v	Volume por volume
µL	Microlitros
µg/mL	Microgramas por mililitros
µM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos confirmados de LV no Brasil de 2005 a 2013.....	13
Figura 2: Fêmea de flebotomíneo, adulto, engurgitada - (foto ampliada)	14
Figura 3: Ciclo de transmissão da leishmaniose incluindo vetor e hospedeiro vertebrado.	15
Figura 4: Área endêmica de doença de Chagas na América Latina.....	19
Figura 5: Distribuição espacial dos casos de DCA no Brasil no período de 2006 a 2013.....	20
Figura 6: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> incluindo o vetor e o hospedeiro vertebrado.	22
Figura 7: Edema das pálpebras superiores e inferiores (esquerda da paciente) conhecido como sinal de Romanã.....	23
Figura 8: Principais estruturas de um Basidiomycota.....	27
Figura 9: Cogumelos Basidiomicetos: 1 - <i>Agaricus blazei</i> , 2 - <i>Lentinus strigosus</i> , 3 - <i>Pleurotus ostreatus</i> e 4 - <i>Astraeus hygrometricus</i>	28
Figura 10: Estrutura química do composto hipnofilina, isolado do basidiomiceto <i>Lentinus strigosus</i>	30
Figura 11: Estrutura química do composto panepoxidona isolado do basidiomiceto <i>Lentinus strigosus</i>	30
Figura 12: Estrutura química do composto astracurcurona isolado do cogumelo <i>Astraeus hygrometricus</i>	30
Figura 13: Estrutura química do composto peróxido de ergosterol isolado do basidiomiceto <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
Figura 14: Cogumelo <i>Pleurotus salmoneostramineus</i> (“cogumelo rosa”).	33
Figura 15: Fluxograma de obtenção do extrato metanólico bruto e das frações obtidas após partição líquido-líquido do <i>P. salmoneostramineus</i>	38
Figura 16: Fluxograma da confirmação da elucidação estrutural	47
Figura 17: Estrutura do ergosterol.....	58
Figura 18: Viabilidade de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> submetidos ao teste com resazurina, após incubação com as frações obtidas do extrato metanólico do <i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	60

- Figura 19:** Viabilidade de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* submetidos ao teste com MTT, após incubação com as frações obtidas do extrato metanólico do *Pleurotus salmoneostramineus*.60
- Figura 20:** Avaliação da efetividade do ergosterol contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*. Macrófagos peritoneais corados com Giemsa e observados em microscopia óptica em aumento de 1000X (imersão em óleo). A. controle não tratado. B. incubação com ergosterol por 120 horas a 150 µg/mL (378,16 µM). Seta demonstra amastigotas e a barra representa 3 µm.....65
- Figura 21:** Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX® Green. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por ***($p < 0,001$) e **($p < 0,002$) em relação ao controle. O desvio é representado pela média das triplicatas de um ensaio representativo.66
- Figura 22:** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi realizada utilizando a sonda Mitotracker® Red CM-H2XROS após uma hora de incubação com o ergosterol * ($p < 0,001$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo.67
- Figura 23:** Avaliação da produção de ROS em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando a sonda H2DCF-DA realizada após uma hora de incubação com o ergosterol. ($p < 0,05$) ***($p < 0,001$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo.68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Pleurotus</i> e suas atividades biológicas.	32
Tabela 2: Frações e massas obtidas após o fracionamento em coluna da fração hexano do <i>P. salmoneostramineus</i>	44
Tabela 3: Grupos de frações, frações e massas de material obtido após fracionamento em coluna da fração hexano do <i>P. salmoneostramineus</i>	45
Tabela 4: Determinação da atividade antiparasitária das frações: hexano, acetato de etila e butanol do <i>P. salmoneostramineus</i> em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> . A viabilidade foi determinada com resazurina e MTT, respectivamente.	59
Tabela 5: Determinação da atividade antiparasitária dos grupos em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> . A viabilidade foi determinada com resazurina e MTT, respectivamente.	61
Tabela 6: Determinação da atividade antiparasitária do ergosterol em formas tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> , promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> e citotoxicidade em macrófagos peritoneais. A viabilidade foi determinada com resazurina e MTT, respectivamente, e os fármacos padrões miltefosina e benznidazol.	64

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. LEISHMANIOSE VISCERAL	12
1.1.1. <i>Manifestações clínicas</i>	16
1.1.2. <i>Tratamento</i>	16
1.1.2.1. Anfotericina B.....	17
1.1.2.2. Miltefosina.....	18
1.2. DOENÇA DE CHAGAS	18
1.2.1. <i>Manifestações clínicas</i>	22
1.2.2. <i>Tratamento</i>	25
1.2.3. <i>Basidiomicetos</i>	26
1.2.3.1. Propriedades medicinais dos cogumelos	28
1.2.3.2. O gênero <i>Pleurotus</i>	31
1.2.3.3. <i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. GERAIS.....	35
3.2. ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. COGUMELO E REAGENTES	37
4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ORGÂNICO E DA PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	37
4.2.1. <i>Maceração a frio</i>	37
4.2.2. <i>Partição líquido-líquido</i>	38
4.3. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES: HEXANO, ACETATO DE ETILA E BUTANOL.....	39
4.3.1. <i>Parasitas, células e animais de experimentação</i>	39
4.3.1.1. Animais de experimentação	39
4.3.1.2. <i>T.cruzi</i>	39
4.3.1.3. <i>Leishmania (L.) infantum</i>	39
4.3.1.4. Células LLC-MK2	40

4.3.1.5.	Células NCTC clone 929.....	40
4.3.1.6.	Macrófagos peritoneais	40
4.3.2.	Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) em <i>Leishmania (L.) infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4.3.2.1.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4.3.2.2.	<i>Leishmania (L.) infantum</i>	41
4.4.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS – FRACIONAMENTO.....	42
4.4.1.	<i>Estudo das frações hexano, acetato de etila e butanol</i>	42
4.4.1.1.	Cromatografia em camada delgada (CCD)	42
4.4.1.2.	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H)	43
4.4.1.3.	Cromatografia em coluna (CC).....	43
4.4.2.	<i>O estudo do grupo CPS-3 (3)</i>	46
4.4.2.1.	Elucidação estrutural.....	46
4.4.2.2.	Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) e da citotoxicidade contra células de mamíferos e do índice de seletividade do ergosterol	47
4.4.2.2.1.	Estudo da atividade antiparasitária em formas amastigotas intracelulares	47
4.4.2.2.2.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.2.2.3.	Amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	48
4.4.2.2.1.	Ensaio de citotoxicidade da miltefosina	49
4.4.2.2.2.	Ensaio de citotoxicidade do ergosterol em macrófagos peritoneais	50
4.4.2.3.	Avaliação dos mecanismos de ação em formas tripomastigotas de <i>T.cruzi</i>	50
4.5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
5.	RESULTADOS	54

5.1. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO METABÓLITO ISOLADO	54
5.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	58
5.2.1. Determinação antiparasitária das frações: hexano, acetato de etila e butanol.....	58
5.2.1.1. Tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
5.2.1.2. Promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	58
5.2.2. Determinação da atividade antiparasitária	61
5.2.2.1. Tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
5.2.2.2. Promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	61
5.2.3. Avaliação da Atividade Antiparasitária e Citotoxicidade do Ergosterol	62
5.2.4. Avaliação dos mecanismos de ação do ergosterol em <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
5.2.4.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática	65
5.2.4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	66
5.2.4.3. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	67
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS.....	78
9. ANEXOS	96

1. Introdução

Doenças negligenciadas possuem amplo impacto social e econômico, constituindo em um grande problema em saúde pública, afetando principalmente populações menos favorecidas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Andrews et al., 2014). A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários responsáveis por importantes doenças parasitárias como a doença de Chagas e a leishmaniose visceral (Fidalgo & Gille, 2011).

1.1. Leishmaniose visceral

Leishmaniose visceral (LV) também conhecida como “calazar” é uma doença parasitária tropical (Mukkavilli et al., 2014), frequentemente associada com o desequilíbrio social: relacionada à pobreza, e fator a ela relacionado com a desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação e falta de recursos sociais (Khadem & Uzonna, 2014). Das infecções tropicais apenas a malária supera o número de mortes por LV (Marinho et al., 2015). Sua incidência mundial é estimada entre 200 a 400 mil novos casos anualmente, com 50 mil mortes, sendo que mais de 90% dos casos estão concentrados em seis países (Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) (WHO, 2015).

Nas Américas a LV foi descrita em 12 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai e Venezuela) e 90% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente na Região Nordeste (Belo et al., 2013; Cantacessi et al., 2015; MS, 2014). O Brasil enfrenta atualmente expansão e urbanização da LV. Entre os anos de 2005 a 2013, os casos de LV no Brasil somaram 31990 casos (**Figura 1**) em grande número de cães infectados têm sido

encontrados em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos, afetando pessoas de todas as idades na maior parte das áreas endêmicas. A maioria dos casos registrados de LV ocorrem em crianças com menos de 10 anos (Gontijo & Melo, 2004). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológico celular agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (MS, 2014).

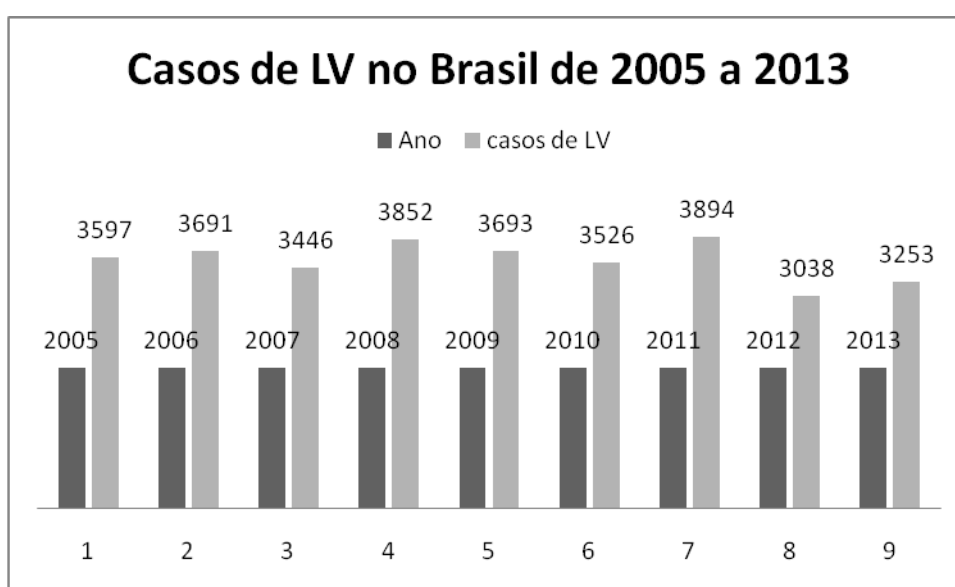


Figura 1: Casos confirmados de LV no Brasil de 2005 a 2013

Fonte: SVS/Sinam/MS, 2015 (modificado).

Os agentes etiológicos da LV são protozoários do gênero *Leishmania* das espécies: *Leishmania (L.) donovani* no velho Mundo (África, Ásia, sul da Europa, bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio) e *Leishmania (L.) infantum* na Bacia do Mediterrâneo e no novo Mundo (América Latina) (Sundar & Chakravarty, 2014). Eventualmente as espécies: *Leishmania (L.) tropica* no Oriente Médio e *Leishmania (L.) amazonensis* na América do sul, podem causar LV (Murray et al., 2005; Stockdale & Newton, 2013).

Os vetores da LV são insetos que possuem de 1,5 a 2,0 milímetros de comprimento denominados flebotomíneos, sendo que apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão (**Figura 2**). Eles são principalmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Dostálová & Volf, 2012). Espécies de dois gêneros são responsáveis pela transmissão da doença: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas (Costa, 2011). Nas Américas, no ambiente urbano, os cães (*Canis familiaris*) são considerados o principal reservatório de *Leishmania* (*L. infantum*) (Belo et al., 2013; Dawit et al., 2013).



Figura 2: Fêmea de flebotomíneo, adulto, engurgitada (foto ampliada)

Fonte: MS, 2014.

O ciclo biológico da *Leishmania* ocorre quando flebotomíneos fêmeas ao sugarem o sangue de mamíferos infectados ingerem macrófagos parasitados pelas formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, reproduzem-se por divisão binária simples e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária simples. Promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes promastigotas metacíclicas. O ciclo do

parasito no flebotomíneo se completa em aproximadamente 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantas ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um novo hospedeiro, o homem ou outro mamífero, liberam as formas promastigotas metacíclicas. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento das células, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário como: linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MS, 2014). Na **Figura 3** está ilustrado o ciclo biológico da *Leishmania*.

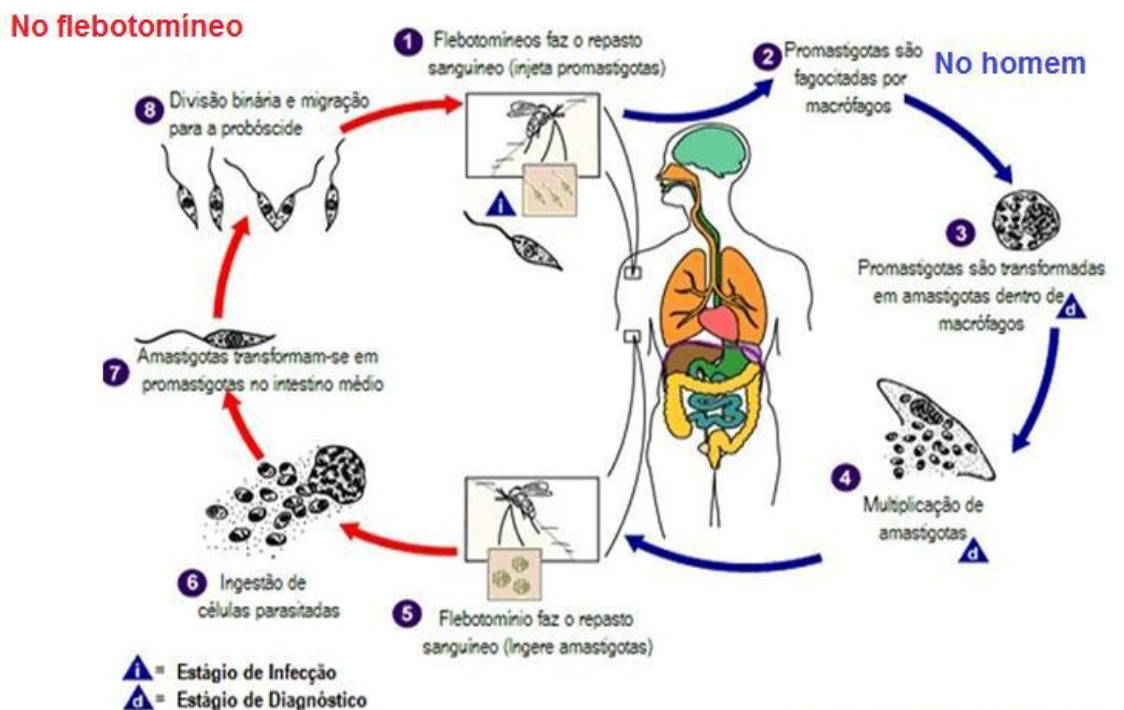


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania* incluindo, vetor e hospedeiro vertebrado.

Fonte: CDC, modificado, 2015.

1.1.1. Manifestações clínicas

A LV é uma infecção sistêmica e afeta a maioria dos órgãos internos do paciente. Os parasitos infectam preferencialmente macrófagos, tendo tropismo pelas vísceras. Geralmente são encontrados na medula óssea, baço, fígado e tecidos linfóides (Kumar & Engwerda, 2014). A infecção pode variar entre fase assintomática com indivíduos infectados por parasitos, mas sem aparente impacto sobre a sua saúde. A fase aguda sintomática é caracterizada por linfadenopatia, febre, diarreia, mal-estar, tosse, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (Fumagalli et al., 2015; Ready, 2014; Rock et al., 2015). Nesta fase a falta de tratamento leva a doença a progredir para caquexia grave, hemorragia, infecções secundárias, acarretando em alto risco de morte, que poderá ocorrer em até dois anos (Roatt et al., 2014).

1.1.2. Tratamento

Atualmente o tratamento da LV é limitado a poucos fármacos, os quais estão associados à alta toxicidade, graves efeitos colaterais, eficácia reduzida pelo aumento de cepas resistentes e longos períodos de tratamento (Freitas et al., 2015; Nühs et al., 2015; Rojo et al., 2015; Singh & Sundar, 2014).

Nos últimos anos a quimioterapia de primeira escolha para o tratamento da LV são os antimoniais pentavalentes tais como estibogliconato de sódio (Glucantime[®]) e antimoniato-N-metil-glucamina (Pentostam[®]). Fármacos como anfotericina B, Ambisome (formulação lipídica de Anfotericina B), miltefosina e aminosidina (paramomicina) são fármacos de segunda escolha utilizados como tratamentos alternativos em áreas de resistência aos fármacos antimoniais (Faleiro et al., 2014).

No Brasil o tratamento tradicional consiste na indicação de antimoniais como primeira linha de tratamento e anfotericina B como segunda linha (Maillo & Vélez, 2013). Frequentemente os pacientes interrompem o tratamento, devido a dificuldades encontradas tais como postos de atendimento distantes, impossibilidade de internação, falta de esclarecimentos sobre a doença (Desjeux, 2004).

1.1.2.1. Anfotericina B

Anfotericina B (Fungizone[®]) é um antibiótico que foi originalmente isolado do fungo *Streptomyces nodosus* (Hussain et al., 2014; Patil et al., 2012). Introduzido no tratamento da LV na década de 1960, tem excelente atividade leishmanicida (Melo & Fortaleza, 2013), porém provoca graves efeitos adversos que incluem: náuseas, vômitos, febre, hipocalemia, insuficiência renal, anemia e problemas cardíacos, restringindo a sua utilização ao ambiente hospitalar (Lindoso et al., 2012).

Sua ação anti-*Leishmania* se dá devido à ligação preferencial com ergosterol, presente na membrana plasmática da *Leishmania*, alterando a permeabilidade da membrana e provocando o extravasamento dos componentes intracelulares, levando o parasito a morte (Junior et al., 2012; Lindoso et al., 2012). Atualmente novas formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas com a finalidade de melhorar a sua biodisponibilidade e as propriedades farmacocinéticas, reduzindo consideravelmente os efeitos adversos (Junior et al., 2012), entretanto o custo elevado dessas novas formulações é um fator limitante para o seu uso generalizado (Fumagalli et al., 2015).

1.1.2.2. Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi o primeiro fármaco leishmanicida oral, originalmente foi desenvolvido para o tratamento de câncer (Hussain et al., 2014; Manna et al., 2015). Utilizado desde 2005 como primeira linha no tratamento da LV na Índia (Berg et al., 2013). Suas limitações de uso são: toxicidade para o trato gastrointestinal, hepático, renal e a teratogênica restringindo o seu uso em mulheres grávidas (Lindoso et al., 2012).

1.1.2.3. Pentamidina

Isotionato de pentamidina (Lomidine[®]) é uma diamidina aromática, utilizada em pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais e anfotericina B. Seu mecanismo de ação está relacionado à interferência na síntese de DNA do parasito agindo sobre o cinetoplasto e na membrana mitocondrial. Devido à sua maior toxicidade e menor eficácia é administrada na dose de 4 mg/kg, 3 vezes por semana durante 5 a 25 semanas. Os efeitos colaterais são: anemia, cefaleia, lesões hepáticas, dispnéia, diabetes mellitus e sudorese (Lindoso et al., 2012).

1.2. Doença de chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descrita em 1909, na cidade mineira de Lassance, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), a qual fez uma das mais abrangentes descobertas; descrevendo o agente etiológico, o vetor, o reservatório, os aspectos clínicos e as fases da doença (Bestetti & Neto,

2011). Estima-se que 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo com DC, principalmente na América Latina onde é endêmica em 21 países (**Figura 4**), e é responsável por 10 mil mortes anuais e constitui um risco para 100 milhões de indivíduos (WHO, 2015).

A distribuição geográfica da DC era inicialmente restrita ao continente Americano, devido à presença dos triatomíneos (vetores) na região sul dos Estados Unidos da América (EUA) até norte da Argentina e Chile (Molina et al., 2012). Nas últimas décadas, o perfil epidemiológico de países não endêmicos localizados na América do norte, Europa, Ásia e Oceania alteram-se devido à migração de pacientes crônicos para esses países, particularmente nos EUA, que têm aproximadamente 300 mil indivíduos infectados cronicamente provenientes de países endêmicos (Carod & Gascon, 2010; Coura et al., 2014).



Figura 4: Área endêmica de doença de Chagas na América Latina.

Fonte: Coura & Dias, 2009 (modificado).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de DC decorrentes de infecções adquiridas no passado, quando a principal forma de transmissão era vetorial, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada na Amazônia Legal, com ocorrência de casos isolados em outros estados (MS, 2009). Na **Figura 5**, nota-se que o maior número dos casos de DCA está na região Norte.



Figura 5: Distribuição espacial dos casos de DCA no Brasil no período de 2006 a 2013.

Fonte: SVS/Sinam/MS, 2015 (modificado).

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da DC, protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Souza, 2014). Os vetores da DC são triatomíneos da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. São aproximadamente 140 espécies conhecidas (Lazzari et al., 2013) e destes 69 triatomíneos foram identificadas no Brasil. São conhecidos popularmente como: barbeiros, chupões, chupança, bicudos entre outros nomes dependendo da região geográfica. Os principais gêneros de importância médica são:

Panstromgylus, *Rhodnius* e *Triatoma*. São encontrados em diferentes biomas das Américas e alimentam-se do sangue de diversos mamíferos (MS, 2009).

O seu ciclo de vida possui duas fases, uma no vetor invertebrado (triatomíneo) e outra no hospedeiro vertebrado (mamífero). No triatomíneo, quando este ingere as formas tripomastigotas metacíclicas ao fazer o repasto sanguíneo no homem ou em outro mamífero infectado, estas formas no triatomíneo se diferenciam em formas epimastigotas e após migrarem para o intestino posterior aderem ao epitélio e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (forma infectante). No mamífero durante ou após o repasto sanguíneo o triatomíneo infectado libera junto com as fezes ou urina as formas tripomastigotas metacíclicas. Estas quando entram em contato com a pele lesionada, invadem a circulação sanguínea sendo capazes de infectar diversos tipos de células. Ao invadir o citoplasma da célula, as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas, onde se dividem por divisão binária simples. Após um período as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, rompem a célula e caem na circulação sanguínea, começando um novo ciclo (**Figura 6**) (Adade et al., 2013; Álvarez et al., 2014; Ferreira e Ávila, 2001).

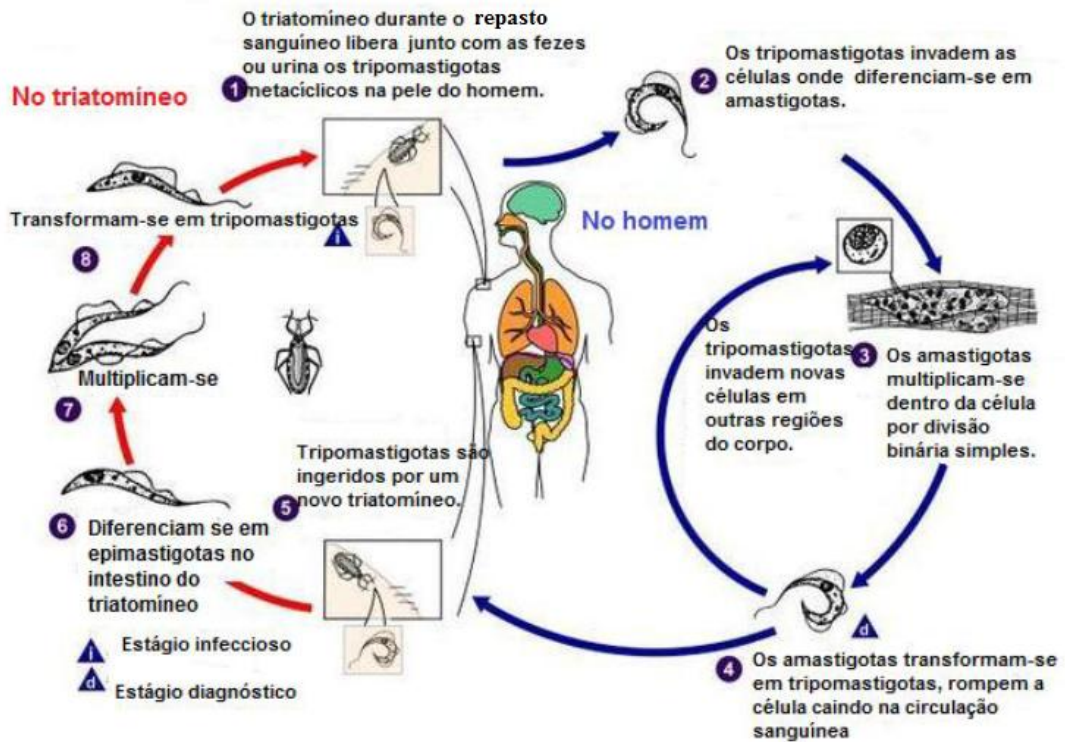


Figura 6: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* incluindo o vetor e o hospedeiro vertebrado.

Fonte: CDC, 2015 (modificado)

1.2.1. Manifestações clínicas

Na maioria dos indivíduos infectados uma eficaz resposta imune consegue controlar a infecção inicial, porém não consegue erradicar a doença ou infecção (Tarleton et al., 2014). A doença de Chagas é caracterizada por duas distintas fases clínicas: a fase aguda que normalmente é assintomática e ocorre na maioria dos indivíduos e a fase crônica, caracterizada pelo desenvolvimento de patologias cardíacas ou digestivas ou ambas ocorre entre 30 a 40 % dos indivíduos cronicamente infectados (Calabuig et al., 2014; Zingales et al., 2014).

A fase aguda inicia-se com a proliferação ativa do parasito no indivíduo infectado e o período de incubação ocorre entre 1 a 2 semanas (Chatelain & Konar, 2015). *Trypanosoma cruzi* é capaz de invadir e multiplicar-se dentro de diferentes células incluindo macrófagos, músculo estriado e liso, fibroblastos e inclusive neurônios (Coura & Castro, 2002). Esta fase tem inúmeras manifestações clínicas incluindo: febre, mal-estar, linfadenopatia, inchaço no local da inoculação, conhecido como Chagoma. Quando a inoculação ocorre na conjuntiva, leva ao edema das pálpebras superiores e inferiores sendo conhecido como sinal de Romanã (**Figura 7**) (Miao & Ndao, 2014).



Figura 7: Edema das pálpebras superiores e inferiores (esquerda da paciente) conhecido como sinal de Romanã.

Fonte: REY, 2001.

Muitos indivíduos infectados têm sintomas inespecíficos e por esta razão, não são diagnosticados corretamente (Malik et al., 2015). Alguns pacientes podem evoluir para doença aguda grave, ocorre em menos de 1% dos pacientes e seus sintomas incluem: miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (Molina et al., 2012). Na ausência de tratamento os sintomas podem persistirem por cerca de 2 meses, com taxa de mortalidade de 2 a 8%, principalmente em crianças (Coura & Castro, 2002).

A fase crônica inicia-se de 8 a 12 semanas após a fase aguda. Nesta fase a parasitemia diminui e o parasito é encontrado escassamente nos tecidos e raramente na circulação sanguínea (Bern et al., 2011;

Montgomery et al., 2014). Após 10 a 20 anos aproximadamente 30 a 40% dos pacientes cronicamente infectados desenvolvem patologias associadas à DC (Méndez et al., 2014). Esta fase caracteriza-se por uma das seguintes formas:

- Forma indeterminada: 60 a 70% dos indivíduos cronicamente infectados permanecerão assintomáticos por toda a vida, embora eles ainda sejam fontes potenciais de transmissão e haja risco de reativação da infecção (Montgomery et al., 2014; Neto & Chevillard, 2014).
- Forma cardíaca: acomete aproximadamente 30% dos pacientes cronicamente infectados, Cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a causa mais comum da miocardiopatia não-isquêmica na América Latina (Garcia et al., 2015). Os sintomas e sinais físicos surgem devido à insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas, tromboembolismo e dor torácica. A insuficiência cardíaca é normalmente biventricular sendo uma manifestação grave da CCC e está associada a um mau prognóstico da doença e às altas taxas de mortalidade em comparação com insuficiência cardíaca relacionada a outras patologias (Maya et al., 2010).
- Forma digestiva: A doença digestiva de Chagas, está presente em 7 a 11% dos pacientes, sendo predominante nos países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai) sendo rara no norte da América do Sul, América Central e México. Este fato pode estar relacionado à predominância de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em cada região (Bern et al., 2011). Esta forma consiste em duas síndromes: megaesôfago e megacólon. Os sintomas são dilatação crônica irreversível

de um segmento do cólon, levando à constipação severa e retenção fecal (Boscardin et al., 2010; Jabari et al., 2014).

- Forma associada (cardiodigestiva): entre 10 a 15% dos pacientes têm as duas formas concomitantemente e um pequeno número (5%) têm sintomas neurológicos (Pinazo et al., 2013).

1.2.2. Tratamento

Embora a DC tenha sido descrita há mais de 100 anos, a quimioterapia disponível até o momento está limitada apenas a dois fármacos nitro-heterocíclicos: benznidazol e nifurtimox (Boscardin et al., 2010). Ambos são efetivos na fase aguda da infecção, com aproximadamente 80% de eficácia (Croft et al., 2005), porém são considerados distantes do ideal, pois causam severos efeitos adversos, com alta toxicidade e eficácia reduzida na fase crônica (Calabuig et al., 2014; Romanha et al., 2010). Estima-se que existam mais de 35 cepas de *T. cruzi*, as quais apresentam diferentes perfis de resistência e susceptibilidade ao benznidazol e nifurtimox dificultando o tratamento (Dias et al., 2009). Ainda que estes fármacos tenham eficácia reduzida na fase crônica, seu uso é recomendado com o intuito de diminuir a morbidade e mortalidade dessa fase (Moreno et al., 2012).

O Nifurtimox (Lampit[®]) foi introduzido em 1960 para o tratamento da fase aguda da DC (Barrett & Croft, 2012). Seu principal mecanismo de ação envolve a bio-redução do radical nitro, gerando radicais livres (hidroxila) os quais causam danos letais ao DNA do parasito (Fidalgo & Gille, 2011).

É administrado por via oral, na dose de 8 a 12 mg/kg/dia, e devido aos severos efeitos adversos que apresenta (anorexia, emagrecimento,

alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e alterações digestivas) não é mais comercializado no Brasil desde a década de 1980, e em alguns países da América do Sul (Argentina, Chile e Uruguai) (Coura & Castro, 2002).

Benznidazol é o único fármaco utilizado no Brasil para reduzir o parasitismo, reduzir os sintomas da fase aguda e abreviar o curso da infecção (Kuehn et al., 2009). Foi introduzido em 1970, quando era comercializado com o nome Rochagan[®]. No momento atual é produzido pela LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco). Utilizado clinicamente para ambas as fases da doença. Sua via de administração é oral na posologia de 5mg/Kg/dia de 2 a 3 vezes ao dia (Coura, 2009). Um recente e amplo estudo clínico sobre a eficácia do benznidazol na cardiomiopatia chagásica foi realizado com 2854 pacientes e concluiu que, apesar da redução da carga parasitária na fase crônica, o fármaco não foi capaz de reduzir o dano cardíaco (Morillo et al., 2015).

Além disso, o fármaco resulta em diversos e severos efeitos adversos que incluem manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea, incluindo: neutropenia, agranulocitose e púrpura, trombocitopêmica; polineuropatia periférica representada por parestesias e polineurite (Dias et al., 2009).

1.2.3. Basidiomicetos

Pertencem ao filo Basidiomycota, e estima-se que este filo contenha aproximadamente 30.000 espécies descritas, correspondendo a 37% das espécies de fungos descritas até hoje. A característica principal do filo é a produção de células chamadas basídios (**Figura 8**), onde são produzidos os esporos sexuais. Estas células têm o formato de clava de

onde ocorrem em sua extremidade a produção dos esporos sexuais denominados de basidiósporos (**Figura 8**) (Guerra, 2011).

Dentro do basídio ocorre a fusão nuclear e em seguida a meiose. Então os núcleos migram para as extremidades do basídio e amadurecem para originarem os basidiósporos. Os esporos produzidos sexualmente germinam dando origem a um micélio cujo estado nuclear é haplóide (n), o qual se funde com outro micélio haplóide compatível para formar o micélio secundário, produzindo-se os núcleos que darão origem aos esporos (Guerra, 2011). **Figura 8**.

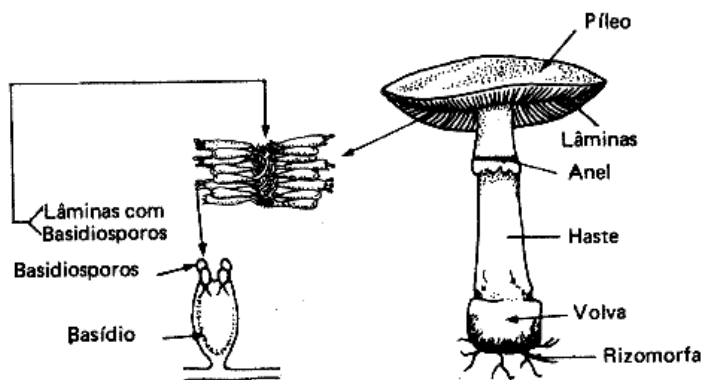


Figura 8: Principais estruturas de um Basidiomycota.

Fonte: <http://www.bemposta.net/cogumelos/cogfungos.htm>

Os membros do filo Basidiomycota (**Figura 9**) estão entre os fungos que são facilmente reconhecidos devido ao tamanho e coloração de alguns dos seus membros. O basidiomiceto é o nome dado à frutificação de fungos superiores pertencentes ao filo Basidiomycota e ao filo Ascomycota (ascomicetos) (Elsayed et al., 2014).



Figura 9: Cogumelos Basidiomicetos: 1 - *Agaricus blazei*, 2 - *Lentinus strigosus*, 3 - *Pleurotus ostreatus* e 4 - *Astraeus hygrometricus*.

Fontes: 1-<http://florais.com.br/site/cogumelo-agaricus-blazei/> ,
 2 - http://www.fichasmicologicas.com/?micos=1&alf=* &art=969
 3 - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pleurotus_ostreatus_JPG3.jpg, 4-
<http://purbeckjournal.co.uk/rare-fungi>

1.2.3.1. Propriedades medicinais dos basidiomicetos

Nas mais antigas civilizações, os basidiomicetos já eram valorizados para fins comestíveis e medicinais para o tratamento e prevenção de doenças. Há relatos de sua utilização remonta ao período neolítico. Em países asiáticos já eram utilizados na medicina popular há séculos, onde suas propriedades medicinais são bem conhecidas. Estima-se que o número de basidiomicetos no mundo é de 150.000 a 160.000 espécies, no entanto são descritas aproximadamente 10% dessas espécies. Portanto apenas uma pequena fração desses compostos são conhecidos. Neste cenário há elevado potencial para descoberta de novas moléculas com propriedades farmacológicas, como futuras candidatas a novos fármacos (Wasser, 2015).

Os basidiomicetos são amplamente utilizados como alimentos funcionais e os seus extratos são usados na terapia natural para prevenção

e tratamento de doenças, aumentando o seu interesse comercial nas últimas décadas (Borges et al., 2013). São encontrados em alguns dos ecossistemas terrestres, produzem um substancial número de metabólitos secundários biologicamente ativos, de baixo peso molecular que não apenas estimulam o sistema imunológico, mas também modulam respostas celulares específicas. Desses metabólitos secundários temos: os terpenóides, esteróides, antraquinona, derivados de ácido benzóico, quinolinas que apresentam alguma atividade biológica e especialmente os polissacarídeos: conjugados de polissacarídeo-proteína e proteínas, em particular as β -glucanas que exibem atividades antitumorais em animais e seres humanos (Fontana et al., 2014; Wasser, 2015).

Valadares e colaboradores (2011) demonstraram a atividade *in vitro* anti-*Leishmania (L.) amazonensis*, anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Leishmania major* de extratos aquosos do Basidiomiceto *Agaricus blazei*, tanto em formas promastigotas quanto amastigotas intracelulares. O mesmo grupo demonstrou posteriormente a atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato bruto do basidiomiceto em modelo experimental, o qual foi observado uma redução em 66% da carga parasitária, com diminuição do processo inflamatório (Valadares et al., 2012).

Estudo realizado por Fagundes e colaboradores (2010) demonstrou o efeito antiparasitário do composto hipnofilina (**Figura 10**) isolado do basidiomiceto *Lentinus strigosus* contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Em outro estudo, Cota e colaboradores (2008), utilizando o mesmo basidiomiceto acima, isolaram o composto panepoxidona (**Figura 11**) com atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (amastigotas e tripomastigotas).

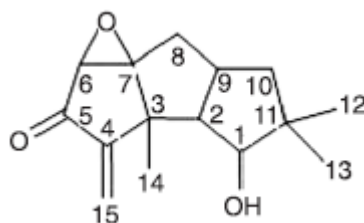


Figura 10: Estrutura química do composto hipnofilina, isolado do basidiomiceto *Lentinus strigosus*.

Fonte: (Fagundes et al., 2010).

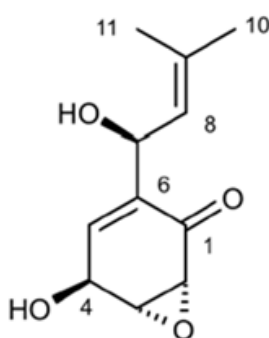


Figura 11: Estrutura química do composto panepoxidona isolado do basidiomiceto *Lentinus strigosus*.

Fonte: (Cota et al., 2008).

Lai e colaboradores (2012) isolaram o triterpeno, astracurcurona (**Figura 12**) do basidiomiceto *Astraeus hygrometricus* com atividade *in vitro* anti- *Leishmania (L.) donovani* para as formas promastigotas.

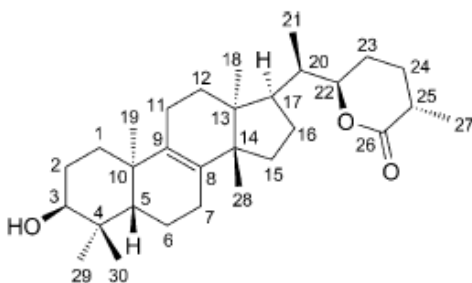


Figura 12: Estrutura química do composto astracurcurona isolado do cogumelo *Astraeus hygrometricus*.

Fonte: Lai et al., 2012.

1.2.3.2. O gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* pertence ao filo Basidiomycota e é o terceiro gênero mais cultivado no mundo. São amplamente consumidos pelo seu sabor e aroma únicos. Possuem alto valor nutricional e significativas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antitumorais, antivirais, antimicrobianas e imunoestimulatórias. Este fato é comprovado na literatura com exemplos de metabólitos secundários isolados das espécies desse gênero com propriedades medicinais. Alguns exemplos são citados na **Tabela 1**. Uma análise química do gênero *Pleurotus* identificou a presença dos seguintes compostos: polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, nucleosídeos, triterpenóides, lectinas, lipídios e seus derivados (Patel et al., 2012; Borges et al., 2013; Usami et al., 2014).

Em um estudo realizado por Ligonio e colaboradores (2012) isolou-se o peróxido de ergosterol (**Figura 13**), um análogo ao ergosterol da membrana do *Trypanosoma cruzi*, a partir de *Pleurotus ostreatus*, o qual apresentou atividade anti-*T. cruzi*.

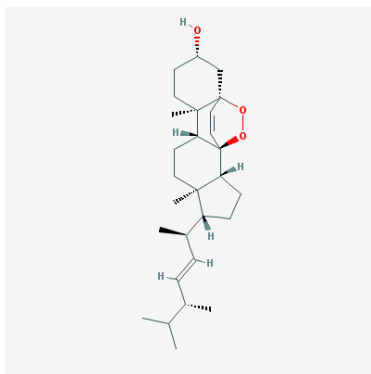


Figura 13: Estrutura química do composto peróxido de ergosterol isolado de basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*.

Fonte: PubChem Compound (2015).

Tabela 1: Espécies do gênero *Pleurotus* e suas atividades biológicas.

Basidiomicetos	Atividades biológicas	Referências
<i>Pleurotus abalonus</i>	antioxidante	Patel et al., 2012
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	antihipertensivo	Patel et al., 2012
<i>Pleurotus djamor</i>	antitumoral	Borges et al., 2013
<i>Pleurotus eryngii</i>	antitumoral ¹ imunoestimuladora ²	Fontana et al., 2014 ¹ Ike et al., 2012 ²
<i>Pleurotus ferulae</i>	antitumoral	Wang et al., 2014
<i>Pleurotus flabellatus</i>	antitumoral e leishmanicida	Rosa et al., 2009
<i>Pleurotus florida</i>	antitumoral	Kulshreshtha et al., 2014
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	antitumoral	Fontana et al., 2014
<i>Pleurotus ostreatus</i>	antimicrobiana ¹ antiparasitária ^{2,3} imunoestimulante ⁴	Chowdhury et al., 2015 ¹ Ligonio et al., 2012 ² Satou et al., 2008 ³ Selegan et al., 2009 ⁴
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	anti-inflamatória	Elsayed et al., 2014
<i>Pleurotus tuberregium</i>	Estimulaa hepato-proteção	Nworu et al., 2014

1.2.3.3. *Pleurotus salmoneostramineus*

Este basidiomiceto foi selecionado para o presente projeto, devido a experiência do nosso grupo com estudo de outros basidiomicetos medicinais e devido relatos na literatura de atividades medicinais desse gênero.

Pleurotus salmoneostramineus (*Pleurocutaneataceae*, *Basidiomycetes*) conhecido popularmente como “cogumelo rosa”, “cogumelo

ostra-de-rosa” e “cogumelo salmão” (**Figura 14**) cresce em folhas de plantas senescentes, sendo encontrado no Japão, Nova Guiné e Sibéria. É cada vez mais popular devido à sua cor, sabor e textura, sendo rico em proteínas, lipídios, fibras, hidratos de carbono, vitaminas e aminoácidos essenciais. É geralmente utilizado na redução de níveis de colesterol plasmático e previne arteriosclerose (Usami et al., 2014; Wu et al., 2010).



Figura 14: Basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus* (“cogumelo rosa”).

Fonte: (<http://www.mycelia.be/en/strain-collection/strain-information/m-2708-pleurotus-salmoneostramineus>).

2. Justificativa

Doenças negligenciadas como a doença de Chagas e leishmaniose se mostram um grande problema de saúde pública, afetando milhões de indivíduos no mundo, principalmente populações menos favorecidas. Contando com um arsenal terapêutico tóxico e limitado, é urgente a necessidade de se buscar novos fármacos. Considerando que produtos naturais, e especificamente basidiomicetos são produtores de diversos metabólitos bioativos, o presente estudo investigou de forma inédita o potencial antiparasitário do basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*.

3. Objetivos

3.1. Gerais

Este projeto visa o isolamento e caracterização química de metabólitos secundários isolados a partir do basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*, ativos contra *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*, assim como a investigação dos possíveis mecanismos de ação antiparasitários.

3.2. Específicos

1. Preparação e avaliação da atividade antiparasitária do extrato bruto hidroalcoólico do basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*.
2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico do basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*.
3. Identificação e elucidação estrutural dos compostos ativos isolados por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.
4. Avaliação do potencial anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* das frações e do composto ativo isolado, com determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em culturas *in vitro*.
5. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do composto ativo isolado e determinação do Índice de Seletividade.
6. Estudo do mecanismo de ação do composto ativo isolado de *Pleurotus salmoneostramineus* em *Trypanosoma cruzi*, com avaliação da

permeabilidade da membrana plasmática, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

4. Materiais e métodos

4.1. Basidiomiceto e reagentes

O basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus* foi adquirido comercialmente da empresa Zucca Funzionale (Nova Odessa, São Paulo, Brasil). Os reagentes: tampão fosfato-salina (*PBS*), azida sódica e Triton X-100 e os solventes utilizados: metanol, hexano, acetato de etila, butanol e diclorometano foram adquiridos da empresa Sigma. As cromatoplasmas de alumínio TLC Siligel 60 F254 com indicadores de fluorescência e a sílica comum foram adquiridos da empresa Merk.

Resazurina, dodecil sulfato de sódio (SDS), SYTOX Green dye[®], Mitotracker[®] Red CM-H2XROS, H₂DCf-DA e MTT foram adquiridos da Molecular Probes[®] (Invitrogen). Dimetilsulfóxido (DMSO), Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), meio 199 (M-199) e miltefosina foram adquiridos da empresa Sigma. Benznidazol (2-nitroimidazol) foi adquirido do Laboratório Farmacêutico do Estado do Pernambuco – LAFEPE.

4.2. Obtenção do extrato orgânico e da partição líquido-líquido

4.2.1. Maceração a frio

Os corpos de frutificação do basidiomiceto *P. salmoneostramineus* (1000 g) foram triturados juntamente com 700 mL de água no liquidificador por 5 minutos; em seguida, em um béquer adicionou-se 700 mL de metanol, sendo a mistura hidroalcoólica (1:1 v/v) sonicada por 10 minutos em banho de sonicação. Posteriormente o material foi filtrado em

funil com papel de filtro (Whatman) e seco a temperatura de 40°C em evaporador rotativo, para obtenção do extrato bruto.

4.2.2. Partição líquido-líquido

O extrato bruto foi ressuspense em 400 mL de água, sonificado por 15 minutos e particionado com solventes de polaridade crescente como: hexano, acetato de etila e butanol. Cada fração foi seca em evaporador rotativo e posteriormente seca em tubos tipo *Eppendorf* em evaporador *Speed-Vacuum* a 40°C e o material armazenado à -20°C até o uso. Na **Figura 15** encontra-se o fluxograma de obtenção do extrato metanólico bruto e das frações obtidas após partição líquido-líquido de *P. salmoneostramineus*.

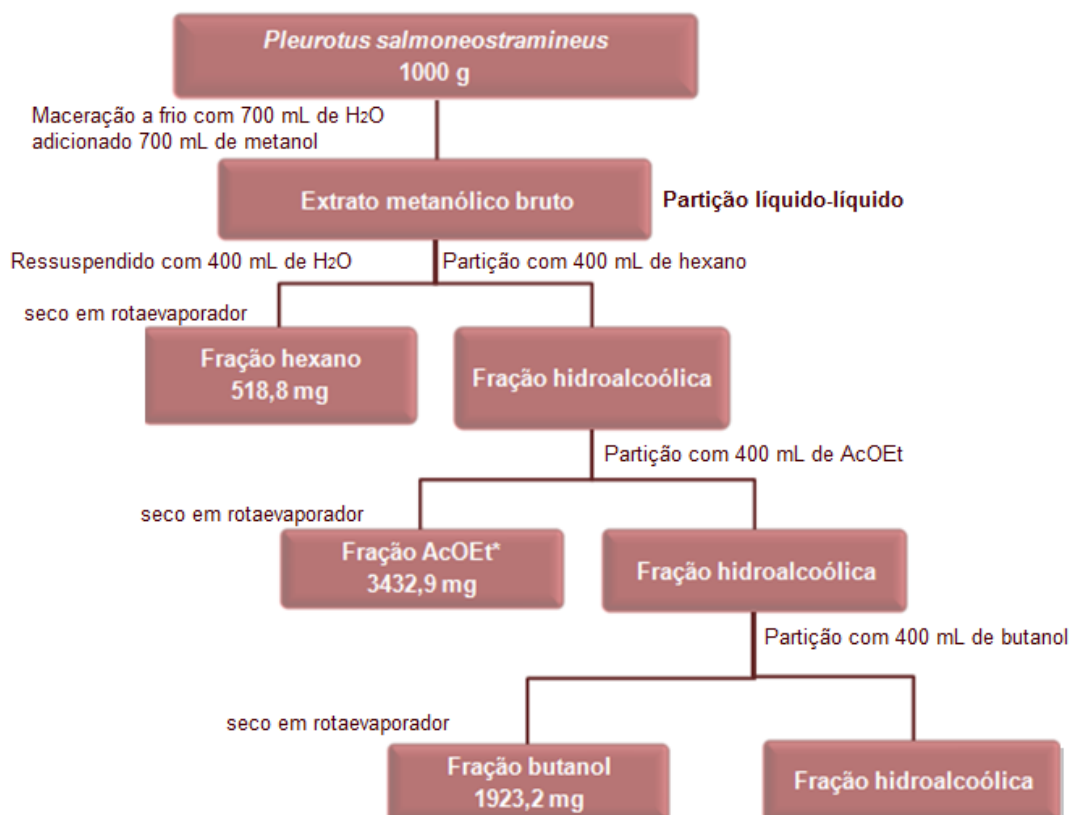


Figura 15: Fluxograma de obtenção do extrato metanólico bruto e das frações obtidas após partição líquido-líquido de *P. salmoneostramineus*.

*Fração AcOEt: fração acetato de etila

4.3. Avaliação das atividades biológicas das frações hexano, acetato de etila e butanol

4.3.1. Parasitos, células e animais de experimentação

4.3.1.1. Animais de experimentação

Foram utilizados 5 camundongos BALB/c fêmeas para obtenção de macrófagos peritoneais; estes animais foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados com animais tiveram aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (**Anexo 5**).

4.3.1.2. *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidos em células LLC-MK2 (*Rhesus* Monkey Kidney Cells – ATCC CCL 7) em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com ambiente à 5% de CO₂.

4.3.1.3. *Leishmania (L.) infantum*

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal

bovino (SFB) inativado, 0,25% de hemina e 5% de urina humana estéril, sob a temperatura de 24° C em estufa BOD, livre da adição de antibióticos.

Amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum* foram obtidas por trituração de baço de hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) previamente infectados para manutenção da cepa. O número de parasitos foi determinado pelo método descrito por Stauber, 60 a 70 dias pós-infecção (Stauber et al., 1958).

4.3.1.4. Células LLC-MK2

Células LLC-MK2 (*Rhesus* Monkey Kidney Cells – ATCC CCL 7) foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB em estufa a 37°C com ambiente à 5% de CO₂.

4.3.1.5. Células NCTC clone 929

As células NCTC clone 929 (*American Type Culture Collection* - ATCC CCL1) foram cultivadas em meio M-199, suplementado com 10% de SFB em estufa a 37°C com ambiente à 5% de CO₂. (Corrêa et al., 2011).

4.3.1.6. Macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas após eutanásia em câmara de CO₂. Foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB. A solução obtida foi mantida resfriada a 4°C até o momento do uso.

4.3.2. Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) em *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*.

4.3.2.1. *Trypanosoma cruzi*.

As frações hexano, acetato de etila e butanol foram primeiramente dissolvidas em metanol e posteriormente diluídas em meio RPMI-1640, sem a adição de antibióticos. Em seguida foram diluídas de modo seriado (base 2) e incubadas em placas de 96 poços com 1×10^6 tripomastigotas por poço em um volume final de 200 μ L na concentração inicial de 300 μ g/mL. Após 24 horas de incubação a 37°C a 5% de CO₂, a viabilidade dos tripomastigotas foi verificada por meio da atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio colorimétrico com resazurina. Brevemente, adicionou-se 20 μ L de resazurina (0,11 mg/mL) em todos os poços. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 20 horas sob as mesmas condições acima e a leitura foi realizada em leitor de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de 570 nm. Como controle positivo (100% mortos), utilizou-se o fármaco padrão benznidazol e como controle do ensaio utilizaram-se tripomastigotas não tratados (100% vivos). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados três ensaios independentes.

4.3.2.2. *Leishmania (L.) infantum*

As frações hexano, acetato de etila e butanol foram primeiramente dissolvidas em metanol e posteriormente em meio M-199 suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) com 0,25% de hemina, sem a adição de antibióticos. Em seguida, foram diluídas de modo seriado (base 2) e incubadas em placas de 96 poços com 1×10^6 promastigotas por poço em um volume final de 150 μ L na concentração inicial de 300 μ g/mL. Após 48 horas

de incubação em estufa BOD à 24 °C, a viabilidade dos promastigotas foi verificada por meio da atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio colorimétrico com MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Brevemente, promastigotas foram incubados por 4 horas com 20 µL/poço de MTT (5 mg/mL) em todos os poços e após este período foram incubados com 80 µL/poço de SDS (0,1 mg/mL) nas mesmas condições acima. Ao final do ensaio a leitura foi realizada em leitor de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) usando filtro de 570 nm. Como controle positivo (100% mortos) utilizou-se o fármaco padrão miltefosina e como controle do ensaio utilizaram-se promastigotas não tratados (100% vivos). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados três ensaios independentes (Tada et al., 1986).

4.4. Métodos cromatográficos – Fracionamento

4.4.1. Estudo das frações hexano, acetato de etila e butanol

4.4.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As frações hexano, acetato de etila e butanol foram submetidas à análise via CCD (cromatografia em camada delgada), visando avaliar o sistema de eluentes mais adequado para separação dos metabólitos presentes. Foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio TLC Siligel 60 F254 com indicador de fluorescência (Merck). A visualização das placas foi efetuada em câmara ultravioleta no comprimento de onda 254 nm. Assim, foi verificado que a mistura de hexano: acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v) apresentava melhor resolução para continuidade dos fracionamentos.

4.4.1.2. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os ensaios de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e o fracionamento em coluna foram realizados no Departamento de Ciências Exatas e da Terra, da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, com a colaboração da Prof^a Dr^a Patrícia Sartorelli.

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram registrados em espectrômetro Ultrashield 300 Bruker Avance III operando a 300 MHz para o núcleo de hidrogênio e a 75 MHz para o núcleo de carbono. Experimentos adquiridos à 25°C, utilizando BCU 0,5 e sonda de 5,0 mm TXI. Todos os experimentos foram obtidos no Centro de Instrumentação para Pesquisa e Ensino (CIPE) da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

As três frações: hexano, acetato de etila e butanol foram submetidas à análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Os espectros das RMN de ^1H das frações acetato de etila (**Anexo 1B**) e hexano (**Anexo 1A**) sugeriram compostos apolares de natureza lipídica presentes nestas frações. O espectro de RMN de ^1H da fração butanol (**Anexo 1C**), sugeriu que na região de 7,5 ppm existia um contaminante denominado ftalato de etila. Sendo assim, esta fração foi descartada.

4.4.1.3. Cromatografia em coluna (CC)

Após as análises das frações (hexano, acetato de etila e butanol) por RMN de ^1H , análise do perfil cromatográfico por CCD, assim como a presença de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, a fração hexano foi selecionada para ser submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC). Assim, foi preparada uma coluna com 510 mg da fração hexano, utilizando-se 89 g de sílica-gel G-60 (Merk), (0,063–0,200 mm).

O sistema de solvente utilizado foi: hexano, acetato de etila em gradiente de polaridade crescente, iniciando com (hexano puro, 10:0 (v/v)) seguido por um aumento gradual na concentração de acetato de etila em um volume final de 50 mL (até 0:10 v/v), em seguida, foram utilizados acetato de etila: metanol iniciando com 9:1 (v/v), seguido por um aumento gradual na concentração de metanol (até 0:10 v/v). Desse processo, foram recolhidas 17 frações de aproximadamente 50 mL cada, as frações foram concentradas em evaporador rotativo; posteriormente o material foi seco em *Speed Vacuum* e armazenado à -20°C até o uso (**Tabela 2**).

Tabela 2: Frações e massas obtidas após o fracionamento em coluna da fração hexano de *P. salmoneostramineus*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1	3,4	10	12,8
2	96,4	11	5,7
3	89,1	12	6,0
4	21,6	13	16,5
5	12,2	14	15,0
6	6,3	15	4,9
7	39,0	16	7,9
8	11,0	17	14,2
9	15,7		

Com cada uma das 17 frações foi realizada uma cromatografia em camada delgada (utilizando o sistema eluente hexano e acetato de etila na proporção de 1:1). Após revelação sob luz UV as frações foram agrupadas de acordo com a semelhança em CCD, formando 10 grupos

(CPS - 1 (1) a CPS – 10 (13-17), como indicado no padrão de bandas

Tabela 3.

Tabela 3: Grupos de frações, frações e massas de material obtido após fracionamento em coluna da fração hexano do *P. salmoneostramineus*.

Grupos	Frações	Massa (mg)
CPS – 1 (1) *	1	3,4
CPS – 2 (2)	2	96,4
CPS – 3 (3)	3	89,1
CPS– 4 (4)	4	21,6
CPS – 5 (5)	5	12,2
CPS – 6 (6)	6	6,3
CPS – 7 (7-8)	7 a 8	50,0
CPS – 8 (9-10)	9 a 10	28,5
CPS – 9 (11-12)	11 a 12	11,7
CPS – 10 (13-17)	13 a 17	58,5

*CPS: Coluna *Pleurotus Salmoneostramineus*

Os dez grupos formados após análise por CCD foram submetidos aos ensaios *in vitro* anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* na concentração máxima de 150 µg/mL. Os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente nos itens 4.3.2.1 e 4.3.2.2.

Durante o processo de cromatografia em coluna da fração hexano, observou-se a formação de cristais no grupo CPS-3 (3), sendo este fato um indicativo de substância pura. Sendo assim, este grupo foi selecionado para ser analisado por RMN de ¹H. Os grupos CPS-1 (1) e CPS-10 (13-17) não demonstraram atividade antiparasitária e por isso não foram considerados neste estudo; apesar da atividade antiparasitária de

outros grupos, não houve tempo para a continuidade do trabalho em função do prazo limitado deste projeto.

4.4.2. O estudo do grupo CPS-3 (3)

4.4.2.1. Elucidação estrutural

A elucidação estrutural do grupo CPS-3 (3), foi realizada pela Prof^a Dr^a Patrícia Sartorelli (Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema). A análise via RMN de ¹H (**Anexo 2**) desse grupo permitiu conferir a pureza desse composto que foi identificado como ergosterol, cuja estrutura foi posteriormente confirmada através de RMN de ¹³C (**Anexo 3**) e por espectrometria de massas (GC-EM) (**Anexo 4**). Na **Figura 16** fluxograma das etapas da elucidação estrutural do ergosterol.

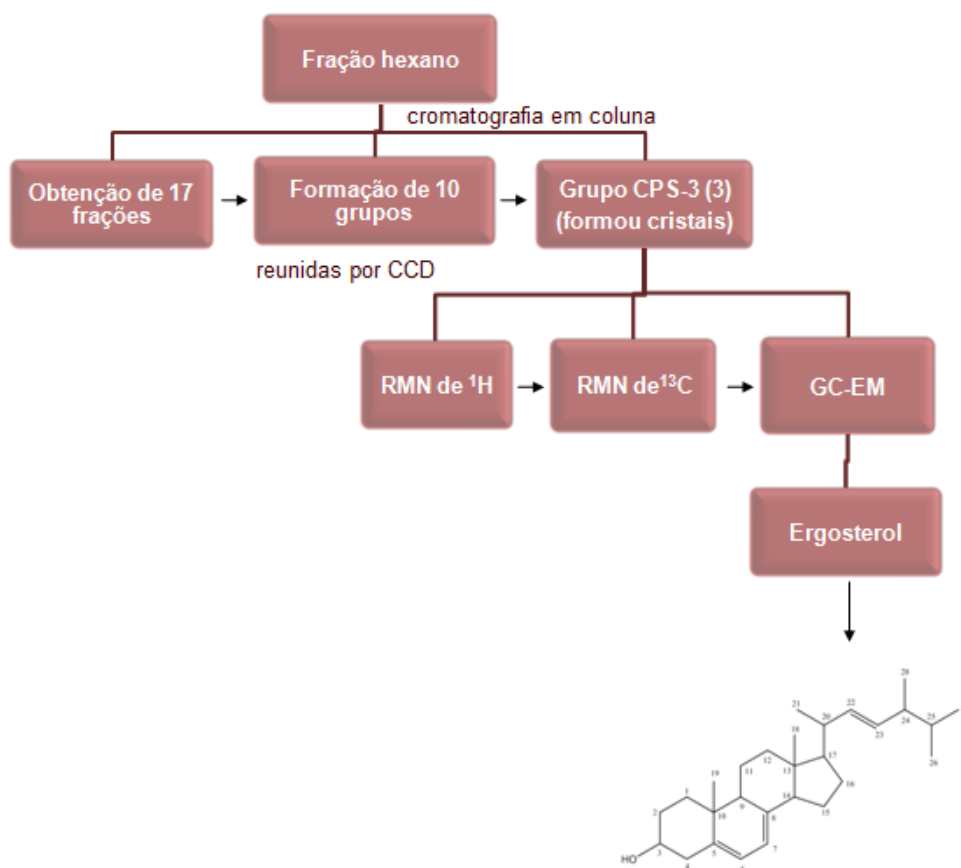


Figura 16: Fluxograma das etapas de elucidação estrutural do ergosterol.

4.4.2.2. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50% (CE₅₀) e da citotoxicidade contra células de mamíferos e do índice de seletividade do ergosterol

4.4.2.2.1. Estudo da atividade antiparasitária em formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas, conforme descrito anteriormente e adicionados (5×10^4 por poço) a placa de 16 poços (NUNC[®]), permanecendo incubados por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram infectados com tripomastigotas na proporção de 5:1 tripomastigotas/macrófago, e incubados por 4 horas sob as mesmas condições anteriores. Após este período, os macrófagos foram lavados com meio RPMI-1640 para a retirada dos tripomastigotas não internalizados. Posteriormente, os macrófagos infectados foram tratados com o ergosterol que foi seriadamente diluído (base 2) na concentração inicial de 150 µg/mL (378,16 µM) e volume final de 300µL. Em seguida, incubados por 48 horas sob as mesmas condições (Tempone et al., 2005). Ao final do ensaio, os poços foram retirados e a lâmina foi fixada em metanol, corada com Giemsa e observada em microscópio ótico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley & Croft, 2000). Como controle do ensaio foi utilizado macrófagos infectados não tratados. O ensaio foi realizado em duplicata e foram feitos dois ensaios independentes.

4.4.2.2. Amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por meio de lavagem em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB. Foram semeados 1×10^5 macrófagos por poço em placas de 16 poços (NUNC[®]) e incubou-se por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, os macrófagos foram infectados com amastigotas purificadas de baço de hamsters previamente infectados na proporção de 10:1 amastigotas/macrófago. Incubou-se novamente por 24 horas sob as mesmas condições anteriores. Posteriormente os macrófagos infectados foram tratados

com o ergosterol que foi seriadamente diluído (base 2) na concentração inicial de 150 µg/mL (378,16 µM) em volume final de 300 µL e miltefosina (controle de 100% de tratamento), por 120 horas, sob as mesmas condições anteriormente citadas (Tempone et al., 2005). Ao final do ensaio, os poços foram retirados e a lâmina foi fixada em metanol, corada com Giemsa e observada em microscópio ótico. A CE₅₀ foi determinada por meio da contagem de 400 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados (Yardley & Croft, 2000). Como controle negativo do ensaio foram utilizados macrófagos infectados não tratados. Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados dois ensaios independentes.

4.4.2.2.1. Ensaio de citotoxicidade da miltefosina

A citotoxicidade do fármaco padrão miltefosina foi analisada em células de mamífero NCTC clone 929. Para isto, o fármaco foi primeiramente dissolvido em água e posteriormente diluído em meio M199 suplementado com 10% de SFB, sem a adição de antibióticos. Em seguida foi realizada diluição seriada (base 2) em placas de 96 poços contendo 6×10^4 células NCTC (clone 929) por poço em um volume final de 150 µL; a concentração máxima foi de 100 µM. Após 48 horas de incubação a 37°C a 5% de CO₂, a viabilidade das células foi verificada por meio da atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio colorimétrico com MTT ((brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Basicamente o MTT (5 mg/mL) foi adicionado a 20 µL/poço e incubado com as células por 4 horas. Após este período, foram adicionados 80 µL/poço de SDS (10%) e incubados nas mesmas condições acima. Ao final do ensaio a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) usando filtro de 570 nm. Como controle do ensaio utilizaram-se células NCTC (clone 929) não tratadas (100% vivos). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados três ensaios independentes (Mesquita et al., 2013).

4.4.2.2. Ensaio de citotoxicidade do ergosterol em macrófagos peritoneais

A citotoxicidade do ergosterol foi verificada em macrófagos peritoneais. Para isto, o ergosterol foi primeiramente dissolvido em DMSO e posteriormente diluído em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, sem a adição de antibióticos. Em seguida foi realizada uma diluição seriada (base 2) em placas de 96 poços contendo 6×10^4 macrófagos por poço que foram previamente coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas, em um volume final de 200 μ L. A concentração máxima testada foi de 200 μ g/mL (504,22 μ M). Após 48 horas de incubação a 37°C a 5% de CO₂, a viabilidade das células foi verificada por meio da atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio colorimétrico com resazurina. Basicamente a resazurina (0,11 mg/mL) foi adicionada a 20 μ L/poço e os macrófagos foram incubados por 20 horas. Após este período sob as mesmas condições acima, a leitura foi realizada em leitor de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de 570 nm. Como controle positivo (100% mortos), utilizou-se o fármaco padrão benznidazol e como controle do ensaio utilizaram-se macrófagos não tratados (100% vivos). Os ensaios foram realizados em duplicatas e foram realizados três ensaios independentes.

4.4.2.3. Avaliação dos mecanismos de ação em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

4.4.2.3.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

As formas tripomastigotas (2×10^6 parasitas/poço) foram lavadas com PBS e incubadas com 30 μL de SYTOX[®] Green (1 μM) em placas pretas de 96 poços por 15 minutos a 37°C e 5% de CO₂. O ergosterol foi adicionado na CE₉₉ de 252 μM e o controle positivo (Triton-X 100) do ensaio a 0,5% (v/v). O SYTOX[®] Green é um fluoróforo utilizado para avaliar a permeabilidade da membrana das células através de sua ligação ao DNA. Esta metodologia foi empregada para observar se o ergosterol estudado alterava ou não a permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*, cujo aumento na fluorescência indica a ligação do marcador fluorescente ao DNA do parasito. A leitura foi mensurada utilizando-se espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. As leituras foram realizadas a cada 20 minutos até o total de 80 minutos. A normalização da leitura foi realizada subtraindo a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 (controle positivo) (Kulkarni et al., 2009). Poços contendo o ergosterol, PBS e fluoróforo foram utilizados para avaliar possível fluorescência do ergosterol, assim como tripomastigotas com PBS e DMSO (0,5%) (controle negativo). Os ensaios foram realizados em triplicatas e foram realizados três ensaios independentes.

4.4.2.3.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O fluoróforo Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS foi utilizado para avaliar o potencial da membrana mitocondrial das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. As células (2×10^6 parasitas por poço) foram lavadas duas vezes em PBS e incubadas com o ergosterol na CE₉₉ de 252 μM por 60 minutos no escuro. Após a incubação, adicionou-se 20 μL de Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS a 500 nM e incubou-se por mais 40 minutos no escuro.

Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em PBS e a leitura foi realizada imediatamente em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 595 nm. Como controle utilizou-se tripomastigotas não tratados. O composto FCCP foi utilizado como controle positivo e a leitura foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do fluoróforo. Poços contendo o ergosterol, PBS e fluoróforo foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência do ergosterol (controle interno). Além disso, o solvente DMSO foi utilizado a 0,5% como controle interno para verificar uma possível interferência nos resultados. Os ensaios foram realizados em triplicatas e foram realizados três ensaios independentes (Mesquita et al., 2013).

4.4.2.3.3. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a análise da produção de ROS, tripomastigotas (2×10^6 células por poço) foram lavados em solução HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) para a retirada do meio de cultura e incubados por 60 minutos com o ergosterol a 100 $\mu\text{g/mL}$ (252,11 μM) (CE_{99}). Após este período, os tripomastigotas foram incubados com o marcador fluorescente $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (5 μM) por 15 minutos. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtros de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Como controle positivo foi utilizado tripomastigota tratado com azida sódica (10 mM) e como controle negativo, utilizou-se tripomastigota não tratado. A leitura foi realizada subtraindo a fluorescência basal do grupo não tratado (controle negativo). Poços contendo o ergosterol, HBSS e fluoróforo foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência do ergosterol. Além disso, o solvente DMSO foi utilizado (0,5%) como controle interno para verificar possível

interferência nos resultados. Os ensaios foram realizados em triplicatas e foram realizados três ensaios independentes (Mesquita et al., 2013).

4.5. Análises estatísticas

As CE_{50} das frações do *Pleurotus salmoneostramineus* e do ergosterol foram determinados por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (r). As diferenças entre amostras foram estatisticamente avaliadas por meio dos valores de P (ANOVA).

5. Resultados

5.1. Identificação estrutural do metabólito isolado e discussão determinação estrutural do ergosterol

A fração purificada foi submetida às análises espectroscópicas (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) além de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas por impacto de elétrons (GC-EI-EM) para elucidação estrutural.

O espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de 28 sinais, referentes a 28 átomos de carbono sugerindo tratar-se de um esteroide com esqueleto ergostano. Foram observados 6 sinais de carbono de dupla na região de δ_{C} 116,3 -141,4 referente aos carbonos C-5 (δ_{C} 139,8); C-6 (δ_{C} 119,6), C-7 (δ_{C} 116,3), C-8 (δ_{C} 141,4), C22 (δ_{C} 135,6) e C23 (δ_{C} 131,9). Foram observados também 6 sinais de metilas referentes aos carbonos metílicos C18 (δ_{C} 12,1), C-19 (δ_{C} 16,3), C-21 (δ_{C} 21,1) C-26 (δ_{C} 28,3), C-27 (δ_{C} 19,7) e C-28 (δ_{C} 17,6), além do sinal referente ao carbono carbinólico C-3 em δ_{C} 70,5. A atribuição completa dos dados de RMN de ^{13}C pode ser observada na **Tabela 4**, comparado com os dados da literatura (Wright et al., 1979).

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz)

C	δ_{C} EXP	δ_{C} Lit. ¹
1	38,4	38,5
2	31,9	32,1
3	70,5	70,5
4	40,8	40,9
5	139,8	139,8
6	119,6	119,7
7	116,3	116,4
8	141,4	141,3
9	46,2	42,3
10	37,1	37,1

11	21,1	21,1
12	39,1	39,1
13	42,9	42,9
14	54,6	54,6
15	22,9	23,1
16	28,3	28,3
17	55,7	55,8
18	12,1	12,1
19	16,3	16,3
20	40,3	40,4
21	21,1	21,2
22	135,6	135,6
23	131,9	132,1
24	42,9	42,9
25	33,1	33,1
26	19,9	20,0
27	19,7	19,7
28	17,6	17,6

1 (Wright, 1979)

O espectro de RMN ^1H corroborou com a estrutura de um esteroide com $\Delta^{5,7}$ evidenciado pelos sinais em δ_{H} 5,58 (*dd*, $J=3,0$; 5,5 Hz) e 5,38 (*dd*, $J=2,9$; 5,4 Hz) característicos dos hidrogênios olefínicos H-6 e H-7, além de um multiplete em δ_{H} 3,64 (H-3) indicando a presença de um hidrogênio ligado a um carbono carbinólico. A presença de mais uma ligação dupla foi evidenciada pelo sinal em 5,20 (m) referente ao H-22 e H-23. Ainda o espectro de RMN ^1H do esteróide apresentou diversas absorções entre δ_{H} 0,8 e 1,1 referentes aos sinais das metilas sendo dois singletos em δ_{H} 0,95 e 0,65 correspondentes aos hidrogênios das metilas em C-18 e C-19 respectivamente, e quatro dubletos em δ_{H} 0,82 (CH_3 -27), 0,84 (CH_3 -26); 0,92 (CH_3 -28) e 1,04 (CH_3 -21). A tabela 5 mostra os deslocamentos de todos os hidrogênios presentes na estrutura.

Tabela 5: Dados de RMN ^1H (300 MHz)

H	δ_{H} EXP	δ_{H} LIT.*
3	3,64 m (1H)	3,61 m (1H)
6	5,58 <i>dd</i> (5,5 e 3,0 Hz 1H)	5,56 <i>dd</i> (5,4 e 2,2 Hz 1H)
7	5,38 <i>dd</i> (5,4 e 2,9 Hz 1H)	5,38 <i>dd</i> (5,4 e 2,5 Hz 1H)
18	0,95 s (3H)	0,95 s (3H)
19	0,65 s (3H)	0,63 s (3H)
21	1,04 d ($J=6,6$ Hz, 3H)	1,00 d ($J=6,6$ Hz, 3H)
22	5,20 m (1H)	5,20 m (1H)

23	5,21 m (1H)	5,20 m (1H)
26	0,84 d (J=6,7 Hz, 3H)	0,84 d (J=6,7 Hz, 3H)
27	0,82 d (J=6,7 Hz, 3H)	0,83 d (J=6,7 Hz, 3H)
28	0,92 d (J=6,6 Hz, 3H)	0,95 d (3H)

1 (Barrero et al., 1998)

O espectro de massas da substância (EI-EM) mostrou pico do íon molecular a m/z 396 correspondendo à fórmula molecular de $C_{28}H_{44}O$, além dos picos dos fragmentos em m/z 378 $[M - H_2O]^+$, 363 $[M - Me - H_2O]^+$, 253 $[M - \text{caeia lateral} - H_2O]^+$ e 271 $[M - \text{cadeia lateral}]$, picos característicos da fragmentação de esteróides (González et al., 1984). A proposta de fragmentação para esta substância está proposta na **Figura 17**.

Figura 17: Proposta de fragmentação para o ergosterol

A análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e de EM além da comparação com os dados da literatura permitiram a identificação do ergosterol (**Figura 18**).

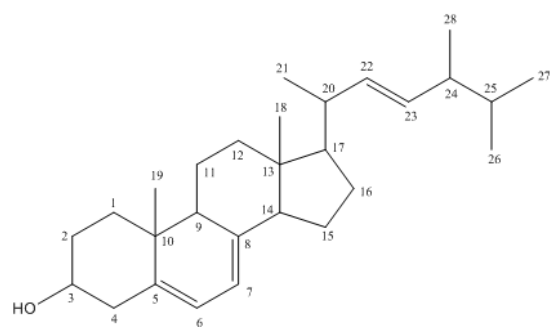


Figura 18: Estrutura do ergosterol

5.2. Determinação da atividade biológica

5.2.1. Determinação da atividade antiparasitária das frações hexano, acetato de etila e butanol

5.2.1.1. Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As frações hexano, acetato de etila e butanol obtidas da partição do extrato metanólico do *P. salmoneostramineus* foram incubadas com tripomastigotas de *T. cruzi* por 24 horas e a viabilidade foi determinada pelo método da resazurina. Após incubação, todas as frações eliminaram 100% dos tripomastigotas na concentração máxima testada (300 µg/mL), resultando em uma CE_{50} de 7,88 µg/mL (I.C.95% 0,20 - 308,20 µg/mL) para hexano, 27,96 µg/mL (I.C.95% 19,52 - 40,05 µg/mL) para a fração acetato de etila, e 58,36 µg/mL (I.C.95% 34,61 - 98,42 µg/mL) para a fração butanol (**Tabela 4**).

5.2.1.2. Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

Os promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foram incubados com as frações hexano, acetato de etila e butanol por 48 horas e a viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Após incubação, nenhuma fração apresentou atividade na concentração máxima testada de 300 µg/mL (**Tabela 6**).

Tabela 6: Determinação da atividade antiparasitária das frações: hexano, acetato de etila e butanol do *P. salmoneostramineus* em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. A viabilidade foi determinada com resazurina e MTT, respectivamente.

Frações	CE ₅₀ (µg/mL) IC 95%	
	<i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)	<i>Leishmania (L.) infantum</i> (promastigotas)
Hexano	7,88 (0,20 – 308,20)	na
Acetato de etila	27,96 (19,52 – 308,20)	na
Butanol	58,36 (34,61 – 98,42)	na

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; na: não ativo na concentração testada.

O teste com resazurina avaliou a viabilidade mitocondrial dos tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os poços azuis demonstram a morte dos parasitos na presença das frações hexano, acetato de etila e butanol, sendo os poços na cor rosa, indicadores de células viáveis (**Figura 19**).

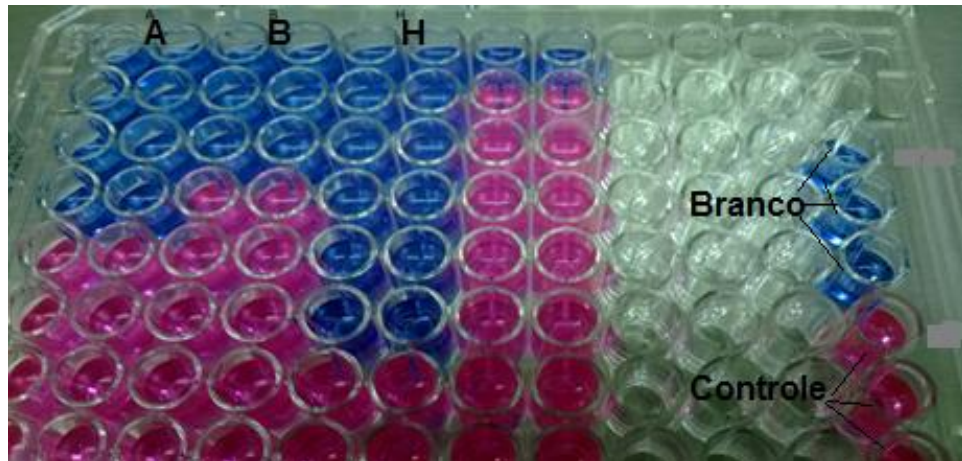


Figura 19: Viabilidade de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* submetidos ao teste com resazurina, após incubação com as frações obtidas do extrato metanólico de *Pleurotus salmoneostramineus*

Legenda: A - fração acetato de etila; B – fração butanol; H- fração hexano; Controle não tratado (células viáveis), Branco (sem células).

Fonte: arquivo pessoal.

O teste colorimétrico do MTT foi realizado para *Leishmania (L.) infantum* na presença das frações hexano, acetato de etila e butanol, onde se pôde verificar que os poços na cor amarela representam a morte dos parasitos na presença de frações ativas e os poços na cor roxa representam parasitos viáveis (**Figura 19**).

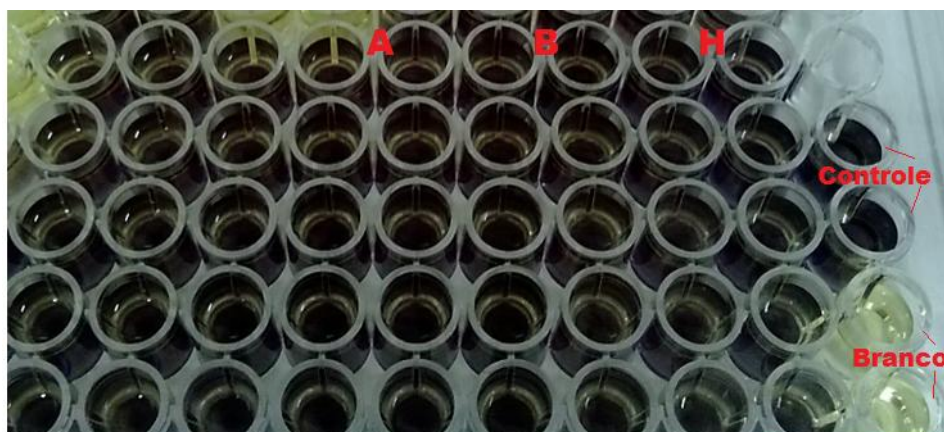


Figura 20: Viabilidade de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* submetidos ao teste com MTT, após incubação com as frações obtidas do extrato metanólico do *Pleurotus salmoneostramineus*.

Legenda: A - fração acetato de etila; B – fração butanol; H- fração hexano; Controle (100% células vivas), Branco (100% mortos, sem células).

Fonte: arquivo pessoal.

5.2.2. Determinação da atividade antiparasitária dos grupos CPS

1 CPS 17

5.2.2.1. Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os 10 grupos formados após a análise do perfil cromatográfico por CCD foram incubados com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* por 24 horas e a viabilidade foi determinada pelo método da resazurina. Após um período de 20 horas de incubação, os grupos CPS-2 (2), CPS-3 (3), CPS-4 (4), CPS-5 (5), CPS-6 (6), CPS-7 (7-8), CPS-8 (9-10) e CPS-9 (11-12) eliminaram 100% dos tripomastigotas na concentração máxima testada (150 µg/mL); os grupos CPS-1 (1) e CPS-10 (13-17) não foram ativos na concentração máxima testada (**Tabela 5**).

5.2.2.2. Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*

Os 10 grupos foram incubadas com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* por 48 horas e a viabilidade foi determinada pelo método do MTT. Após a incubação, os grupos CPS-4 (4) e CPS-5 (5) eliminaram 100% dos promastigotas na concentração máxima testada (150 µg/mL). Os grupos: CPS-1 (1), CPS-2 (2), CPS-3 (3), CPS-6 (6), CPS-7 (7-8), CPS-8 (9-10), CPS-9 (11-12) e CPS-10 (13-17), não apresentaram atividade na concentração máxima testada (**Tabela 7**).

Tabela 7: Determinação da atividade antiparasitária dos grupos em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. A viabilidade foi determinada com resazurina e MTT, respectivamente.

Grupos	CE ₅₀ (µg/mL) IC 95%	
	<i>T. cruzi</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
	(tripomastigotas)	(promastigotas)
CPS-1 (1)*	na	na
CPS-2 (2)	32,56 (26,90 – 39,41)	na
CPS-3 (3)	51,26 (46,06 – 57,04)	na
CPS-4 (4)	6,04 (5,33 – 6,84)	92,28 (66,36 – 128,30)
CPS-5 (5)	11,13 (7,53 – 16,47)	100,70 (79,17 – 128,10)
CPS-6 (6)	9,27 (8,64 – 9,94)	na
CPS-7 (7-8)	68,92 (55,12 – 86,18)	na
CPS-8 (9-10)	21,61 (20,21 – 23,10)	na
CPS-9 (11-12)	72,15 (59,11 – 88,06)	na
CPS-10 (13-17)	na	na

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; na: não ativo na concentração testada.

*CPS: Coluna *Pleurotus Salmoneostramineus*

5.2.3. Avaliação da atividade antiparasitária e citotoxicidade do ergosterol

A atividade antiparasitária do ergosterol foi avaliada em diferentes modelos. Formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum* foram incubadas por 120 horas com o ergosterol e ao final do ensaio, foi observado uma CE₅₀ de 125,27 µM (**Tabela 8**). Na **Figura 20** observa-se a lâmina do grupo tratado com ergosterol, demonstrando eliminação de 100% dos amastigotas intracelulares no macrófago. No grupo não tratado, observam-se vários amastigotas intracelulares. As formas promastigotas não foram susceptíveis ao ergosterol. O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão tanto para promastigotas e amastigotas, resultando em valores de CE₅₀ de 16,43 µM e 16,86 µM, respectivamente (**Tabela 8**).

Os ensaios em *Trypanosoma cruzi* demonstraram que as formas tripomastigotas foram susceptíveis ao ergosterol após 48 h de incubação, resultando em uma CE_{50} de 129,23 μM (**Tabela 8**). As formas amastigotas intracelulares não demonstraram susceptibilidade ao ergosterol na concentração máxima testada. O fármaco benznidazol foi utilizado como padrão para tripomastigotas e amastigotas, resultando em valores de CE_{50} de 440,73 μM e 319,70 μM , respectivamente.

A citotoxicidade do ergosterol foi avaliada em macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após incubação por 48 horas e a viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico com resazurina. O ergosterol resultou em uma CE_{50} de 619,43 μM (**Tabela 8**). Os fármacos benznidazol e miltefosina foram testados em células NCTC e resultaram em valores de CE_{50} de 469,93 μM e 122,00 μM , respectivamente.

Tabela 8: Determinação da atividade antiparasitária do ergosterol em formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e citotoxicidade em macrófagos peritoneais. Como controle, utilizou-se os fármacos padrões miltefosina e benznidazol.

Parasitas e células	CE ₅₀ (µM) IS 95%		
	Compostos		
	Ergosterol	Benznidazol	Miltefosina*
<i>Trypanosoma cruzi</i> (tripomastigotas)	129,23 (116,12 – 143,80)	440,73 (272,40 – 478,40)	nd
<i>Trypanosoma cruzi</i> (amastigotas)	na	319,70 (283,80 – 360,10)	nd
<i>Leishmania (L.) infantum</i> (promastigotas)	na	nd	16,43 (15,45 – 17,46)
<i>Leishmania (L.) infantum</i> (amastigotas)	125,27 (93,73 – 168,46)	nd	16,86 (11,57 – 24,57)
NCTC clone 929	nd	469,93 (414,98 – 532,18)	122,00 (94,78 – 157,00)
Macrófagos peritoneais	619,43 (22,21 – 1726,71)	nd	nd
Índice de Seletividade (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	4,80	1,10	nd
Índice de Seletividade (<i>Leishmania (L.) infantum</i>)	4,94	nd	7,23

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; IC95%: Intervalo de Confiança 95%; na: não ativo; nd: não determinado; IS: Índice de Seletividade, razão entre CE₅₀ em células de mamíferos e CE₅₀ em tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Toxicidade determinada em macrófagos peritoneais de camundongos. Toxicidade* - toxicidade determinada em células de tecido conjuntivo NCTC clone 929.

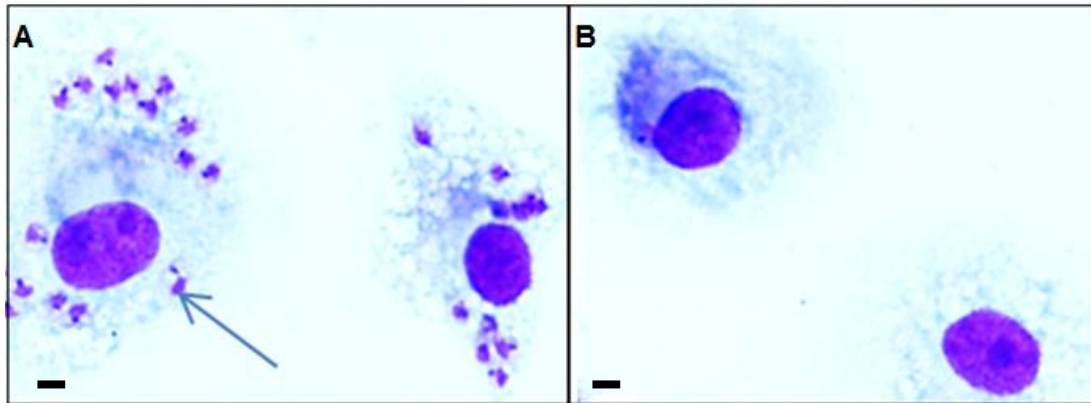


Figura 21: Avaliação da atividade do ergosterol contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*. Macrófagos peritoneais corados com Giemsa e observados em microscopia óptica em aumento de 1000X (imersão em óleo). A. controle não tratado. B. incubação com ergosterol por 120 horas a 150 µg/mL (378,16 µM). Seta demonstra um amastigotas e a barra representa 3 µm.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.4. Avaliação dos mecanismos de ação do ergosterol em *Trypanosoma cruzi*

5.2.4.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

O ergosterol foi incubado por 80 minutos com tripomastigotas de *T. cruzi* e a permeabilidade da membrana plasmática foi avaliada com SYTOX[®] Green. Conforme indicado na **Figura 22**, pode-se observar que o ergosterol permitiu o influxo da sonda fluorescente, desde o tempo inicial de incubação, até os 80 minutos máximos testados. O resultado foi significativo quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p < 0,05$). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 (controle positivo), onde se observou significativo influxo da sonda quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p < 0,002$).

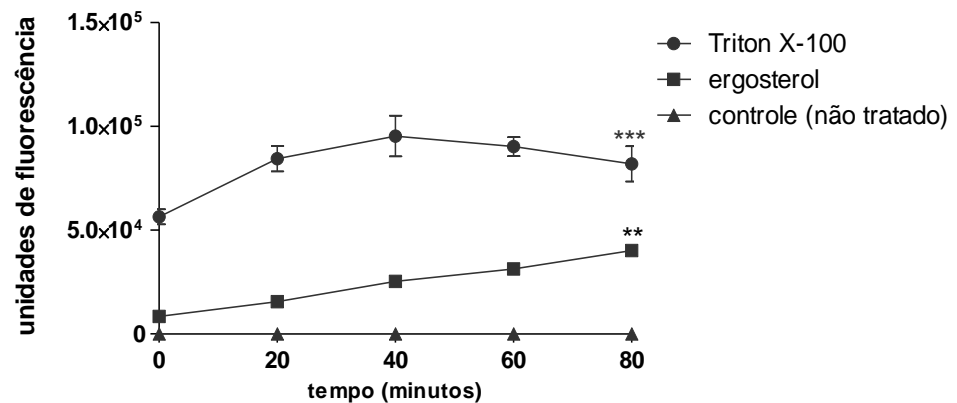


Figura 22: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX[®] Green. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por ***($p < 0,001$) e **($p < 0,002$) em relação ao controle. Os pontos representam a média das triplicatas de um ensaio representativo.

5.2.4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial em tripomastigotas foi monitorada pela sonda Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS. Os parasitos não tratados foram incubados com a sonda e foram utilizados como grupo controle. Após 60 minutos de incubação, os níveis de fluorescência detectados indicaram o funcionamento normal do potencial de membrana mitocondrial da célula (controle). Os resultados demonstraram que o ergosterol (**Figura 23**) induziu uma despolarização do potencial de membrana mitocondrial, reduzindo em aproximadamente 69% a fluorescência em relação ao controle não tratado. A comparação entre o grupo controle e o ergosterol sugere valores significativamente diferentes ($p < 0,001$). FCCP foi utilizado como grupo controle positivo, reduzindo significativamente ($p < 0,001$) a fluorescência em 88% quando comparado ao grupo controle (não tratado).

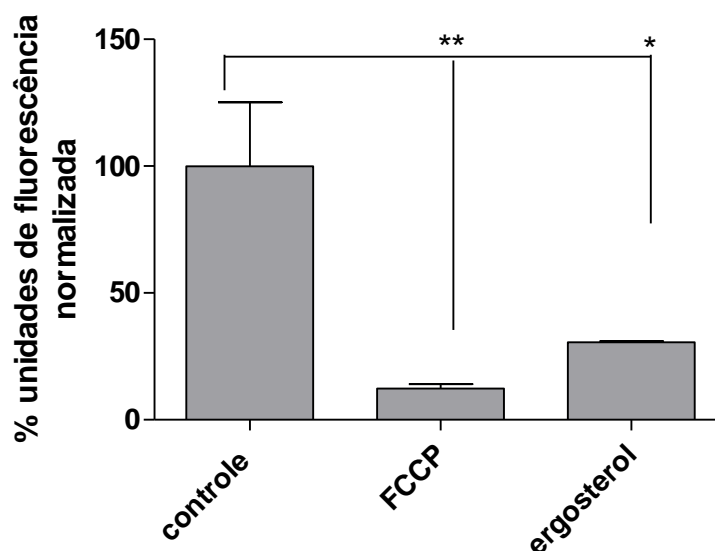


Figura 23: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, realizada utilizando a sonda Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS após uma hora de incubação com o ergosterol * $p < 0,001$ em relação ao controle. A barra representa a média das triplicatas de um ensaio representativo.

5.2.4.3. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção de ROS em tripomastigotas foi avaliada na presença do ergosterol após 60 minutos de incubação, utilizando-se a sonda H₂DCF-DA. Tripomastigotas não tratados foram utilizados como grupo controle. Os dados demonstraram que o ergosterol induziu um aumento não significativo ($p > 0,05$) na produção de ROS, quando comparado ao grupo controle não tratado ($p > 0,05$) (**Figura 24**). Azida sódica foi utilizada como controle positivo, sendo utilizada para normalização dos dados.

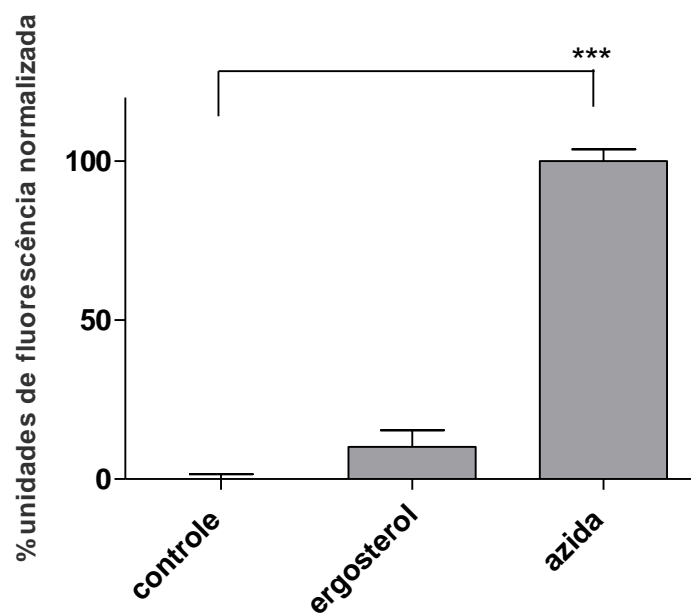


Figura 24: Avaliação da produção de ROS em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando a sonda H₂DCF-DA após uma hora de incubação com o ergosterol. ***($p < 0.001$) em relação ao controle. A barra representa a média das triplicatas de um ensaio representativo.

6. Discussão

Metabólitos secundários isolados de basidiomicetos são importantes biomoléculas ativas. Estudos recentes realizados por Lai e colaboradores (2012) demonstraram um triterpenóide isolado de basidiomiceto *Astraeus hygrometricus* com atividade anti-*Leishmania* (*L.*) *donovani*. Atividade antimicrobiana também foi relatada para o basidiomiceto *Lentinula edodes* (Chowdhury et al., 2015).

No presente estudo, foi realizado pela primeira vez, o fracionamento do extrato orgânico do basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*, visando à avaliação do potencial de seus metabólitos contra os protozoários *Leishmania* (*L.*) *infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Para isso, o fracionamento químico foi realizado, onde diferentes técnicas foram empregadas para separação dos metabólitos e identificação de compostos ativos. A atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do basidiomiceto *P. salmoneostramineus* foi encontrada em frações de diferentes polaridades, desde a fase hexano, até acetato de etila e butanol. Os valores de CE₅₀ variaram entre 7 a 58 µg/mL; no entanto, os promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *infantum* não foram susceptíveis nas concentrações testadas. Apesar de ambos serem tripanossomatídeos, esta diferença pode estar relacionada às diferenças bioquímicas entre os parasitos, conferindo mecanismos de defesa diferentes contra xenobióticos (Pinto et al., 2014).

Entre as frações testadas, a fração hexano apresentou a maior atividade, sugerindo a natureza lipofílica do composto ativo. Embora as frações não tenham apresentado atividade anti-*Leishmania* (*L.*) *infantum*, estudos realizados por Tempone e colaboradores (2007) demonstraram que o prévio fracionamento de extratos brutos, pode gerar subfrações ativas (Tempone et al., 2011). Diante disso, a fração hexano foi selecionada para o fracionamento em cromatografia em coluna (CC). Dentre os 10 grupos

gerados, 8 destes demonstraram atividade anti-*Trypanosoma cruzi* com valores de CE₅₀ entre 6 a 72 µg/mL e dois grupos demonstraram atividade anti- *Leishmania (L.) infantum* com valor de CE₅₀ ≤ 100 µg/mL, corroborando a hipótese citada acima.

Durante o fracionamento da fração hexano, se observou a cristalização do grupo CPS-3 (3), um indicativo de pureza. Estudos realizados para eludidação estrutural utilizando a ressonância magnética nuclear (¹H e ¹³C), assim como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, confirmaram que a subfração estava pura; os dados da literatura (Wright, 1979) permitiram a identificação do composto como ergosterol.

Esteróis presentes em membranas celulares regulam a fluidez e contribuem para a organização das membranas. Diferentemente das células dos mamíferos que contém o colesterol, porém, de forma similar aos fungos, membranas celulares dos protozoários *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi* contêm o ergosterol, assim como outros derivados de esteróis (McCall et al., 2015). Os esteróis são sintetizados a partir da acetil-CoA por um processo metabólico específico e nestes parasitos, envolve um complexo enzimático pertencente ao citocromo P450, denominado CYP51 ou esterol 14-alfa-demetilase (Lepesheva & Waterman, 2011; Souza & Rodrigues, 2009). Considerando as diferenças bioquímicas entre as células de mamífero e o parasito, a síntese de ergosterol (CYP51) tem sido um alvo terapêutico para seleção de novos fármacos (Lepesheva et al., 2015; Riley et al., 2015).

Devido a este fato, fármacos antifúngicos pertencentes à classe dos azóis têm sido empregados na clínica da leishmaniose, como o cetoconazol, itraconazol (Ozgoztasi & Baydar, 1997), assim como em estudos clínicos na doença de Chagas, como o posoconazol (Francisco et al., 2015). A eficácia destes compostos tem sido bastante variável, com dependência da espécie do parasito estudada (Reithinger et al., 2007). Recentemente um estudo avaliou o efeito anti-*Trypanosoma cruzi* do

posaconazol e do ravuconazol ambos fármacos em uso clínico como antifúngicos e inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi* (Soeiro et al., 2013), porém apesar dos estudos iniciais promissores, o DNDi vem despriorizando inibidores da CYP51, pois demonstrou-se que o fármaco mais promissor desta classe, o posaconazol, resultou em falha terapêutica em estudos pré-clínicos com a doença de Chagas (Francisco et al., 2015).

Ligonio e colaboradores (2012) isolaram pela primeira vez o peróxido de ergosterol presente no basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, o qual demonstrou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* com valor de CE₅₀ de 6 µg/mL contra formas epimastigotas. Em nosso estudo, o ergosterol demonstrou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* contra a forma tripomastigota, porém, apresentou um valor de CE₅₀ cerca de 8 vezes maior quando comparado aos dados de Ligonio e colaboradores (2012). Quando comparado ao fármaco padrão benznidazol, o ergosterol se apresentou cerca de 3 vezes mais ativo. As diferenças encontradas entre os trabalhos, além de relacionadas à estrutura química do composto, podem estar relacionadas também ao metabolismo e diferenças bioquímicas encontradas entre as diferentes formas estudadas. Epimastigotas geralmente são formas extracelulares e mais susceptíveis a fármacos, uma vez que se encontram no inseto vetor; já os tripomastigotas, forma utilizada em nosso trabalho, são formas mais resistentes a fármacos, encontradas no interior das células nos mamíferos, assim como na circulação sanguínea. Estas diferenças reforçam a necessidade de se investigar a atividade de fármacos nas formas evolutivas presentes nos hospedeiros vertebrados, isto é, tripomastigotas e amastigotas intracelulares (Castro et al., 1993). Apesar da atividade contra uma das formas do parasito (tripomastigotas), nossos estudos indicaram falha do ergosterol no tratamento de macrófagos infectados com amastigotas intracelulares. Este fato pode estar relacionado a ausência de penetração do composto no interior da célula hospedeira, assim como degradação do mesmo ou ainda ausência de atividade para a forma amastigota, devido as mudanças metabólicas do parasito e maior potencial de proteção (Schmidt et al., 2012). Pesquisadores do DNDi relatam que

fármacos que atuam somente no estágio intracelular do parasito (amastigotas) podem contribuir para tratamentos deficientes, uma vez que as formas tripomastigotas residentes levam a quadros conhecidos de recidiva e falha terapêutica (Chatelain, 2015). Desta forma, a associação de dois fármacos com atividade em ambas a formas poderia ser uma alternativa.

Ligonio e colaboradores (2012) demonstraram que o peróxido de ergosterol se apresentou pouco tóxico em células de mamífero, com uma CE_{50} de 3 $\mu\text{g/mL}$. Apesar de compostos que apresentam grupos endoperóxidos demonstrarem na literatura um potencial maior de citotoxicidade a células de mamífero o peróxido de ergosterol foi cerca de 12 vezes menos tóxico quando comparado ao ergosterol testado em nosso estudo. As diferenças de toxicidade encontradas poderiam então ser explicadas pelas diferentes linhagens de células estudadas, fato este muito observado em nossos estudos no laboratório. Em nosso estudo, o ergosterol apresentou um índice de seletividade de aproximadamente 5, demonstrando ser mais tóxico para os parasitos *Trypanosoma cruzi* (tripomastigotas) e amastigotas intracelulares (*Leishmania*) do que para as células de mamífero estudadas. Este fato é um importante parâmetro quando se avalia o potencial antiparasitário de um composto (Mercer et al., 2007; Meshnick, 2002).

Nosso estudo demonstrou pela primeira a atividade do ergosterol frente ao *T. cruzi*, e ainda, a atividade do extrato orgânico do basidiomiceto comestível, *P. salmoneostramineus*. Esteróis sintéticos ou mesmo isolados de diferentes fontes naturais possuem atividades antiparasitárias (Nganso et al., 2011; Viegelmann et al., 2014). Braga e colaboradores (2005) demonstraram que derivados sintéticos de esteróis apresentaram atividade anti-*T. cruzi*. Tempone e colaboradores demonstram a atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania* dos esteróis telocinobufagina e helebrigenina, isolados do veneno de *Rhinella jimi* (Tempone et al., 2008).

Quando avaliado em *Leishmania (L.) infantum*, o ergosterol não apresentou atividade contra os promastigotas. Em contrapartida, demonstrou atividade contra a forma intracelular do parasito, (amastigota). Ainda, quando comparado ao fármaco padrão, o ergosterol foi cerca de 3 vezes menos ativo do que a miltefosina. A atividade do ergosterol na forma intracelular de *Leishmania* e sua ausência de atividade contra a forma extracelular poderiam ser explicadas por uma possível imunomodulação nos macrófagos, desencadeando ou inibindo a produção de citocinas, as quais poderiam contribuir com a morte do parasito. Zhang e colaboradores (2015), ao investigar o papel do ergosterol, isolado de *Scleroderma polyrhizum*, em síndrome pulmonar aguda, demonstrou uma inibição da produção do fator de transcrição nuclear kappa B, ciclooxigenase-2 (COX-2) e da síntese de óxido nítrico além da citocina IL-6. A IL-6 tem sido considerada uma citocina exacerbatória na leishmaniose, contribuindo para o agravamento da doença quando aumentada (Silva et al., 2015). Futuros estudos poderão demonstrar o papel do ergosterol e seus possíveis efeitos imunomodulatórios no macrófago. Além disso, as diferenças metabólicas entre os amastigotas e os promastigotas são suficientes para explicar o efeito diferenciado do ergosterol no parasito.

Para entendermos a natureza da ação letal do ergosterol nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, foi necessário estudar o mecanismo de ação, utilizando diferentes sondas para avaliação da permeabilidade da membrana plasmática, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio. Utilizando a sonda fluorescente SYTOX[®] Green, foi possível verificar que o ergosterol alterou a permeabilidade da membrana plasmática em tempos curtos de incubação, pois permitiu um rápido influxo da sonda fluorescente. A alteração da permeabilidade de membrana pode contribuir para o desbalanceamento de íons, levando o parasito a morte (Das, 1993). Fármacos como a miltefosina (Brilhante et al., 2015) e a anfotericina B (Yang et al., 2013), que alteram a permeabilidade da membrana plasmática de fungos são bem conhecidos;

porém, até o presente momento, não havia sido relatado que o tratamento com ergosterol poderia causar o mesmo efeito. O efeito de diferentes concentrações de anfotericina B em células tumorais HT29 foi relatado, demonstrando a abertura de poros aquosos concentração-dependente (Yang et al., 2013). Futuros ensaios em modelos de membrana poderão avaliar com precisão o efeito do ergosterol na membrana de *Trypanosoma cruzi*. Os estudos realizados neste trabalho permitem apenas confirmar a alteração da permeabilidade da membrana plasmática neste parasito.

Tripanosomatídeos assemelham-se aos fungos em termos de biossíntese de esteróis, porém, ao contrário dos mamíferos que sintetizam o colesterol, o *T. cruzi* produz principalmente ergosterol. Formas amastigotas de *T. cruzi* contêm significativas quantidades de colesterol de origem exógena, mas continua a ser altamente suscetível a inibidores de sua biossíntese, demonstrando a necessidade de esteróis específicos não sintetizados pelo parasito.

A via de biosíntese de esterol é considerada um dos alvos mais importantes para a pesquisa de novos fármacos na doença de Chagas (Kessler et al., 2013). Enzimas desta via têm sido estudadas como possíveis alvos de tratamento e o ergosterol poderia contribuir como uma ferramenta para se avaliar o motivo pelo qual, quando em excesso, contribuiria para desestabilização da membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade e levando o parasito a morte. Diferentes metabólitos de origem natural, além da própria anfotericina B, alteram a permeabilidade de membranas de *Trypanosoma cruzi* ou *Leishmania* spp. Rea e colaboradores (2013) demonstraram que um composto natural, a soulamarina, isolada da planta *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), induziu alteração da permeabilidade de membrana de *T. cruzi*, contribuindo para a morte de tripomastigotas de *T. cruzi*. Pinto e colaboradores, demonstraram que peptídeos isolados da secreção cutânea de anfíbio, como as dermaseptinas e filoseptinas, também alteram esta permeabilidade de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* (Pinto et al., 2014).

Em continuidade aos estudos de mecanismo de ação, quando se utilizou a sonda Mitotracker[®] Red CM-H₂XROS, foi possível demonstrar que após a alteração da permeabilidade da membrana plasmática, houve uma rápida despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Vercesi e colaboradores (1991) demonstraram que a permeabilização da membrana de epimastigotas por digitonina a 64 μ M, não induziu alterações mitocondriais. Por outro lado, Rodrigues e colaboradores (2001), demonstraram que epimastigotas de *T. cruzi*, quando tratadas com digitonina na mesma concentração, resultou em permeabilização da membrana plasmática, associada à perda do potencial de membrana mitocondrial e redução dos níveis de ATP. Em nossos estudos, o ergosterol demonstrou um efeito similar àquele observado por Rodrigues et al (2001), alterando a permeabilidade da membrana plasmática e contribuindo para alteração do potencial de membrana. Porém, este efeito mitocondrial causado pelo ergosterol no *Trypanosoma cruzi* pode ser resultado de um efeito secundário à alteração da permeabilidade de membrana, uma vez que a mitocôndria pode estar tentando reparar a rápida alteração da permeabilidade da membrana plasmática, e desta forma, alterar seu potencial.

O sistema redox é essencial para a sobrevivência dos tripanossomatídeos. Todos os organismos aeróbicos são expostos a ROS, tais como superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais de hidroxila (OH), gerados pelo metabolismo, incluindo o processo de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria. O desequilíbrio redox ocorre no parasito quando os antioxidantes endógenos não conseguem lidar com a excessiva produção de ROS (tanto endógeno como exógeno), e isso leva ao estresse oxidativo (Pal & Bandyopadhyay, 2012). Conforme indicado pela sonda H₂DCF-DA, nossos dados demonstraram que, apesar da despolarização do potencial de membrana mitocondrial, não houve aumento significativo da produção de ROS após o tratamento com ergosterol. Este dado sugere que morte induzida pelo ergosterol não deve estar associada a

um estresse oxidativo no parasito. Futuros ensaios poderão avaliar os efeitos celulares do ergosterol em *T. cruzi*, possibilitando o desenho de novos e mais seletivos compostos antiparasitários. O ergosterol poderia ser utilizado como uma ferramenta para se avaliar novas rotas de morte celular, visando novas terapias para a doença de Chagas.

7. Conclusões

- 1- O basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus* foi fracionado e resultou em três frações ativas no *T. cruzi*: fração hexano, fração acetato de etila e fração butanol. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* não foram susceptíveis as frações orgânicas.
- 2- Dentre as frações obtidas da partição líquido-líquido, a fração hexano apresentou a maior atividade anti-*T. cruzi*, com menores valores de Concentração Efetiva 50%.
- 3- Da fração hexano foram obtidos 10 grupos, sendo 2 grupos com atividade leishmanicida (promastigotas) e tripanomicida (tripomastigotas), 6 grupos com atividade tripanomicida (tripomastigotas) e 2 grupos não ativos.
- 4- Dentre os grupos, um grupo foi caracterizado como substância pura denominado ergosterol.
- 5- Um composto antiparasitário ativo foi isolado do basideomiceto *Pleurotus salmoneostramineus* e sua estrutura química elucidada, resultando no ergosterol. O basideomiceto apresenta outros possíveis compostos ativos
- 6- O ergosterol apresentou atividade (100% de morte) contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, demonstrando um efeito tripanomicida e leishmanicida.
- 7- O ergosterol apresentou toxicidade para as células de mamífero, porém apresentou seletividade de aproximadamente 5 para ambos os parasitos estudados.
- 8- O ergosterol alterou a permeabilização da membrana plasmática em tripomastigotas de *T. cruzi*, contribuindo para uma despolarização do potencial de membrana mitocondrial, e levando o parasito a morte sem indução de estresse oxidativo.

8. Referências

Adade CM, Carvalho AL, Tomaz MA, Costa TF, Godinho JL, Melo PA, Lima AP, Rodrigues JC, Zingali RB, Souto-Padrón T. Crovirin. A snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against *Trypanosomes* and *Leishmania*. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct; 16;8 (10).

Álvarez JM, Fonseca R, Silva HB, Marinho CR, Bortoluci KR, Sardinha LR, Epiphanyo S, Lima MRD. Chagas disease: still many unsolved issues. Mediators Inflamm. 2014; 2014:912965.

Alves LR, Oliveira C, Goldenberg S. Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol. 2015 May 19; 15:104.

Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2014 Mar 24; 4 (2): 95-111.

Barbosa MP, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. Ventricular arrhythmias in Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 2015 Jan-Feb; 48(1):4-10.

Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. Br Med Bull. 2012; 104:175-96.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, Struchiner CJ. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Apr 25; 7(4): e2182.

Berg M, Mannaert A, Vanaerschot M, Auwera GVD, Dujardin JC. (Post-) Genomic approaches to tackle drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology*. 2013 Oct; 140(12):1492-505.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Oct;24(4):655-81.

Bestetti RB, Neto AC. Did death hinder the process of justice? Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1935. *Int J Cardiol*. 2011 Feb 17; 147(1):172-3.

Borges GM, De Barba FF, Schiebelbein AP, Pereira BP, Chaves MB, Silveira ML, Pinho MS, Furlan SA, Wisbeck E. Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and 95 antitumor activity on Sarcoma 180. *Braz J Microbiol*. 2013 Mar 10;44(4):1059-65.

Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6B):1373-84.

Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I, de Souza W. Effects of inhibitors of Delta24 (25)-sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal*. 2005 Dec;11(6):506-15.

Brilhante RS, Caetano EP, Lima RA, Castelo Branco DS, Serpa R, Oliveira JS, Monteiro AJ, Rocha MF, Cordeiro RA, Sidrim JJ. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. *J Appl Microbiol*. 2015 Oct; 119(4):962-9.

Calabuig JAB, Sottile GP, Roitberg AE. Unraveling the differences of the hydrolytic activity of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and *Trypanosoma*

rangeli sialidase: a quantum mechanics-molecular mechanics modeling study. J Phys Chem B. 2014 Jun 5, 118 (22):5807-16.

Cantacessi C, Torres FD, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. Trends Parasitol. 2015 Mar; 31 (3):100-8.

Carod FJA, Gascon J. Chagas disease and stroke. Lancet Neurol. 2010 May; 9 (5):533-42.

Castro de SL, Soeiro MN, Higashi KO, Meirelles MN. Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. Braz J Med Biol Res. 1993 Nov;26 (11):1219-29.

CDC, Centers for Disease –Chagas disease. [acesso em 20 de maio de 2015]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>

Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. Drug Des Devel Ther. 2015 Aug 19;9: 4807-23.

Chiguer DLD, Luis FH, Torres BN, Castillo R, Ducoing OR, Campos AH, Ambrosio JR. JVG9, a benzimidazole derivative, alters the surface and cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Sep; 109 (6):757-60.

Chowdhury M, Kubra K, Ahmed S. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015 Feb 7; 14:8.

Corrêa DS, Tempone AG, Reimão JQ, Taniwaki NN, Romoff P, Fávero OA, Sartorelli P, Mecchi MC, Lago JH. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). Parasitol Res. 2011 Jul; 109 (1):231-26.

Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Mar-Apr; 44 (2) :232-42. Epub 2011 Apr 1.

Cota BB, Rosa LH, Fagundes EM, Filho OAM, Oliveira RC, Romanha AJ, Rosa CA, Zani CL. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 May; 103(3):263-70.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan; 97(1): 3-24.

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 (4):549-54.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104 Suppl 1:31-40.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Nov;109 (7):856-62.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissionsa comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 May; 110(3):277-82.

Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2005 Nov; 21 (11):508-12.

Das A. Studies on mitochondrial ATPase of *Leishmania donovani* using digitonin-permeabilized promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Aug;60 (2):293-301.

Dawit G, Girma Z, Simenew K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol. 2013 4:166.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Sep;27 (5):305-18. Review.

Dias JC. [Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals]. Rev Soc Bras Med Trop.2006 Jul-Aug; 39(4):370-5.

Dias L.C, Dessoy MA, Silva JJN, Thuemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos Quim. Nova, Vol. 32, No. 9, 2444-2457, 2009.

Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors. 2012 Dec 3; 5: 276.

Elsayed EA, El Enshasy H, Wadaan MA, Aziz R. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Mediators Inflamm. 2014; 2014:805841.

Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul 10 ;8(7):e2914.

Fagundes EMS, Cota BB, Rosa LH, Romanha AJ, Oliveira RC, Rosa CA, Zani CL, Carvalho AT, Filho OAM. In vitro activity of hypnophilin from *Lentinus strigosus*: a potential prototype for Chagas disease and leishmaniasis chemotherapy. Braz J Med Biol Res. 2010 Nov; 43 (11) :1054.

Ferreira AW, Ávila ALM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto – Imunes. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* 2011; 11: 2758-70.

Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug; 59 (8) :4653-61.

Freitas EO, Nico D, Guan R, Fernandes JRM, Clinch K, Evans GB, Tyler PC, Schramm VL, Sousa CBP. Immucillins Impair *Leishmania (L.) infantum chagasi* and *Leishmania (L.) amazonensis* Multiplication *In Vitro*. *PLoS One.* 2015 Apr 24;10(4):e0124183.

Fontana S, Flugy A, Schillaci O, Cannizzaro A, Gargano ML, Saitta A, De Leo G, Venturella G, Alessandro R. In vitro antitumor effects of the cold-water extracts of Mediterranean species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) on human colon cancer cells. *Int J Med Mushrooms.* 2014; 16(1): 49-63.

Fumagalli MAC, Ribeiro TG, Castilho RO, Fernandes SO, Cardoso VN, Coelho CS, Mendonça DV, Soto M, Tavares CA, Faraco AA, Coelho EA. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 May-Jun;48(3):235-42.

Garcia MN, Murray KO, Hotez PJ, Rossmann SN, Gorchakov R, Ontiveros A, Woc-Colburn L, Bottazzi ME, Rhodes CE, Ballantyne CM, Aguilar D. Development of chagas cardiac manifestations among Texas blood donors. *Am J Cardiol.* 2015 Jan 1;115(1):113-7.

Gómez-P CF, Mantilla JCH, Morales AJR. Fatal chagas disease among solid-organ transplant recipients in Colombia. *Open Forum Infect Dis.* 2014 Jun 7;1(1):ofu032.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. bras. epidemiol. [online]. 2004, vol.7, n.3, pp. 338-349. ISSN 1980-5497.

Guerra R.A.T, Educação a Distância. 2. Biologia João Pessoa: Ed. Universitária, 2011. 610p. [acesso em 20 jun 2015]. Disponível em: http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_2/5-fungos_briofitas.pdf.

Herrador Z, Rivas E, Gherasim A, Barroso DG, García J, Benito A, Aparicio P. Using hospital discharge database to characterize Chagas disease evolution in Spain: there is a need for a systematic approach towards disease detection and control. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Apr 17;9(4):e0003710.

Hidron AI, Gilman RH, Justiniano J, Blackstock AJ, Lafuente C, Selum W, Calderon M, Verastegui M, Ferrufino L, Valencia E, Tornheim JA, O'Neal S, Comer R, Galdos-Cardenas G, Bern C; Chagas Disease Working Group in Peru and Bolivia. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. PLoS Negl Trop Dis. 2010 May 18;4(5):e688.

Hussain H, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Green IR, Gibbons S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. Chem Rev. 2014 Oct 22;114(20):10369-428.

Ike K, Kameyama N, Ito A, Imai S. Induction of a T-Helper 1 (Th1) immune response in mice by an extract from the *Pleurotus eryngii* (Eringi) mushroom. J Med Food. 2012 Dec;15 (12):1124-8.

Jabari S, de Oliveira EC, Brehmer A, da Silveira AB. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. Histochem Cell Biol. 2014 Sep;142 (3):235-44.

Junior LHF, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012 Jan 28;2: 11-9.

Kessler RL, Soares MJ, Probst CM, Krieger MA. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One*. 2013; 8 (1):e55497.

Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol*. 2014; 9 (7):901-15.

Kuehn CC, Oliveira LGR, Santos CD, Ferreira DS, Toldo MPA, de Albuquerque S, do Prado JC Jr. Melatonin and dehydroepiandrosterone combination: does this treatment exert a synergistic effect during experimental *Trypanosoma cruzi* infection? *J Pineal Res*. 2009 Oct;47 (3):253-9.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W; Mcgwire B S. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:15496-15504.

Kulshreshtha S, Mathur N, Bhatnagar P. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*. 2014 Apr 1;4: 29.

Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology*. 2014 Mar 14;3 (3):e13.

Lai TK, Biswas G, Chatterjee S, Dutta A, Pal C, Banerji J, Bhuvanesh N, Reibenspies JH, Acharya K. Leishmanicidal and anticandidal activity of constituents of Indian edible mushroom *Astraeus hygrometricus*. *Chem Biodivers*. 2012 Aug;9 (8):1517-24.

Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108 Suppl 1:34-47.

Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr Top Med Chem.* 2011;11 (16):2060-71.

Lepesheva GI, Hargrove TY, Rachakonda G, Wawrzak Z, Pomel S, Cojean S, Nde PN, Nes WD, Locuson CW, Calcutt MW, Waterman MR, Daniels JS, Loiseau PM, Villalta F. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015 Nov 1;212(9):1439-48.

Ligonio AR, Monteon AL, Trigos A. Trypanocidal activity of ergosterol peroxide from *Pleurotus ostreatus*. *Phytother Res.* 2012 Jun; 26 (6):938-43.

Lindoso JAL, Costa JML, Queiroz TI, Goto H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine.* 2012;3 Jul (3) 69-77.

Maillo BM, Vélez RL. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs.* 2013 Nov; 73 (17):1863-88.

Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors.* 2015 May 28;8:289.

Marinho DS, Casas CN, Pereira CC, Leite IC. Health economic evaluations of visceral leishmaniasis treatments: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Feb 27;9(2):e0003527.

Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, Muñoz RL, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res.* 2010;43(3):323-31.

McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G, Johnston JB, Chen S, Kellar D, Siqueira-Neto JL, Roush WR, Podust LM, McKerrow JH. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of

sterol 14 alpha-demethylase. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Mar 13;9(3):e0003588.

Melo EC, Fortaleza CM. Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. J Trop Med. 2013; 2013:319234.

Méndez AR, Viñas PA, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J; Chagas Disease COHEMI Working Group. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct 30;8(10):e3245.

Mercer AE, Maggs JL, Sun XM, Cohen GM, Chadwick J, O'Neill PM, Park BK. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds. J Biol Chem. 2007 Mar 30;282(13):9372-82. Epub 2007 Jan 16. PubMed PMID: 17227762.

Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. Int J Parasitol. 2002 Dec 4;32(13):1655-60. Review

Mesquita JT, Pinto EG, Taniwaki NN, Galisteo AJ Jr, Tempone AG. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. Acta Trop. 2013 Dec;128(3):666-73.

Miao Q, Ndao M. *Trypanosoma cruzi* infection and host lipid metabolism. Mediators Inflamm. 2014; 2014:902038.

Molina JAP, Norman F, Vélez RL. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. Curr Infect Dis Rep. 2012 Jun;14(3):263-74.

Montgomery SP, Starr MC, Cantey PT, Edwards MS, Meymandi SK. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 2014 May; 90 (5) :814-8.

Moreno AMH, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother.* 2012 May; 67 (5):1261-6.

Morillo CA, Neto JAM, Avezum A, Estani SS, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015 Oct; 373 (14) :1295-306.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde: zoonoses. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

Mukkavilli R, Pinjari J, Patel B, Sengottuvelan S, Mondal S, Gadekar A, Verma M, Patel J, Pothuri L, Chandrashekar G, Koiram P, Harisudhan T, Moinuddin A, Launay D, Vachharajani N, Ramanathan V, Martin D. *In vitro* metabolism, disposition, preclinical pharmacokinetics and prediction of human pharmacokinetics of DNDI-VL-2098, a potential oral treatment for Visceral Leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Dec 18; 65:147-55.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005 Oct 29-Nov 4; 366 (9496):1561-77.

Neto EC, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:683230.

Nganso YO, Ngantchou IE, Nkwenoua E, Nyasse B, Denier C, Hannert V, Schneider B. Antitrypanosomal and cytotoxic activities of 22-103

Hydroxyclosterol, a new sterol from *Allexis cauliflora* (Violaceae). *Sci Pharm*. 2011 Mar; 79 (1):137-44.

Nühs A, De Rycker M, Manthri S, Comer E, Scherer CA, Schreiber SL, Loset JR, Gray DW. Development and Validation of a Novel *Leishmania donovani* Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 25; 9(9):e0004094.

Nworu CS, Ihim SA, Ugwu LE, Laiyemo KA, Akah PA. Hepato- and nephroprotective activities of a Nigerian local king tuber oyster mushroom, *Pleurotus tuberregium* (higher Basidiomycetes), in chemically induced organ toxicities in rats. *Int J Med Mushrooms*. 2014;16(4):305-18.

Ozgoztasi O, Baydar I. A randomized clinical trial of topical paromomycin versus oral ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Turkey. *Int J. Dermatol*. 1997 Jan; 36(1):61-3.

Pal C, Bandyopadhyay U. Redox-active antiparasitic drugs. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Aug 15; 17(4):555-82.

Patel Y, Naraian R, Singh VK. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*. 2012 3 (1): 01-12, 2012.

Patil RS, Patil MS, Kshirsagar SS, Chaudhari PS, Bayas JP, Oswal RJ. Synthetic and Natural products against leishmaniasis: A Review. *World Journal of Public Health Sciences* 2012; 1:7-22.

Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan; 57 (1):390-5.

Pinto EG, Antoniazzi MM, Jared C, Tempone AG. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of the cutaneous secretion of *Siphonops annulatus*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2014 Nov 24; 20:50.

Pinto EG, Pimenta DC, Antoniazzi MM, Jared C, Tempone AG. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2013 Dec; 135 (4):655-60.

PubChem Compound. [acesso em 15 de Janeiro de 2015]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>.

Rea A, Tempone AG, Pinto EG, Mesquita JT, Rodrigues E, Silva LG, Sartorelli P, Lago JH. Soultamarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Dec 5;7(12):e2556.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014 May 3; 6:147-54.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007 Sep; 7(9):581-96.

Repetto EC, Zachariah R, Kumar A, Angheben A, Gobbi F, Anselmi M, Al Rousan A, Torrico C, Ruiz R, Ledezma G, Buoninsegna MC, Khogali M, Van den Bergh R, De Maio G, Egidi AM, Maccagno B, Garelli S. Neglect of a Neglected Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas Disease in Bergamo Area. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 5;9 (9):e0004103.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Riley J, Brand S, Voice M, Caballero I, Calvo D, Read KD. Development of a Fluorescence-based *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibition Assay for Effective

Compound Triaging in Drug Discovery Programmes for Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 22;9 (9):e0004014.

Roatt BM, Soares RDA, Vital WC, Ker HG, Moreira ND, Souza JV, Giunchetti RC, Carneiro CM, Reis AB. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. Front Immunol. 2014 Jun 13; 5:272.

Rock KS, Rutte EA, de Vlas SJ, Adams ER, Medley GF, Hollingsworth TD. Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. Trends Parasitol. 2015 Jun; 31 (6):251-9.

Rodrigues CO, Catisti R, Uyemura SA, Vercesi AE, Lira R, Rodriguez C, Urbina JA, Docampo R. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. J Eukaryot Microbiol. 2001 Sep-Oct;48(5):588-94.

Rojo D, Canuto GA, Martins EAC, Tavares MF, Barbas C, González ÁL, Rivas L. A Multiplatform Metabolomic Approach to the Basis of Antimonial Action and Resistance in *Leishmania infantum*. PLoS One. 2015 Jul 10;10 (7):e0130675.

Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B, Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E, Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM, Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T, Degraeve W, Andrade Zde A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010 Mar; 105 (2) :233-8.

Rosa LH, Machado KM, Rabello AL, Fagundes EMS, Correa-Oliveira R, Rosa CA, Zani CL. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of Basidiomycota fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek. 2009 Mar; 95 (3): 227-37.

Satou T, Kaneko K, Li W, Koike K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. Biol Pharm Bull. 2008 Apr; 31(4):574-6.

Selegian M, Putz MV, Rugea T. Effect of the polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* against infectious bursal disease virus. Int J Mol Sci. 2009 Aug 18;10(8):3616-34.

Silva TAC, Grecco SS, de Sousa FS, Lago JH, Martins EG, Terrazas CA, Varikuti S, Owens KL, Beverley SM, Satoskar AR, Tempone AG. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*. J Nat Prod. 2015 Apr 24; 78(4):653-7.

Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. Front Immunol. 2014 Jun 26; 5: 296.

Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R, Da Costa FB, de Castro SL, Ferreira VF, de Lacerda MV, Lago JH, Leon LL, Lopes NP, das Neves Amorim RC, Niehues M, Ogungbe IV, Pohlit AM, Scotti MT, Setzer WN, de N C Soeiro M, Steindel M, Tempone AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. Curr Med Chem. 2012;19 (14):2128-75.

Soeiro M de N, de Souza EM, da Silva CF, Batista Dda G, Batista MM, Pavão BP, Araújo JS, Aiub CA, da Silva PB, Lionel J, Britto C, Kim K, Sulikowski G, Hargrove TY, Waterman MR, Lepesheva GI. In vitro and in vivo studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Sep; 57 (9):4151-63.

Souza de W, Rodrigues JC. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009 : 642502.

Souza de W. *Trypanosoma cruzi*-Host Cell Interaction. Front Immunol. 2014 Aug 4;5:339.

Stauber L A, Franchino E M, Grun J. An 8 day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. J Protozool 1958; 5:269 -73.

Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Jun 20;7(6):e2278.

Sundar S, Chakravarty J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. Expert Opin Investig Drugs. 2015 Jan;24 (1):43-59. Epub 2014 Nov 20.

SVS/Sinam/MS. Sinam (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Ministério da Saúde [acesso 20 de maio de 2015]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2011/d0205.def>

Tarleton RL, Gürtler RE, Urbina JA, Ramsey J, Viotti R. Chagas disease and the London declaration on neglected tropical diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Oct 9; 8(10):e3219.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 Aug;101(5):463-91.

Tempone A G, Silva A C, Brandt C A, Martinez F S, Borborema S E, Silveira M A et al. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:1076-1080.

Tempone AG, Sartorelli P, Mady C, Fernandes F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2007 Jul;5 (3):222-35.

Tempone AG, Pimenta DC, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN, de Andrade HF Jr, Antoniazzi MM, Jared C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity

of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicol.* 2008 Jul; 52 (1) :13-21.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* 2011 Apr;77 (6):572-85.

Usami A, Nakaya S, Nakahashi H, Miyazawa M. Chemical composition and aroma evaluation of volatile oils from edible mushrooms (*Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus sajor-caju*). *J Oleo Sci.* 2014; 63(12):1323-32.

Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Costa LE, Leite JP, Santoro MM, Régis WC, Tavares CA, Coelho EA. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol Int.* 2011 Dec; 60 (4):357-63.

Valadares DG, Duarte MC, Ramírez L, Chávez-Fumagalli MA, Lage PS, Martins VT, Costa LE, Ribeiro TG, Régis WC, Soto M, Fernandes AP, Tavares CA, Coelho EA. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res.* 2012 Oct;111 (4):1807-16.

Viegelmann C, Parker J, Ooi T, Clements C, Abbott G, Young L, Kennedy J, Dobson AD, Edrada-Ebel R. Isolation and identification of antitrypanosomal and antimycobacterial active steroids from the sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2014 May 16; 12(5):2937-52.

Wang W, Chen K, Liu Q, Johnston N, Ma Z, Zhang F, Zheng X. Suppression of tumor growth by *Pleurotus ferulae* ethanol extract through induction of cell apoptosis, and inhibition of cell proliferation and migration. *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e102673.

Wasser SP. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J.* 2014 Nov-Dec;37(6):345-56.

WHO. *World Health Organization*. Leishmaniasis. [acesso em 13 de Outubro de 2015]. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

WHO. *World Health Organization*. Chagas disease. [acesso em 13 de Outubro de 2015]. Disponível em <http://www.who.int/chagas/en/>

Wright J.L.C. The occurrence of ergosterol and (22E724R)-24-ethylcholesta-5,7,22-trien-3P-ol in the unicellular chlorophyte *Bunaliella tertioleeta* CAN. J. CHEM. Vol 5, 1979.

Wu X, Zheng S, Cui L, Wang H, Ng TB. Isolation and characterization of a novel ribonuclease from the pink oyster mushroom *Pleurotus djamor*. J Gen Appl Microbiol. 2010 Jun; 56 (3):231-9.

Yang TS, Ou KL, Peng PW, Liou BC, Wang WT, Huang YC, Tsai CM, Su CH. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. Biochim Biophys Acta. 2013 Aug;1828(8):1794-801.

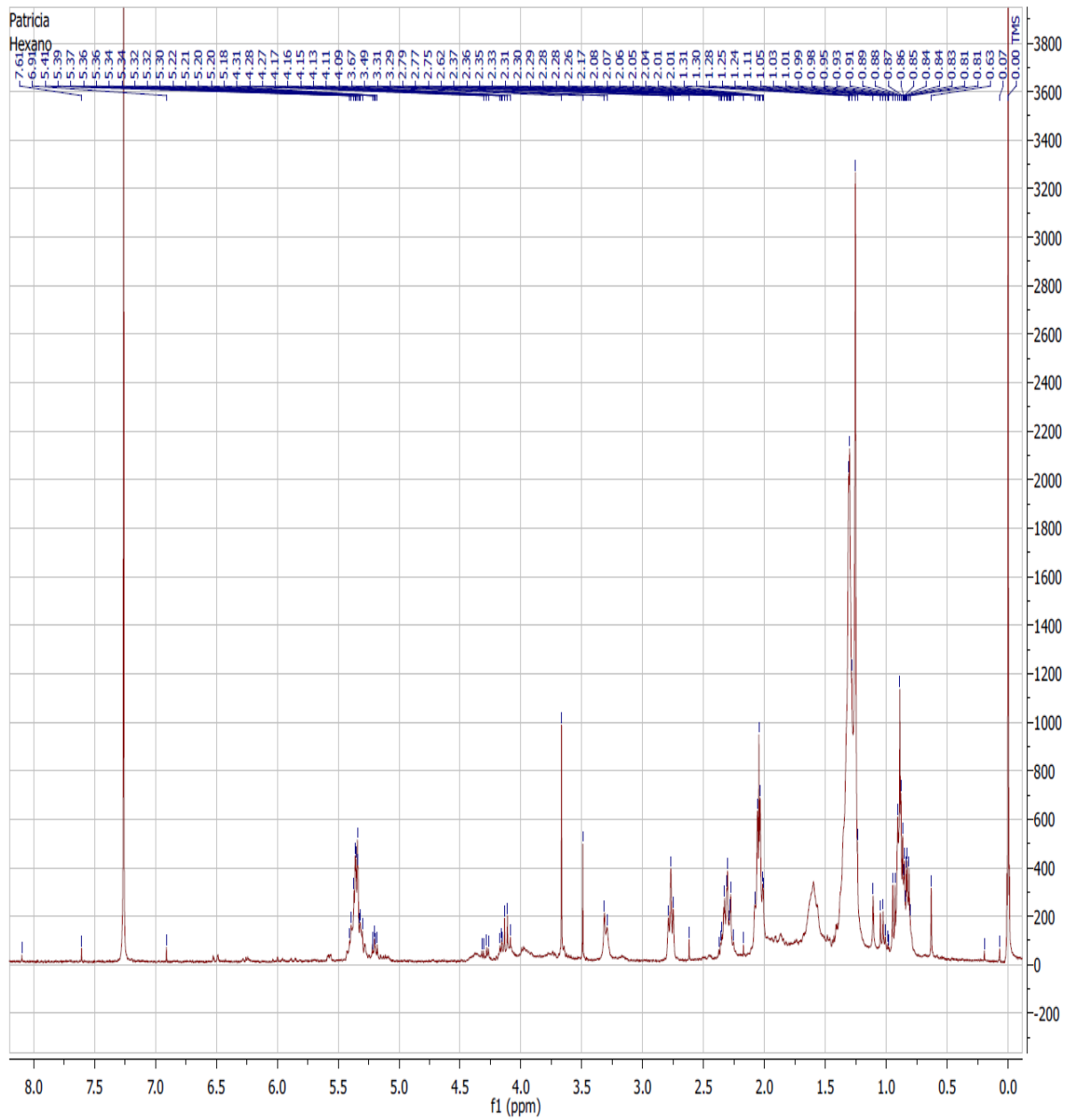
Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Agents 2000; 4:243-8.

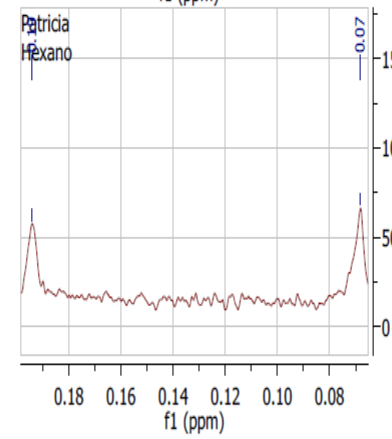
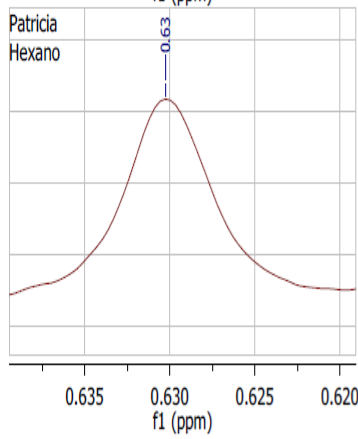
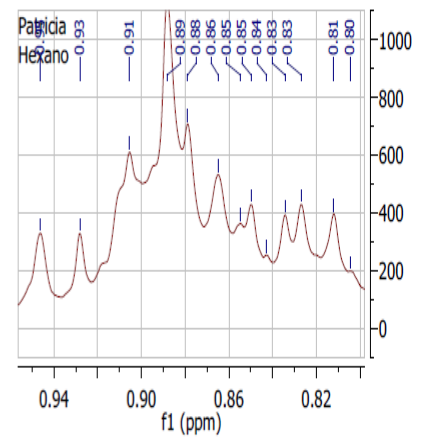
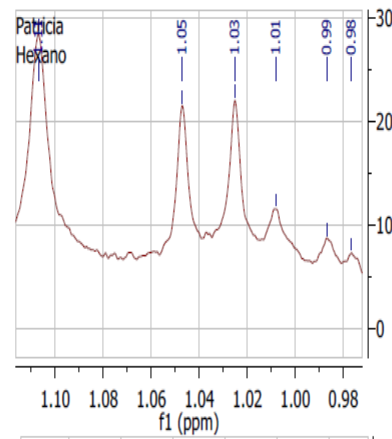
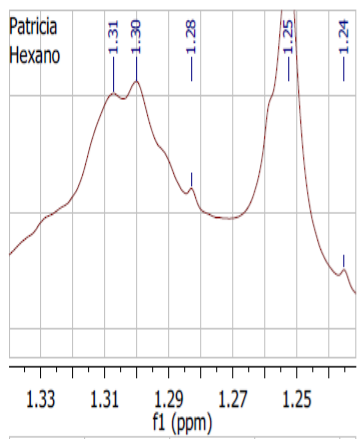
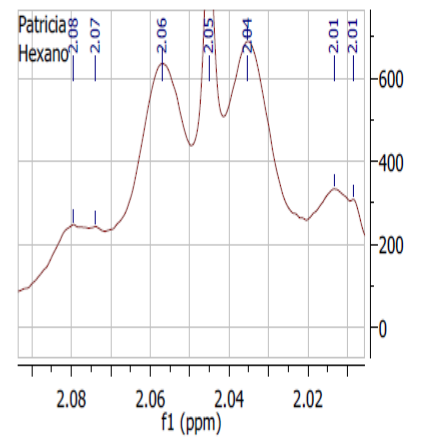
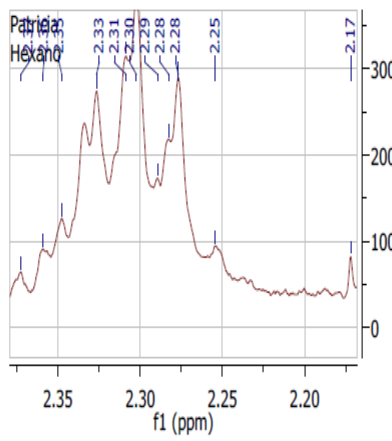
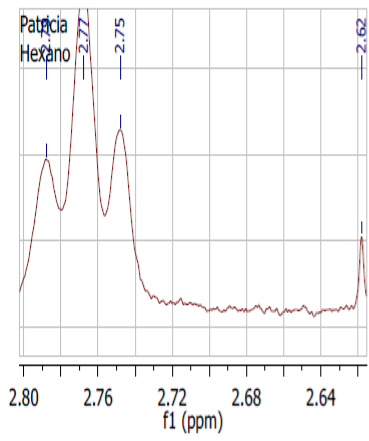
Zhang SY, Xu LT, Li AX, Wang SM. Effects of Ergosterol, Isolated from *Scleroderma Polyrhizum* Pers., on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury. Inflammation. 2015 Apr 29.

Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I; Drugs for Neglected Disease Initiative; Chagas Clinical Research Platform Meeting. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Sep;109 (6):828-33.

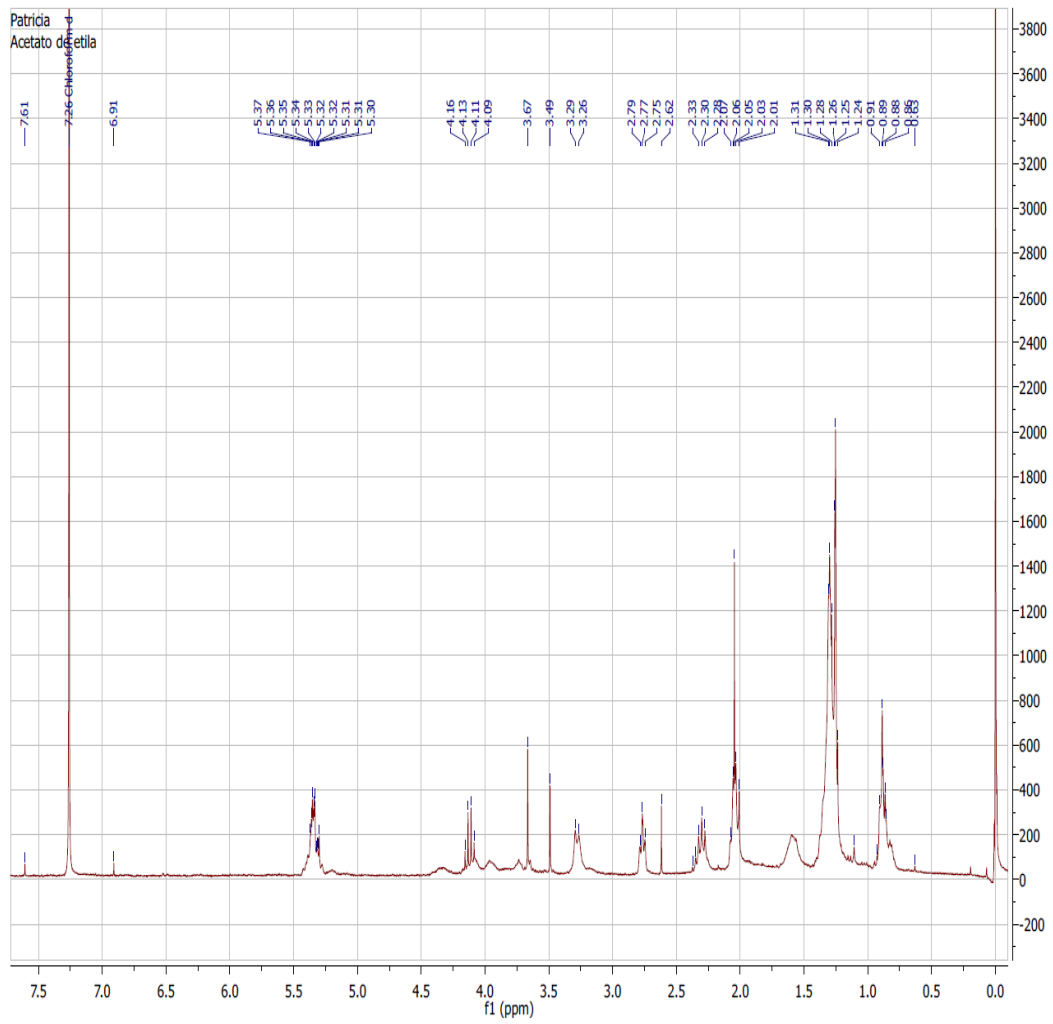
9. Anexos

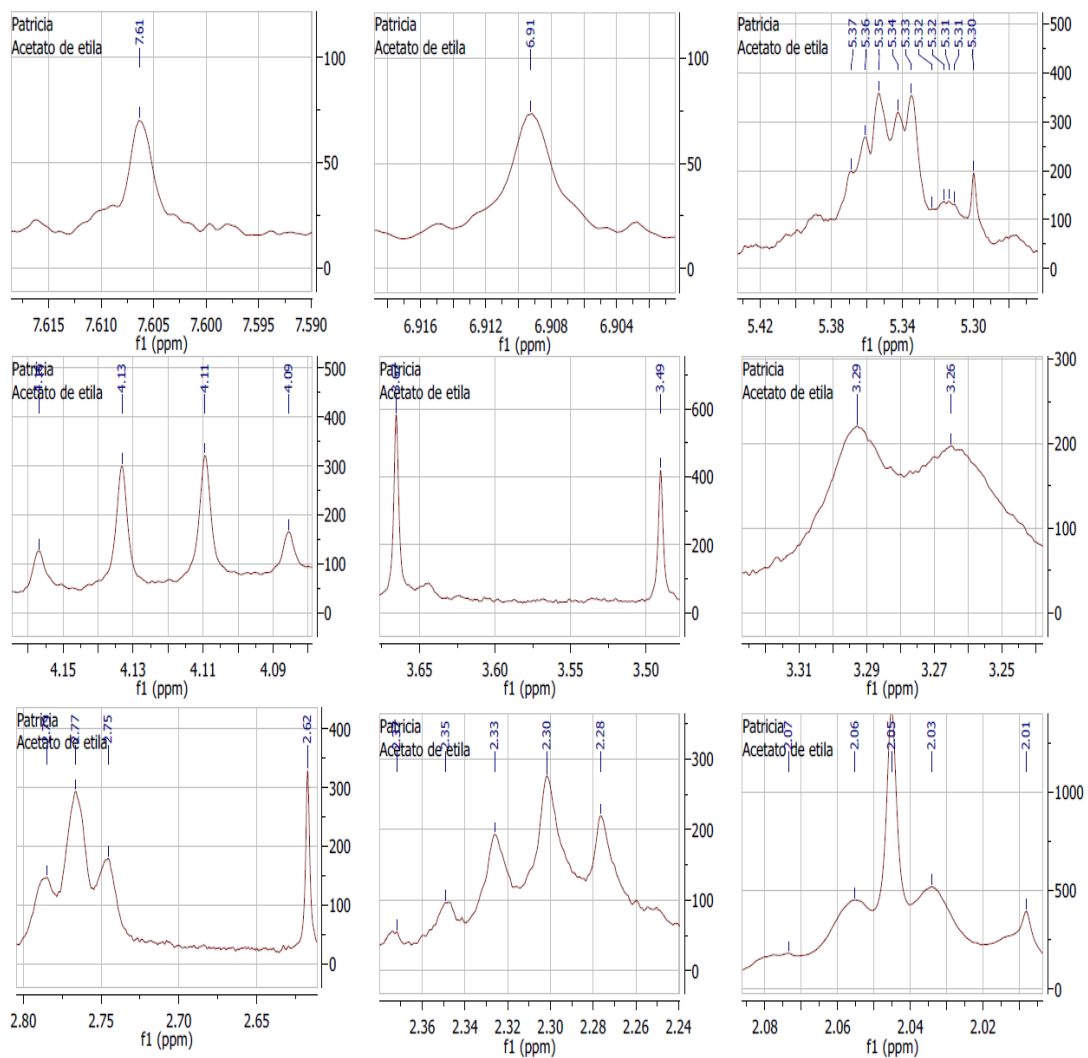
Anexo 1A: Espectro de RMN de ^1H da fase hexano de *P. salmoneostramineus* (δ , CDCl_3 , 300 MHz)



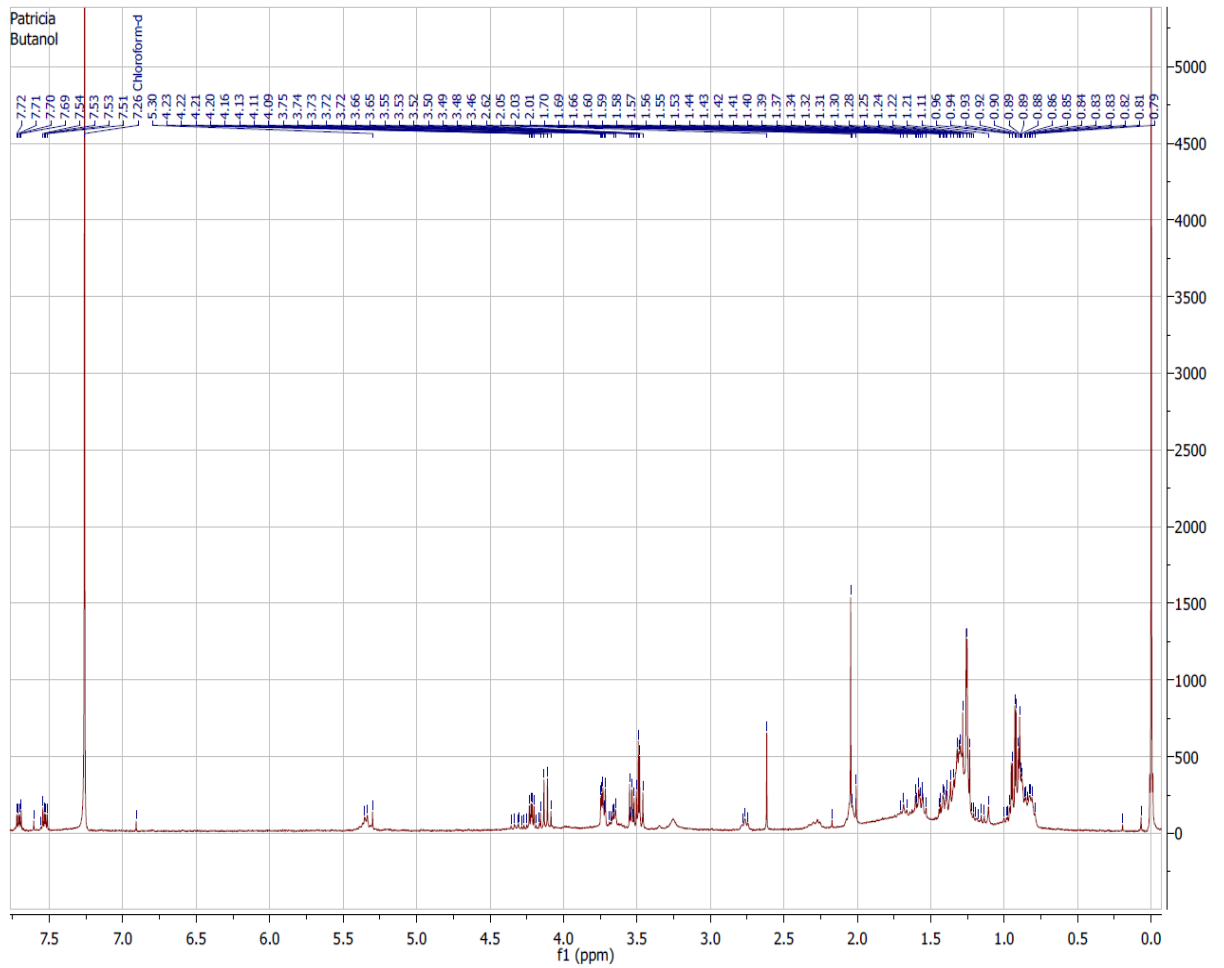


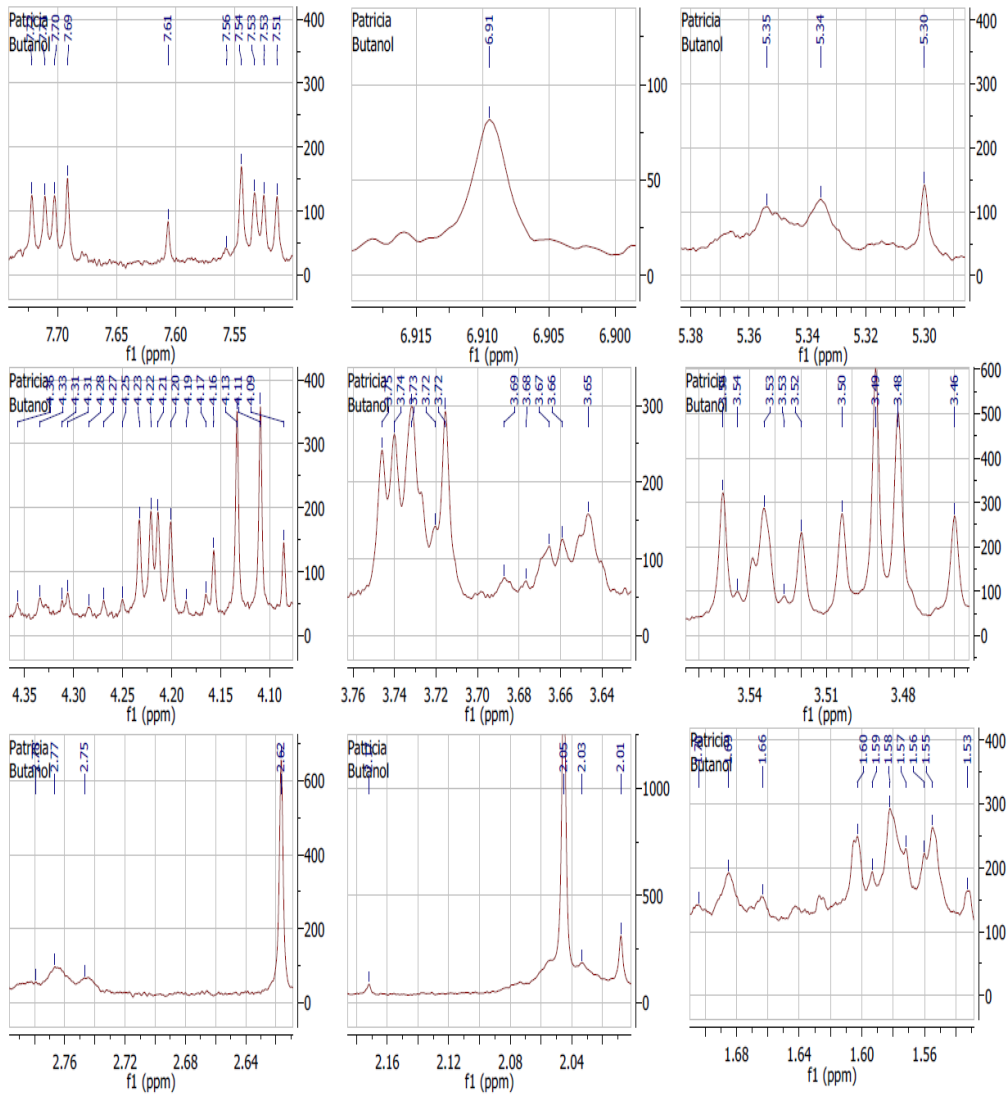
Anexo 1B: Espectro de RMN de ^1H da fase acetato de etila de *P. salmoneostramineus* (δ , CDCl_3 , 300 MHz).



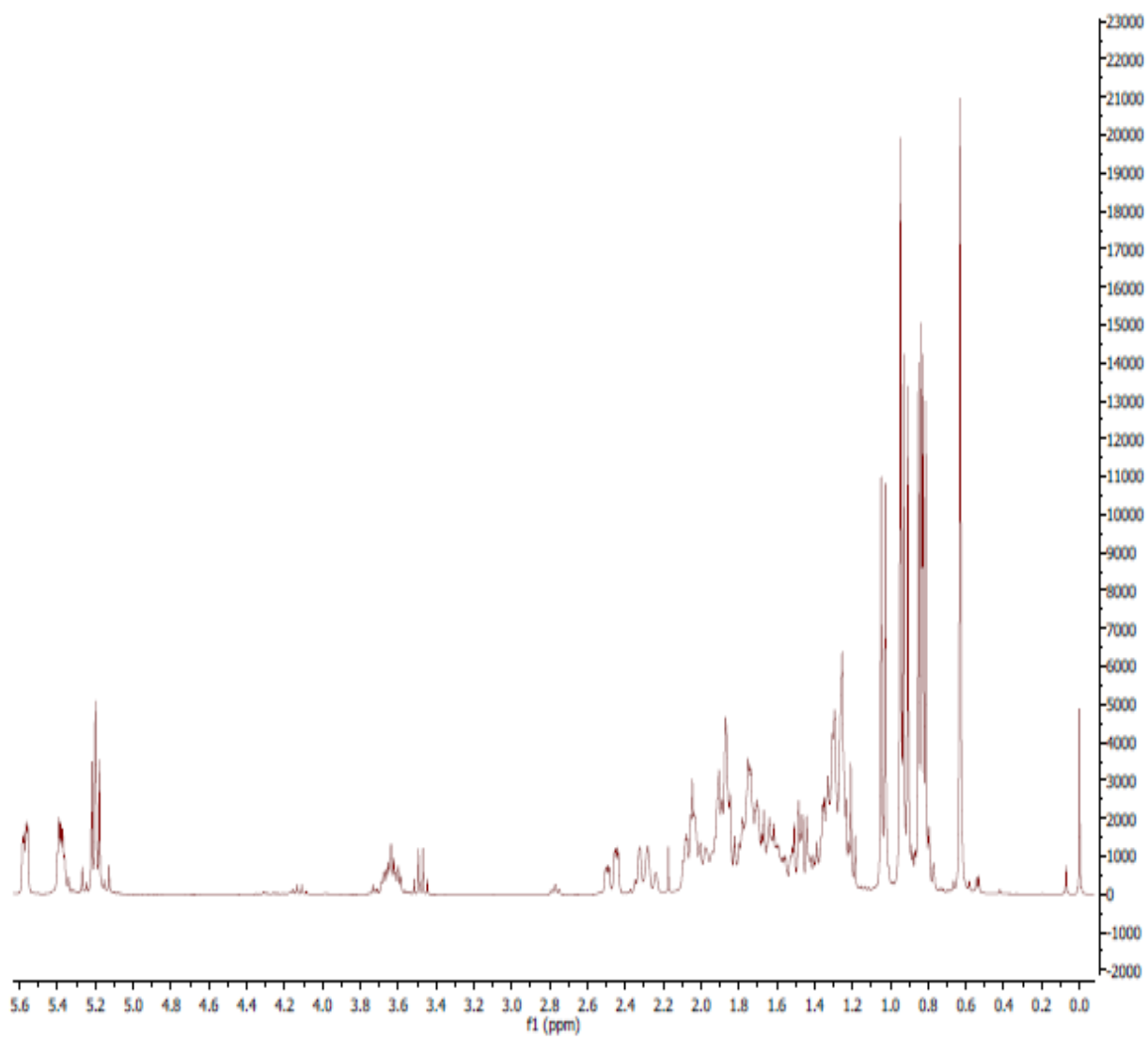


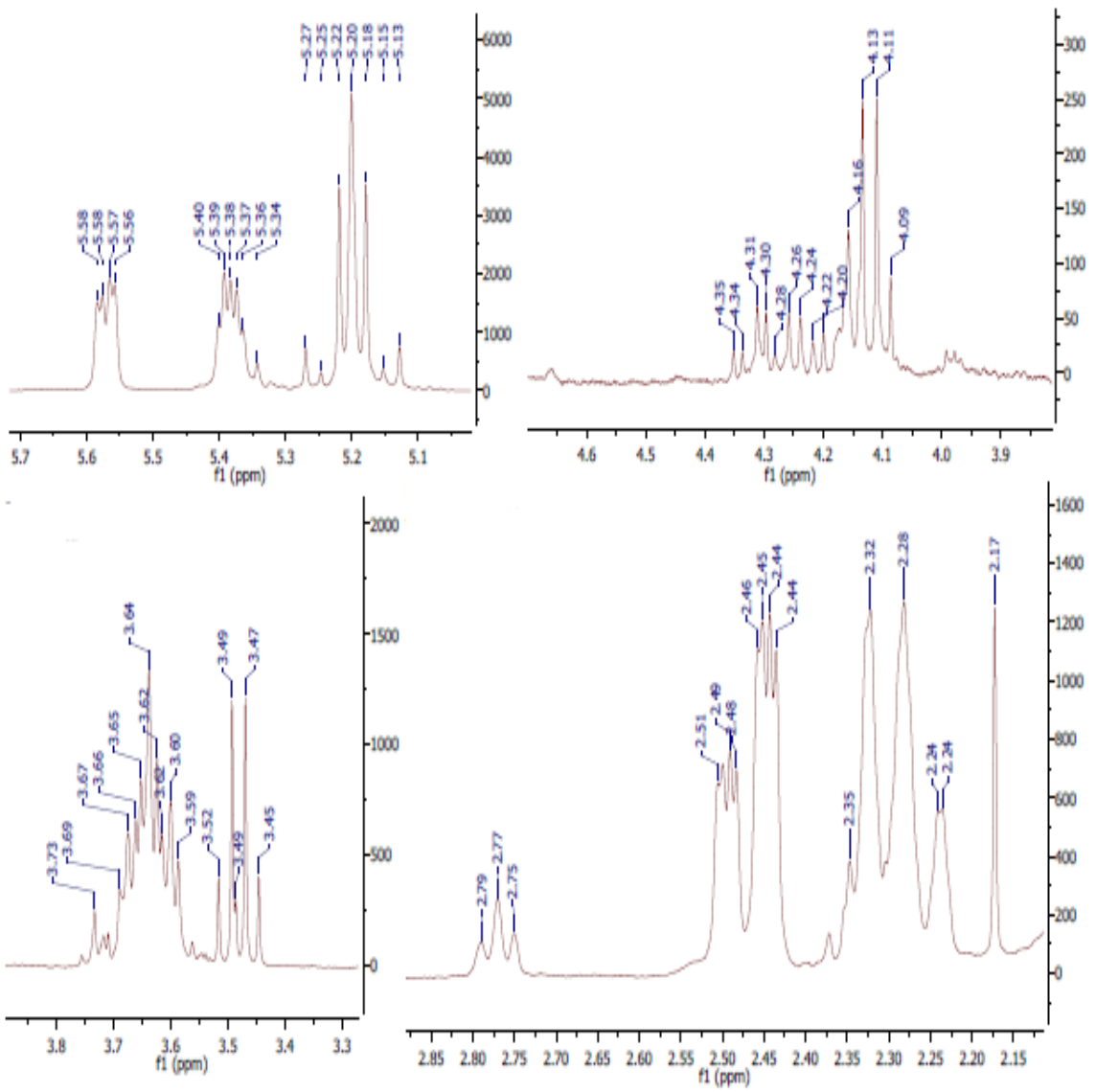
Anexo 1C: Espectro de RMN de ^1H da fase butanol de *P. salmoneostramineus* (δ , CDCl_3 , 300 MHz).

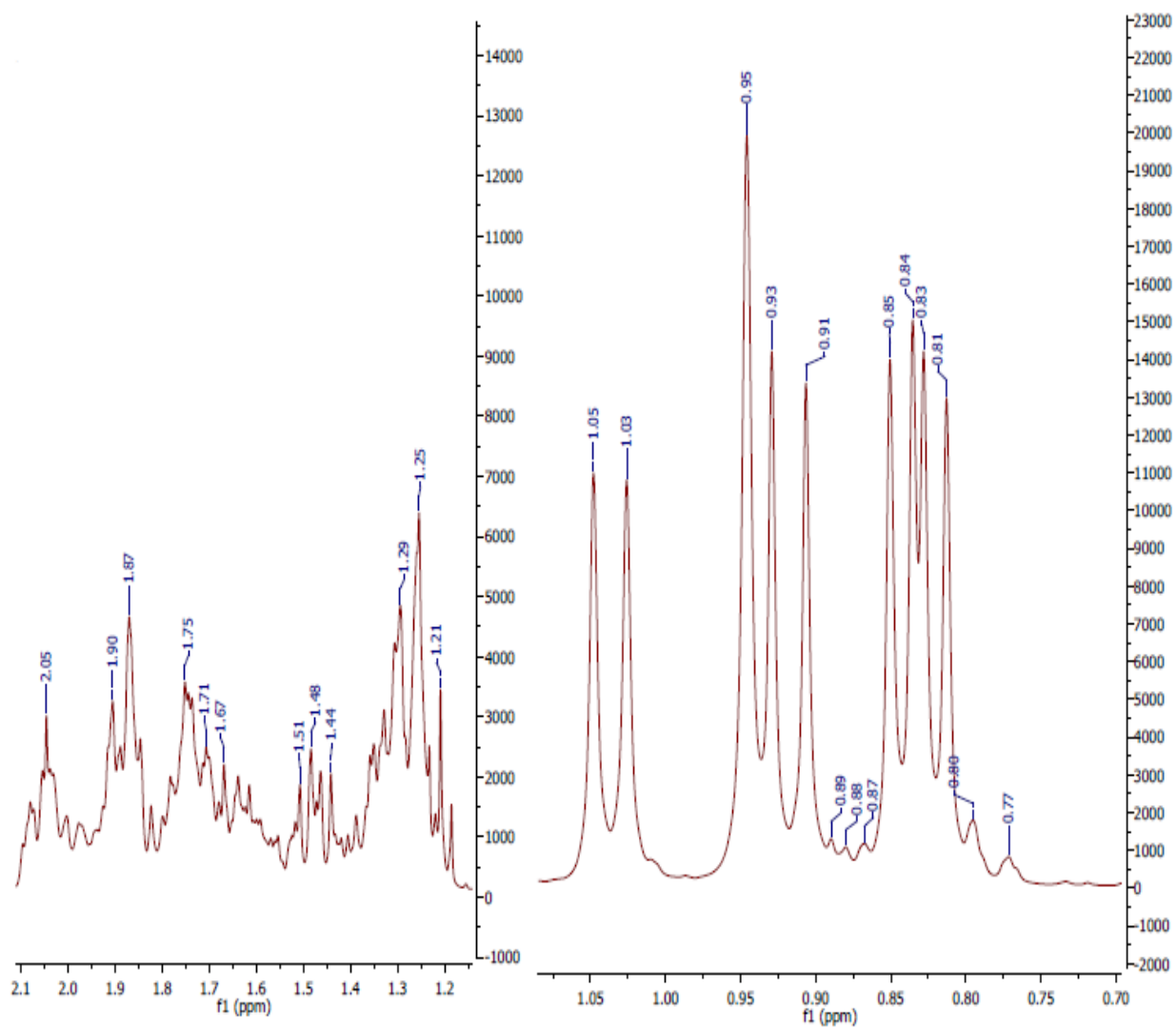




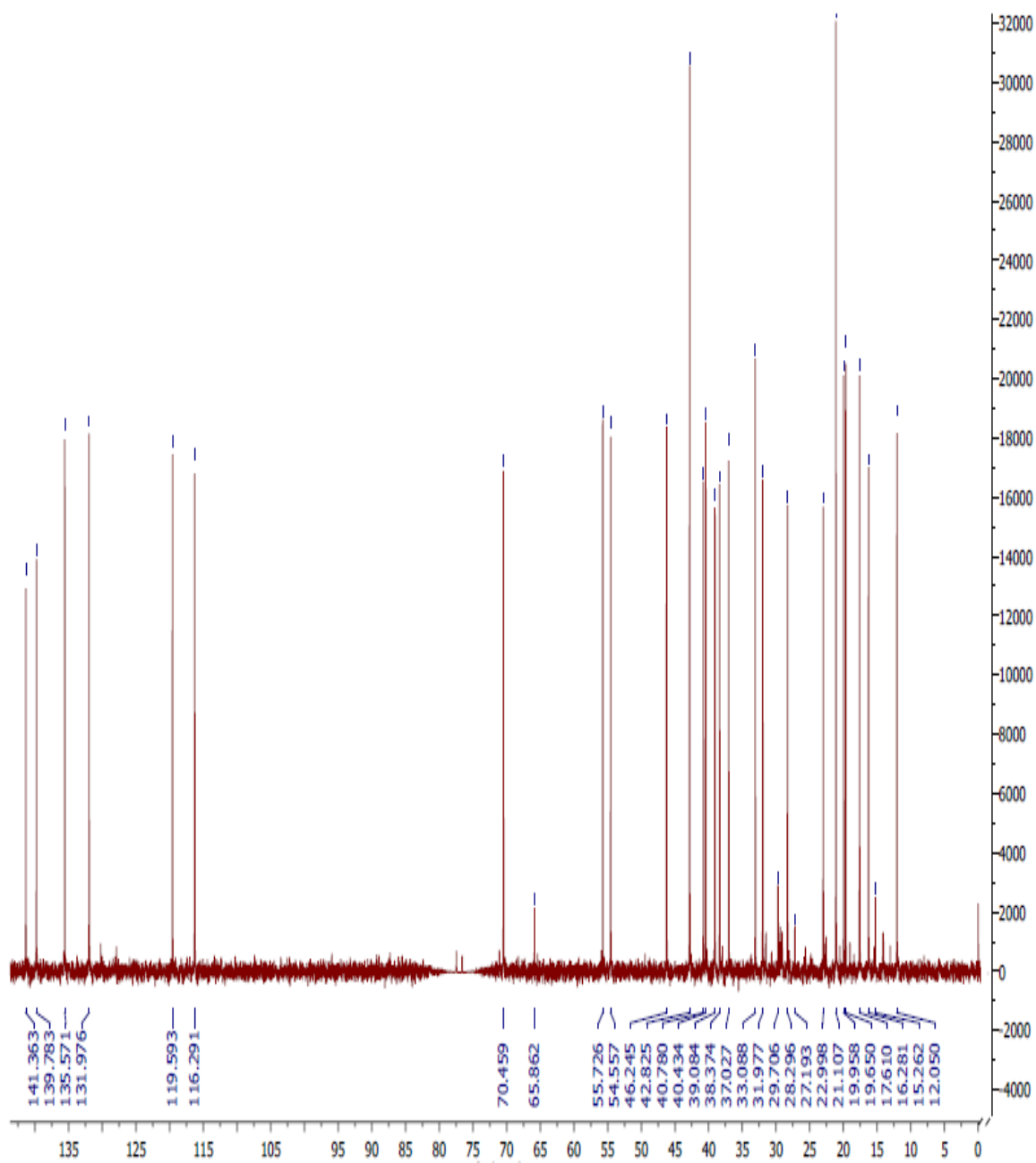
Anexo 2: Espectro da RMN ^1H do ergosterol.



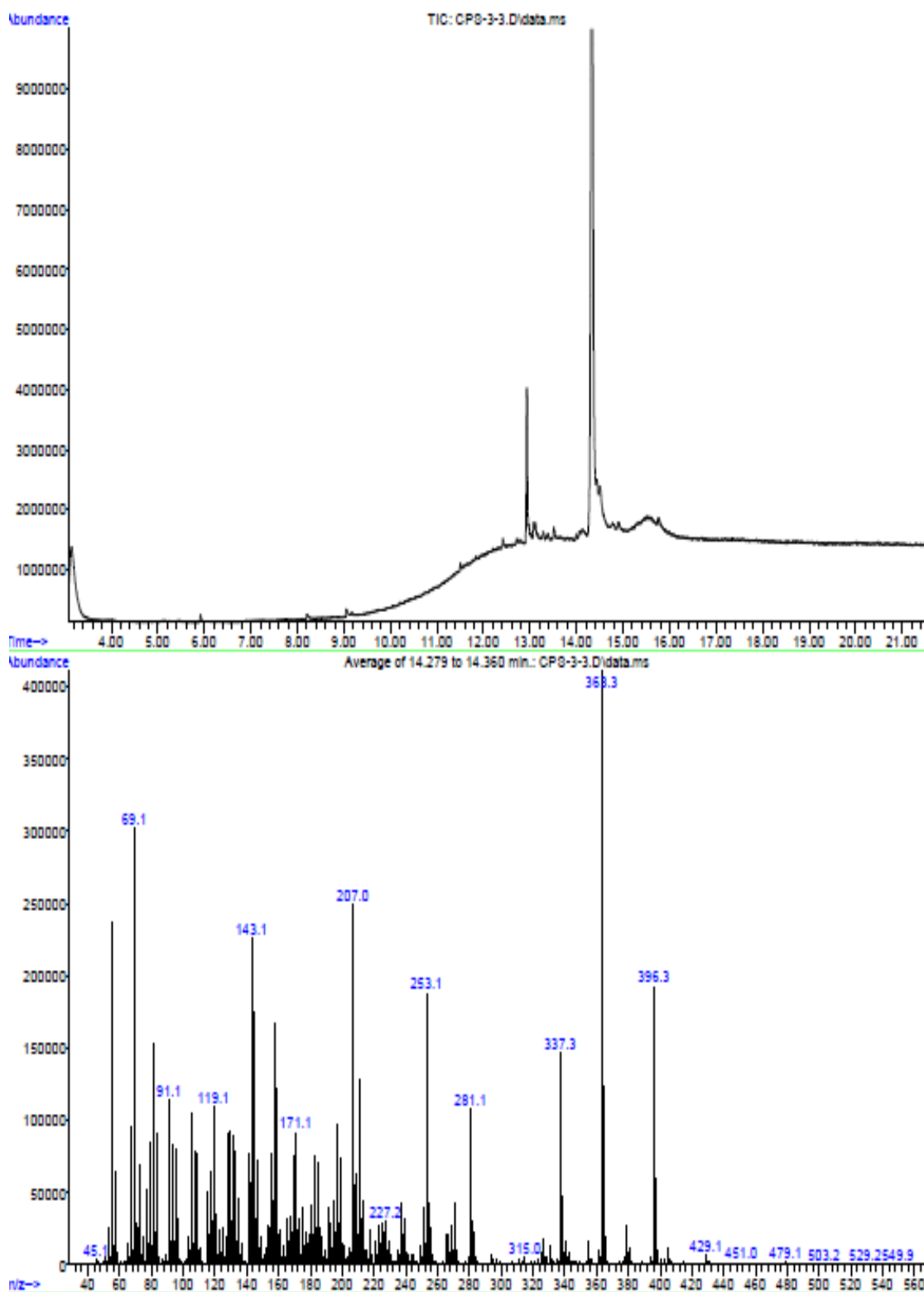




Anexo 3: Espectro de RMN ^{13}C do ergosterol.

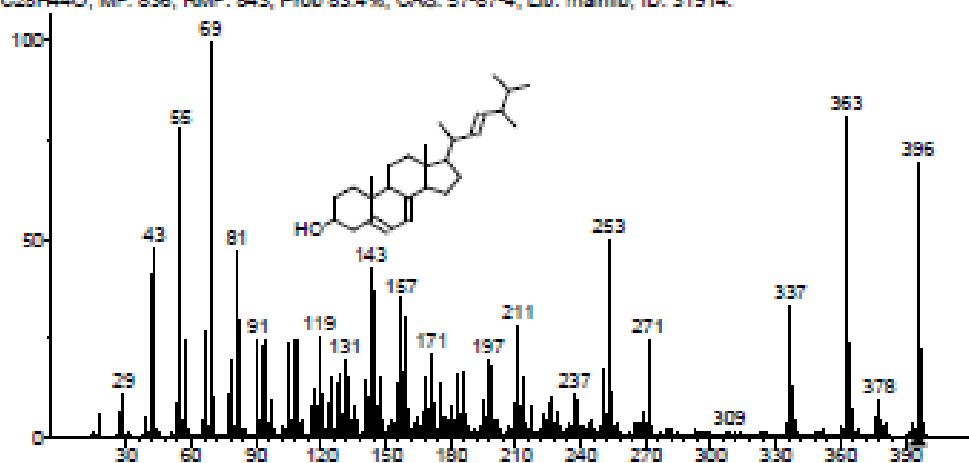


Anexo 4: Espectrometria de massas do ergosterol.

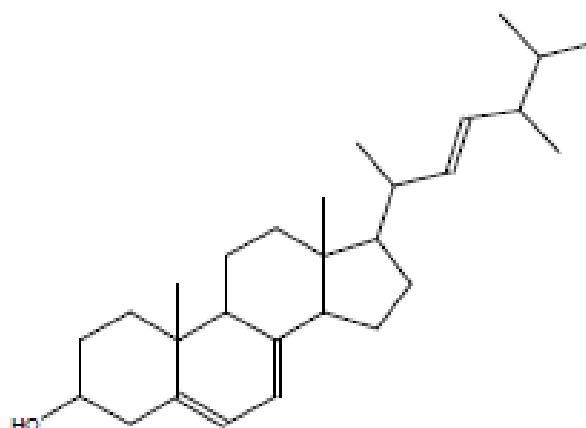


Hit 1 : Ergosterol

C₂₈H₄₄O; MF: 836; RMF: 843; Prob: 83.4%; CAS: 57-87-4; Lib: mainlib; ID: 31914.



(mainlib) Ergosterol



Name: Ergosterol

Formula: C₂₈H₄₄O

MW: 396 CAS#: 57-87-4 NIST#: 229095 ID#: 31914 DB: mainlib

Other DBs: Fine, HODOC, EINECS

Contributor: Japan AIST/NIMC Database- Spectrum MS-NW-1727

10 largest peaks:

69 999 | 363 811 | 55 779 | 396 696 | 253 501 |
43 477 | 81 473 | 143 432 | 41 407 | 146 366 |

Synonyms:

1.Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3 β ,22E)-

2.Ergosterin

3.Provitamin D

4.Provitamin D2

5.(3 β)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol

6.(3 β ,22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol

7.(22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3-ol #

Anexo 5: Aprovação do comitê de ética



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 24 de fevereiro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 01/2011

Prezado Senhor,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa **"Estudo do Potencial Anti-Leishmania e Anti-Trypanosoma cruzi de Moléculas Isoladas de Basidiomicetos: Uma Busca por Alvos Terapêuticos"**, sob sua coordenação, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Adriano Abbud
Coordenador da CEUA-IAL/Pasteur

Ilmo. Sr.
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso
Pesquisador Científico
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355
10º Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3088-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br