



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ

Composição fitoquímica e atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente

TERESINA – PIAUÍ

2017

BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ

Composição fitoquímica e atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior

TERESINA – PIAUÍ

2017

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

Q3c Queiroz, Bárbara Cristina Silva Holanda.
Composição fitoquímica e atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri* : um cogumelo bioluminescente / Bárbara Cristina Silva Holanda Queiroz. -- 2017.
114 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

“Orientação : Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior.”

Bibliografia

1. Produtos naturais. 2. Bioluminescência. 3. Cogumelos. 4. Citotoxicidade. 5. Doenças Negligenciadas. 6. Leishmanioses. I. Título. II. Universidade Federal do Piauí – Teresina.

CDD 615.1

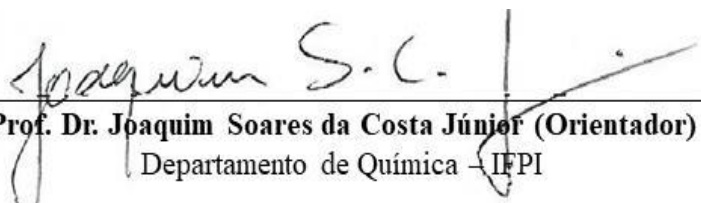
BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ

Composição fitoquímica e atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente

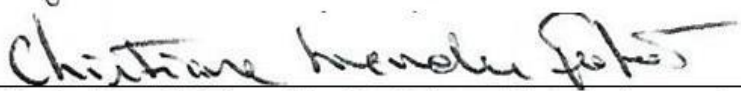
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 21/02/2017

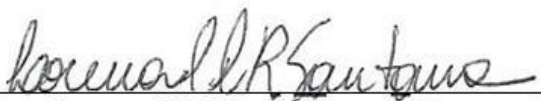
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior (Orientador)
Departamento de Química - IFPI



Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa (Membro interno)
Departamento de Química - UFPI



Profa. Dra. Lorena Citó Lopes Resende Santana (Membro externo)
Setor de Farmácia do Hospital Universitário – HU, UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por estar sempre comigo, por ter me capacitado e renovado minhas forças para conseguir chegar até aqui.

Aos meus pais, Marcelo e Cristina, e a meu irmão, Marcelo Filho, por seu imenso amor e apoio, por serem minha razão e meu alicerce em todos os momentos da vida.

A toda a minha família, especialmente meus avós, tios e primos-irmãos que sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para ajudar no alcance dos meus objetivos e sonhos.

Aos professores Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, Dr. Pedro Marcos de Almeida e Dra. Francielle Martins, por sua excelente orientação, atenção e amizade, por me acolherem tão calorosamente em seus laboratórios, pelos conselhos, conhecimentos e experiências compartilhados. Nossa parceria rendeu além deste mestrado, seus bons frutos.

Às professoras, Dra. Chistiane Mendes Feitosa e Dra. Lorena Citó Lopes Resende Santana, por gentilmente aceitarem o convite para participar como membros da banca. Seus conhecimentos, sugestões e considerações serão de grande valia para este trabalho.

Ao professor Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior, pelas parcerias que me permitiu fazer durante o mestrado.

A todos os meus queridos amigos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais e Laboratório de Atividade Antileishmania, presentes que o mestrado me deu e que levo para a vida.

Ao meu prezado amigo, Michel Muálem, irmão que Deus colocou no meu caminho em momento mais que oportuno, por tudo que vivemos e crescemos juntos nesse ano; por sua imensa dedicação, determinação, amizade, amor ao próximo, sabedoria e alguns “puxões de orelha”, sem os quais este trabalho não teria sido concretizado. Minha admiração e gratidão eternas.

À Maria das Dores Alves de Oliveira e à Débora Cássia, por sua amizade e dedicação, por serem peças fundamentais no desenvolvimento de todo esse trabalho.

Aos amigos do LABGENE-UESPI, Regina, João, Cleiane e Socorro, que além de participarem ativamente deste trabalho, me presentearam com sua amizade e carinho. Obrigada pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

Aos colegas de turma do biênio de 2015-2017, pessoas e profissionais admiráveis.

Aos colegas do LAPGENIC-NTF, por toda ajuda e disponibilidade no tempo em que estive em seu laboratório.

Aos amigos dos tempos de infância e graduação, sempre presentes e que sempre torceram pelo meu sucesso, me incentivaram nos momentos de dificuldade, e que me proporcionam até hoje, os melhores momentos.

À Família Cenáculo do Santuário São Francisco de Assis, por ser minha base espiritual, por todo o suporte dado, por todas as orações e por ser luz, reflexo de Deus, no meu caminho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização de mais essa importante etapa.

*“Mas aqueles que esperam no SENHOR renovam suas forças. Voam alto como águias;
correm e não se fatigam, caminham e não se cansam.
(Isaías, 40:31)*

Composição fitoquímica e atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente. BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ. Orientador: Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. 114p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017.

RESUMO

Neonothopanus gardneri Berk. ex Gardner é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo, sendo amplamente distribuído nas regiões Norte e Nordeste do território nacional. Membros da mesma família e mesmo gênero de *N. gardneri* apresentaram atividades citotóxica contra células tumorais e antimicrobiana, no entanto, não existem relatos acerca da composição química e atividades biológicas de *N. gardneri*. As protozooses são um problema de saúde pública mundial, especialmente em países de terceiro mundo, onde cerca de 15% da população mundial estão sob risco de contraírem estas doenças. Nesse contexto, as leishmanioses são doenças infecto-parasitárias tendo como agente etiológico mais de vinte espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuída, a doença atinge por volta de 88% dos países e atualmente, 12 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 1 a 2 milhões de novos casos surgem a cada ano. Os tratamentos convencionais são onerosos, limitados e possuem uma gama de efeitos colaterais. Produtos naturais vêm sendo investigados de forma massiva para o combate aos danos causados por estas enfermidades. Além disso, existem as doenças causadas por danos ao material genético, como o câncer. Este estudo teve como objetivo realizar *screening* fitoquímico bem como explorar o potencial antileishmania, citotóxico, imunomodulador e genotóxico dos extratos e compostos isolados obtidos de *N. gardneri*. A análise fitoquímica dos extratos revelou a presença predominante de alcaloides, açúcares redutores, taninos e depsídeos. Os extratos e compostos isolados de *N. gardneri* demonstraram significativo potencial antileishmania, inibindo o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e provocando morte das formas amastigotas axênicas em cerca de 100% na concentração de 800 µg/mL para os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila, apresentando resultados de CI_{50} de 17,099; 40,727 e 68,204 µg/mL, respectivamente. Os extratos e isolados também apresentaram redução na viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro, como também promissora atividade imunomodulatória, aumentando a capacidade fagocítica, volume lisossomal e induzindo a síntese de óxido nítrico. Ademais, os extratos acetato de etila e metanólico mostraram significativa atividade citotóxica em células meristemáticas de *A. cepa*. Por fim, *N. gardneri* demonstrou potencial atividade antileishmania *in vitro* e imunomodulatória, bem como atividade citotóxica e mutagênica, sendo este estudo, portanto, o pioneiro na investigação das possíveis propriedades biológicas deste fungo. Explorações futuras devem ser realizadas a fim de elucidar seus mecanismos de ação, bem como avaliar seu potencial terapêutico em diferentes modelos experimentais.

Palavras-chave: Produtos naturais; bioluminescência; cogumelos; citotoxicidade; doenças negligenciadas; leishmanioses.

Phytochemical composition and antileishmanial, cytotoxic, immunomodulatory and genotoxic activities of *Neonothopanus gardneri*: a bioluminescent mushroom. BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ. Advisor: Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. 114p. Master's dissertation. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí-UFPI, 2017.

ABSTRACT

Neonothopanus gardneri Berk. Ex Gardner is the largest bioluminescent fungus in Brazil and one of the largest in the world, being widely distributed in the North and Northeast regions of Brazil. Members of the same family and same genus of *N. gardneri* presented cytotoxic against tumor cells, antimalarial and antimycobacterial activities, however, there are no reports about the chemical composition and biological activities of *N. gardneri*. Protozooses are a worldwide public health problem, especially in third world countries, where about 15% of the world's population are at risk of being infected. In this context, leishmaniasis are infectious and parasitic diseases having as etiologic agents more than twenty parasites species of genus *Leishmania*. Widely distributed, the disease affects about 88% of countries and currently 12 million people are infected with about 1 to 2 million new cases coming up each year. Conventional treatments are expensive, limited, and have a range of side effects. Natural products have been investigated in a massive way to combat the discomfort caused by these diseases. In addition, there are diseases caused by damage to genetic material, such as cancer. This study aimed to perform phytochemical screening as well as to explore the antileishmanial, cytotoxic, immunomodulatory and genotoxic potential of the extracts and isolated compounds obtained from *N. gardneri*. Phytochemical analysis revealed the predominant presence of alkaloids, reducing sugars, tannins and depsides. The extracts and isolated compounds of *N. gardneri* demonstrated significant antileishmanial potential, inhibiting the growth of promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and causing death of axenic amastigote forms in about 100% at the concentration of 800 µg/mL for the isolates Subfraction 2, ether; Subfraction 1, n-butanol and Fraction 1-ethyl acetate, yielding IC₅₀ results of 17.099; 40.727 and 68.204 µg/mL, respectively. The extracts and isolates also showed reduction in the cellular viability of murine peritoneal macrophages and sheep erythrocytes, as well as promising immunomodulatory activity, increasing the phagocytic capacity, lysosomal volume and inducing the synthesis of nitric oxide. In addition, ethyl acetate and methanolic extracts showed significant cytotoxic activity in meristematic cells of *A. cepa*. Finally, *N. gardneri* demonstrated potential antileishmanial activity *in vitro* and immunomodulatory, as well as cytotoxic and mutagenic activity, being this study, therefore, the pioneer in the investigation of the possible biological properties of this mushroom. Future explorations should be done to elucidate their mechanisms of action, as well as assess their therapeutic potential in experimental models.

KEYWORDS: Natural products, bioluminescence, mushrooms, cytotoxicity, neglected diseases, leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Basidiomas (a–d) e culturas (e–f) de *Neonothopanus gardneri* coletadas sob luz natural (esquerda) e no escuro (direita). Escala = 30mm. 21
- Figura 2.** Espécimes de *N. gardneri* encontrados no Brasil 22
- Figura 3.** Mecanismos postulados envolvidos na bioluminescência de fungos 28
- Figura 4.** Ciclo biológico de protozoário do gênero *Leishmania* 33

CAPÍTULO I

- Figura 1:** Esquema do processo de obtenção dos extratos Ext. AcOEt e Ext. MeOH a partir de corpos de frutificação de *N. gardneri* liofilizados 48
- Figura 2:** Esquema do processo de obtenção do Ext. EtOH e partições a partir de corpos de frutificação de *N. gardneri* não liofilizados 49
- Figura 3:** Esquema do processo de obtenção das frações e subfrações isoladas a partir das partições P-Éter, P-AcOEt e P-n-but do Ext. EtOH de *N. gardneri*. 50

CAPÍTULO II

- Figura 1:** Atividade antileishmania dos extratos Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* 72
- Figura 2:** Atividade antileishmania dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* sobre formas promastigotas de *L. amazonenses* 74
- Figura 3:** Atividade antileishmania dos extratos Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonenses* 75
- Figura 4:** Atividade antileishmania dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* 76

Figura 5: Efeito dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de <i>N. gardneri</i> sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	77
Figura 6: Efeito dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	78
Figura 7: Efeito dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de <i>N. gardneri</i> sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro	79
Figura 8: Efeito dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro	80
Figura 9: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de <i>N. gardneri</i>	81
Figura 10: Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i>	82
Figura 11: Atividade lisossomal de macrófagos tratados com Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de <i>N. gardneri</i> em macrófagos peritoneais murinos	83
Figura 12: Atividade lisossomal dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> em macrófagos peritoneais murinos	83
Figura 13: Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico pelos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de <i>N. gardneri</i> sobre macrófagos peritoneais murinos	85
Figura 14: Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico pelos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> em macrófagos peritoneais murinos	85

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Testes realizados para caracterização fitoquímica dos extratos de *N. gardneri* 52

Tabela 2: Screening fitoquímico dos extratos Ext. AcOEt, Ext. MeOH e Ext. EtOH de *Neonothopanus gardneri* 53

CAPÍTULO II

Tabela 1: Concentração inibitória média (CI₅₀), concentração citotóxica média (CC₅₀) e concentração hemolítica média (CH₅₀) dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH, e Ext. AcOEt e dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* 73

CAPÍTULO III

Tabela 1: Valores dos índices mitóticos e médias das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, observados após a exposição por 24 h ao extrato acetato de etila do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* em diferentes concentrações. 101

Tabela 2: Valores dos índices mitóticos e médias das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, observadas após a exposição por 24 h ao extrato metanólico do cogumelo *N. gardneri* em diferentes concentrações. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Anf-B	Anfotericina B
AC	Alterações cromossômicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.O.D.	Biochemical oxygen demand
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CC ₅₀	Concentração citotóxica média
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CH ₅₀	Concentração hemolítica média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CO ₂	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
Ext. AcOEt	Extrato Acetato de Etila
Ext. EtOH	Extrato etanólico
Ext. MeOH	Extrato metanólico
P-Éter	Partição Éter
P-AcOEt	Partição Acetato de Etila
P-n-but	Partição n-butanol
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN- γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IM	Índice Mitótico
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo

LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MMS	Metilmetanossulfonato
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol- <i>z</i> il]-2,5-difeniltetrazolio
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PBS	Tampão fosfato-salino
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de necrose tumoral-alfa
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS E MEDIDAS

μL	microlitros
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitros
μm	micrômetro
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
cm^2	centímetro quadrado
g	gramas
h	Hora
Kg	quilo
L	litros
Min	minutos
mg	miligramas
mg/Kg	miligramas por quilo
mg/L	miligramas por litro
mL	mililitros
mM	milimolar
mol/L	mol/litro
NaCl	Cloreto de Sódio
N_2	nitrogênio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
O_2	oxigênio
UI/L	unidades internacionais por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 Fungos bioluminescentes	25
3.2 Bioluminescência: mecanismo e significado adaptativo	26
3.3 Aplicação ecotoxicológica e biológica de fungos bioluminescentes	28
3.4 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)	30
Leishmaniose	33
3.5 Resposta imune à leishmaniose	34
3.6 Estudos de Toxicidade e Genotoxicidade	35
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO I: OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, COMPOSTOS ISOLADOS E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE <i>Neonothopanus gardneri</i>: UM COGUMELO BIOLUMINESCENTE	42
1 Introdução	45
2 Materiais e métodos	47
2.1 Coleta e identificação do material fúngico	47
2.2 Solventes utilizados	47
2.3 Preparação dos extratos, partições e compostos isolados de <i>N. gardneri</i>	47
2.3.1 Obtenção dos extratos acetato de etila (Ext. AcOEt) e metanólico (MeOH) de <i>N. gardneri</i>	48
2.3.2 Obtenção do extrato etanólico (Ext. EtOH), partições e compostos isolados de <i>N. gardneri</i>	48

2.4 Análise por cromatografia	50
2.4.1 Cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC)	50
2.4.2 Cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP)	50
2.4.3 Revelação das cromatoplasas	51
2.4.4 Separações por cromatografia de coluna CC Sephadex®LH-20 e análise por HPLC	51
2.5 Análise fitoquímica dos extratos Ext. AcOEt, Ext.MeOH e Ext.EtOH de <i>N. gardneri</i>	51
3 Resultados e discussão	52
3.1 Caracterização fitoquímica dos extratos Ext. AcOEt, Ext.MeOH e Ext.EtOH de <i>N. gardneri</i>	52
4 Conclusão	57
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO II: ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DE <i>Neonothopanus gardneri</i>: um cogumelo bioluminescente	59
1 Introdução	63
2 Materiais e métodos	65
2.1 Coleta e identificação do material fúngico	65
2.2 Substâncias teste	65
2.3 Solventes utilizados	65
2.4 Animais, parasitos e células	66
2.5 Preparo das soluções-mãe dos extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i> para os ensaios biológicos <i>in vitro</i>	67
2.6 Protocolos experimentais	67
2.6.1 Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> de extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i> sobre formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i>	67
2.6.2 Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> de extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i> sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonenses</i>	67
2.6.3 Determinação da citotoxicidade de extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i> em células de mamíferos	68

2.6.3.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT	68
2.6.3.2 Citotoxicidade de extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i> em eritrócitos de carneiro	69
2.6.4 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos por extratos e compostos isolados de <i>N. gardneri</i>	69
2.6.4.1 Preparo das soluções	69
2.6.4.2 Avaliação da atividade lisossomal	70
2.6.4.3 Determinação da capacidade fagocítica	70
2.6.4.4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico (NO)	70
2.7 Análise Estatística	71
3 Resultados e discussão	72
3.1 Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e dos compostos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> sobre <i>L. amazonensis</i>	72
3.2 Avaliação da atividade citotóxica sobre macrófagos murinos dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila obtidos de <i>N. gardneri</i>	77
3.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos EtOH, MeOH e AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> em eritrócitos de carneiro	79
3.4 Avaliação dos parâmetros de ativação de macrófagos	80
3.4.1 Avaliação da capacidade fagocítica dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila obtidos de <i>N. gardneri</i> sobre macrófagos peritoneais murinos	80
3.4.2 Avaliação da atividade lisossomal dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt, e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila, obtidos de <i>N. gardneri</i> sobre macrófagos peritoneais murinos	82
3.4.3 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico (NO) dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de <i>N. gardneri</i> sobre macrófagos peritoneais murinos	84
4 Conclusão	88
REFERÊNCIAS	89

CAPÍTULO III: ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DOS EXTRATOS METANÓLICO E ACETATO DE ETILA DO COGUMELO BIOLUMINESCENTE <i>Neonothopanus gardneri</i> EM <i>Allium cepa</i> L.	93
1 Introdução	97
2 Material e Métodos	99
2.1 Coleta e Identificação do material fúngico	99
2.2 Substâncias teste e material biológico	99
2.3 Protocolo experimental: Ensaio <i>Allium cepa</i>	99
2.4 Análise Estatística	100
3 Resultados e discussão	101
4 Conclusão	106
REFERÊNCIAS	107
PERSPECTIVAS	109
PRODUÇÃO CIENTÍFICA NA VIGÊNCIA DO MESTRADO	110
ANEXOS	114
ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em experimentação animal - UFPI	

1 INTRODUÇÃO

A quimiluminescência e a bioluminescência são processos muito importantes do ponto de vista químico e biológico, constituindo modelos particularmente interessantes para diversas pesquisas multidisciplinares, tais como estudos sobre os mecanismos de conversão de energia química, estrutura e função das proteínas, evolução das enzimas, fotoecologia e material educativo. A bioluminescência de fungos, emissão de luz visível a olho nu, tem sido conhecida ao longo dos séculos, desde os tempos de Aristóteles (384-322 a.C.) e Plínio (23-79 d.C.). Várias espécies de bactérias, fungos, insetos, crustáceos, moluscos, celenterados, peixes, algas primitivas, vermes terrícolas e marinhos são descritos como bioluminescentes (BONDAR et al., 2012; STEVANI et al., 2013).

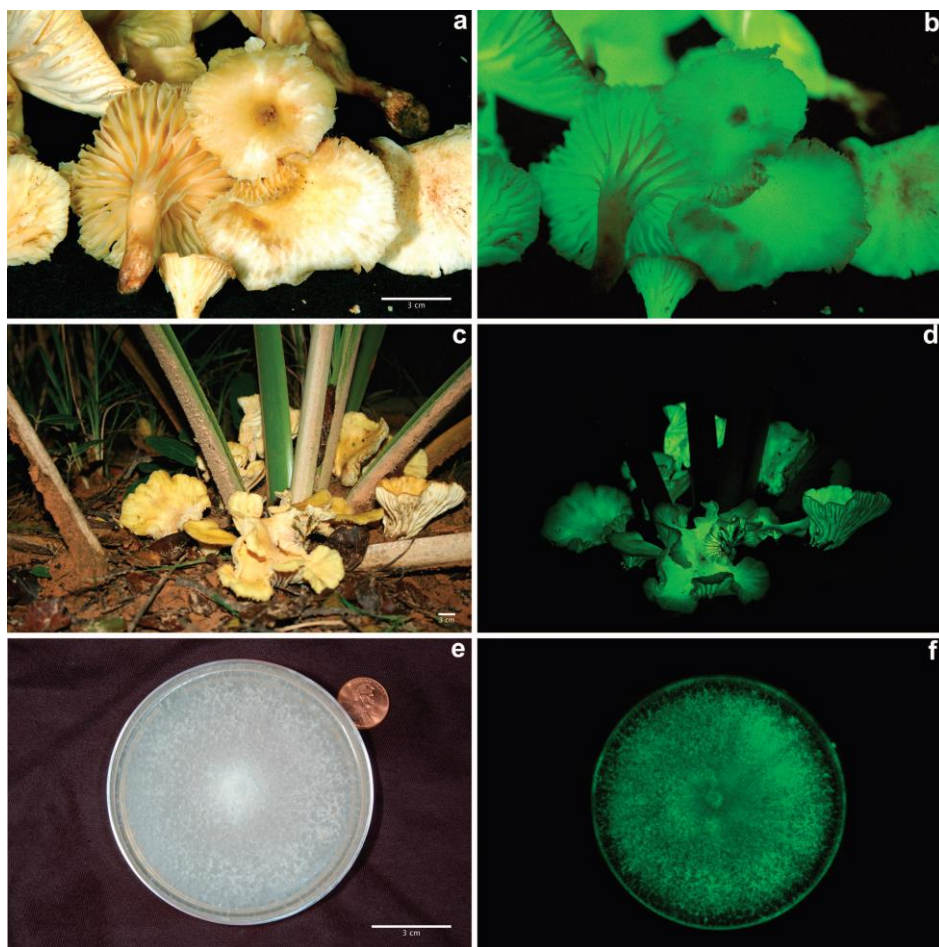
Em relação à bioluminescência de fungos, existem muitos registros históricos sobre a emissão de luz em madeira e outros materiais celulósicos em decomposição. Em 2013, apenas 71 espécies de fungos foram conhecidas como sendo terrestres e bioluminescentes. Elas pertencem a quatro linhagens evolutivas distintas na ordem Agaricales: 52 de *Micenoide* (Ásia, Europa, Américas, África, Caribe, Austrália e Ilhas do Pacífico), 5 de *Armillaria* (um nativo do Sul / Sudeste da Ásia e quatro da Europa / América do Norte), 12 de *Omphalotus* (Ásia, Europa, Américas, Caribe e Austrália) e 2 a partir de *Lucentipes* (*Gerronema viridilucens* e *Lucentipes mycena* encontrado no Brasil) (OLIVEIRA et al., 2013).

A bioluminescência de fungos depende de quatro componentes, ou seja, um substrato (luciferina), uma solúvel redutase NAD (P) H- dependente, uma oxigenase ligada à membrana (luciferase), e de oxigênio. A luciferina ativa pode ser extraída a partir de micélio cultivado, utilizando tampão de citrato de ebulição sob uma atmosfera de argônio para impedir a oxidação. As enzimas também podem ser parcialmente purificadas a partir do micélio cultivado utilizando tampão fosfato frio, e a redutase e a luciferase subsequentemente separadas por ultracentrifugação, porque a luciferase é uma proteína de membrana insolúvel (OLIVEIRA; STEVANI, 2009).

Neonothopanus gardneri é o maior cogumelo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo, pertence à linhagem *Omphalotus* e exibe excepcionalmente intensa luminescência tanto do micélio quanto de basidiomas. Conhecido popularmente como “Flor de coco”, *N. gardneri* foi descoberto em 1840 por Gardner, que viu garotos brincando com o que pensou serem vagalumes, na cidade de Natividade, em Tocantins (GARDNER, 1840). Este cogumelo, no entanto, foi classificado como *Agaricus gardeni* e não tinha sido visto até então. Em 2011, Capelari e colaboradores encontraram no Piauí o cogumelo que emite luz e

que após um trabalho de reclassificação do fungo com dados moleculares revelou-se tratar do *Neonothopanus gardneri*. Sua distribuição estende-se ao longo da Mata dos Cocais brasileira nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí, que é um bioma de transição entre a Floresta Amazônica e a Caatinga. Os basidiocarpos de *Neonothopanus gardneri* crescem em troncos de Pindobas (*Attalea oleifera*) ou babaçu (*Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011).

Figura 1. Basidiomas (a–d) e culturas (e–f) de *Neonothopanus gardneri* coletadas sob luz natural (esquerda) e no escuro (direita). Escala = 30mm.



Fonte: Capelari et al., 2011.

Figura 2. Espécimes de *N. gardneri* encontrados no Brasil



Fonte: Zmescience, 2015.

Neothopanus nambi Speg. (Marasmiaceae) é um cogumelo venenoso luminescente da mesma família de *Neothopanus gardneri*, que sob condições de pouca luminosidade, brilha com luz que varia do tom verde ao amarelado, sendo visível cerca de 10 a 20 m de distância. *N. nambi* tem se mostrado uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos, como por exemplo, nambinonas A-C, *1-epi*-nambinona B, nambinona D, aurisina A e aurisina K. Os compostos aurisina A e aurisina K exibiram atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* e atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os compostos nambinona C, aurisina A e aurisina K apresentaram citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer NCI-H187. Além disso, aurisina A e aurisina K mostraram citotoxicidade contra as linhagens celulares de colangiocarcinoma (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

No entanto, no que diz respeito à *N. gardneri*, nenhuma investigação acerca dos seus metabólitos e possíveis atividades tem sido relatada na literatura. Este se constitui, portanto, do primeiro estudo de isolamento de substâncias, caracterização fitoquímica e bioatividades de extratos e compostos isolados a partir desse cogumelo. Assim, a compreensão do mecanismo e da natureza dos constituintes envolvidos presentes na química de *N. gardneri* abrirá novas perspectivas de estudos acadêmicos e aplicados.

Muitas classes de princípios ativos foram isoladas de fontes naturais brasileiras. De fato, o Brasil tem o maior total de biodiversidade do mundo, abrangendo acima de 45.000

espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta), 4.680 algas, 32.715 angiospermas, 1.519 de briófitas, 5652 fungos, 30 gimnospermas e samambaias, e 1.239 licófitos. Estas são consideradas fontes de substâncias biologicamente ativas e sua preservação e estudo são de fundamental importância para a descoberta de novos fármacos com potenciais ações farmacológicas, despertando interesse de pesquisadores das áreas química e farmacêutica (DUTRA et al., 2016).

O uso de plantas medicinais para tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas constitui-se de uma longa tradição adotada pela população brasileira. Notavelmente, os compostos derivados de produtos naturais são atualmente empregados na terapia moderna, além de desempenhar um papel importante para a síntese de algumas moléculas mais complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados de fontes naturais, nomeadamente de plantas e microorganismos. Mais recentemente, o uso de novas tecnologias, como as abordagens proteômica e genômica, tem levado a um interesse recorrente em produtos naturais tanto do meio acadêmico como de empresas farmacêuticas (HARVEY et al., 2015).

O processo de pesquisa compreende as fases de *screening*, desenho molecular e estudos farmacológicos em busca de uma molécula promissora. Após eleger uma doença-alvo, que apresente mercado atrativo para o novo medicamento que se pretende, iniciam-se as atividades de pesquisa básica – o chamado *screening* de novas moléculas. Servem para determinar um grupo de moléculas ou uma molécula “promissora”, ou seja, que tem grande potencial de interação com o alvo, e que será objeto do desenvolvimento futuro. Dentro da fase de desenvolvimento, estão compreendidos os estudos toxicológicos, clínicos de eficácia e segurança até o patenteamento do fármaco (NEWMAN; CRAGG, 2013).

Um segmento importante na pesquisa de novos fármacos refere-se às doenças negligenciadas e ao câncer. A leishmaniose, uma das principais doenças negligenciadas e infecciosas do mundo, é causada por parasitas do gênero *Leishmania*, que se multiplicam dentro de macrófagos para causar patologias cutâneas e viscerais. A leishmaniose afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas em 88 países e seu controle é um desafio importante para a comunidade científica, governo e iniciativas da indústria. Os antimoniais pentavalentes, o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) seguido de pentamidina e anfotericina B são atualmente as principais estratégias para o tratamento da leishmaniose. No entanto, estes fármacos são administrados por via intravenosa durante períodos prolongados (pelo menos 20 dias), e estão associados com toxicidade fora do

alvo e ocasionalmente baixa eficácia, o que pode levar à falha no tratamento (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2016).

Além disso, está bem estabelecido na literatura que uma maior ocorrência de câncer pode ser correlacionada com um aumento da frequência de danos ao DNA resultantes da exposição humana a agentes xenobióticos. Em geral, as lesões ao DNA podem ser (I) genotóxicas, o que se refere a danos predominantemente moleculares tais como quebras de dupla vertente, reticulações, excisão de base e lesões alcalisilares que podem ser corrigidas por reparação intracelular; ou (II) mutagênico, que se refere ao dano irreversível que se instala permanentemente no DNA, derivado de alterações moleculares tais como lesões clastogênicas ou aneugênicas. Neste sentido, a identificação de compostos antimutagênicos capazes de favorecer os mecanismos intracelulares de reparação e de diminuir a frequência de mutações são de grande valor para proteger futuras gerações de doenças (FEDEL et al., 2014; BIANCHI et al., 2016).

Desse modo, levando-se em consideração o elevado custo para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e a necessidade de pesquisa por novas alternativas terapêuticas, o presente trabalho, intitulado “Composição fitoquímica, atividade antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente” foi dividido em três capítulos, com o intuito primordial de fornecer maior abrangência dos resultados encontrados e torná-los disponíveis a outros grupos de pesquisa, além de dar origem a novos artigos científicos, os quais serão submetidos à publicação em revistas internacionais com extensa divulgação na comunidade científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar *screening* fitoquímico qualitativo, bem como avaliar as atividades antileishmania, citotóxica, imunomoduladora e genotóxica de extratos e compostos isolados obtidos de *Neonothopanus gardneri*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos (etanólico, metanólico e acetato de etila), partições, frações e subfrações isoladas de *N. gardneri* através de técnicas cromatográficas;
- Realizar análise fitoquímica qualitativa dos extratos de *N. gardneri* para presença de açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, polissacarídeos, catequinas, alcaloides, flavonoides, taninos e fenois, carotenoides, saponinas e depsídeos e depsidonas;
- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*;
- Determinar a citotoxicidade de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* em macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro;
- Investigar os efeitos de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* sobre parâmetros de ativação de macrófagos murinos: capacidade fagocítica, volume lisossomal e síntese de Óxido Nítrico;
- Calcular as CI_{50} (concentração inibitória média), CC_{50} (concentração citotóxica média) e CH_{50} (concentração hemolítica média) de extratos e compostos isolados de *N. gardneri*.
- Avaliar as atividades citotóxica e genotóxica dos extratos acetato de etila e metanólico de *N. gardneri* em células meristemáticas de *Allium cepa* L.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos bioluminescentes

A posição única que o reino dos cogumelos mantém na natureza viva foi sagazmente predita pelo botânico francês e micologista Sebastien Vaillant. Fabulosa previsão na virada dos séculos XVII e XVIII, quando nada se sabia sobre bioquímica, para não mencionar genética. No entanto, o desenvolvimento da biologia prova a equidistância do reino dos cogumelos tanto de animais quanto de plantas (BONDAR et al., 2012).

A emissão de luz por organismos vivos tem atraído a atenção da humanidade desde o tempo de Aristóteles (384-322 a. C.) e Plínio (23-79 d. C.). Há uma infinidade de espécies descritas como bioluminescentes (por exemplo, bactérias, fungos, dinoflagelados, animais marinhos e terrestres). Este fenômeno é distribuído em cerca de 700 gêneros de 16 principais filos, predominantemente encontradas nos oceanos. A distribuição de organismos bioluminescentes na árvore filogenética da vida é muito intrigante, uma vez que não há relação aparente ou regra para a sua distribuição (HADDOCK et al., 2010; BONDAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Em relação à bioluminescência fúngica, há muitos registros históricos sobre a emissão de luz de madeira e outros materiais celulósicos em decomposição. Desde 2013, apenas 71 espécies fúngicas são conhecidas por serem terrestres e bioluminescentes. Eles pertencem a quatro linhagens evolutivas distintas na ordem Agaricales: 52 de Micenoide (Ásia, Europa, Américas, África, Caraíbas, Austrália e Ilhas do Pacífico), 5 de *Armillaria* (um nativo da Ásia do Sul / Sudeste e quatro da Europa / América do Norte), 12 da *Omphalotus* (Ásia, Europa, Américas, Caribe e Austrália) e 2 de Lucentipes (*Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes* encontrados no Brasil) (OLIVEIRA et al., 2015).

Todos os fungos bioluminescentes descritos até à data, com exceção de alguns fitopatógenos (por exemplo, *Armillaria mellea* e *Mycena citricolor*) são saprotróficos. Eles podem ser encontrados em áreas tropicais e temperadas, onde a alta umidade e clima quente favorece sua reprodução, crescimento e sobrevivência. Todas as espécies são basidiomicetos Agaricales de “podridão branca” (*white-rot*), que produzem corpos de frutificação (cogumelos) e cujo micélio segrega enzimas extracelulares (isto é, lacases, lignina e peroxidases de manganês) capazes de degradar a lignina (DEHEYN et al., 2007; MENDES; BASTOS; STEVANI, 2010). A distribuição de tecidos luminosos entre espécies fúngicas não é uniforme, em algumas espécies tanto o micélio como todo o basidioma são luminescentes, enquanto em outras espécies apenas certas partes emitem luz. Corpos de frutificação também

podem brilhar apenas a partir do estipe (caule), píleo (tampa) ou lamelas. No entanto, para todas as espécies a luz é emitida como um brilho contínuo (WALDENMAIER et al., 2012).

O maior cogumelo bioluminescente do Brasil, *Neonothopanus gardneri*, pertence à linhagem *Omphalotus* e exibe luminescência excepcionalmente intensa de micélio ou basidiomas. Este fungo está distribuído por toda a Mata dos Cocais nos estados do Maranhão, Tocantins, Goiás e Piauí, que é um bioma de transição entre a Floresta Amazônica e a Caatinga. Corpos de frutificação crescem na base de palmeiras (*Attalea humilis*, *A. funifera* e *Orbignya phalerata*). *Neonothopanus gardneri* caracteriza-se por essa combinação de características: basidiomas de onfalotoides com píleo amarelo a amarelado de 10-90 mm de diâmetro, profundamente decrescentes, distantes, lamelas largas, bem desenvolvidas, estipe excêntrico a central e tecidos de contexto amarelo pálido; basidiosporos hialinos, inamiloides, lisos, globosos com média de $10,2 \times 9,7 \mu\text{m}$ e basidiomas que são fortemente luminescentes (CAPELARI et al., 2011).

3.2 Bioluminescência: mecanismo e significado adaptativo

Apenas recentemente, a emissão de luz por fungos foi confirmada como resultado de um sistema bioluminescente clássico, isto é, pode ser testado misturando um extrato 'frio' rico em luciferase com um extrato 'quente' rico em luciferina em soluções normalmente arejadas, como descrito por Dubois em 1886, ao estudar a bioluminescência de um besouro (Elateridae: *Pyrophorus plagiophthalmus*) (OLIVEIRA et al., 2013).

A bioluminescência fúngica apresenta uma distribuição espectral que corresponde aproximadamente à fluorescência da flavina ($\lambda_{\text{max}}=530 \text{ nm}$) e requer uma luciferina ainda não identificada, um par de redutase dependente de luciferase termolábil / NAD(P)H e oxigênio molecular (DESJARDIN et al., 2010; DUBOIS, 1986).

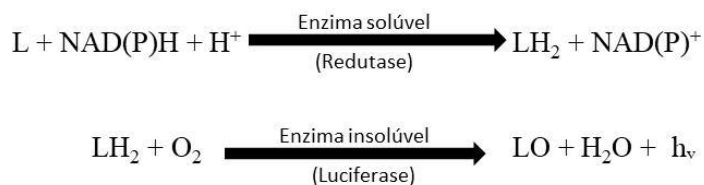
A bioluminescência fúngica depende de quatro componentes, a saber, um substrato (luciferina), uma redutase NAD(P)H dependente solúvel, uma oxigenase ligada à membrana (luciferase) e oxigênio. A luciferina ativa pode ser extraída do micélio cultivado utilizando tampão de citrato em ebulição sob atmosfera de Argônio para evitar a oxidação. As enzimas também podem ser parcialmente purificadas a partir do micélio cultivado utilizando tampão de fosfato a frio, e a redutase e a luciferase subsequentemente separadas por ultracentrifugação, pois a luciferase é uma proteína de membrana insolúvel (AIRTH; FOESTER et al., 1962; OLIVEIRA; STEVANI, 2009).

O substrato das reações bioluminescentes, a luciferina, é também exclusivo de um dado sistema luminescente com exceções notáveis, incluindo coelenterazina e luciferina de

pirilampo. A coelenterazina é a luciferina de alguns organismos bioluminescentes marinhos de seis filos [Sarcomastigophora (protozoa), Cnidaria, Ctenophora, Mollusca, Arthropoda, e Chordata (pisces)]. A luciferina do vagalume ocorre em todas as famílias de besouros bioluminescentes caracterizados (Lampyridae, Elateridae e Phengodidae). Normalmente, tanto a luciferina como a luciferase são utilizadas como termos genéricos para se referir a qualquer substrato e enzima envolvidos num sistema bioluminescente. Além disso, a bioluminescência não deve ser confundida com a quimioluminescência ultra-leve, que é um processo ligado ao estresse oxidativo e à produção de espécies reativas de oxigênio e de carbonila originadas de oxigênio singlete, estados de tripleto, peroxinitrito, peroxidação lipídica e reações entre proteínas heme e peróxidos (SHIMOMURA, 2006; HALIWELL, GUTERRIDGE, 2007).

A bioluminescência em si pode cumprir uma variedade de funções biológicas e ecológicas dependendo do organismo luminoso, incluindo a atração de presas, o aposematismo, a iluminação, a defesa, o ataque, a comunicação, o cortejo sexual ou como um subproduto metabólico simples. Considera-se a luminescência como um subproduto metabólico improvável, dada a existência de uma luciferina e luciferase específicas e considerando, em vez disso, possível significância à luz da biologia de *N. gardneri* e fungos em geral (HASTINGS; WILSON, 2013).

Figura 3. Mecanismos postulados envolvidos na bioluminescência de fungos.



L: luciferina; LH₂: luciferina reduzida; LO: luciferina oxidada

Adaptado de Stevani et al., 2013.

A investigação da bioluminescência fúngica não seria completa sem o exame da sua função ecológica e da sua evolução, o que é particularmente interessante dado que poucas espécies (apenas 71) são luminescentes e estão amplamente distribuídas nos Agaricales (com 9.000 espécies), mas todas partilham de comparáveis mecanismos que conduzem à produção de luz. Ainda mais intrigante, ao contrário da maioria dos outros organismos

bioluminescentes, os fungos não têm meios reconhecidos para detectar sua própria luz ou a luz de outros. Portanto, o significado da bioluminescência fúngica pode provavelmente envolver interações com outros organismos (OLIVEIRA et al., 2015).

Sivinski (1980) realizou uma investigação da interação de artrópodes e fungos luminosos no início da década de 1980, na qual frascos de vidro revestidos com adesivo foram utilizados para cobrir cogumelos e micélios luminescentes, e estas armadilhas foram então colocadas nos locais onde os cogumelos luminosos cresciam. Artrópodes como Collembola e Diptera foram observados mais frequentemente em armadilhas de cola luminescentes do que controles. Em seu trabalho, Sivinski apresentou várias hipóteses para a importância ecológica da bioluminescência fúngica: (1) atrair dispersores de esporos, carnívoros de fungívoros, fungívoros de outros concorrentes fúngicos, ou atração de fertilizantes; (2) repelir fungívoros fototróficos e, (3) como um sinal aposemático. As investigações do significado ecológico da bioluminescência fúngica não têm sido realizadas desde Sivinski nos anos 80. Recentemente, foram realizados experimentos similares no campo para abordar a função ecológica da bioluminescência fúngica em duas regiões geográficas distintas do Brasil com base em trabalhos anteriores relatados por Sivinski (1981) (HASTINGS; WILSON, 2014).

Compreender a bioquímica da produção de luz em fungos ajudará a entender como interpretar mudanças na bioluminescência após exposição a condições ambientais variáveis e contaminantes. A modificação da produção de luz após a exposição à contaminação e, presumivelmente, o estresse, torna os fungos luminosos atrativos para aplicação como ferramentas ecotoxicológicas.

3.3 Aplicação ecotoxicológica e biológica de fungos bioluminescentes

Existem pelo menos 1,5 milhões de espécies de fungos distribuídos em todo o mundo, entre os quais apenas cerca de 100 mil foram cientificamente identificados e catalogados. Os fungos são bem conhecidos por serem um grupo grande e diversificado que desempenha papel essencial nas atividades econômicas, como a fabricação de alimentos e antibióticos, a síntese de compostos orgânicos, enzimas e vitaminas (GADD, 1993; DELUCA, 1977; OLIVEIRA et al., 2012).

Os organismos vivos estão sujeitos a uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos tóxicos no ambiente, tanto de fontes bióticas como abióticas. Estes tóxicos podem afetar a esporulação fúngica e o seu metabolismo, causando alterações na reprodução, crescimento, emissão luminosa (no caso das espécies bioluminescentes), expressão e

atividade das enzimas. As características ambientais também influenciam a toxicidade, dependendo das propriedades físico-químicas do solo, o que pode afetar a disponibilidade de compostos tóxicos (MENDES et al., 2010; ANAHID et al., 2011).

As interações de tóxicos com fungos são amplamente variadas, especialmente devido à grande quantidade de compostos do solo em várias formas de especiação, além da grande variedade e complexidade dos organismos e seus processos metabólicos. Geralmente, a emissão de luz diminui como resposta à exposição a um tóxico, mas em alguns casos também pode aumentar (VYDRYAKOVA et al., 2011).

Os bioensaios toxicológicos fúngicos são úteis para avaliar possíveis mudanças no crescimento, biomassa, reprodução e viabilidade celular e são importantes para auxiliar na prevenção e avaliação da contaminação ambiental causada por produtos químicos potencialmente tóxicos presentes em matrizes ambientais. Além disso, os bioensaios fúngicos podem ajudar no desenvolvimento de fungicidas mais eficientes para controlar os patógenos das culturas e, assim, aumentar a produtividade agrícola (HORWELL et al., 2006; PATON et al., 2006).

Em geral, os estudos toxicológicos que utilizam bioensaios consomem tempo e mão-de-obra, exigindo pessoal treinado para manter os organismos e realizar os experimentos. Assim, é muito interessante investigar e gerar relações de energia livre lineares que podem razoavelmente prever a toxicidade das diferentes classes de substâncias para um organismo alvo específico. Alguns modelos de previsão baseiam-se nas relações quantitativas estrutura-atividade (QSARs, para compostos orgânicos) ou em relações quantitativas de caráter-atividade (QICARs, para espécies inorgânicas) para estimar a toxicidade de compostos não testados para o organismo alvo baseado nos valores anteriormente obtidos. Os valores de EC₅₀ determinados experimentalmente são representados em função das propriedades físico-químicas dos compostos orgânicos e inorgânicos e as relações com os coeficientes de correlação mais elevados são escolhidas (NEWMAN; CLEMENTS, 2008).

No caso de atividades biológicas conhecidas para cogumelos bioluminescentes, temos *Neonothopanus nambi* Speg. (Marasmiaceae), que é um cogumelo luminescente venenoso da mesma família de *Neonothopanus gardneri*. *Neonothopanus nambi* apresentou-se como uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos, tais como nambinonas A-C, 1-epi-nambinona B, nambinona D, aurisina A e aurisina K, os quais exibiram atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, antimicobacteriana contra o *Mycobacterium tuberculosis* e citotóxica contra as linhagens celulares de câncer NCI-H187 e colangiocarcinoma (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

O componente bioativo do cogumelo luminescente *N. nambi* foi extraído e relatado anteriormente (BUA-ART et al., 2010). Vários cientistas relataram a identificação e exploração de compostos bioativos derivados de outros cogumelos luminescentes. Sterner et al. (1997) estudaram a atividade nematicida de uma substância tóxica, a onfalotina de cogumelo luminescente, *Omphalotus olearius*, contra o nematoide de nó de raiz (*M. incognita*). A maioria dos cogumelos luminescentes da família Omphalotaceae liberam a toxina onfalotina que afeta o sistema nervoso de *M. incognita*. Além disso, os cogumelos luminescentes *O. illulens* e *O. olearius* produziram não somente a onfalotina, mas também a illudina S e a illudina M, tóxicas para células cancerosas de ratos (MEYER et al., 2004).

O efeito nematicida de filtrado de cultura e micélios de cogumelos *N. nambi* foi avaliado em larvas infectantes (J2) de *M. incognita* e foi relatado que tanto filtrado de cultura quanto micélios de *N. nambi* causaram elevada percentagem de mortalidade de J2 (BUA-ART, 2007). Da mesma forma, o relatório de Heydari et al. (2006) indicaram que os filtrados de cultura de cogumelo ostra (*Pleurotus ostreatus*) tiveram atividade nematicida e causaram mortalidade de nematoide de nó de raiz *M. javanica*.

Conhecido popularmente como ‘Flor de coco’, o fungo *Neonothopanus gardneri* foi descoberto em 1840 por Gardner, que viu garotos brincando com o que pensou serem vagalumes, na cidade de Natividade, em Tocantins (GARDNER, 1840). Este cogumelo, no entanto, foi classificado como *Agaricus gardeni* e não tinha sido visto até então. Em 2011, Capelari e colaboradores, encontraram no Piauí o cogumelo que emite luz e que após um trabalho de reclassificação do fungo com dados moleculares revelou-se tratar do *Neonothopanus gardneri*. O basidiomiceto é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo (CAPELARI et al., 2011). Os basidiocarpos de *Neonothopanus gardneri* crescem em troncos de Pindobas (*Attalea oleifera*) ou babaçu (*Orbignya phalerata*).

Em virtude dessas atividades relatadas na literatura, apesar dos poucos estudos ainda existentes, esse gênero de cogumelos mostra características promissoras que podem ser testadas em mais tipos de linhagens de células e em outros tipos de parasitas, especialmente os causadores de doenças negligenciadas, que se constituem como um problema de saúde pública no país e no mundo.

3.4 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo diverso de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, custando a economias em desenvolvimento bilhões de dólares

a cada ano. São de maior ocorrência em populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em estreito contato com vetores infecciosos, animais domésticos e gado. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente 17 doenças parasitárias crônicas são classificadas como DTNs: dengue, raiva, tracoma, úlcera de Buruli (infecção por *Mycobacterium ulcerans*), treponematoses endêmicas, hanseníase (doença de Hansen), doença de Chagas (tripanosomíase americana), doença do sono (tripanosomíase africana), leishmaniose, cisticercose, dracunculíase (infecção pelo por alimentos, filariose linfática, oncocercose (cegueira dos rios), esquistossomose (bilharziose) e helmintíases transmitidas pelo solo (DIAS et al., 2013; WHO, 2017).

As DTNs impõem limitações sérias às sociedades atingidas, levando a um panorama de enfermidade, sofrimento, incapacidade e morte, com graves consequências sociais, econômicas e psicológicas para milhões de homens, mulheres e crianças. São doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, haja vista que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (BRITO et al., 2015).

Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2016; WELLS; HUIJSDUIJNEN; BURROWS, 2017).

Há um grande volume de trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética dos parasitas causadores destas doenças, porém todos esses estudos não conseguem ser revertidos em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas. Segundo a *DNDi* (Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas, em português), estas doenças têm sido progressivamente marginalizadas pelos programas de pesquisa tanto do setor público quanto do privado. Ademais, as terapias existentes sofrem de várias deficiências, nomeadamente, alto grau de toxicidade e efeitos indesejados, disponibilidade e acessibilidade limitadas e / ou aplicação problemática nas condições de vida das populações afetadas. O desenvolvimento de medicamentos novos, seguros e acessíveis é, portanto, uma necessidade urgente (BEYRER et al, 2007; LEE; BARTSCH; GORHAM, 2015).

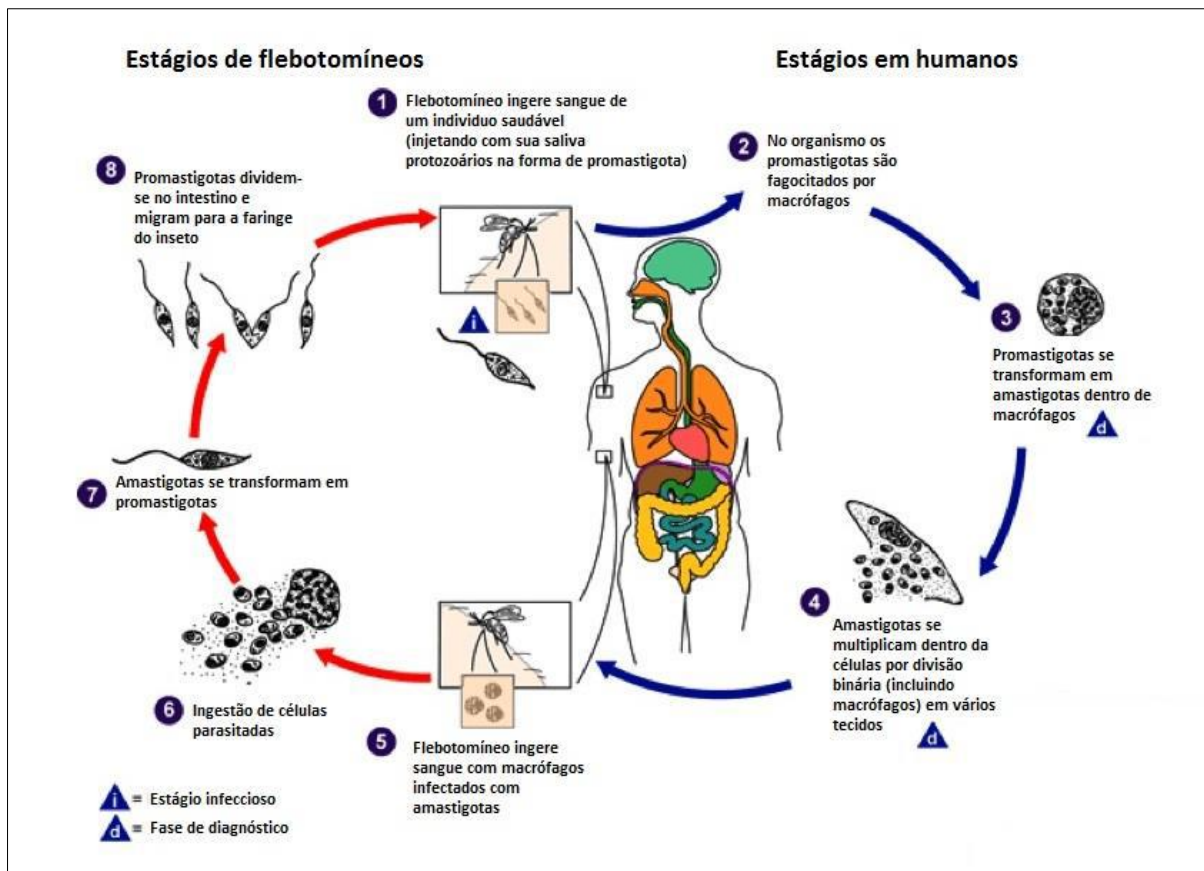
Dentro desse contexto está a leishmaniose, doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A primeira observação do parasita *Leishmania* foi feita por Cunnigham em 1885 e, posteriormente, a descrição foi feita por Leishman (1900) e Donovan (1903) de parasitas encontrados no tecido esplênico de pacientes na Índia (HANDMAN, 1999). Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania* e denominou *Leishmania donovani* o agente causador do calazar (DONOVAN, 1903). No Brasil, o primeiro a relatar a doença e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores foi Cerqueira em 1885, na Bahia (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose é prevalente nas regiões dos trópicos e subtropicais, desde a América Central e Sul até o oeste da Ásia e Sul da Europa (CUNNINGHAM, 2002). Esta parasitose figura como um importante problema de Saúde Pública, endêmica em 88 países, com incidência estimada em 2 milhões de novos casos por ano. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, tem ocorrido a progressão da doença, pois, no período entre 2001 a 2007, foram registrados 185.037 casos de leishmaniose tegumentar e, no ano de 2008, foram notificados 1.580 casos na Região Sudeste (WHO, 2014; SAKTHIANANDESWAREN et al., 2009; METZDORF et al., 2017).

O estado do Piauí, onde a doença é conhecida desde 1934, é um dos principais focos da doença no Brasil. A partir de 1980, observou-se nesse estado uma epidemia que atingiu vasta extensão de seu território, concentrando-se especialmente na área urbana da capital, Teresina (COSTA et al., 1990).

O ciclo de vida dos parasitas de *Leishmania* gira entre o trato digestivo de flebotomíneos, onde residem promastigotas extracelulares infectantes e fagolisossomos de macrófagos, onde promastigotas se transformam em amastigotas intracelulares, que é o estágio responsável pela patologia da leishmaniose. O protozoário *Leishmania* é responsável pelo aparecimento de doenças que variam de lesões cutâneas simples, caracterizadas pelo desenvolvimento de uma úlcera no local da picada, que curam espontaneamente; lesões cutâneas difusas que ocorrem em indivíduos com sistema imunológico deficiente; lesões mucosas com destruição tecidual intensa e lesões viscerais, doença sistêmica severa que quando não tratada, é fatal (HANDMAN, 2001; HANDMAN, 1999; MURRAY et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2012).

Figura 4. Ciclo biológico de protozoário do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

No contexto da saúde pública, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem aumentado significativamente sua importância, devido ao crescente processo de urbanização. Inicialmente, a doença tinha caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte. Em franca expansão geográfica no Brasil, a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma das infecções dermatológicas mais importantes, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar (DIAS et al., 2007; LINDOSO et al., 2014).

O perfil epidemiológico da doença tem sofrido alterações e o contato entre o homem e o parasito foi favorecido pelo desenvolvimento urbano, devastação de florestas, mudanças ambientais, e migração para as áreas endêmicas, aumentando o número de casos em regiões urbanas e periurbanas (ASHFORD, 2000; NEITZKE et al., 2008; TARIKU et al., 2010).

Essas doenças afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (MANJOLIN et al., 2013). Segundo a OMS,

aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de contaminação de leishmaniose (HARHAY et al., 2011; OMS, 2014). No Brasil, do ano de 2005 a 2014, foram confirmados 217.462 casos de leishmaniose tegumentar americana, só no ano de 2014 foram notificados 20.296 casos, a região nordeste notificou nesse mesmo ano 4.969 casos, e o Piauí 85 novos casos (Data SUS, 2016).

O controle das leishmanioses é feito através do combate ao inseto vetor, detecção dos reservatórios e tratamento dos casos humanos (SANTIAGO et al., 2008).

Devido à falta de uma vacina humana confiável, e ao difícil controle de vetores de parasitas e reservatórios, o tratamento baseia-se exclusivamente na quimioterapia, com antimoniais pentavalentes, como drogas de primeira linha, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (PARRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2015).

Novas drogas como miltefosine, um hexadecil-fosfocolina, têm demonstrado eficácia para o tratamento de leishmaniose visceral, muito embora apresentem também alta toxicidade. A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas, dentre as quais se incluem os fitoterápicos (CARNEIRO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

3.5 Resposta imune à leishmaniose

O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra leishmaniose depende de uma rede de cooperação envolvendo a participação de componentes estruturais, moleculares e celulares e a ação coordenada de células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (células T). A primeira barreira contra a infecção é a imunidade inata que é ativada pela fagocitose dos parasitos pelos macrófagos do hospedeiro, essa ação pode direcionar a resposta imune local gerando diferentes formas clínicas da doença. A resposta à infecção parece ser um processo dependente do genótipo e susceptibilidade do hospedeiro (SILVA-ALMEIDA et al., 2010) e da espécie de *Leishmania* (COELHO et al., 2010).

Uma vez dentro dos macrófagos os antígenos são processados e apresentados às células T, isso gera uma resposta do tipo Th₁ ou Th₂ (HERNÁNDEZ-CHINEA, 2007). Essas duas subpopulações são funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas e estão diretamente correlacionadas com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*: o subtipo Th₁, secreta principalmente interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-

12) e interferon gama (IFN- γ); e o subtipo Th₂, secreta interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10) (WILSON et al., 2005).

Um perfil de citocinas tipo Th₁, como IL-2, IFN- γ , IL-12, estará presente em quantidades suficientes para regular a resposta imunológica, ativar os macrófagos e controlar a infecção ainda na pele (WANDERLEY et al., 2012). Todavia, se quantidades excessivas de citocinas tipo Th₂ são produzidas, tais como IL-4, IL-5 e IL-10, haverá uma menor ativação macrofágica e conseqüentemente aparecerão as formas clínicas da doença (ALEXANDER; MCFARLANE, 2008). A predominância da resposta Th₁ na infecção favorece uma doença limitada, enquanto a resposta Th₂, a disseminação da doença. Portanto, o evento crucial para indução da resposta imune protetora contra a leishmania é a eficiente ativação dessas células que estimula a liberação de outras citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que levam à ativação de macrófagos, via IFN- γ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2007).

Além da apresentação de antígeno os macrófagos são as células efetoras na morte de patógenos. Porém, sabe-se que as leishmanias são dotadas de mecanismos que lhes permitem escapar dessas defesas. Sendo um destes, a expressão de receptores de membrana do parasito, as quais impedem a formação do complexo lítico de ataque a sua membrana pelo sistema complemento do hospedeiro. Também são capazes de facilitar a fagocitose e ativar citocinas anti-inflamatórias, inibindo assim a produção de óxido nítrico (NO) (NYLÉN; GAUDAM, 2010).

Outro mecanismo de escape consiste na baixa regulação dos sinais que desencadeiam a resposta antiparasitária, havendo uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos macrófagos, caso contrário, o poder oxidante desses radicais livres atuam na destruição dos parasitos (CASTELLANO, 2005; DEOLINDO, 2008). Essas alterações são benéficas para a sobrevivência do parasito no interior de macrófagos, garantindo a continuidade da infecção. Dessa forma, a leishmania é capaz de subverter a resposta imune, escapando dos mecanismos microbicidas do macrófago.

Além de testar as atividades biológicas e farmacológicas, faz-se necessária a realização de estudos de toxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, a fim de elucidar os mecanismos de ação e efeitos das possíveis alternativas terapêuticas e candidatos a novos fármacos.

3.6 Estudos de Toxicidade e Genotoxicidade

A toxicidade de uma substância em relação a um organismo vivo pode ser compreendida como a capacidade desta em promover danos graves ou morte, havendo uma relação entre concentração e tempo de exposição quando da ocorrência destes danos (BARROS; DAVINO, 2003).

Dentro desse contexto, deve-se considerar que tanto plantas medicinais como fungos, em virtude da presença de xenobióticos, são compostos de substâncias que podem desencadear reações adversas ao organismo, sendo necessário enfrentar a falsa ideia de que os fitoterápicos, por terem seus constituintes obtidos da natureza, possuem uma naturalidade inócua, ou seja, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos. Desta forma, para que os recursos originados da medicina popular possam ser adequadamente incorporados à medicina científica, torna-se imprescindível a avaliação de eficácia e segurança destes produtos, através dos estudos de toxicidade aguda ou crônica (MELLO et al., 2007; SILVA, 2007; MADALOSSO, 2011;).

De acordo com a legislação brasileira para registro de medicamentos fitoterápicos, os testes de toxicidade pré-clínica exigidos são estipulados pelo “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Neste documento, constam, dentre outros, os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração), que devem ser efetuados quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos (BRASIL, 2010).

Além disso, para o desenvolvimento de novos fármacos também são importantes a avaliação dos efeitos genotóxicos e os mecanismos destes para prosseguir investindo ou não no desenvolvimento do fármaco (SNYDER; GREEN, 2001; ROBERTO et al., 2016). Os agentes químicos e físicos podem induzir danos ao DNA. Os danos ao DNA podem ser reparados ou não, se não reparados podem levar a mutações (CHEN et al., 2008; MARIN-MORALES et al., 2016).

A compreensão do reparo, a conversão destas lesões em mutações e outras alterações genéticas, e a quais modificações estas perturbações no DNA ocasionam ao fenótipo da célula devem ser avaliadas como prevenção de instabilidades genéticas. Alguns biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para a avaliação de efeitos agudos e crônicos de diversos agentes químicos, podendo predizer um perfil de segurança e eficácia de novas moléculas (MALUF; ERDTMANN, 2003). Vários testes detectam lesões ao DNA, dentre eles se destacam o teste de Ames (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), o teste de micronúcleos com *Tradescantia* (MIŠÍK et al., 2011), o teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* (NUNES et al., 2006), o teste de *Allium cepa* (CARVALHO et al., 2011), o teste de

micronúcleos com bloqueio de citocinese (FENECH, 2007) e o teste cometa (DHAWAN et al., 2009).

O teste de *A. cepa* apresenta uma boa correlação com outros testes de genotoxicidade, o organismo teste possui cromossomos grandes, em pequena quantidade ($2n=16$) e tem a capacidade de ativar pró-mutágenos (FISKESJÖ, 1985). Com o teste *A. cepa* é possível observar efeitos tóxicos (CARVALHO et al., 2011; HERRERO et al., 2012), citotóxicos (FERNANDES et al., 2007; ROSSATO et al., 2010), genotóxicos e conhecer os mecanismos de ação (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Em estudos recentes, o teste *A. cepa* tem sido utilizado também para analisar os efeitos antígenotóxicos (MALINI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; FELICIDADE et al., 2014; BIANCHI et al., 2015; ROBERTO et al., 2016).

REFERÊNCIAS

- AIRTH, R. L.; FOERSTER, G. E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. **Archives. Biochemistry. Biophysics**, v. 97, p. 567, 1962.
- ALVAR et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. 356-71, 2012.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12, p. 1269-1281, 2000.
- BEYRER, C.; VILLAR, J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S. D.; MILLS, E. J. Neglected Diseases, civil conflicts, and the right to health. **Lancet**, v.18, n.370, p.619–627, 2007.
- BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Informe Técnico. Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n.1, p.200-202, 2010.
- BRITO, S. M. O. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry**, v. 186, p.185–191, 2015.
- CAPELARI, M.; DESJARDIN, D.E.; PERRY, B.A.; ASAI, T.; STEVANI, C.V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, p. 1433–1440, 2011.
- CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA A. P. L.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.
- CROFT, S; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p.502-508, 2003.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 399, 2006.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p.132-141, 2002.
- DANTAS-TORRES, et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, 531-538, 2012.
- DATA SUS – **Leishmaniose Tegumentar – casos**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>>. Acesso em 02 mar 2016.
- DESJARDIN, D. E. et al. Luminescent *Mycena*: new and noteworthy species. **Mycologia**, v. 102, p. 459, 2010.

- DIAS, E. S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SILVA, J. C.; MONTEIRO, E. M.; PAULA, K. M.; GONÇALVES, C. M.; BARATA, R. A. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.
- DIAS, L.C.; DESSOY, M.A.; GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v.36, n.10, p.1552-56, 2013.
- DUTRA, R. C. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>> , 2017.
- GARDNER, G. Description of a new phosphorescent species of *Agaricus*, with remarks upon it by the Rev. MJ Berkeley. Hooker, **Journal of Experimental Botany**, v. 2, p. 426-428, 1840.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- HADDOCK, S. H.; MOLINE, M. A.; CASE, J. F. Bioluminescence in the sea. **Annual Review of Marine Science**, v. 2, p. 443-93, 2010.
- HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, v. 44, p.1-39, 1999.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 403-409, 2011.
- HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D., SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n.10, p.1018-1027, 2007.
- KANOKMEDHAKUL, S. et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 39, p. 8261-8266, 2012.
- LEE, B. Y.; BARTSCH, S. M.; GORHAM, K. M. Chapter Eight – Economic and Financial Evaluation of Neglected Tropical Diseases. **Advances in Parasitology**, v. 87, p. 329-417, 2015.
- LINDOSO, J. A.; COSTA, J. M.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 6, p. 147-154, 2014.
- MANJOLIN, L.C. et al. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2253–2262, 2013.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising antileishmania delivery system loaded with a

natural Brazilian product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 123, p. 195–204, 2016.

MENDES, L. F.; BASTOS, E. L.; STEVANI, C. V.; prediction of metal cation toxicity to the bioluminescent fungus *gerronema viridilucens*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 29, p. 2177, 2010.

METZDORF, I. P. et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.013>>, 2017.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAKAMURA C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.

NEITZKE, H. C.; SCODRO, R. B. L.; CASTRO, K. R. R.; SVERSUTTI, A. C. D.; SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 17-22, 2008.

OLIVEIRA, A. G. et al. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 314-319, 2013.

OLIVEIRA, A.G.; STEVANI, C.V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 1416–1421, 2009.

OLIVEIRA, A. G. et al. Circadian Control Sheds Light on Fungal Bioluminescence. **Current biology**, v. 25, 964–968, 2015.

OMS (Organização mundial de Saúde) – **Report of the Fifth Consultative Meeting On Leishmania/HIV Coinfection-Addis Ababa, Ethiopia: 20-22, 2007.**

PARRA, M. G.; FIDALGO, L. M.; MARTINEZ, J. M.; ALVAREZ, A. M. M.; IGLESIAS, O. V. Leishmanicidal activity of *Echinaster* (*Othilia*) *echinophorus* crude extract. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 89-93, 2010.

PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.C.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de *N*-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365-371, 2003.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-553, 2003.

- RODRIGUES, K. A. et al. *Sygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit antileishmanial activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.
- SAKTHIANANDESWAREN A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends In Parasitology**, v. 25, n. 8, p.383-391, 2009.
- SANTIAGO, M. A.; RIBEIRO, F.C.; MOUTA-CONFORT, E.; NASCIMENTO, L. D.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F.; BERTHO, A. L. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. **Veterinary parasitology**, v. 154, n. 3, p. 341-346, 2008.
- SILVA, E. A. M. Utilização de DNA p36 (lack) na indução de resposta imune e na proteção contra infecção por *Leishmania chagasi* em camundongos balb/c. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.
- STEVANI, C.V. et al. Current Status of Research on Fungal Bioluminescence: Biochemistry and Prospects for Ecotoxicological Application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, p.1318–1326, 2013.
- TARIKU, Y.; HYMETE, A.; HAILU, A.; ROHLOFF, J. Essential-Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 1009-1018, 2010.
- WELLS, T.N.C., et al. New Models of Drug Discovery and Development for Neglected Disease Populations. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2017.
- WILSON, T.; HASTINGS, J.W. **Bioluminescence – Living Lights, Lights for Living**. (Cambridge: Harvard Press), 2014.

CAPÍTULO I – Obtenção dos extratos, compostos isolados e análise fitoquímica de *Neonothopanus gardneri*: um cogumelo bioluminescente



**OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, COMPOSTOS ISOLADOS E ANÁLISE
FITOQUÍMICA DE *Neonothopanus gardneri*: UM COGUMELO BIOLUMINESCENTE**

**QUEIROZ, B.C.S.H¹.; OLIVEIRA, M.D.A².; MACHADO, N. S.³.; STEVANI, C.V.⁴.;
CARVALHO, F.A.A.⁵.; ALVES, M.M.M.⁶.; COSTA JÚNIOR, J.S.⁷**

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Pós-graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, CEP: 64.002-150, Teresina.

⁴Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP: 05008-000, Butantã, São Paulo, Brasil.

⁵Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁶Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁷Laboratório de Química de produtos naturais, Instituto Federal do Piauí, CEP: 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

A identificação de componentes ativos presentes em fungos e plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia. Várias substâncias extraídas de fungos são responsáveis por sua aplicabilidade em áreas como alimentação e saúde, o que tem servido de estímulo ao desenvolvimento do estudo químico de muitos destes organismos. *Neonothopanus gardneri* (Berk. ex Gardner) é um cogumelo bioluminescente pertencente à família Marasmiaceae, sendo considerado o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo. *Neonothopanus nambi* Speg. (Marasmiaceae) é um cogumelo venenoso luminescente da mesma família de *N. gardneri*, que tem se mostrado uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos com atividade biológica. No entanto, nenhuma investigação acerca dos metabólitos ativos de *N. gardneri* tem sido relatada. Desse modo, este estudo teve como objetivo obter os extratos, partições e compostos isolados de *N. gardneri*, bem como realizar a análise fitoquímica qualitativa dos extratos obtidos. Após a coleta no povoado Mimoso (São Francisco, Maranhão, Brasil), os cogumelos foram lavados e congelados. Parte do material foi submetida à liofilização, com a qual preparou-se dois extratos: acetato de etila (Ext. AcOEt) e extrato metanólico (Ext. MeOH). Com a parte não liofilizada, preparou-se o extrato etanólico (Ext. EtOH). As partições, frações e subfrações isoladas de *N. gardneri* foram obtidas através de cromatografia clássica. A análise fitoquímica foi realizada para detecção de açúcares

reduzores, proteínas e aminoácidos, polissacarídeos, catequinas, alcaloides, flavonoides, taninos e fenois, carotenoides, saponinas e depsídeos/depsidonas. Foi observada a presença de alcaloides e açúcares reduzores nos três extratos (Ext. AcOEt, Ext. MeOH e Ext. EtOH). A presença de proteínas/aminoácidos, catequinas e depsídeos/depsidonas ficou restrita a dois dos extratos (Ext. MeOH e Ext. EtOH). Taninos foram detectados apenas no Ext. MeOH. A presença dos metabólitos secundários encontrados nos extratos que remetem à diversas propriedades farmacológicas já conhecidas, servem de pressuposto para novas pesquisas envolvendo possíveis atividades biológicas e terapêuticas de *N. gardneri*, assim como da caracterização química mais detalhada deste cogumelo bioluminescente.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, bioluminescência, cogumelos, fitoquímico, *N. gardneri*.

ABSTRACT

The identification of active compounds present in fungi and plants, as well as their mechanisms of action, has been one of the major challenges for pharmaceutical chemistry, biochemistry, toxicology and pharmacology. Several substances extracted from fungi are responsible for their applicability in areas such as food and health, which has stimulated the development of chemical studies of many of these organisms. *Neonothopanus gardneri* (Berk. Ex Gardner) is a bioluminescent mushroom belonging to the Marasmiaceae family, considered the largest bioluminescent fungus in Brazil and one of the largest in the world. *Neonothopanus nambi* Speg. (Marasmiaceae) is a luminescent poisonous mushroom from the same family of *N. gardneri*, which has been shown to be a rich source of cytotoxic sesquiterpenes with biological activity. However, no investigation of the active metabolites of *N. gardneri* has been reported. Thus, this study aimed to obtain extracts, partitions and compounds isolated from *N. gardneri*, as well as perform the qualitative phytochemical analysis of the extracts obtained. After collection in Mimoso village (Saint Francisco, Maranhao, Brazil), the mushrooms were washed and frozen. Part of the material was subjected to lyophilization, with which two extracts were prepared: ethyl acetate (AcOEt Ext.) and methanolic extract (MeOH Ext.). With the non-lyophilized portion, the ethanolic extract (EtOH Ext.) was prepared. Partitions, fractions and subfractions isolated from *N. gardneri* were obtained through classical chromatography. The phytochemical analysis of the extracts was carried out to detect reducing sugars, proteins and aminoacids, polysaccharides, catechins, alkaloids, flavonoids, tannins and fenois, carotenoids, saponins and depsides. It was observed the presence of alkaloids and reducing sugars in the three extracts (AcOEt Ext., MeOH Ext. and EtOH Ext.). The presence of proteins / aminoacids, catechins and depsides / depsidones was restricted to two of the extracts (MeOH Ext. and EtOH Ext.). Tannins were detected only in MeOH Ext. The presence of the secondary metabolites found in the extracts that refer to various pharmacological properties already known, are a prerequisite for new research involving possible biological and therapeutic activities of *N. gardneri*, as well as the more detailed chemical characterization of this bioluminescent mushroom.

KEYWORDS: Natural products, bioluminescence, mushrooms, phytochemical, *N. gardneri*.

1 Introdução

O uso de plantas medicinais e fungos para curar enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Dessa forma, as observações populares quanto ao uso, bem como pesquisas, contribuem para a descoberta de novos fármacos (LÓPEZ, 2006). A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos efetivos no tratamento de algumas patologias ainda sem tratamento adequado ou que possam substituir os existentes sem muitos ônus ou dotados de menores efeitos colaterais têm impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes buscas nesse âmbito. Os produtos naturais ainda desempenham um papel significativo na descoberta de novas drogas e no desenvolvimento desta área (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

A identificação de componentes ativos presentes em fungos e plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia. A busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças é um área de interesse crescente de diversos grupos de pesquisa (BRAZ FILHO, 2010).

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas indústrias farmacêuticas nos últimos anos. As pesquisas existentes com esses produtos têm contribuído de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (NEWMAN; CRAGG, 2013).

Várias substâncias extraídas de fungos são responsáveis por sua aplicabilidade em áreas como alimentação e saúde, o que tem servido de estímulo ao desenvolvimento do estudo químico de muitos destes organismos. Os compostos resultantes do metabolismo podem ser classificados em metabólitos primários que são os glicídios, proteínas e lipídios, estudados principalmente no âmbito da bioquímica, e metabólitos secundário, que são os compostos terpênicos, alcalóides, flavonóides, taninos, glicosídeos e vários outros estudados dentro do que se convencionou denominar química de produtos naturais (SILVA, 2010).

Neonothopanus gardneri (Berk. ex Gardner) é um cogumelo bioluminescente pertencente à família Marasmiaceae. Conhecido popularmente como ‘Flor de coco’, o fungo foi descoberto em 1840 por Gardner, que viu garotos brincando com o que pensou serem vagalumes, na cidade de Natividade, em Tocantins (GARDNER, 1840). Este cogumelo, no entanto, foi classificado como *Agaricus gardeni* e não tinha sido visto até então. Em 2011,

Capelari e colaboradores encontraram no Piauí o cogumelo que emite luz e que após um trabalho de reclassificação do fungo com dados moleculares, revelou-se tratar de *Neonothopanus gardneri*. O basidiomiceto é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo (CAPELARI et al., 2011). Os basidiocarpos de *N. gardneri* crescem em troncos de Pindobas (*Attalea oleifera*) ou babaçu (*Orbignya phalerata*).

Neonothopanus Nambi Speg. (Marasmiaceae) é um cogumelo venenoso luminescente da mesma família de *N. gardneri*, que tem se mostrado uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos com atividade biológica, tais como nambinonas A-C, *1-epi*-nambinona B, nambinona D, aurisina A e aurisina K (KANOKMEDHAKUL et al., 2012). No entanto, nenhuma investigação acerca dos metabólitos ativos de *N. gardneri* tem sido relatada.

O presente estudo teve como objetivo obter os extratos, partições e compostos isolados de *N. gardneri*, bem como realizar a análise fitoquímica qualitativa dos seus extratos.

2 Material e métodos

2.1 Coleta e identificação do material fúngico

Espécimes do cogumelo *Neonothopanus gardneri* Berk. ex Gardner foram coletados no povoado Mimoso (Latitude: -6.16667; Longitude: -43.0833), localizado no município de São Francisco (Latitude: 6° 15' 9" S; Longitude: 42° 51' 37" W), estado do Maranhão, Brasil, em bases de coqueiros babaçu (*Orbignya phalerata*), no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização mediante comprovante de registro para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, SISBIO número 54548-1. Os cogumelos foram mantidos congelados a uma temperatura de -20 °C, no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí (IFPI- campus central), sob a responsabilidade do professor Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani e seu grupo de pesquisa do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil), através de análise filogenética e os espécimes estão depositados no Herbário do Instituto de Botânica (SP) (MycoBank MB519818).

2.2 Solventes utilizados

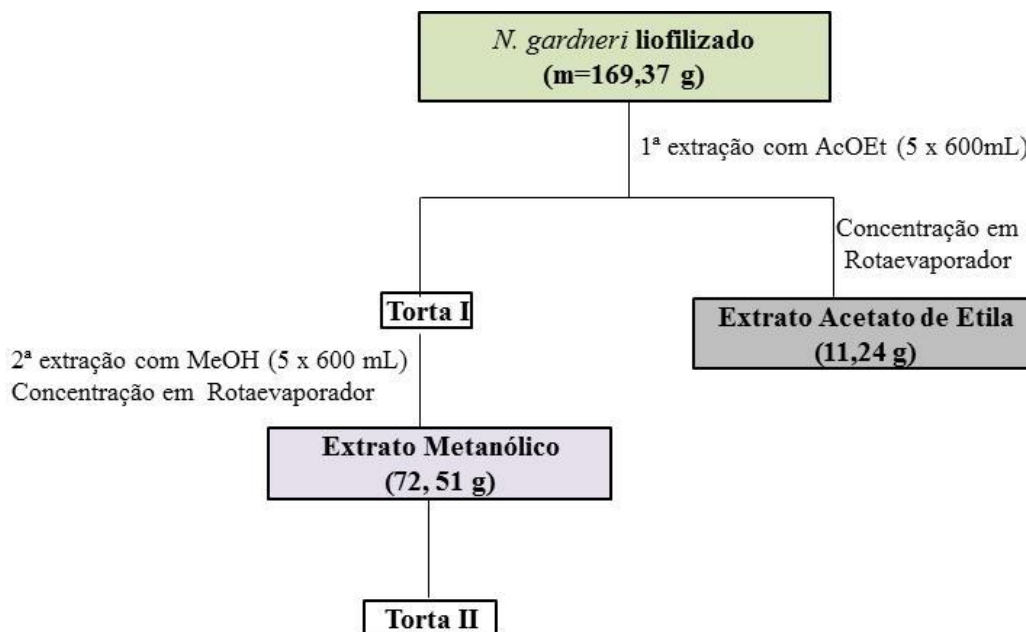
Os solventes utilizados nos processos de extração pertencem às marcas Synth e Dinâmica, P. A. Para as análises em HPLC, utilizou-se metanol, acetonitrila e ácido acético de grau espectroscópico das marcas Vetec[®] e AppliChem Panreac[®]. A água ultra pura empregada foi obtida através do aparelho Elga Purelab Option-Q.

2.3 Preparação dos extratos, partições e compostos isolados obtidos de *N. gardneri*

2.3.1 Obtenção dos extratos acetato de etila e metanólico de *N. gardneri*

Após a coleta, os corpos de frutificação do cogumelo foram retirados e posteriormente congelados em freezer de geladeira a cerca de -20 °C. Para início do processo de extração, os cogumelos foram lavados em água corrente e triturados com auxílio de gral e pistilo. Aproximadamente 169,37 g do material triturado foi submetida à liofilização, com a qual preparou-se dois extratos, segundo a metodologia de Kanokmedhakul et al. (2012): Acetato de Etila (Ext. EtOAc) e Metanólico (Ext. MeOH). O processo de obtenção dos extratos metanólico e acetato de etila está representado na Figura 1.

Figura 1. Esquema do processo de obtenção dos extratos Ext. AcOEt e Ext. MeOH a partir de corpos de frutificação de *N. gardneri* liofilizados.



2.3.2 Obtenção do extrato etanólico, partições e compostos isolados de *N. gardneri*

Neste processo, foram utilizados 426 g do material fúngico triturado, que foi submetido à extração por maceração com 3000 mL de etanol (EtOH, 600 mL, por cinco vezes consecutivas), sendo o extrato etanólico obtido (Ext. EtOH), posteriormente filtrado a temperatura ambiente e o solvente removido por rotaevaporador, sem ultrapassar a rotação de 80 rpm e a temperatura de 60 °C.

O processo de partição do Ext. EtOH deu-se da seguinte maneira: pesou-se 10 g de amostra do extrato etanólico e o mesmo foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, como exposto na Figura 2. Os produtos obtidos das partições, P-Éter (Partição Éter); P-AcOEt (Partição Acetato de Etila) e P-n-but (Partição n-butanol), foram então submetidos à Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se os seguintes eluentes nas respectivas proporções: diclorometano/ hexano 48:52 mL; diclorometano/ etanol 90:10 mL; diclorometano/ metanol 88:12 mL.

Durante o processo de CCDP da partição P-AcOEt, isolou-se uma fração de massa igual a 0,2279 g, e das partições P-Éter e P-n-butanol foram obtidas três frações (F.E1, F.E2 e F.E3; F.b1, F.b2 e F.b3, respectivamente), as quais foram submetidas à CCDC (cromatografia em camada delgada comparativa). A partir desta técnica, verificou-se que as frações F.E2 e

F.E3 eram iguais, logo, as mesmas foram unidas e adicionadas a uma coluna de 3,0 cm de diâmetro contendo, aproximadamente, 15 cm de fase estacionária (Lipophilic Sephadex[®], LH 20100-100G, 25-100 μm , Sigma-Aldrich). A coluna foi eluída com MeOH (100%), obtendo-se duas subfrações puras (SF.E1, $m= 0,0122\text{ g}$ e SF.E2, $m= 0,0034\text{ g}$). A fração F.b2 também foi submetida à Cromatografia em Coluna Sephadex, da qual isolou-se a subfração 1, n-butanol (SF.b1). O fluxograma do processo de partição e obtenção dos isolados está ilustrado na Figura 3. Por fim, as substâncias isoladas serão solubilizadas em metanol de grau espectroscópico, retirando-se uma alíquota de 0,5 mL de cada fração obtida. Essa solução foi filtrada em membrana Chromafil[®] Xtra Macherey-Nagel, PTFE-45/25 e 0,45 μm de espessura e em seguida analisadas por HPLC, dando continuidade ao processo de isolamento de compostos de *N. gardneri* a serem enviados para caracterização química por outros métodos.

Figura 2. Esquema do processo de obtenção do Ext. EtOH e partições a partir de corpos de frutificação de *N. gardneri* não liofilizados

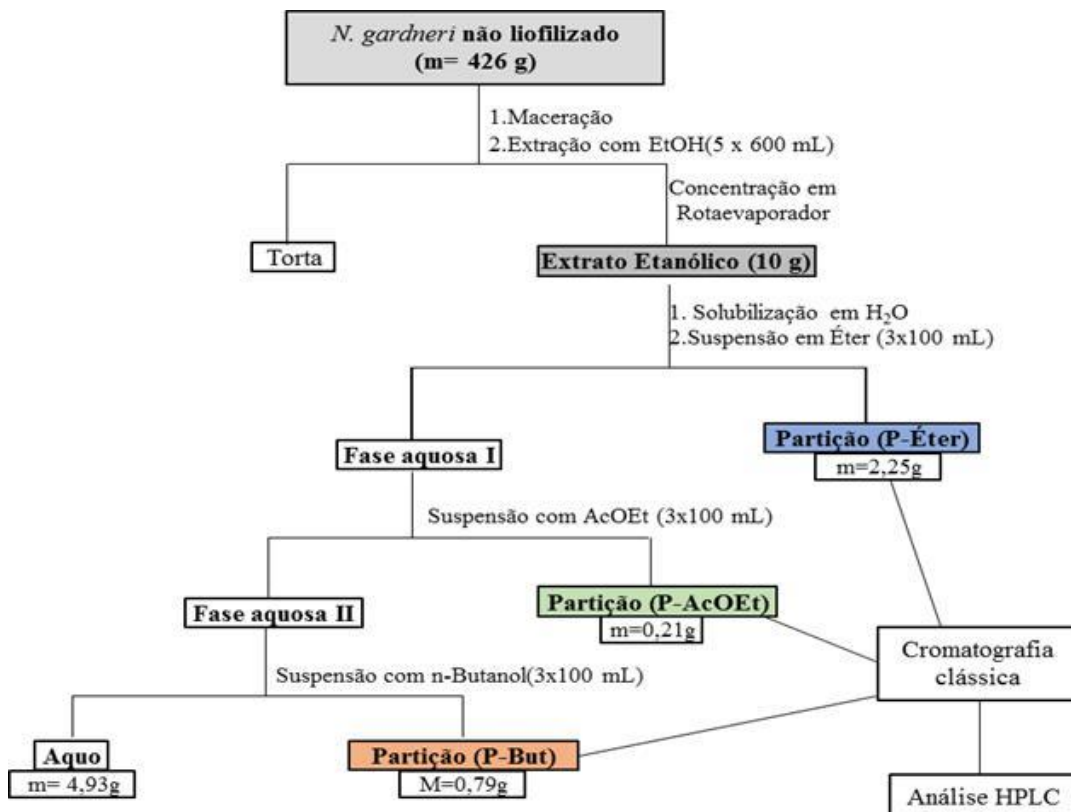
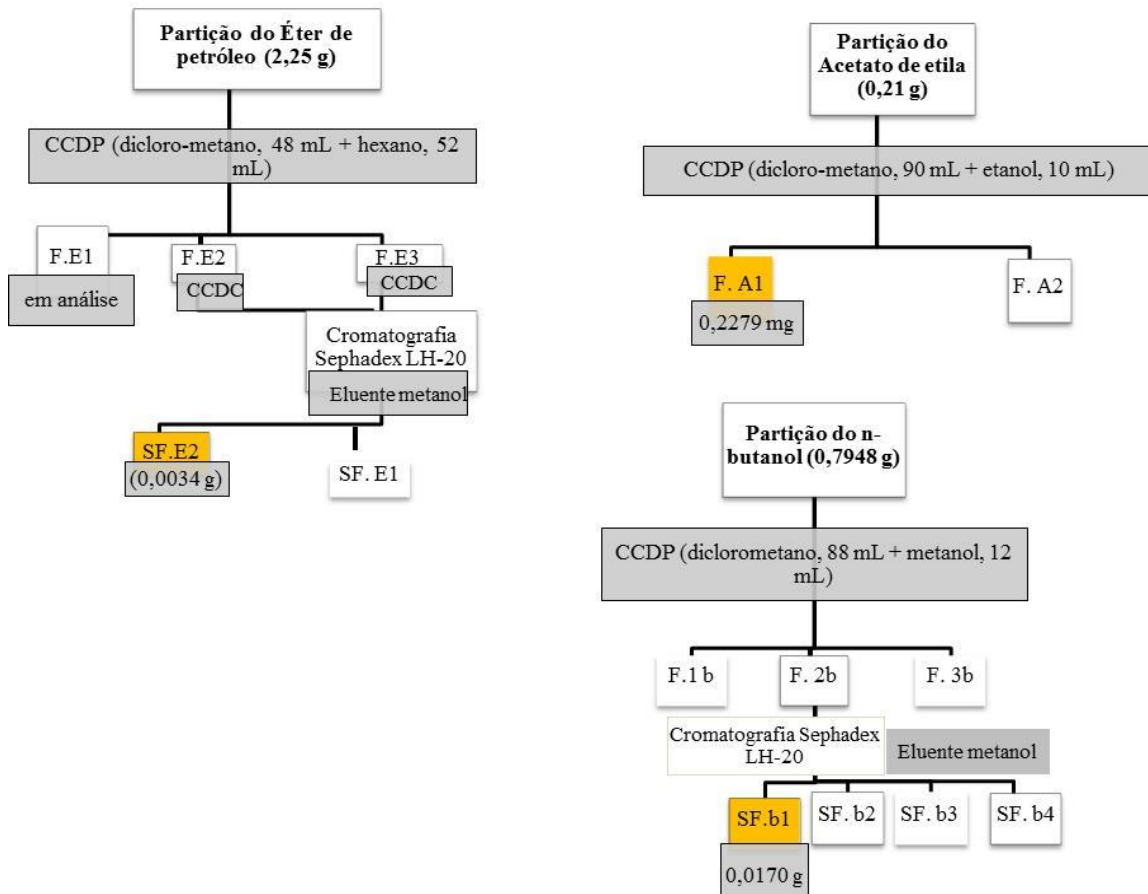


Figura 3. Esquema do processo de obtenção das frações e subfrações isoladas a partir das partições P-Éter, P-AcOEt e P-n-but do Ext. EtOH de *N. gardneri*.



2.4 Análise por cromatografia

2.4.1 Cromatografias em camada delgada comparativa

Utilizou-se esta técnica para análise comparativa das partições éter de petróleo (P-Éter), acetato de etila (P-AcOEt), n-Butanol (P-n-But) e das frações obtidas no decorrer do processo de fracionamento cromatográfico dos extratos do fungo bioluminescente *N. gardneri*.

2.4.2 Cromatografias em camada delgada preparativa

As cromatoplasmas foram preparadas aplicando-se em uma suspensão de sílica gel 60 PF₂₅₄ da marca Fluka, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v) sobre placas de vidro, obtendo-se aproximadamente 25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação das cromatoplasmas, estas repousaram por 12 horas e em seguida foram ativadas em estufa por 60 minutos em temperatura de 60 °C.

2.4.3 Revelação das cromatoplacas:

As cromatoplacas foram reveladas por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

(A) Inspeção em luz ultravioleta: as cromatoplacas foram expostas a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

(B) Solução de vanilina:

Solução. A: Dissolveu-se 1g de Vanilina em Etanol e completou-se o volume para 100 mL.

Solução. B: Diluiu-se 10 mL de H₂SO₄ em Etanol e elevou-se o volume até 100 mL.

No momento da aplicação sobre a placa cromatográfica, retirou-se uma alíquota de cada solução obedecendo à proporção de 1:1.

2.4.4 Separações por cromatografia de coluna CC Sephadex[®] LH-20 e análise por HPLC

Essa técnica foi usada para purificar as frações obtidas após o processo de partição e análise e em CCDC.

Nas análises dos extratos, frações de partição e substâncias puras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, SHIMADZU[®], modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 A, coluna Nuleodur[®] 100-5 Macherey-Nagel, C18, 5µm (250 x 4,6 mm).

2.5 Análise fitoquímica dos extratos acetato de etila, metanólico e etanólico de *N. gardneri*

Foram realizados testes de prospecção fitoquímica para a identificação dos principais metabólitos primários e secundários presentes nos extratos de *N. gardneri*, de acordo com a metodologia descrita por Barbosa et al. (2001), a fim de detectar-se os seguintes compostos: açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, polissacarídeos, catequinas, alcaloides, flavonoides, taninos e fenóis, carotenoides, saponinas e depsídeos. A técnica e os possíveis resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Testes realizados para a caracterização fitoquímica dos extratos de *N. gardneri*

TESTE	TÉCNICA	POSSÍVEIS RESULTADOS
Açúcares redutores	Dissolve-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho-maria em ebulição durante 5 min.	O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores.
Polissacarídeos	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se e adicionou-se duas gotas de lugol.	O aparecimento de coloração azul, indica resultado positivo.
Fenóis e taninos	Dissolveu-se 10 miligramas de extrato seco em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionar 2 gotas de solução alcoólica de FeCl ₃ a 1%.	Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + solução de FeCl ₃). Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.
Flavonoides Geral	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco, em 10mL de metanol. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.	O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.
Alcaloides	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5%. Em seguida, separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionou-se gotas dos reativos de Bouchardat, de Dragendorff e de Mayer.	Resultado para Reativo de Bouchardat: precipitado laranja avermelhado Resultado para Reativo de Dragendorff,: precipitado vermelho tijolo Resultado para Reativo de Mayer: precipitado branco
Catequinas	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 3 mL de metanol. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado.	O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.
Antraquinonas	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de tolueno. Adicionou-se 2 mL de solução de NH ₄ OH a 10%, agitou-se suavemente.	O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.
Depsídeos e depsídonas	Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de éter etílico. Evaporou-se todo o éter em banho-maria juntou-se ao resíduo 3mL de metanol. Agitou-se e adicionou-se 3 gotas de solução de FeCl ₃ a 1%.	O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

Adaptado de Barbosa et al. (2001).

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização fitoquímica dos extratos acetato de etila, metanólico e etanólico de *N. gardneri*

A presença ou ausência dos metabólitos primários e secundários pesquisados de acordo com Barbosa et al. (2001) nos três extratos (acetato de etila, metanólico e etanólico) de *N. gardneri* estão expostas na Tabela 2.

Tabela 2. *Screening* fitoquímico dos extratos Ext. AcOEt, Ext. MeOH e Ext. EtOH de *Neonothopanus gardneri*

Metabólitos	Extrato Acetato de etila	Extrato metanólico	Extrato etanólico
Alcaloides	+	+	+
Açúcares redutores	+	+	+
Flavonoides	-	-	-
Proteínas/aminoácidos	-	+	+
Polissacarídeos	-	-	-
Catequinas	-	+	+
Fenois	-	-	-
Taninos	-	+	-
Depsídeos/depsidonas	-	+	+
Saponinas	-	-	-

+ = presente; - = ausente

Como pode-se observar, foi detectada a presença de alcaloides e açúcares redutores nos três extratos (Ext. AcOEt, Ext. MeOH e Ext. EtOH). A presença de proteínas/aminoácidos, catequinas e depsídeos/depsidonas ficou restrita a dois dos extratos, metanólico e etanólico (Ext. MeOH e Ext. EtOH). Taninos foram detectados apenas no Ext. MeOH. Polissacarídeos, flavonoides, fenois e saponinas não foram detectados em nenhum dos extratos por esta análise.

Conforme Simões et al. (2007), os alcaloides constituem-se de num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, comparável àquela dos terpenoides,

representando 20% das substâncias naturais descritas. A biossíntese desse grupo de metabólitos é extensivamente estudada, contudo muitas rotas metabólicas ainda não foram amplamente delineadas. Normalmente, a formação do sistema heterocíclico dos alcaloides ocorre através de reações inter ou intramoleculares, através de dois mecanismos gerais: reações do tipo Mannich e formação de bases de Schiff (DEWICK, 2009).

A presença de alcaloides pode ser assinalada em ampla gama de atividades biológicas investigadas. Assim, pode-se citar ação anticolinérgica, antihipertensiva, antimalárica, antitumoral, antitussígena, antiviral, dentre outras. Diversos alcaloides são utilizados na terapêutica atualmente, puros ou em associação, e também na forma de derivados e outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos (SIMÕES et al., 2007).

Depsídeos e depsidonas são compostos fenólicos, ocorrendo em líquens e vegetais superiores. Em geral, a biossíntese dos compostos fenólicos de líquens ocorre pela rota do acetatopolimalonato. Xantonas e depsidonas naturais são produzidas também por plantas superiores e fungos. Em fungos e líquens, substâncias das duas classes são biossintetizadas totalmente pela via policetídica. As depsidonas representam um grupo de compostos estruturalmente relacionados aos depsídeos, sendo estes considerados seus precursores. Esses grupos têm sido reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas (HONDA; VILEGAS, 1998; MACEDO et al., 2007; MICHELETTI et al., 2009; MOTA, 2013).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Além disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais. Sua maior parte é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Para alguns derivados fenólicos tem sido relatada atividade antioxidante, cujas evidências têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta (SIMÕES et al., 2007).

Ainda sobre os taninos, sua complexação com proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias, tanto quanto por suas atividades farmacológicas. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, inflamações renais e urinárias, pois acredita-se que tais

características estejam relacionadas, em maior ou menor grau, com dois grupos de taninos, os hidrolisáveis e os condensados, pois tem a capacidade de complexar ferro, vanádio, manganês, cobre e alumínio, ação antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade em complexar com outras moléculas a exemplo de proteínas e polissacarídeos (SIMÕES et al., 2007).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, álcool, acetona e glicerina, e insolúveis em éter puro, clorofórmio e benzeno, alguns dos quais foram utilizados nos processos de extração e partição de *N. gardneri* (MELO; SANTOS, 2001).

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarreico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Ademais, os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcaloides, podem vir a servir de antídoto em casos de intoxicações (BRUNETON, 1991). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO; SANTOS, 2001).

Ademais, em estudo recente realizado por nosso grupo, foi explorada a atividade antileishmania e imunomoduladora dessas moléculas. Ambas demonstraram elevado potencial e eficácia em inibir o crescimento “*in vitro*” de formas promastigotas de *L. major*, demonstraram possuir seletividade aceitável para o parasita em relação às células do hospedeiro (IS > 20) e grande capacidade imunomoduladora, ativando macrófagos e tornando-os efetivos em resolverem a infecção (ALVES et al., 2017).

Também foi detectada a presença de catequinas, que são compostos do grupo dos polifenóis e oxidam facilmente, ou seja, quando a mesma está presente no organismo e encontra um radical livre, logo reagirá com o mesmo evitando a oxidação de células sadias, prevenindo o envelhecimento precoce e doenças relacionadas ao estresse oxidativo (SCHMITZ et al., 2005).

Muitos cogumelos possuem significativo valor nutricional, relacionado à presença de carboidratos, glicoproteínas, vitaminas e minerais, sendo, inclusive, muito utilizados na indústria alimentícia em todo o mundo (FURLANI; GODOY, 2005).

De acordo com Queiroz (2014), quando se inicia o estudo pioneiro com produtos naturais com o objetivo de isolar os princípios ativos, é complexo identificar todos os seus constituintes químicos, que são numerosos. Em um estudo pioneiro é possível que uma planta ou fungo produza milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica. Daí a necessidade de dispor de testes biológicos ou farmacológicos para localizar a atividade procurada no extrato da planta ou fungo e, também, nas frações obtidas nas diferentes etapas de purificação e separação.

4 Conclusão

Ante o exposto, pode-se inferir que a obtenção dos extratos, partições e compostos isolados de *N. gardneri*, bem como os resultados da análise fitoquímica qualitativa, foram de fato relevantes, haja vista que as mesmas eram, até então, desconhecidas. A presença dos metabólitos primários e secundários encontrados nos extratos, como por exemplo, alcaloides, taninos, proteínas/aminoácidos, catequinas e depsídeos/depsidonas que possuem propriedades farmacológicas conhecidas, servem de pressuposto para novas pesquisas envolvendo possíveis atividades biológicas e terapêuticas de *N. gardneri*, assim como da caracterização química mais detalhada deste cogumelo bioluminescente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. M. M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 390, n. 9, p. 893-903, Sep 2017.
- BARBOSA, W. L. R. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.
- BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. AS/Espanha: Ed. Acribia. 594p, 1991.
- CAPELARI, M. et al. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1433-40, 2011.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.
- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. London: John Wiley & Sons, 539 p, 2009.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.
- GARDNER, G. Description of a new phosphorescent species of *Agaricus*, with remarks upon it by the Rev. MJ Berkeley. Hooker, **Journ. Bot**, v. 2, p. 426-428, 1840.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998.
- KANOKMEDHAKUL, S. et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 39, p. 8261-8266, 2012.
- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. v. 1, p. 19- 27, 2006.
- MACEDO, F. M. et al. Triagem fitoquímica barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1166-1168, 2007.
- MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543, 2001.

MICHELETTI, A. C. et al. Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler – isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 12-20, 2009.

MOTA, L. J. T. **Estudo químico e biológico das folhas e galhos de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth (Lamiaceae - Lamiales)**. 2013. 63 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá. Macapá. 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

QUEIROZ, E.F.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K.; VIERA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. 2 ed. EdUFSCar.p.232, 2014.

SCHIMTZ, W.; SAITO, Y. A.; ESTEVÃO, D.; SARIDAKIS, O. H. **Green tea as a chemoprotector**. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-16, 2010.

SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

CAPÍTULO II – Atividade antileishmania,
citotóxica e imunomoduladora de *Neonothopanus*
gardneri: um cogumelo bioluminescente



**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA, CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DE
Neonothopanus gardneri: UM COGUMELO BIOLUMINESCENTE**

**QUEIROZ, B.C.S.H¹.; ALVES, M.M.M².; CARVALHO, F.A.A³.; OLIVEIRA, M.D.A⁴.;
STEVANI, C.V.⁵.; COSTA JÚNIOR, J.S.⁶**

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Pós-graduação em Farmacologia, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

³Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁵Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP: 05008-000, Butantã, São Paulo, Brasil.

⁶Laboratório de Química de produtos naturais, Instituto Federal do Piauí, CEP: 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

As protozooses são um problema de saúde pública mundial, especialmente em países de terceiro mundo, onde cerca de 15% da população mundial estão sob risco de serem infectadas. Nesse contexto, as leishmanioses são doenças infecto-parasitárias tendo como agentes etiológicos mais de vinte espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuída, a doença atinge por volta de 88% dos países e, atualmente, 12 milhões de pessoas estão infectadas com cerca de 1 a 2 milhões de novos casos surgindo a cada ano. Os tratamentos convencionais são onerosos, limitados e possuem uma gama de efeitos colaterais. Produtos naturais vêm sendo investigados de forma massiva no combate aos danos causados por estas enfermidades. *Neonothopanus gardneri* é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo, sendo amplamente distribuído nas regiões Norte e Nordeste do território nacional. Este estudo teve como objetivo explorar o potencial antileishmania, citotóxico e imunomodulador em células de mamíferos, dos extratos e compostos isolados obtidos de *N. gardneri*. Avaliou-se a atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri* e seus isolados Subfração 2, éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1, acetato de etila contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, estabelecendo suas concentrações inibitórias médias (CI₅₀), a produção de óxido nítrico (NO), a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), bem como os seus efeitos citotóxicos em macrófagos murinos e eritrócitos de carneiro. Os extratos e isolados de *N. gardneri* demonstraram significativo potencial antileishmania, inibindo o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e provocando morte das formas amastigotas

axênicas em cerca de 100% na concentração de 800 µg/mL para os isolados Subfração 2, éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila, apresentando resultados de CI_{50} de 17,099; 40,727 e 68,204 µg/mL, respectivamente. Os extratos e compostos isolados também apresentaram redução na viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro, como também promissora atividade imunomodulatória aumentando a capacidade fagocítica, volume lisossomal e induzindo a síntese de óxido nítrico. *N. gardneri* demonstrou potencial atividade antileishmania *in vitro* e imunomodulatória, sendo este estudo, portanto, o pioneiro na investigação das possíveis propriedades biológicas deste fungo. Explorações futuras devem ser feitas para elucidar seus mecanismos de ação, bem como avaliar seu potencial terapêutico em modelos experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais, bioluminescência, cogumelos, citotoxicidade, doenças negligenciadas, leishmanioses.

ABSTRACT

Protozooses are a worldwide public health problem, especially in third world countries, where about 15% of the world's population are at risk of being infected. In this context, leishmaniasis are infectious and parasitic diseases having as etiologic agents more than twenty parasites species of genus *Leishmania*. Widely distributed, the disease affects about 88% of countries and currently 12 million people are infected with about 1 to 2 million new cases coming up each year. Conventional treatments are expensive, limited, and have a range of side effects. Natural products have been investigated in a massive way to combat the damages caused by these diseases. *Neonothopanus gardneri* Berk. Ex Gardner is the largest bioluminescent fungus in Brazil and one of the largest in the world, being widely distributed in the North and Northeast regions of Brazil. This study aimed to explore the antileishmania, cytotoxic and immunomodulatory potential in mammalian cells, of the extracts and isolated compound obtained from *N. gardneri*. The *in vitro* leishmanicidal activity of *N. gardneri* extracts (Ext. EtOH, Ext. MeOH and Ext. AcOEt) and of their isolates (Subfraction 2, ether; Subfraction 1, n-butanol and Fraction 1, ethyl acetate) against promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* was evaluated, establishing their medium inhibitory concentrations (IC_{50}), nitric oxide production (NO), induced nitric oxide synthase expression (iNOS), as well as its cytotoxic effects on murine macrophages and sheep erythrocytes. The extracts and isolated compounds of *N. gardneri* demonstrated significant antileishmania potential, inhibiting the growth of promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and causing death of axenic amastigote forms in about 100% at the concentration of 800 µg/mL for the isolates Subfraction 2, ether; Subfraction 1, n-butanol and Fraction 1-ethyl acetate, yielding IC_{50} results of 17.099; 40.727 and 68.204 µg/mL, respectively. The extracts and isolated compounds also showed reduction in the cellular viability of murine peritoneal macrophages and sheep erythrocytes, as well as promising immunomodulatory activity, increasing the phagocytic capacity, lysosomal volume and inducing the synthesis of nitric oxide. *N. gardneri* demonstrated potential antileishmania activity *in vitro* and immunomodulatory, being this study, therefore, the pioneer in the investigation of the possible biological properties of this fungus. Future explorations should be done to elucidate their mechanisms of action, as well as assess their therapeutic potential in experimental models.

KEYWORDS: Natural products, bioluminescence, mushrooms, cytotoxicity, neglected diseases, leishmaniasis.

1 Introdução

As protozooses são um problema de saúde pública mundial, especialmente em países de terceiro mundo, onde cerca de 15% da população mundial estão sob risco de serem infectadas (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010; KAYE; SCOTT, 2011). Nesse contexto, as leishmanioses são doenças infecto-parasitárias tendo como agente etiológico mais de vinte espécies de parasitas pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; SINGH et al., 2013). Amplamente distribuída, a doença atinge por volta de 88% dos países e atualmente, 12 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de, 1 a 2 milhões de novos casos surgem a cada ano (ALVAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017).

Estes parasitos apresentam ciclo de vida heteróximo, ou seja, vivem alternativamente em hospedeiros vertebrados e em insetos vetores, os flebotomíneos, estes últimos transmitem os parasitos aos hospedeiros vertebrados ao realizar repasto sanguíneo (BARAK et al., 2005; MAURER et al., 2009). Durante seu ciclo de vida, a leishmania apresenta duas formas bioquímica e morfológicamente distintas: as formas amastigotas que são arredondadas e não apresentam flagelo livre, estas são encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado e formas promastigotas, infectantes, que são alongadas e possuem um único flagelo livre, são encontradas no trato digestivo do inseto vetor e podem ser mantidas em cultura axênica, *in vitro* (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MAURER et al., 2009). Dentre as espécies causadoras de leishmanioses, *Leishmania amazonensis* é amplamente difundida e um dos principais causadores de LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana) no Brasil, sendo capaz de provocar infecções híbridas, causando manifestações tegumentares e visceral (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010).

O parasita alberga e se multiplica no interior hostil de células do sistema fagocítico monoclular do hospedeiro vertebrado, atuando através de mecanismos evasivos de imunossilenciamento, tais como, redução da síntese de iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzida) e dicotomia existente entre resposta imune Th1 e Th2. Portanto encontrar um tratamento seguro, eficaz e acessível é de grande preocupação e alta prioridade (MONTALVO et al., 2012; ROY et al., 2014)

Os tratamentos convencionais são onerosos, limitados e possuem uma gama de efeitos colaterais. Por falta de tratamentos seguros e de uma vacina eficaz, a busca por novas alternativas terapêuticas visa não apenas a atividade contra o parasita em si, como também atuar mutuamente com os mecanismos imunológicos do hospedeiro para debelar a infecção e

controlar a parasitemia, sendo, portanto, necessária para atuar em conjunto com as diversas áreas de enfrentamento às doenças negligenciadas (ISLAMUDDIN et al., 2015).

Produtos naturais vêm sendo investigados de forma massiva no combate aos efeitos nocivos causados por estas enfermidades. *Neonothopanus gardneri* é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo, sendo amplamente distribuído nas regiões Norte e Nordeste do território nacional. Estudos de bioprospecção utilizando cogumelos têm demonstrado seu potencial antimicrobiano e antitumoral. *Neonothopanus nambi* Speg. (Marasmiaceae) é um cogumelo venenoso luminescente da mesma família de *Neonothopanus gardneri* e tem se mostrado uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos, os quais apresentam atividade antimalárica, antimicobacteriana e citotóxica contra algumas linhagens celulares de câncer (KANOKMEDHAKUL et al., 2012).

No entanto, ainda não existem relatos da composição química e atividade biológica de *N. gardneri*, sendo este estudo o pioneiro e cujo objetivo foi investigar o potencial antileishmania, citotóxico e imunomodulador em células de mamíferos, dos extratos e compostos isolados obtidos de *N. gardneri*.

2 Material e Métodos

2.1 Coleta e identificação do material fúngico

Espécimes do cogumelo *Neonothopanus gardneri* Berk. ex Gardner foram coletados no povoado Mimoso (Latitude: -6.16667; Longitude: -43.0833), localizado no município de São Francisco (Latitude: 6° 15' 9" S; Longitude: 42° 51' 37" W), estado do Maranhão, Brasil, em bases de coqueiros babaçu (*Orbignya phalerata*), no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização mediante comprovante de registro para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, SISBIO número 54548-1. Os cogumelos foram mantidos congelados a uma temperatura de -20°C, no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí (IFPI- campus central), sob a responsabilidade do professor Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani e seu grupo de pesquisa do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil), através de análise filogenética e os espécimes estão depositados no Herbário do Instituto de Botânica (SP) (MycoBank MB519818).

2.2 Substâncias teste

Para avaliação das atividades antileishmania *in vitro*, citotóxica e imunomodulatória foram utilizados três extratos e três compostos isolados de *N. gardneri*, respectivamente: extrato etanólico (Ext. EtOH), extrato metanólico (Ext. MeOH) e extrato acetato de etila (Ext. AcOEt); Subfração 2, éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1, acetato de etila, em diferentes concentrações.

2.3 Solventes utilizados

Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%, PubChem CID: 679), GIEMSA (PubChem CID: 13735) foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de Schneider (PubChem CID: 2723893, meio RPMI (PubChem CID: 1640), soro fetal bovino (FBS, PubChem CID: 86289556), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio (CID: 370), e os antibióticos penicilina e estreptomicina (PubChem CID 71311919) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.4 Animais, parasitos e células

Foram utilizadas cepas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania, Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, em passagens sucessivas em Camundongos BALB/c e cultivados em meios Schneider's (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 26 °C.

Macrófagos murinos foram elicitados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (20-30g), machos e fêmeas de 4 a 5 semanas de vida, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM/UFPI), mantidos a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após tranquilização e sedação por injeção intraperitoneal de uma associação de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80 mg/Kg de peso vivo) de acordo com a Resolução nº 1000, de 12 de maio de 2012, CRMV (Conselho Regional de Medicina Veterinária).

A retirada dos macrófagos foi feita em capela de fluxo laminar onde o animal, após eutanásia conforme previamente descrito, foi fixado em placa na posição de decúbito dorsal, administrando-se 8 mL de tampão fosfato salino (PBS – NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 9 mM, Na_2HPO_4 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4°C, na cavidade abdominal. Em seguida, foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade para 50 mL, centrifugado a 1000 rpm durante 10 min. Logo em seguida, foi lavado três vezes com PBS estéril na temperatura de 4°C. Para averiguação da viabilidade celular, os macrófagos foram contados em Câmara de Neubauer, com diluição em corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Para o teste de hemólise, coletou-se 4 mL de sangue em tubo com anticoagulante (EDTA) da veia jugular de um carneiro adulto (9 meses de idade), proveniente do biotério central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA – UFPI), mantido sob condições de alimentação balanceada de forragem/pastagem e ração, e água *ad libitum*.

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEAA/UFPI nº 132/16).

2.4 Preparo das soluções-mãe dos extratos e compostos isolados de *N. gardneri* para os ensaios biológicos *in vitro*

Os extratos e compostos isolados de *N. gardneri* foram solubilizados em dimetilsulfóxido – (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, USA), a fim de se obter soluções-mãe de 80 mg/mL. Em cada protocolo, as soluções-mãe foram diluídas nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações desejadas, não ultrapassando a quantidade de 0,2% de DMSO.

2.6 Protocolos experimentais

2.6.1 Atividade anti-leishmania *in vitro* de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram semeadas em placas de cultivo celular com 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmanias por poço. Em seguida, as soluções-mãe dos extratos e isolados foram adicionadas aos poços e realizadas diluições seriadas, atingindo as concentrações de 3.200 a 25 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos, e de 800 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados. As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26 °C por 48 h e, restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 μL de Resazurina® $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, quando incubou-se novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%) (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

2.6.2 Atividade anti-leishmania *in vitro* de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a fase exponencial tardia ou fase estacionária de crescimento foram lavadas uma vez em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, a concentração foi ajustada para 50×10^6 promastigotas por mL em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF), pH 5,5 ou 6,3 em frasco de cultivo celular 25cm² e mantidos a 34 °C sem CO₂.

Após 5 dias, as culturas foram repicadas. Sempre que necessário, os parasitos foram passados 3 vezes por agulha 26 G $\frac{1}{2}$ para desagregação dos grumos de amastigotas axênicas formados.

As formas amastigotas axênicas foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^6 amastigotas/100 μ L em meio definido para sua manutenção, e incubadas por 48 horas a 34 °C e 5% de CO₂, na presença de diferentes concentrações obtidas por diluições seriadas dos extratos (3.200 a 25 μ g/mL) e compostos isolados (800 a 6,25 μ g/mL) a serem testados. A atividade leishmanicida de cada composto foi avaliada através do método colorimétrico da Resazurina®. Após incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C por 48 h, foram adicionados aos poços 20 μ L de Resazurina® 1×10^{-3} mol/L, faltando 6 h para o fim do protocolo. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorbância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de amastigotas mortas (%).

2.6.3 Determinação da citotoxicidade de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* em células de mamíferos

2.6.3.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Avaliou-se a citotoxicidade de extratos e isolados de *N. gardneri* utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (GONÇALVES et al., 2016). Em placa de 96 poços, aproximadamente 2×10^5 macrófagos por poço foram incubados em 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina, a 37 °C e 5% de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado para retirada das células que não aderiram.

Posteriormente, os extratos e isolados de *N. gardneri* foram diluídos de forma seriada em RPMI 1640 suplementado obtendo-se as concentrações de 1.600 a 12,5 μ g/mL e de 800 a 6,25 μ g/mL, para extratos e isolados, respectivamente. Em seguida, incubou-se por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10 μ L de MTT [5 mg/mL] diluído em 100 μ L de meio RPMI para avaliação da citotoxicidade. A placa foi incubada por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μ L de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente, para dissolução completa dos cristais de formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800).

Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC₅₀), sendo o grupo controle considerado como 100% de viabilidade (NOGUEIRA et al., 2007). O controle negativo foi realizado com meio RPMI 1640 suplementado a 0,2% de DMSO. A seguir, calculou-se o índice de seletividade para avaliar o nível de segurança do extrato e das frações frente a macrófagos murinos, esse índice representa a relação entre CC₅₀ e CI₅₀ para formas amastigotas (ÓSORIO, 2007).

2.6.3.2 Citotoxicidade de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* em eritrócitos de carneiro

Após a coleta do sangue de carneiro com anticoagulante EDTA, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando-se a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida, foram adicionadas as substâncias a serem analisadas, nas concentrações de 1.600 a 12,5 µg/mL para os extratos e, de 800 a 6,25 µg/mL para os isolados de *N. gardneri*, diluídas em um volume de 20 µL de PBS. Feito isso, as amostras foram incubadas durante 1h, a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200µL de PBS. Logo após, as suspensões foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 540 nm para quantificação da atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH₅₀), considerando o controle positivo como 100% de hemólise (LÖFGREN et al., 2008).

2.6.4 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos por extratos e compostos isolados de *N. gardneri*

2.6.4.1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada nos itens 2.6.4.2 e 2.6.4.3 constitui-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador

utilizado é o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% (v/v), cloreto de sódio 2% (p/v) e acetato de cálcio 1% (p/v) em água destilada (GRANDO et al., 2009).

2.6.4.2 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com extratos e isolados de *N. gardneri* nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL, obtidas por diluição seriada. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline, a placa foi lida a 550 nm (BONATTO et al., 2004).

2.6.4.3 Determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com extratos isolados de *N. gardneri* nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL, obtidas por diluições seriadas. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9% a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline, as absorbâncias foram medidas a 550 nm (GRANDO et al., 2009).

2.6.4.4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico (NO)

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço e incubados com extratos e isolados de *N. gardneri* nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL, obtidas por diluições seriadas. Transcorridas 24 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® em concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM diluídos em meio RPMI 1640. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H₃PO₄ 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes

iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e fez-se a leitura das absorbâncias na leitora de placa a 550nm (SOARES et al., 2007).

2.7 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração citotóxica média (CC_{50}) e a concentração hemolítica média (CH_{50}) com limite de confiança de 95% foram calculadas utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA *oneway* seguida pelo teste de Bonferroni, através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística (SOKAL; ROHLF, 1996).

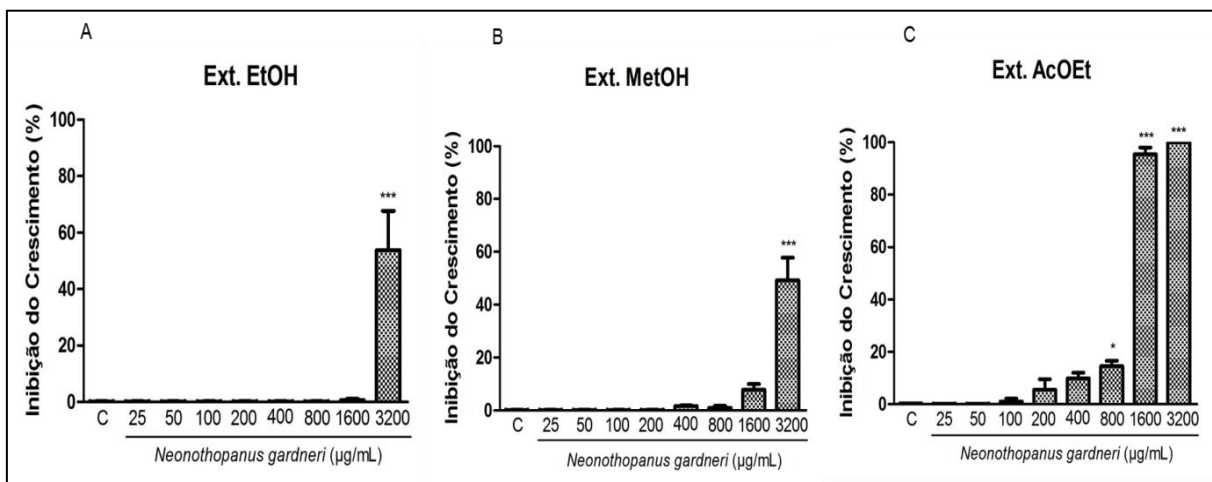
3 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos etanólico, metanólico e acetato de etila e dos compostos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* sobre *L. amazonensis*

Para a investigação da atividade leishmanicida, avaliou-se o comportamento de diferentes concentrações de extratos e compostos isolados de *N. gardneri* sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Os três extratos obtidos de *N. gardneri* foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Observou-se cerca de 65% de inibição do crescimento para as formas promastigotas na concentração de 3.200 µg/mL do Ext. EtOH, a qual foi a única concentração em que houve a capacidade do extrato em inibir o crescimento *in vitro* do parasita de forma significativa (Figura 1). O Ext. MeOH inibiu cerca de 60% do crescimento do parasita na concentração de 3.200 µg/mL, e o Ext. AcOEt inibiu 100% do crescimento dos parasitas nessa mesma concentração e, ainda, 98% na concentração de 1.600 µg/mL de forma significativa, obtendo resultados de concentração inibitória média (CI₅₀) de 3112,521; 3530,578 e 1147,074 µg/mL, respectivamente (Figura 1 e Tabela 1).

Figura 1. Atividade antileishmania dos extratos Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*



O gráfico representa a Média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado o teste ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do Ext. EtOH (A); Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

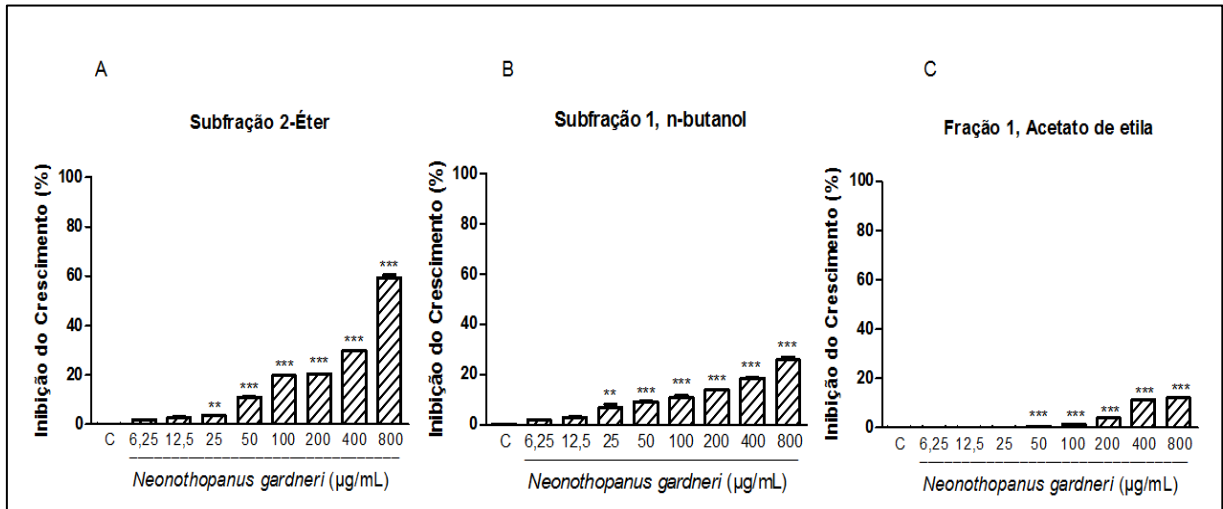
Tabela 1. Concentração inibitória média (CI₅₀), concentração citotóxica média (CC₅₀) e concentração hemolítica média (CH₅₀) dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH, e Ext. AcOEt e dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri*

Amostras	Promastigotas CI ₅₀ (µg/mL)	Amastigotas axênicas CI ₅₀ (µg/mL)	Macrófagos CC ₅₀ (µg/mL)	Hemácias CH ₅₀ (µg/mL)	IS sobre formas amastigotas axênicas
Extrato etanólico (Ext. EtOH)	3112, 521	904, 794	NT ¹	NT ¹	ND ²
Extrato metanólico (Ext. MeOH)	3530, 578	582, 401	1596, 256	NT ¹	2,74
Extrato Acetato de Etila (Ext. AcOEt)	1147, 074	1335, 97	469, 212	NT ¹	0,35
Subfração 2-éter	772, 721	17, 099	188, 104	NT ¹	11
Subfração 1, n-butanol	NT ¹	40, 727	472, 668	NT ¹	11,61
Fração 1- Acetato de etila	NT ¹	68,204	NT ¹	NT ¹	ND ²
Anfotericina B^a	0,43 ^a	0,65 ^a	21,1 ^a	NT ^{1a}	32,3 ^a

Os valores representam as médias da CI₅₀ e CC₅₀ calculadas em ao menos três experimentos independentes cada. Para esse cálculo, foi utilizado o modelo de regressão de Probit com o programa SPSS 13.0. IS= Índice de seletividade = CC₅₀/CI₅₀ (ÓSORIO, 2007). ²Não determinado; ¹Não tóxico; ^aOliveira et al., 2017.

A atividade antileishmania sobre a inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* de compostos isolados obtidos a partir de *N. gardneri* também apresentou resultados significativos (Figura 2). As subfrações 2-Éter; 1, n-butanol e a fração 1, acetato de etila demonstraram inibição do crescimento tanto nas maiores como nas menores concentrações testadas (de 800 a 25 µg/mL), sendo a porcentagem máxima de inibição de 60% referente à Subfração 2-Éter. O valor de CI₅₀ encontrado para a Subfração 2-éter foi de 772,721 µg/mL, menor em relação às encontradas nos extratos, podendo esta ser considerada mais tóxica para as leishmanias. Os demais isolados não apresentaram CI₅₀ passível de determinação estatística, por estarem acima da concentração máxima testada na estimativa da regressão de probitos, não apresentando, portanto, toxicidade nessas concentrações.

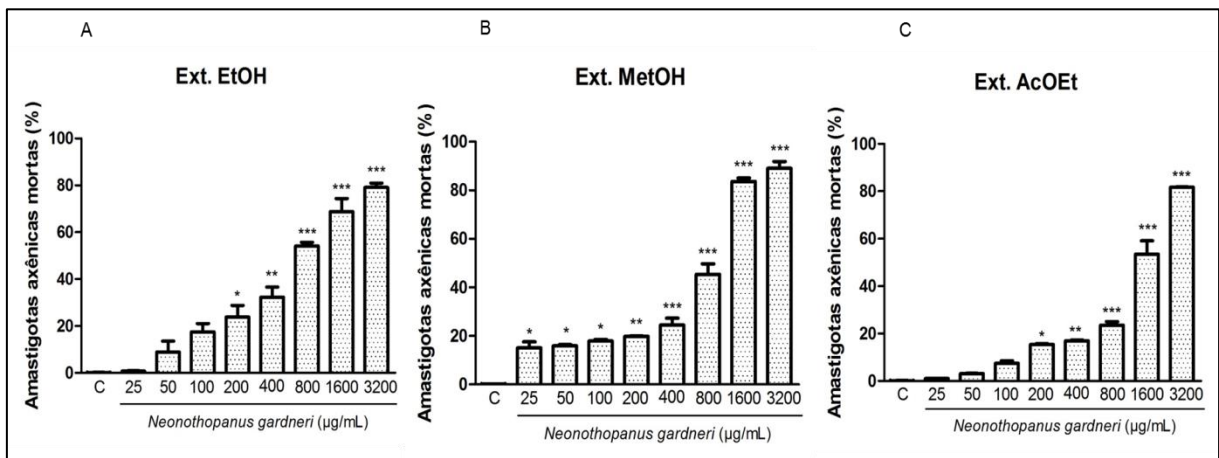
Figura 2. Atividade antileishmania dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*



O gráfico representa a Média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado o teste ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do (A) Subfração 2-éter; (B) Subfração 1, n-butanol e (C) Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Além disso, observou-se significativa atividade antileishmania de extratos e isolados de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Houve aproximadamente 80; 91 e 81% de morte das amastigotas axênicas na concentração de 3.200 µg/mL e 74; 85; 59% na de 1.600 µg/mL dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt, obtendo-se resultados de concentração inibitória média (CI₅₀) de 904,794; 582,401 e 1335,397 µg/mL, respectivamente, sendo essa atividade observada dependente da concentração (Figura 3 e Tabela 1). No Ext. MeOH, essa capacidade foi significativa também nas menores concentrações em cerca de 20%, semelhantemente ao Ext. EtOH.

Figura 3. Atividade antileishmania dos extratos Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

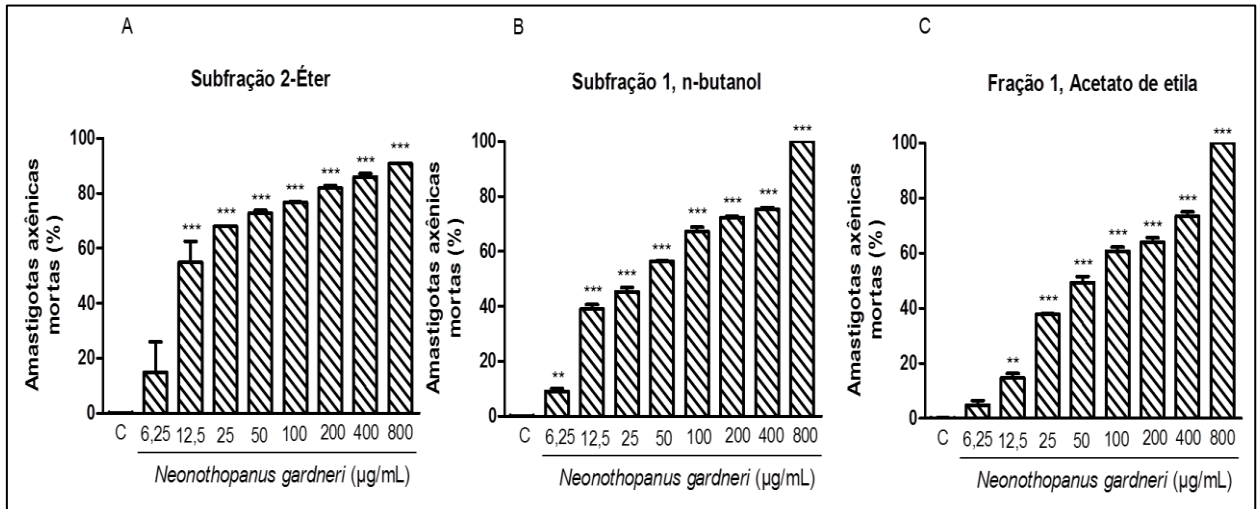


O gráfico representa a Média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado o teste ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do Ext. EtOH (A); Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Não obstante, os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1 n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* também obtiveram resultados de atividade antileishmania sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* concentração-dependente na maioria das concentrações testadas, onde se observou morte de 100% dos parasitas na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados Subfração 1-n-butanol e Fração 1-acetato de etila. Na Subfração 2-éter, o valor observado foi de aproximadamente 90% nesta mesma concentração (Figura 4). Nas demais concentrações, inclusive nas menores, esses valores foram bem mais altos que nos extratos, chegando a mais de 90% de morte de amastigotas nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ dos referidos isolados. Os valores de CI_{50} para Subfração 2-éter; Subfração 1 n-butanol e Fração 1-acetato de etila foram, respectivamente: 17,099; 40,727 e 68,204 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tanto os extratos como os isolados, Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol; Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* obtiveram melhor atividade antileishmania sobre formas amastigotas axênicas do parasita, sendo esta fase evolutiva do parasita mais uma forma de se aumentar o *screening* na busca por novas alternativas terapêuticas, por ser mais resistente que a promastigota, sendo capaz de modular a resposta imune dos hospedeiros (DE MUYLDER et al., 2011; KIMA et al., 2007).

Figura 4. Atividade antileishmania dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*



O gráfico representa a Média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100 % de viabilidade. Foi realizado o teste ANOVA *One-way* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações do Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* da observada no controle (DMSO 0,2 % em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Sugere-se que a presença de alcaloides nos três extratos e de compostos fenólicos nos extratos metanólico e etanólico detectada por análise fitoquímica, tenha influência nos resultados observados neste estudo, haja vista que investigações anteriores envolvendo metabólitos isolados de plantas e fungos com atividade antileishmania, especialmente os detectados em *N. gardneri*, comprovaram sua atividade antimicrobiana e antiparasitária em várias espécies de *Leishmania*, incluindo a espécie *L. amazonensis*. Dentre eles pode-se destacar os taninos e os alcaloides que estão presentes também em *Anacardium occidentale* L., *Myracrodruon urundeuva* (Allemão), *Anogeissus leiocarpus*, *Quercus infectoria*, *Stryphnodendron obovatum* (KHEIRANDISH et al., 2016; MURAKAMI et al., 1991; RIBEIRO et al., 2015; SHUAIBU et al., 2008; VATTEM; GHAEDIAN; SHETTY, 2005), e os derivados do cogumelo *Agaricus blazei* Murill, popularmente conhecido como “cogumelo-do-sol”, os quais obtiveram resultados positivos nesse âmbito, corroborando com este estudo (VALADARES et al., 2011).

Os resultados observados sugerem ainda que os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1 n-butanol e Fração 1- acetato de etila presentes e obtidos de partições do extrato Ext. EtOH de *N. gardneri* também podem ter sido responsáveis por esta atividade biológica, sendo necessária sua caracterização química para associação da mesma com as análises já realizadas.

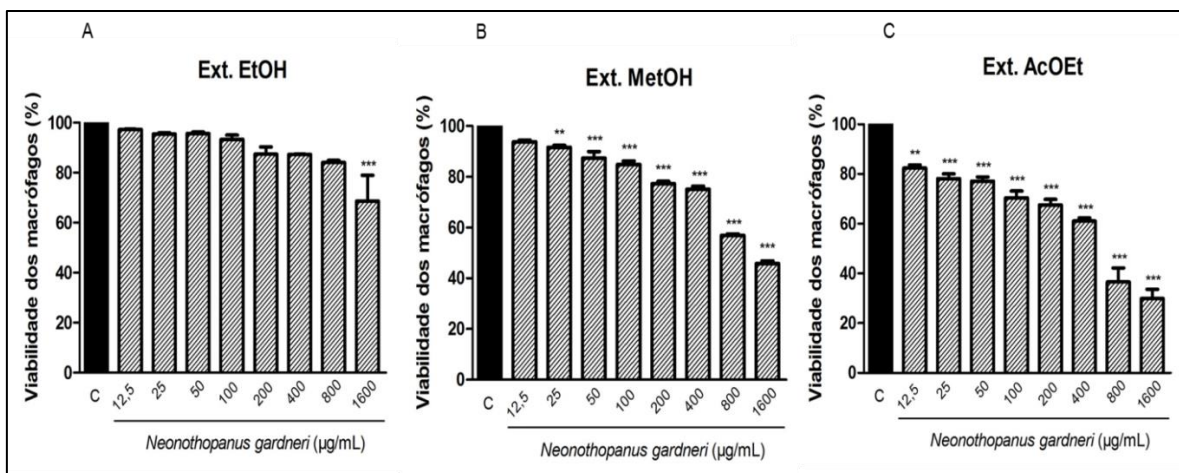
3.2 Avaliação da atividade citotóxica sobre macrófagos murinos dos extratos etanólico, metanólico e acetato de etila e dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila obtidos de *N. gardneri*

Os extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* foram capazes de reduzir a viabilidade dos macrófagos murinos de forma significativa, resultando em valores de CC_{50} de 1596,256 e 469,212 $\mu\text{g/mL}$ para Ext. MeOH e Ext. AcOEt, respectivamente.

Para o Ext. EtOH, só foi observada redução significativa na maior concentração, 1.600 $\mu\text{g/mL}$, de aproximadamente 12% em relação ao controle negativo (100% de viabilidade) e para o cálculo da CC_{50} por regressão de probitos, o mesmo apresentou-se fora da curva, ou seja, acima da concentração máxima testada, sendo considerado como não tóxico (NT), e dessa forma os índices de seletividade (CC_{50}/CI_{50}) passam a ser indeterminados.

Os extratos metanólico e acetato de etila (Ext. MeOH e Ext. AcOEt) provocaram redução significativa na viabilidade dos macrófagos para 47% e 37%, respectivamente. Nas menores concentrações desses dois extratos, a viabilidade chegou a mais de 80% demonstrando ser um efeito dependente de concentração (Figura 5).

Figura 5. Efeito dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri* sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos

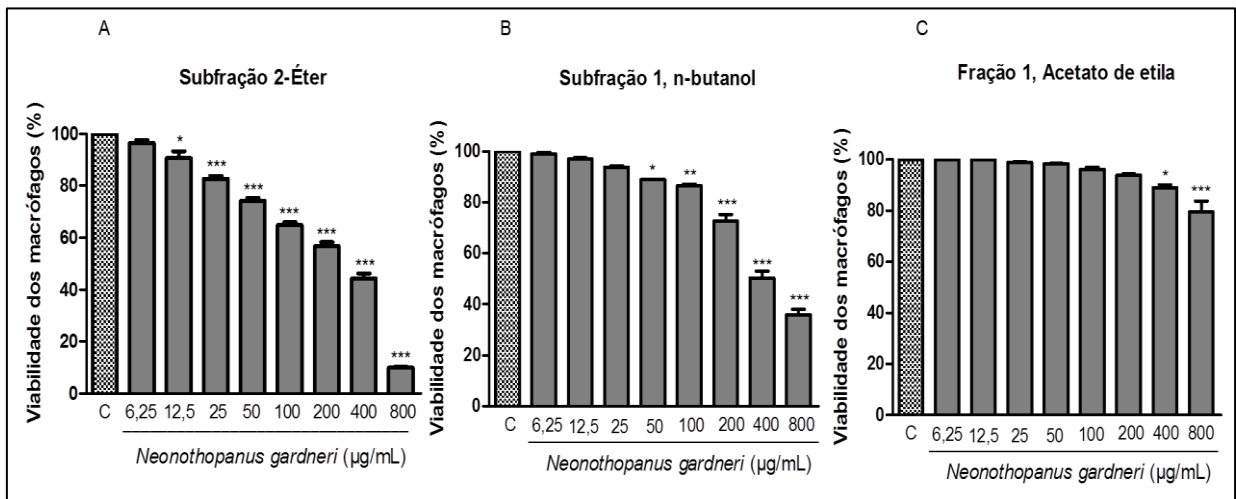


Os macrófagos foram incubados por 48 h à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO_2 , na ausência e na presença de diferentes concentrações dos extratos Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri*, e posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do 3-[4, 5 dimetiliazol-2-il]-2, 5- difeniltetrazolium brometo (MTT). O gráfico representa a Média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2% em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para os isolados Subfração 2-éter e Subfração 1, n-butanol os valores encontrados foram 188,104 e 472,668 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo que a primeira reduziu a viabilidade

dos macrófagos para cerca de 10% na concentração de 800 µg/mL e na segunda, cerca de 38% (Figura 6). A Fração 1, acetato de etila demonstrou-se a menos tóxica, na qual, na maioria das concentrações, a viabilidade manteve-se igual ou próximo de 100%.

Figura 6. Efeito dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos



Os macrófagos foram incubados por 48 h à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂, na ausência e na presença de diferentes concentrações dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1-acetato de etila (C) de *N. gardneri*, e posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do 3-[4, 5 dimetiliazol-2-il]-2, 5- difeniltetrazolium brometo (MTT). O gráfico representa a Média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2% em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os isolados de *N. gardneri* apresentaram índice de seletividade de 11 e 11,61 para a Subfração 2-éter e Subfração 1, n-butanol, respectivamente. Este índice é preconizado conforme Osório et al. (2007) como seguro acima de 20, denotando em teoria, maior seletividade para o parasita do que para as células. Na prática, sabe-se que, os tratamentos atuais, como a anfotericina B cujos valores de toxicidade estão expostos na Tabela 1 para comparação, são extremamente tóxicos para as células dos mamíferos, mesmo seu índice de seletividade sendo maior que 20 (OLIVEIRA et al., 2017) e maior que os dos extratos e compostos isolados de *N. gardneri* nas concentrações testadas. De modo geral neste estudo, *N. gardneri* mostrou maior seletividade para as formas amastigotas axênicas do parasita do que para macrófagos murinos (Tabela 1).

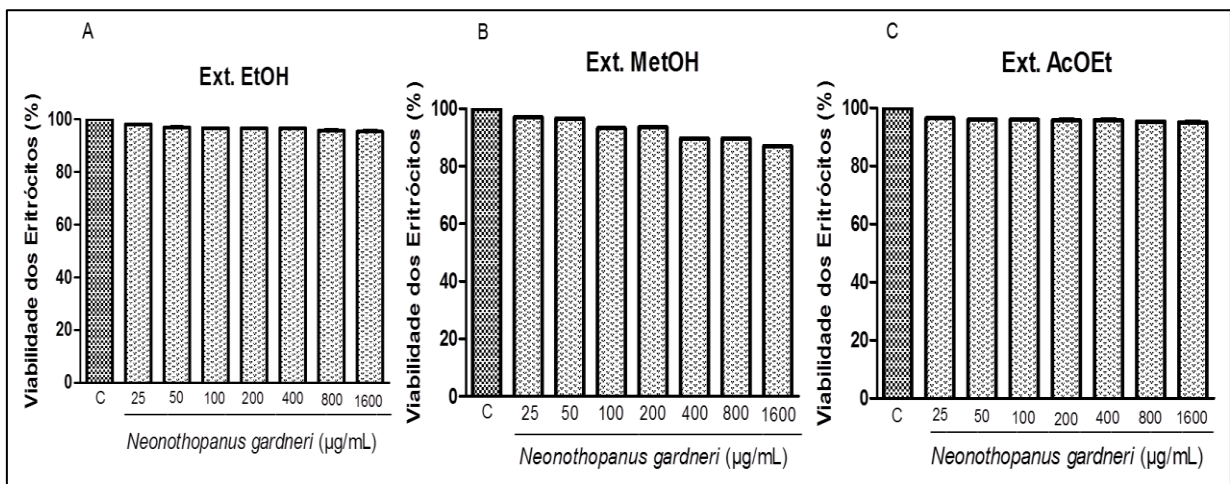
Devido à necessidade da descoberta de novas substâncias com atividade antileishmania que apresentem maior seletividade em relação ao parasita e menor toxicidade para as células hospedeiras, é de grande valia a investigação da atividade citotóxica de

extratos e isolados de *N. gardneri* contra células de mamíferos. Estudos anteriores relataram uma correlação direta entre a citotoxicidade *in vitro* e a toxicidade aguda *in vivo* em animais e seres humanos (LÖFGREN et al., 2008; PELIZZARO-ROCHA et al., 2011). A investigação do efeito toxicológico de novos compostos antileishmania em macrófagos é marcadamente importante, porque estas são as principais células infectadas no hospedeiro vertebrado e por exercerem papel central na modulação da resposta imune (RODRIGUES et al., 2013; UPEGUI et al., 2014).

3.3 Avaliação da citotoxicidade dos extratos EtOH, MeOH e AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* em eritrócitos de carneiro

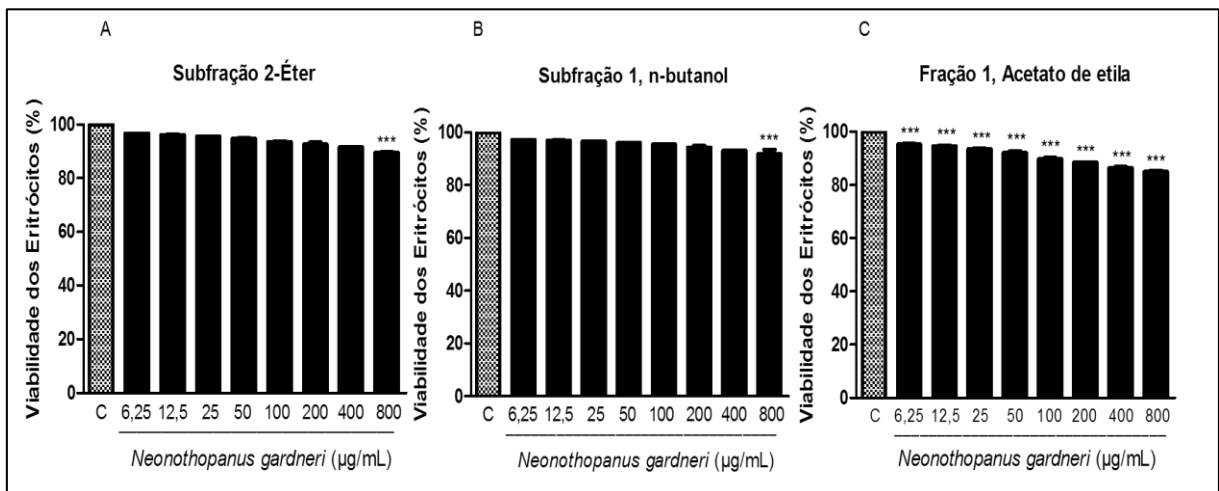
Surpreendentemente, os extratos de *N. gardneri* não apresentaram citotoxicidade sobre as células vermelhas provenientes de sangue de carneiro (Figura 7). Porém, os compostos isolados apresentaram significativa citotoxicidade na concentração de 800 µg/mL diminuindo a viabilidade para cerca de 94% em ambas Subfração 2-éter e Subfração 1,-n-butanol e, em todas as concentrações testadas para a Fração 1-acetato de etila, diminuindo a viabilidade para cerca de 89% (Figura 8).

Figura 7. Efeito dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri* sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro



Eritrócitos de carneiro foram incubados com diferentes concentrações dos extratos Ext. EtOH (A); MeOH (B) e AcOEt (C) de *N. gardneri* durante 1 h a 37°C e a atividade hemolítica foi determinada colorimetricamente. Cada ponto representa Média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes realizados em duplicata, com limite de confiança de 95%.

Figura 8. Efeito dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro



Eritrócitos de carneiro foram incubados com diferentes concentrações dos isolados Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1-acetato de etila (C) de *N. gardneri* durante 1 h a 37°C e a atividade hemolítica foi determinada colorimetricamente. Cada ponto representa Média \pm Erro Padrão da Média de três experimentos independentes realizados em duplicata, com limite de confiança de 95%.

Estudos preliminares de investigação das propriedades tóxicas de novas alternativas terapêuticas derivadas de plantas e fungos para o enfrentamento das leishmanioses são de suma importância, uma vez que o parasita é intracelular obrigatório (ISLAMUDDIN et al., 2015). A avaliação da citotoxicidade em eritrócitos indica novas perspectivas sobre a possível dissociação de efeitos antileishmania e citotóxicos e permite assim a identificação de análogos com um elevado índice de seletividade para serem utilizados como potenciais agentes terapêuticos. Resultados de citotoxicidade semelhantes na bioprospecção de produtos naturais corroboram com este estudo (OLIVEIRA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2015; VALADARES et al., 2011; VALADARES et al., 2012).

3.4 Avaliação dos parâmetros de ativação de macrófagos

3.4.1 Avaliação da capacidade fagocítica dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila obtidos de *N. gardneri* sobre macrófagos peritoneais murinos

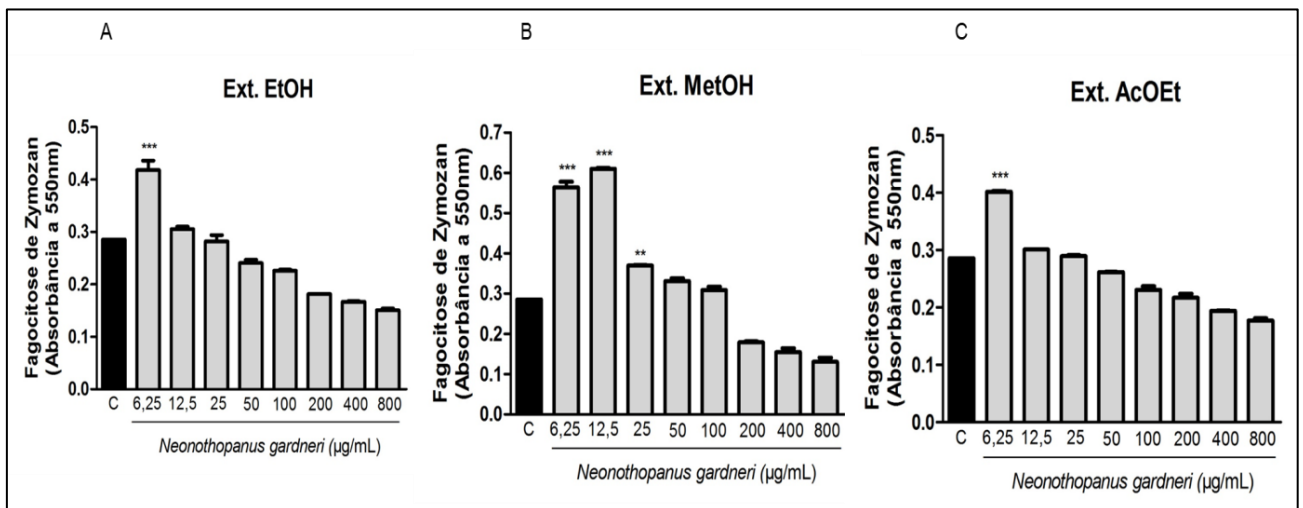
Como explicado anteriormente, os macrófagos exercem papel fundamental na modulação da resposta imune através de diversos mecanismos como capacidade de aderir e espalhar sobre substratos, fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que permitem que estas células sejam altamente microbicidas e tumouricidas (GORDON, 2003). Os macrófagos podem desempenhar estas funções de uma forma direta, envolvendo a liberação de EROs, radicais de nitrogênio e TNF- α , que são prejudiciais para os

microrganismos, ou de forma indireta, induzindo atividades citotóxicas secretando citocinas que são capazes de ativar outras células, tais como linfócitos T ou por processamento e apresentação de antígenos (FORLAND et al., 2010).

Os estudos de parâmetros de ativação de macrófagos são úteis para avaliar a capacidade de imunomodulação de fármacos. Sabe-se que nas infecções por *Leishmania sp.* há uma dicotomia pertinente entre resposta imune do tipo Th1 e Th2 (ISLAMUDDIN et al., 2015), onde a prevalência de resposta Th2 induzida pelo parasita (ROY et al., 2014) confere em aumento da parasitemia e cronicidade da doença. Portanto, a imunomodulação induzida por ação dos fármacos que venham a tender a prevalência de resposta imune Th1 confere ao hospedeiro cura e resistência a possíveis recidivas do parasita em seu organismo (ISLAMUDDIN et al., 2015).

Os extratos obtidos de *N. gardneri* foram capazes de aumentar a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais murinos. Os Ext. EtOH e Ext. AcOEt aumentaram significativamente a fagocitose de zymozan pelos macrófagos na concentração de 6,25 µg/mL e o Ext. MeOH induziu a fagocitose nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25 µg/mL (Figura 9).

Figura 9. Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri*



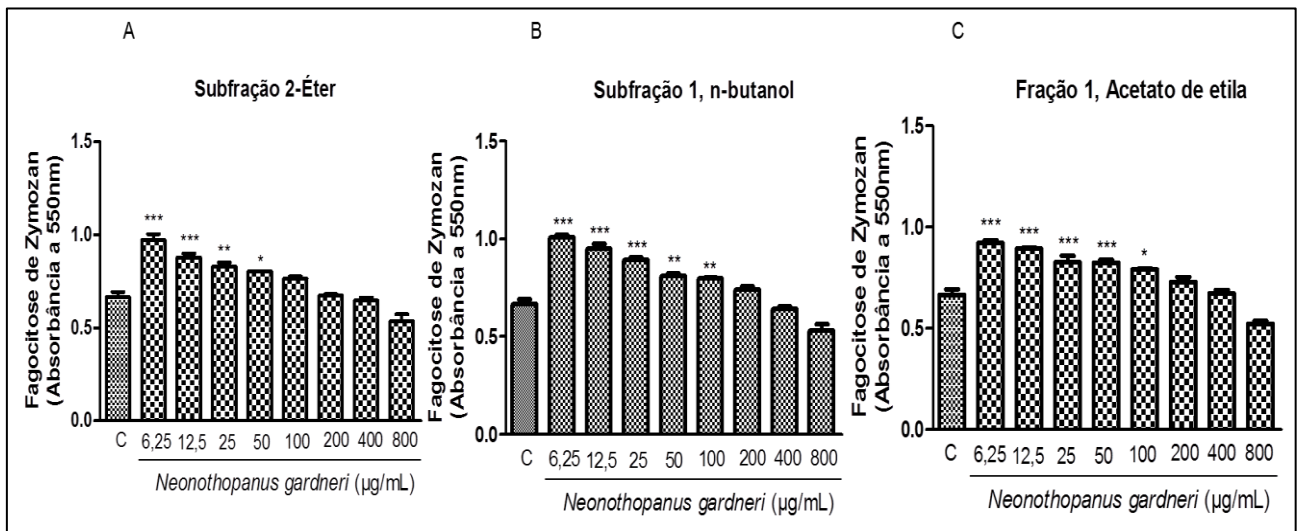
O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Ext. EtOH; (B) Ext. MeOH; (C) Ext. AcOEt de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

Ao se avaliar o mesmo parâmetro para os isolados obtidos do cogumelo, observou-se aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos murinos nas concentrações de 6,25; 12,5;

25; 50 e 100 µg/mL para os isolados Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila. O isolado Subfração 2-éter também aumentou essa capacidade avaliada nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL (Figura 10).

Observa-se que, com o aumento da concentração de extratos e isolados de *N. gardneri*, não há aumento da capacidade fagocítica, mas sim, o inverso. Esse comportamento pode ser diretamente correlacionado com os resultados obtidos para o teste do MTT, no qual os extratos e isolados reduziram de forma significativa a viabilidade celular nas maiores concentrações (Figuras 5 e 6). Nesse caso, com a diminuição na quantidade de macrófagos viáveis, evidentemente não haverá aumento na capacidade de fagocitose do zimosan.

Figura 10. Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com os isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri*



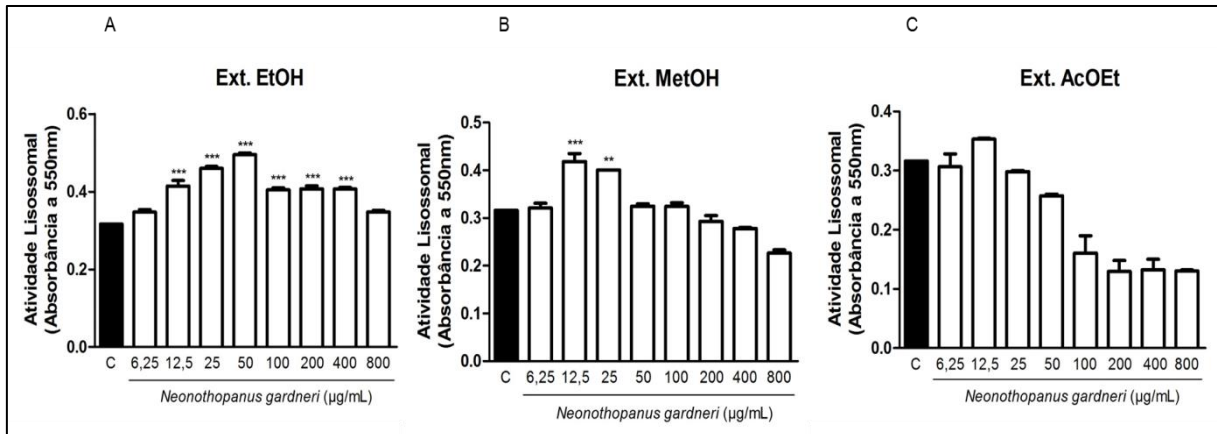
O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Subfração 2-éter; (B) Subfração 1, n-butanol; (C) Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

3.4.2 Avaliação da atividade lisossomal dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt, e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila, obtidos de *N. gardneri* sobre macrófagos peritoneais murinos

Os resultados obtidos da avaliação da atividade lisossomal demonstraram que os extratos Ext. EtOH e Ext. MeOH obtidos de *N. gardneri* foram capazes de reter maior quantidade de vermelho neutro em suas vesículas lisossomais, nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL para o Ext. EtOH, e nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL para o

Ext. MeOH. O Ext. AcOEt não foi capaz de promover significativamente o aumento da atividade lisossomal dos macrófagos murinos (Figura 11).

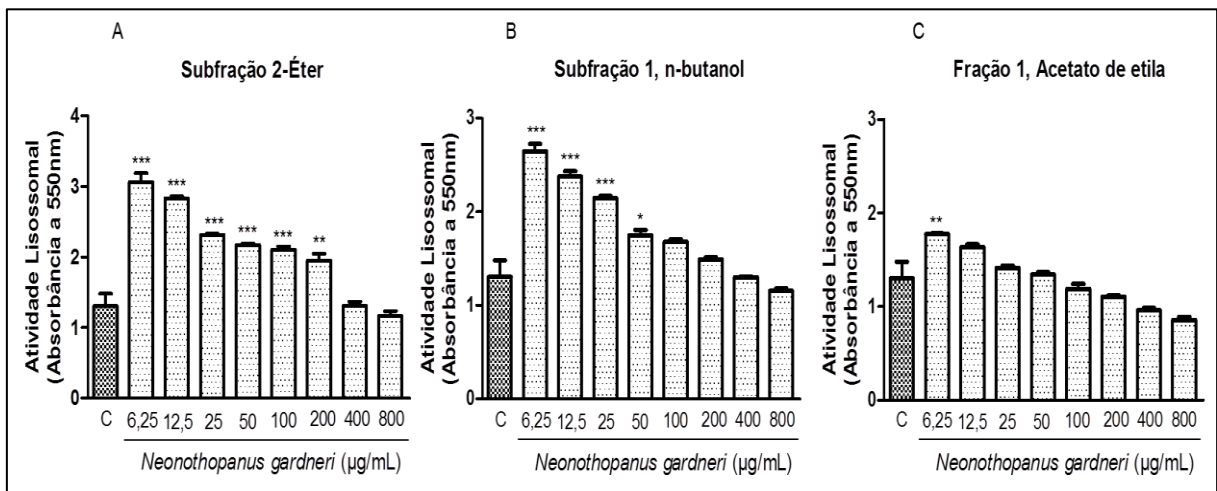
Figura 11. Atividade lisossomal de macrófagos tratados com Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri* em macrófagos peritoneais murinos



O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Ext-EtOH; (B) Ext. MeOH; (C) Ext. AcOEt de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, ABS – Absorbância.

Por outro lado, todos os isolados obtidos de *N. gardneri* foram capazes de aumentar a retenção de vermelho neutro no interior das vesículas, tendo aumento significativo nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL para a Subfração 2-éter. Na Subfração 1, n-butanol houve aumento nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL e na Fração 1-acetato de etila apenas na concentração de 6,25 µg/mL (Figura 12).

Figura 12. Atividade lisossomal dos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* em macrófagos peritoneais murinos



O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do (A) Subfração 2-éter; (B) Subfração 1, n-butanol; (C) Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

A explicação para esses resultados, assemelha-se à descrita para a capacidade fagocítica, a qual também ocorreu aumento nas menores concentrações. Aumento de capacidade fagocítica e de volume lisossomal conferem características de resposta imune inata com atividade microbicida, importante para o controle de infecções levando a degradação parasitária e apresentação de antígenos por MHC de classe II à células TCD4⁺ (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Após a endocitose do parasita, ocorre a formação de fagossomos proveniente dos endossomos, seguida da fusão com lisossomos que produzem os fagolisossomos patógenos que são assim debelados dentro do fagolisossoma (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; LOPES et al., 2006).

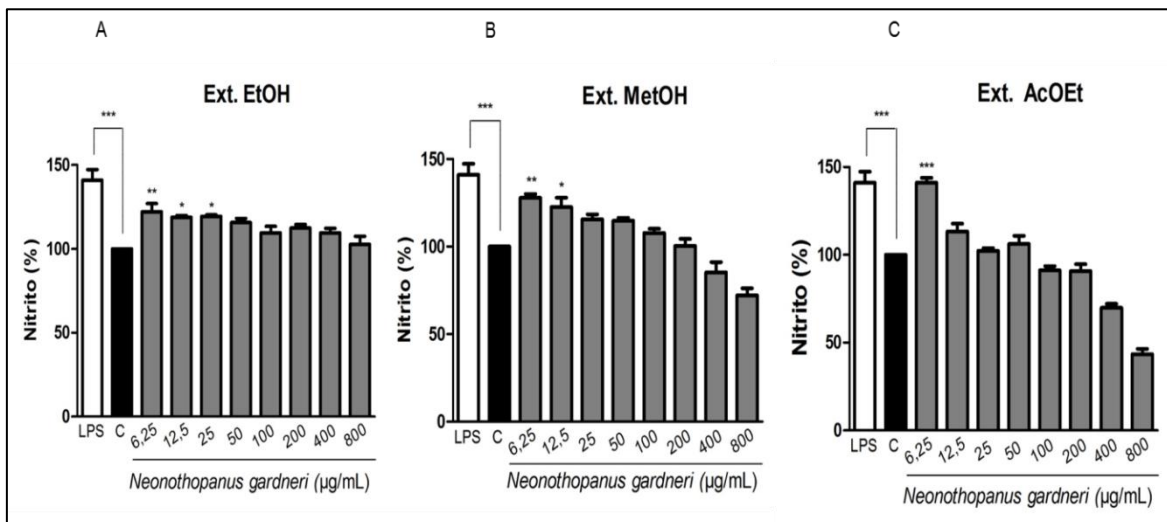
3.4.3 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico (NO) dos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt e isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* sobre macrófagos peritoneais murinos

Outro parâmetro de ativação de macrófagos importante é a avaliação da síntese de óxido nítrico (NO). Por ser uma molécula extremamente volátil, o que se avaliou foi o seu produto final, o nitrito. Neste estudo, se investigou a indução da síntese de óxido nítrico por quantificação de nitrito através do reagente de Griess[®], usando o lipopolissacáride de

Escherichia coli (LPS) como controle positivo, por ser um excelente indutor da síntese de óxido nítrico por macrófagos murinos.

Todos os extratos e isolados de *N. gardneri* foram capazes de induzir nos macrófagos a síntese de óxido nítrico, nas menores concentrações testadas, o que demonstra o alto potencial desse cogumelo em ativar a via da Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) das células responsáveis por resposta imune inata. O Ext. EtOH promoveu aumento significativo de nitrito nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25 µg/mL. O Ext. MeOH nas concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL e o Ext. AcOEt na concentração de 6,25 µg/mL (Figura 13).

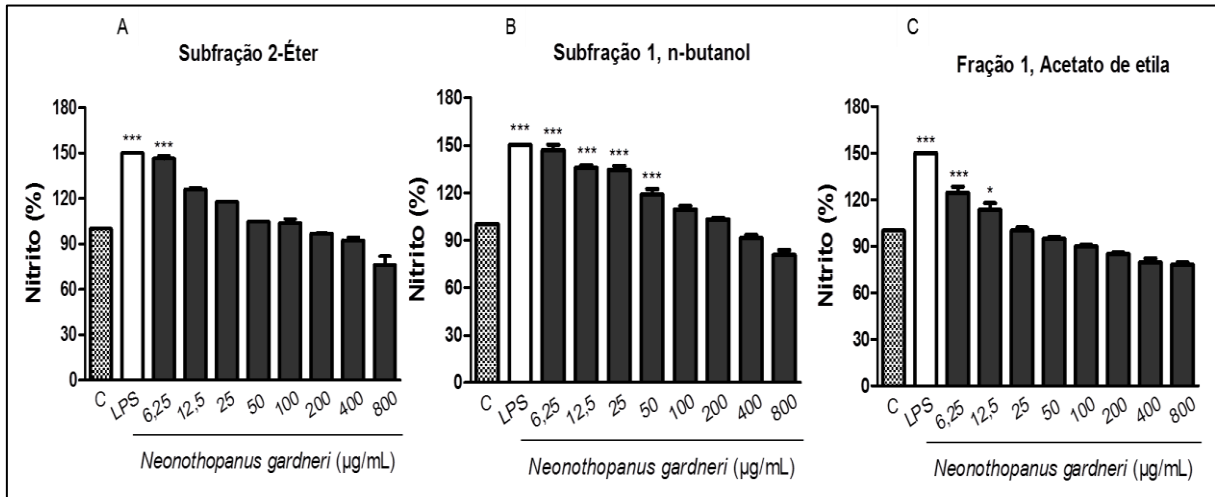
Figura 13. Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico pelos extratos Ext. EtOH, Ext. MeOH e Ext. AcOEt de *N. gardneri* sobre macrófagos peritoneais murinos



O óxido nítrico foi dosado a partir da concentração de nitritos produzidos por macrófagos tratados com Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri*. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. One-way ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do Ext. EtOH (A), Ext. MeOH (B) e Ext. AcOEt (C) de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), LPS – Lipopolissacarídeo.

Não distante disso, o isolado Subfração 2-éter induziu a síntese de NO na concentração de 6,25 µg/mL; a Subfração 1, n-butanol induziu nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL e a Fração 1- acetato de etila nas concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL (Figura 14).

Figura 14. Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico pelos isolados Subfração 2-éter; Subfração 1, n-butanol e Fração 1- acetato de etila de *N. gardneri* em macrófagos peritoneais murinos



O óxido nítrico foi dosado a partir da concentração de nitritos produzidos por macrófagos tratados com Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri*. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos tratados com diferentes concentrações do Subfração 2-éter (A); Subfração 1, n-butanol (B) e Fração 1- acetato de etila (C) de *N. gardneri* com o controle (DMSO 0,2 % em meio RPMI 1640), LPS – Lipopolissacarídeo.

A estimulação da produção de NO nos macrófagos é grandemente estimada na busca de novos fármacos que apresentem atividade antileishmania, sendo há muito tempo, a característica mais eficaz envolvida na defesa contra infecções por *Leishmania sp.* (GANTT et al., 2001). O NO é criado após a ativação de macrófagos por citocinas tais como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que aumentam a produção da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma enzima que catalisa L-arginina para gerar NO e citrulina (LIEW et al., 1990). Uma vez dentro do fagolisossoma, o NO combina-se com o Superóxido para produzir nitrito de peróxido, o qual é altamente reativo e atua como um microbicida (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; UEDA-NAKAMURA et al., 2006).

Extratos e compostos isolados do cogumelo bioluminescente *Neothopanus gardneri* apresentaram capacidade imunomoduladora em todos os parâmetros de ativação de macrófagos investigados neste trabalho. Estudos com cogumelos que envolvem atividade antileishmania, como também sinergismo em imunomodulação, têm obtido resultados surpreendentes *in vitro* corroborando com o supracitado no presente estudo (VALADARES et al., 2011; VALADARES et al., 2012a; VALADARES et al., 2012b).

As propriedades imunológicas dos cogumelos foram associadas com frações de polissacarídeos. Foi relatado que os β -glucanos de fungos ativam leucócitos e podem

aumentar a atividade fagocitária das mesmas células, tais como monócitos e granulócitos, assim como a produção de intermediários reativos do oxigênio e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (BROWN; GORDON, 2003; BERNARDSHAW et al., 2006; BERNARDSHAW et al., 2007).

Em relação às frações de polissacarídeos, os taninos representam um grupo de metabólitos fenólicos que exibem uma vasta gama de atividades bioquímicas e farmacológicas *in vitro*, incluindo propriedades antivirais e antimicrobianas (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005). Tratamentos de um amplo espectro de doenças com medicamentos à base de produtos naturais polifenólicos suscitaram interesse na avaliação destas substâncias como agentes antileishmania promissores, substâncias estas presentes em *N. gardneri*, como observado por análise fitoquímica.

4 Conclusão

Os extratos e compostos isolados obtidos do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* apresentaram atividade antileishmania *in vitro* sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, como também demonstraram ser mais seletivos para o parasita do que para as células de mamíferos. Foram capazes de induzir mecanismos de imunomodulação, aumentando a capacidade fagocítica, volume lisossomal e induzindo a síntese de NO em macrófagos murinos. Este consistiu, portanto, no primeiro estudo a se investigar as atividades biológicas de *N. gardneri*. Novas pesquisas serão realizadas a fim de se avaliar seus efeitos terapêuticos e elucidar os mecanismos de ação envolvidos em diferentes modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R.O. et al. Avaliação biológica de *Foeniculum vulgare* (Mill.) (Umbelliferae/Apiaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 257-263, 2013.
- BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N.; ZILBERSTEIN, D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 99-108, 2005.
- BONATTO, S. J. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunology**, v. 231, n. 1-2, p. 56-62, Sep-Oct, 2004.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-34, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2016. O que é o SINAN. Brasília: Ministério da Saúde. Available from: <http://www.datasus.gov.br/idb>. Accessed janeiro 2017.
- DE MUYLDER, G. et al. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.
- GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893-901, Jul 15 2001.
- GONÇALVES, J. C. R. Antitumoral activity of novel 1,4-naphthoquinone derivative involves L-type calcium channel activation in human colorectal cancer cell line. **Journal of applied biomedicine**, v. 14, p. 229-234, 2016.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GRANDO, F. C. et al. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 42, n. 7, p. 599-605, Jul 2009.
- ISLAMUDDIN, M. et al. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n.1, p. 1-16, 2015.

KANOKMEDHAKUL, S. et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 39, p. 8261-8266, 2012.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, jul. 2011.

KHEIRANDISH, F. et al. Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 208-15, Aug 2016.

KIMA, P.E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1087–1096, 2007.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1299-306, Nov 2003.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by (VALADARES; DUARTE; RAMIREZ; CHAVEZ-FUMAGALLI; MARTINS; et al., 2012) nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990.

LÖFGREN, S.E.; MILETTI, L.C. ; STEINDEL, M; BACHÈRE, E. ; BARRACCO, M.A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 197–202, 2008.

LOPES, L. et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 277-87, 2006.

MAURER, M.; DONDJI, B.; STEBUT, E. V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 198, p. 137–146, 2009.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-22, aug. 2010.

MONTALVO, A. M. et al. [Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection]. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 64, n. 2, p. 108-31, 2012.

MURAKAMI, S. et al. Inhibition of gastric H⁺, K(+) -ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Med**, v. 57, n. 4, p. 305-8, 1991.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 422-8, Aug 2004.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 50-53, 2007.

- OLIVEIRA, L. G. C. et al. *In vitro* effects of the neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, p. 52-58, 2016.
- OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-5, 2007.
- RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimao) extract and constituent compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 238-42, May 13 2015.
- RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.
- ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, Londres, v. 14, p. 70-72, 1903.
- ROY, N., et al. Regulation of PKC Mediated Signaling by Calcium during Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-8, 2014.
- SHUAIBU, M. N. et al. Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of *Leishmania* in vitro. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p. 1333-8, Nov 2008.
- SINGH, N. et al. **Bioorg. Med. Chem.** < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>>, 2013.
- SOARES, C. D., et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principle and practice of statistics**. Biological Research. 2 ed. New York: W.H. Freeman and company, 1996.
- UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, Jun 2006.
- UPEGUI, Y. et al. Preparation of rotenone derivatives and in vitro analysis of their antimalarial, antileishmanial and selective cytotoxic activities. **Molecules**, v.19, p.18911–22, 2014.
- VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 357-63, 2011.
- VALADARES, D. G. et al. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1807-16, 2012a.
- VALADARES, D. G. et al. Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 228-36, 2012b.

VATTEM, D. A.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 14, n. 2, p. 120-30, 2005.

CAPÍTULO III – Estudo do potencial citotóxico e genotóxico dos extratos metanólico e acetato de etila do cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* em *Allium cepa* L.



ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DOS EXTRATOS METANÓLICO E ACETATO DE ETILA DO COGUMELO BIOLUMINESCENTE

Neonothopanus gardneri EM *Allium cepa* L.

QUEIROZ, B.C.S.H.¹; MONTEIRO, C.N.²; SOUSA, R.M.S.²; MORAIS, J.G.S.²;
OLIVEIRA, M.D.A.³; ALMEIDA, P.M.²; MARTINS, F.A.²; STEVANI, C.V.⁴; COSTA
JÚNIOR, J.S.⁵

¹Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

²Laboratório de Genética, Universidade Estadual do Piauí, CEP: CEP: 64.002-150, Teresina.

³Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, CEP: 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

⁴Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CEP: 05008-000, Butantã, São Paulo, Brasil.

⁵Laboratório de Química de produtos naturais, Instituto Federal do Piauí, CEP: 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Novos agentes químicos e materiais biológicos são continuamente utilizados pela população, no entanto, é necessário que estes sejam submetidos a testes de genotoxicidade antes mesmo de serem comercializados e utilizados pelo público em geral. Nesse contexto, o teste com *Allium cepa* é simples, barato e de alta reprodutibilidade, fornecendo ao mesmo tempo, resultados sobre a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade de substâncias. *Neonothopanus gardneri* (Berk. ex Gardner) pertence à família Marasmiaceae e é o maior cogumelo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do mundo. Membros da mesma família apresentaram atividades citotóxica e antimicrobiana de compostos isolados. O objeto deste estudo foi avaliar, pela primeira vez, o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos extratos acetato de etila e metanólico de *N. gardneri* em células meristemáticas de *A. cepa*. Para tal, espécimes de *N. gardneri* foram coletados na cidade de São Francisco, Maranhão, Brasil. Em seguida, os fungos foram congelados e submetidos à liofilização. Posteriormente, preparou-se os extratos acetato de etila (Ext. AcOEt) e metanólico (Ext. MeOH), que foram diluídos em DMSO 0,2% mais solução salina 0,9%, obtendo-se as concentrações testes de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/mL. Sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri contendo água destilada. Logo após, as mesmas foram transferidas para os controles e para as concentrações citadas dos extratos por 24 h. Como controle negativo (CN), foi utilizado DMSO 0,2% mais solução salina 0,9% e como controle positivo (CP), o metilmetanossulfonato (MMS, 10 µg/L). As raízes foram então fixadas em metanol: ácido acético (3:1), hidrolisadas em HCl por 10 min, lavadas em água destilada e coradas com Reativo de Schiff, por 2 h no escuro. Cinco mil células meristemáticas por tratamento, 500 células por lâmina (total de 10 lâminas), foram analisadas em microscópio

óptico (400 x). As análises estatísticas foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância no programa BioEstat 5.3. Os valores de CP foram significativos em relação ao CN para os parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade. Quanto ao índice mitótico, houve aumento significativo nas concentrações de 50, 250 e 500 µg/mL em relação ao CN, resultando no efeito citotóxico. Quanto à genotoxicidade e à mutagenicidade, não houve diferença significativa entre as concentrações e o CN para o Ext.AcOEt, mas houve para o Ext. MeOH. Os resultados obtidos demonstraram que o Ext. AcOEt de *N. gardneri* possui efeito citotóxico na maioria das concentrações testadas e alterações cromossômicas não significativas, e o Ext.MeOH apresentou efeito citotóxico e mutagênico. Adicionalmente, análises sobre a composição química de *N. gardneri* e testes em outros bioensaios fazem-se necessários para a elucidação da interferência quanto ao ciclo celular.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade. Produtos naturais. Bioluminescência. *Allium cepa*. Mutagenicidade.

ABSTRACT

New chemical agents and biological materials are continuously used by the population, however, they must be subjected to genotoxicity tests before they are even marketed and used by the general public. In this context, the *Allium cepa* test is simple, inexpensive and highly reproducible, while providing results on cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of substances. *Neonothopanus gardneri* (Berk. Ex Gardner) belongs to the Marasmiaceae family and is the largest bioluminescent mushroom of Brazil and one of the largest in the world. Members of the same family have already presented cytotoxic and antimicrobial activities of isolated compounds. The aim of this study was to evaluate, for the first time, the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of the ethyl acetate and methanolic extracts of *N. gardneri* in *A. cepa* meristematic cells. For this, specimens of *N. gardneri* were collected in the city of São Francisco, Maranhao, Brazil. The fungi were then frozen and subjected to lyophilization. Then were prepared the extracts with ethyl acetate (EtOAc Ext.) and methanol (MeOH Ext.), which were diluted in 0.2% DMSO with 0.9% saline, to give the test concentrations of 50, 100, 250, 500 and 1000 µg/ml. Seeds of *A. cepa* strain were germinated in Petri dishes containing distilled water. Subsequently, they were transferred to the controls and to the abovementioned concentrations of the extracts for 24 h. As negative control (NC), 0.2% DMSO with 0.9% saline solution was used as the positive control (PC), methyl methanesulfonate (MMS, 10 µg/L). The roots were then fixed in methanol: acetic acid (3:1), hydrolyzed in HCl for 10 min, washed in distilled water and stained with Schiff's Reagent for 2 h in the dark. Five thousand meristematic cells per treatment, 500 cells per slide (total of 10 slides), were analyzed under an optical microscope (400 x). Statistical analyzes were evaluated using the Kruskal-Wallis test at 5% significance in the BioEstat 5.3 program. PC values were significant in relation to NC for genotoxicity and mutagenicity parameters. As for the mitotic index, there was a significant increase in the concentrations of 50, 250 and 500 µg/mL in relation to the NC, resulting in the cytotoxic effect. As for genotoxicity and mutagenicity, there was no significant difference between the concentrations and the NC for the AcOEt Ext., but there was significant for the MeOH Ext. The results obtained demonstrated that the AcOEt Ext. of *N. gardneri* has a cytotoxic effect in the majority of the tested concentrations and non-significant chromosomal alterations, and the MeOH Ext. showed a cytotoxic and mutagenic effect. Additionally, analyzes on the chemical composition of *N. gardneri* and tests in other bioassays are necessary for the elucidation of the interference in the cell cycle.

KEYWORDS: Cytotoxicity. Natural products. Bioluminescence. *Allium cepa*. Mutagenicity.

1 Introdução

O crescente contato de pessoas com novas substâncias químicas sintéticas e naturais de plantas e fungos indica que é necessário avaliar esses produtos para possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. A maioria dos produtos químicos cancerígenos é capaz de interagir com o material genético e há uma correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade, com informações suficientes disponíveis para sugerir que o câncer pode ser induzido por eventos mutacionais (BELLINI et al., 2008; PING et al., 2012). No entanto, como os agentes genotóxicos produzem alterações no DNA, podem ser detectados por ensaios genéticos e é importante que novos agentes químicos e materiais biológicos sejam submetidos a testes de genotoxicidade antes mesmo de serem comercializados e utilizados pelo público em geral (ATOYEBI et al., 2015).

Os sistemas de teste podem ser divididos em grupos com base no sistema biológico empregado e seu ponto final genético detectado. Os bioensaios com procariotos permitem a detecção de agentes que induzem mutação genética e danos primários ao DNA. Por outro lado, as análises com eucariotos permitem a detecção de maior extensão de danos, variando de mutações genéticas a danos cromossômicos e aneuploidias (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de aberração cromossômica da raiz de *Allium cepa*, introduzido por Levan (1938) e validado pela Organização Mundial de Saúde, Programa Ambiental das Nações Unidas e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, é utilizado para detectar a toxicidade de pesticidas, herbicidas, e outros xenobióticos (MAURO et al., 2014). É um ensaio simples e confiável com o intuito de registrar todas as aberrações cromossômicas em células mitóticas, podendo ser utilizado para medir tanto a citotoxicidade, como a genotoxicidade e a mutagenicidade, através da observação do índice mitótico, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos, respectivamente, sem a necessidade de outros ensaios para tal, especialmente com o uso de animais (MOHAMMED et al., 2015).

Neonothopanus gardneri (Berk. ex Gardner) é um cogumelo bioluminescente pertencente à família Marasmiaceae, conhecido popularmente como “Flor de coco”. Este cogumelo foi descoberto em 1840 por Gardner, que viu garotos brincando com o que pensou serem vagalumes, na cidade de Natividade, em Tocantins (GARDNER, 1840). No entanto, ele foi classificado como *Agaricus gardeni* e não tinha sido visto até então. Em 2011, Capelari e colaboradores encontraram no Piauí o cogumelo que emite luz e que após um trabalho de reclassificação do fungo com dados moleculares, revelou-se tratar de *Neonothopanus gardneri*. O basidiomiceto é o maior fungo bioluminescente do Brasil e um dos maiores do

mundo. Os basidiocarpos de *N. gardneri* crescem em troncos de Pindobas (*Attalea oleifera*) ou babaçu (*Orbignya phalerata*) (CAPELARI et al., 2011).

Neonothopanus Nambi Speg. (Marasmiaceae) é um cogumelo venenoso luminescente da mesma família de *N. gardneri*, que tem se mostrado uma rica fonte de sesquiterpenos citotóxicos com atividade biológica, tais como nambinonas A-C, *1-epi*-nambinona B, nambinona D, aurisina A e aurisina K, que apresentaram ação contra células de alguns tipos de câncer, antimicrobiana e antiparasitária (KANOKMEDHAKUL et al., 2012). Estudos com outros basidiomicetos superiores, envolvendo suas atividades biológicas, toxicidade e na terapêutica de diversas doenças em todo o mundo também já foram registrados (POUCHERET; FONS; RAPIOR, 2006). No entanto, não há nenhuma investigação acerca das possíveis propriedades tóxicas e farmacológicas de *N. gardneri* relatada na literatura.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico dos extratos metanólico e acetato de etila de *N. gardneri*, utilizando o sistema teste *Allium cepa* L.

2 Material e métodos

2.1 Coleta e identificação do material fúngico

Espécimes do cogumelo *Neonothopanus gardneri* Berk. ex Gardner foram coletados no povoado Mimoso (Latitude: -6.16667; Longitude: -43.0833), localizado no município de São Francisco (Latitude: 6° 15' 9" S; Longitude: 42° 51' 37" W), estado do Maranhão, Brasil, em bases de coqueiros babaçu (*Orbignya phalerata*), no período de janeiro a maio de 2013, no horário entre 18 e 20 horas, sob autorização mediante comprovante de registro para coleta e transporte de material botânico, fúngico e microbiológico, SISBIO número 54548-1. Os cogumelos foram mantidos congelados a uma temperatura de -20°C, no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí (IFPI- campus central), sob a responsabilidade do professor Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior. O material foi identificado pelo professor Dr. Cassius Vinícius Stevani e seu grupo de pesquisa do Laboratório de Bioluminescência de Fungos, Instituto de Química, da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil), através de análise filogenética e os espécimes estão depositados no Herbário do Instituto de Botânica (SP) (Mycobank MB519818).

2.2 Substâncias teste e material biológico

Para avaliação das atividades genotóxica, citotóxica e mutagênica foram utilizados dois extratos de *N. gardneri*: extrato metanólico (Ext. MeOH) e extrato acetato de etila (Ext. AcOEt) preparados segundo a metodologia de KANOKMEDHAKUL et al. (2012).

Os extratos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%, PubChem CID: 679) a uma concentração de 0,2% mais solução salina 0,9%, obtendo-se as concentrações testes de 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg/ml, de acordo com experimentos pilotos conduzidos.

As sementes de *A. cepa* (cv. Vale Ouro IPA - 11) utilizadas nos bioensaios foram gentilmente fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, Recife, Brasil). Os danos ao DNA foram induzidos com o agente alquilante MMS (metilmetanossulfonato) (Acros Organics®, CAS 156890050), estrutura química C₂H₆O₃S, a uma concentração de 10 µg/mL (FELICIDADE et al, 2014).

2.3 Protocolo experimental: Ensaio *Allium cepa*

Cerca de cem (100) sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri contendo água destilada à temperatura ambiente. Quando as radículas atingiram cerca de 1 cm

de comprimento, as mesmas foram transferidas para placas de Petri contendo cada uma 15 mL das cinco concentrações dos extratos acetato de etila e metanólico e dos controles, durante 24 h. Utilizou-se DMSO 0,2% + Solução Salina 0,9% como controle negativo (CN) e MMS (metilmetanossulfonato 4×10^{-4} M), um fármaco com atividade clastogênica, como controle positivo (CP) (FERNANDES et al., 2009).

Quando as raízes atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, o material foi fixado em metanol: ácido acético (3:1), por 6-8 h, a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e, posteriormente armazenado a -20 °C até a preparação das lâminas.

Para a preparação das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes com água destilada, por 5 min cada vez, e hidrolisadas a 60 °C em HCl 1N por 10 min. Após hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar contendo reagente de Schiff, no qual permaneceram durante 2 h no escuro. Após este período, as raízes foram lavadas até a remoção completa do reagente, transferidas para as lâminas, esmagadas com uma gota de ácido acético a 2% e montadas com Entellan[®].

A unidade experimental consistiu de uma raiz individual (uma raiz por espécime). A citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade foram avaliadas por meio de um escore de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: lâmina com 500 células, com um total de 10 lâminas analisadas por tratamento) em microscópio óptico (aumento de 400 x). Os aspectos avaliados foram: (1) índice mitótico (citotoxicidade), (2) índice de aberrações cromossômicas (genotoxicidade) e (3) índice de micronúcleos (mutagenicidade). A genotoxicidade inclui aberrações resultantes de efeitos aneugênicos (por exemplo, metáfase C, metáfase com aderências cromossômicas, perda cromossômica, anáfase multipolar, células binucleadas, metáfases poliploides e outras aberrações) ou efeitos clastogênicos (por exemplo, fragmentos cromossômicos em metáfase ou anáfase, pontes cromossômicas, entre outras aberrações). Micronúcleos podem ser resultado de efeitos aneugênicos ou clastogênicos.

2.4 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística para avaliar a distribuição dos dados em relação à normalidade foi realizada pelo teste de Lilliefors no programa Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002), e os resultados obtidos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Student-Newman-Keuls (valor mínimo de significância estatística de $p < 0,05$) no programa BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

3 Resultados e discussão

O teste de citotoxicidade realizado com a exposição de sementes de *A. cepa* à cinco diferentes concentrações do extrato acetato de etila (Ext.AcOEt) de *N. gardneri* mostrou uma redução significativa nos valores do índice mitótico (IM), que é o número de células em divisão no ciclo celular, para a maioria das concentrações testadas, exceto para a de 100 µg/ml, quando comparadas ao CN. Na maior concentração, essa redução foi de 108 para 21,14, e na concentração de 250 µg/ml para 37,51. IMs significativamente menores do que o controle negativo podem indicar alterações decorrentes da ação química no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Com relação à frequência de alterações cromossômicas (AC), de modo geral, o Ext. AcOEt não provocou aumento significativo nas referidas concentrações, quando comparado com o CN (Tabela 1).

Observando-se as ACs isoladamente, percebe-se um aumento significativo na frequência de Brotos Nucleares, nas maiores concentrações analisadas, 500 e 1.000 µg/ml. Neste teste, foi utilizado MMS como controle positivo indutor de dano, porque o mesmo constitui-se de um agente de alquilação, em outras palavras, ele adiciona grupos alquila em várias posições de bases de DNA. Sabe-se que os agentes alquilantes são capazes de induzir uma série de modificações deletérias das cadeias de DNA incluindo aductos, ligações cruzadas e quebras, e estes podem ser expressos como lesões cromossômicas e micronúcleos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

As principais alterações causadas pelo MMS observadas neste estudo foram: aderência, ponte e perda cromossômicas e formação de micronúcleos. A média e o desvio padrão se referem ao número total de alterações cromossômicas, à frequência total de alterações e ao índice mitótico. O CP sendo significativo em relação ao CN valida o teste, pois comprova que o agente indutor de dano está exercendo sua ação de forma eficaz.

Fato semelhante ocorreu com extrato metanólico de *N. gardneri*, no qual observou-se redução significativa do IM, especialmente nas maiores concentrações, onde esse valor foi de 109,37 para apenas 12,38, aproximadamente, caracterizando esse extrato também como citotóxico. Não ocorreu aumento na frequência de aberrações cromossômicas (genotoxicidade), no entanto, houve formação significativa de micronúcleos na maioria (3) das concentrações testadas: 50; 250 e 1.000 µg/ml caracterizando o efeito mutagênico (Tabela 2).

Tabela 1. Valores do índice mitótico e médias das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, observados após a exposição por 24 h ao **extrato acetato de etila** do cogumelo bioluminescente *N. gardneri* em diferentes concentrações.

IM e AC	Controles		Tratamentos (µg/ml)				
	DMSO + Salina ¹	CP ²	50	100	250	500	1000
Índice Mitótico	108,67 ± 50,05	225,18 ± 96,71 ^{***}	54,41 ± 34,13 [*]	58,10 ± 18,87	37,51 ± 28,02 ^{**}	47,76 ± 26,37 [*]	21,14 ± 13,75 ^{***}
Broto Nuclear	0,48 ± 1,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,88	0,29 ± 0,47	0,57 ± 1,21 [*]	7,69 ± 11,49 ^{**}
Aderência Cromossômica	0,77 ± 1,10	3,08 ± 1,29 [*]	0,45 ± 1,13	0,38 ± 1,21	0,19 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C- Metáfase	0,10 ± 0,32	1,20 ± 1,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Perda Cromossômica	0,00 ± 0,00	3,35 ± 3,18 ^{**}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ponte Cromossômica	0,09 ± 0,27	2,51 ± 1,43 ^{**}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Quebra Cromossômica	0,00 ± 0,00	1,23 ± 1,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Micronúcleo	1,34 ± 1,37	15,27 ± 12,45 ^{**}	1,01 ± 1,50	2,12 ± 2,06	1,53 ± 2,08	6,67 ± 8,32	3,65 ± 5,36
Total de Alterações Cromossômicas	3,29 ± 2,54	28,80 ± 14,83 ^{**}	1,55 ± 2,00	2,88 ± 2,33	2,31 ± 2,15	10,08 ± 11,00	11,44 ± 16,68

¹Controle Negativo (Dimetilsulfóxido, DMSO 0,2% + Solução salina 0,9%). ²Controle Positivo (MMS: Metilmetanossulfonato, 10 mg/L). Valores comparados ao controle negativo. *Significativo no teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Student-Newman-Keuls (***p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05). Resultados referentes a 5.000 células por concentração. IM=Índice Mitótico; AC=Alterações cromossômicas.

Pontes cromossômicas, fragmentos cromossômicos e parte da formação de micronúcleos estão relacionados à atividade clastogênica (FENECH et al., 2011). As pontes e fragmentos cromossômicos, por exemplo, poderiam ser o resultado de ciclos de ruptura cromossômica-fusão-ponte, elucidados pela primeira vez por Barbara McClintock nos anos 1930 em cromossomos de milho (revisado por JONES, 2005). No entanto, fragmentos cromossômicos também poderiam ser induzidos por vários fatores envolvidos em quebras de DNA (FENECH, 2000). Por outro lado, a formação de micronúcleos poderia ser induzida por atividades tanto aneugênicas como clastogênicas, relacionadas a cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos, respectivamente, não incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular (FENECH et al., 2011).

O broto nuclear tem origem aneugênica, podendo dar origem a micronúcleos. No caso do Ext. AcOEt, sugere-se que este dano foi reparado, não levando à formação de micronúcleos de forma significativa nas células. As alterações ditas mutagênicas (MN) não são passíveis de reparo e passam para as células descendentes durante o processo de divisão celular (BIANCHI et al., 2016).

O fato de não ter ocorrido aumento na frequência de ACs em ambos os extratos de forma significativa, está diretamente ligado à atividade citotóxica, tendo em vista que houve redução no índice mitótico, não havendo, portanto, divisão celular. Foi constatada, ainda, durante a observação das lâminas, alteração na morfologia das células, podendo também ser relacionada com a alta citotoxicidade do cogumelo, indicando que a célula poderia estar entrando em apoptose, devido à observação de células em tamanhos menores que o normal.

Esta atividade pode estar relacionada com a presença de alcaloides em ambos os extratos, para os quais existem relatos de atividade citotóxica na literatura (SABANDAR et al., 2013). Muitos fungos são capazes de produzir metabólitos secundários, alguns dos quais são pigmentos, antimicrobianos ou toxinas para plantas e animais. As toxinas fúngicas podem interromper a produção de energia celular, inibir o transporte de glicose, bloquear a síntese proteica e causar a formação de adutos de DNA, sendo este último responsável pelas propriedades carcinogênicas e mutagênicas de alguns fungos (GUTERRES et al., 2005).

Tabela 2. Valores dos índices mitóticos e médias das alterações cromossômicas em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, observadas após a exposição por 24 h ao extrato metanólico do cogumelo *N. gardneri* em diferentes concentrações.

IM E AC	Controles		Tratamentos (µg/ml)				
	DMSO + Salina ¹	CP ²	50	100	250	500	1000
Índice Mitótico	109,37 ± 50,12	225,18 ± 96,71 ^{***}	42,51 ± 22,29*	49,41 ± 20,59	23,02 ± 22,92 ^{**}	12,38 ± 14,96 ^{***}	12,38 ± 14,96 ^{***}
Broto Nuclear	0,48 ± 1,50	0,00 ± 0,00	1,45 ± 1,65	5,80 ± 16,04	3,39 ± 6,12*	3,52 ± 5,96*	1,87 ± 3,09
Aderência Cromossômica	0,79 ± 1,13	3,08 ± 1,29*	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,29	0,00 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,27
C- Metáfase	0,10 ± 0,32	1,20 ± 1,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Perda Cromossômica	0,00 ± 0,00	3,43 ± 3,11 ^{**}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ponte Cromossômica	0,09 ± 0,27	2,51 ± 1,43 ^{**}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Quebra Cromossômica	0,00 ± 0,00	1,23 ± 1,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Micronúcleo	1,34 ± 2,37	15,52 ± 12,18 ^{**}	5,89 ± 6,68*	3,87 ± 5,17	6,22 ± 6,24*	4,46 ± 4,31	6,95 ± 5,60 ^{**}
Total de Alterações Cromossômicas	3,31 ± 2,53	29,15 ± 14,32 ^{***}	7,44 ± 7,75	9,77 ± 16,09	9,61 ± 11,06	7,98 ± 7,04	8,87 ± 6,04

¹Controle Negativo (Dimetilsulfóxido, DMSO 0,2% + Solução salina 0,9%). ²Controle Positivo (MMS: Metilmetanossulfonato, 10 mg/L). Valores comparados ao controle negativo. *Significativo no teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Student-Newman-Keuls (***p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05). Resultados referentes a 5.000 células por concentração. IM=Índice Mitótico; AC=Alterações cromossômicas.

Estes resultados se fazem de grande importância diante do *screening* de atividades de um produto natural novo como é o caso do cogumelo em questão, e de sua pesquisa como uma futura potencialidade terapêutica, sendo que até o momento, não existe nenhuma investigação acerca da composição química e bioatividades de *N. gardneri*.

Os extratos metanólico e acetato de etila de *Neonothopanus gardneri* possuem efeito citotóxico na maioria das concentrações testadas e alterações cromossômicas não significativas. O extrato metanólico de *N. gardneri* apresentou efeito mutagênico, observado pela formação significativa de micronúcleos na maioria das concentrações testadas.

Esse foi o primeiro estudo a investigar a citotoxicidade e a genotoxicidade desse cogumelo bioluminescente, o que se mostra de grande valia para a comunidade científica e a população em geral, na busca por um novo produto para enfrentamento das doenças existentes, especialmente às relacionadas aos danos no material genético e ciclo celular, como o câncer, tendo em vista a citotoxicidade significativa observada nos testes executados. Adicionalmente, análises sobre a composição química de *N. gardneri* e testes em diferentes bioensaios fazem-se necessários para a elucidação da interferência de seus compostos quanto ao ciclo celular.

4 Conclusão

Os extratos metanólico e acetato de etila do cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* foram capazes de reduzir significativamente o índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa*, resultando em um efeito citotóxico, na maioria das concentrações testadas. Para o extrato metanólico, houve também formação significativa de micronúcleos, em três das cinco concentrações avaliadas, acarretando em efeito mutagênico. De modo geral, *N. gardneri* não causou aumento significativo na frequência de alterações cromossômicas, não ocorrendo, portanto, genotoxicidade, podendo estas alterações terem sido reparadas durante o ciclo celular. A elucidação da estrutura química dos compostos presentes nesses extratos faz-se necessária para uma melhor correlação com os resultados observados neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ATOYEBIL, S.M. et al. Genotoxicity and anti-genotoxicity of aqueous extracts of herbal recipes containing *Luffa cylindrica* (L), *Nymphaea lotus* (L) and *Spondias mombin* (L) using the *Allium cepa* (L) assay. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 15, p. 492-499, 2015.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.3 – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p., 2007.
- BELLINI, M. F. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 122-127, 2008.
- BIANCHI et al. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of environmental sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.
- BIANCHI, J. et al. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475–483, 2016.
- CAPELARI, M.; DESJARDIN, D.E.; PERRY, B.A.; ASAI, T.; STEVANI, C.V. *Neonothopanus gardneri*: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, p. 1433–1440, 2011.
- FEDEL-MIYASATO, L.E.S. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A comparative study. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3411-3425, 2014.
- FELICIDADE, I. et al. Mutagenic And Antimutagenic Effects Of Crude Hydroalcoholic Extract Of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) On Cultured Meristematic Cells *Allium Cepa*. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, 2014.
- FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p.125-132, 2011.
- FERNANDES, T.C.C. et al Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralinherbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. v. 102, p. 99-112, 1985.
- GARDNER, G. Description of a new phosphorescent species of *Agaricus*, with remarks upon it by the Rev. MJ Berkeley. Hooker, **Journal of Experimental Botany**, v. 2, p. 426-428, 1840.

GUTERRES, Z.R. et al. Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. **Genetic and Molecular Biology**, v. 28, p. 458-463, 2005.

JONES, R.N. McClintock's controlling elements: the full story. **Cytogenet Genome Research**, v. 109, p. 90-103, 2005.

KANOKMEDHAKUL, S. et al. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nambi*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 39, p. 8261-8266, 2012. ISSN 0040-4020.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, p. 71-81. 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicines on root mitoses in *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 24 p. 471-486, 1938.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. da S.; MATSUMOTO, S. T. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using *in vivo* and *in vitro* test systems. **Genetics and Molecular Biology**. v. 33, p. 176-181, 2010.

MOHAMMED, K. P. et al. Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research**, v. 777, p. 29-32, 2015.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3rd ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

PING, K. Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. **Molecules**, v. 17, p. 7782-7791, 2012.

POUCHERET, P.; FONS, F.; RAPIOR, S. Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20-Year Retrospective Analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 27, n. 4, p. 311-333, 2006.

ROBERTO, M. M. et al. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SABANDAR, C.W. et al. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. **Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

PERSPECTIVAS

- ✓ Finalizar a caracterização química completa dos compostos isolados de *N. gardneri*;
- ✓ Publicar os dados com outros experimentos até então realizados em Sarcoma 180, câncer de mama e testes com leveduras;
- ✓ Elucidação de mecanismos de ação e testes em diferentes modelos experimentais;
- ✓ Publicação de artigos científicos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NA VIGÊNCIA DO MESTRADO

Premiação (*)

- Menção honrosa de Primeiro lugar por trabalho apresentado na forma de Resumo Expandido, Modalidade Painel em seção pública realizada no decorrer da II Semana Acadêmica de Farmácia- SEMAFAR, em parceria com União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí- UIFARPI. Universidade Federal do Piauí, 2016.
- Menção honrosa por trabalho apresentado na forma de Resumo Expandido, Modalidade Painel em seção pública realizada no decorrer da II Semana Acadêmica de Farmácia- SEMAFAR, em parceria com União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí- UIFARPI. Universidade Federal do Piauí, 2016.
- Menção honrosa de Primeiro lugar por trabalho apresentado na modalidade Comunicação Oral, durante o II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes. Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.
- Prêmio Adauto José Gonçalves de Araújo por trabalho Oral, apresentado durante o II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes. Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.
- Menção honrosa por trabalho apresentado na modalidade Comunicação Oral, durante o XXI Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

Resumos expandidos apresentados em eventos e publicados em anais de congressos

- QUEIROZ, B.C.S.H.; GOMES, D.C.V.; OLIVEIRA, M.D.A.; CARVALHO, R.M.; DA MATA, A.M.O.F.; BARBOSA, S. L.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; COSTA JÚNIOR, J.S. Atividade oxidante do extrato metanólico do fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* em *Saccharomyces cerevisiae*. In: Brazilian Journal of Biodiversity and Biotechnology, ISSN 2447-6714. Anais do III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, v.1, n.1. Parnaíba: UFPI, 2015.
- QUEIROZ, B.C.S.H.; GOMES, D.C.V.; OLIVEIRA, M.D.A.; CARVALHO, R.M.; DA MATA, A.M.O.F.; BARBOSA, S. L.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; COSTA JÚNIOR, J.S. Atividade oxidante do extrato acetato de etila do fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* em *Saccharomyces cerevisiae*. In: Brazilian Journal of Biodiversity and Biotechnology, ISSN 2447-6714. Anais do III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, v.1, n.1. Parnaíba: UFPI, 2015.
- QUEIROZ, B.C.S.H.; ALVES, M.M.M.; SOBRINHO JÚNIOR, E.P.C.; FIGUEIREDO, J.F.S.; OLIVEIRA, M.D.A.; CARVALHO, F.A.A.; COSTA JÚNIOR, J.S. *Neonothopanus gardneri*: Atividade antileishmania *in vitro* sobre formas

- amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. In: Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde, ISSN 2358-6966. Parnaíba, 2016. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes – II CONDONER, v.3,n.3. Parnaíba: UFPI, 2016.
- (*) QUEIROZ, B.C.S.H.; ALVES, M.M.M.; SOUSA, A.C.; OLIVEIRA, M.D.A.; CARVALHO, F.A.A.; COSTA JÚNIOR, J.S. Indução da síntese de Óxido Nítrico em macrófagos peritoneais murinos tratados com *Neonothopanus gardneri* para uso na atividade antileishmania In: Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde, ISSN 2358-6966. Parnaíba, 2016. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes – II CONDONER, v.3, n.3. Parnaíba: UFPI, 2016.
 - QUEIROZ, B.C.S.H.; ALVES, M.M.M.; BRITO, L.M.; CARVALHO, T.P., SOUSA, A.C.; CARVALHO, F.A.A.; OLIVEIRA, M.D.A; COSTA JÚNIOR, J.S. *Neonothopanus gardneri*: antileishmanial activity associated with *in vitro* growth inhibition of *Leishmania amazonensis* promastigotes forms. In: III Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress – III ABCF, Porto Alegre, 2016. III ABCF Congress and I Symposium “Teaching and Research in Pharmaceutical Services in the Omics Era”, p. 183. Porto Alegre: 2016.
 - QUEIROZ, B.C.S.H.; MONTEIRO, C.N.; SOUSA, R.M.S.; MORAIS, J.G.S.; OLIVEIRA, M.D.A.; MARTINS, F.A.; ALMEIDA, P.M.; COSTA JÚNIOR, J.S. Potencial genotóxico e mutagênico do fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* berk. Ex gardner em células meristemáticas de *Allium cepa* L. In: XXI Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE. Recife, 2016. Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste, p. 344. UFPE: Recife, 2016.
 - QUEIROZ, B.C.S.H.; MONTEIRO, C.N.; COSTA, M.W.S.; MARTINS, F.A.; ALMEIDA, P.M. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do extrato foliar da *Poincianella bracteosa* (tul.) L. P. Queiroz, mediante o teste *Allium cepa* L. In: XXI Encontro de Genética do Nordeste – ENGENE. Recife, 2016. Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste, p. 316. UFPE: Recife, 2016.
 - (*) FIGUEIREDO, J.F.S.; ALVES, M.M.M; QUEIROZ, B.C.S.H.; SANTOS, B.N.G.; CITÓ, A.M.G.L.; CARVALHO, F.A.A.; CARVALHO, M.G.F.M. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* HBK, e seus majoritários, timol e carvacrol sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. In: Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde, ISSN 2358-6966. Parnaíba, 2016. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes – II CONDONER, v.3, n.3. Parnaíba: UFPI, 2016.
 - (*) SOUZA, A.C.; BRITO, L.M.; ALVES, M.M.M.; QUEIROZ, B.C.S.H.; FREITAS, S.D.L.; CHAVES, M.H.; CARVALHO, F.A.A. Atividade antileishmania *in vitro* do Extrato Etanólico e frações obtidas da casca do caule de *Platonia insignis* Mart. sobre *Leishmania amazonensis*. In: Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde, ISSN 2358-6966. Parnaíba, 2016. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes – II CONDONER, v.3, n.3. Parnaíba: UFPI, 2016.
 - CARVALHO, T.P.; ALVES, M.M.M.; SOUZA, A.C.; QUEIROZ, B.C.S.H; OLIVEIRA, J.S.S.M.; CHAVES, M.H.; CARVALHO, F.A.A. Avaliação clínica de

camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Leishmania major*, após tratamento com ácido gálico e ácido elágico. In: Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde, ISSN 2358-6966. Parnaíba, 2016. Anais do II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes – II CONDONER, v.3, n.3. Parnaíba: UFPI, 2016.

- (*) ALVES, M.M.M.; QUEIROZ, B.C.S.H.; BRITO, L.M.; SOUZA, A.C.; CARVALHO, T.P; CHAVES, M.H.; CARVALHO, F.A.A. Acting of gallic acid and ellagic acid on promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. In: Revista Integrada de Ciências Farmacêuticas e Saúde do Piauí, ISSN: 2446-6506. Teresina, 2016. Anais da II Semana Acadêmica de Farmácia- SEMAFAR, em parceria com União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí- UIFARPI. UFPI: Teresina, 2016.
- (*) CARVALHO, T.P.; BRITO, L.M.; CARVALHO, C.E.S.; QUEIROZ, B.C.S.H.; SOUZA, A.C.; ALES, M.M.M.; CARVALHO, F.A.A. Evaluation of 2,3-dihydrobenzofuran and lupeol in the topical treatment of leishmaniotic injuries caused by *Leishmania major* in balb/c mice. In: Revista Integrada de Ciências Farmacêuticas e Saúde do Piauí, ISSN: 2446-6506. Teresina, 2016. Anais da II Semana Acadêmica de Farmácia- SEMAFAR, em parceria com União Independente de Farmacêuticos e Acadêmicos de Farmácia do Piauí- UIFARPI. UFPI: Teresina, 2016.
- SILVA, S.W.C.; LIMA, A. B.; QUEIROZ, B.C.S.H; SANTOS, J.V.O.; MACHADO, K.C.M.; REZENDE JÚNIOR, L.M.; SILVA, O. A.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, G. F. Avaliação da toxicidade aguda do (-)-mirtenol e complexo de inclusão (-)-mirtenol- β -ciclodextrina em ratos Wistar. In: Brazilian Journal of Biodiversity and Biotechnology, ISSN 2447-6714. Anais do III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, v.1, n.1. Parnaíba: UFPI, 2015.
- DA MATA, A.M.O.F; SILVA, R.R.; CARVALHO, R.M.; QUEIROZ, B.C.S.H.; RÊGO, S. C.; GOMES, D.C.V.; ALENCAR, M.V.O.B.; PAZ, M.F.C.J.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; SILVA, B.B. Avaliação do potencial oxidativo do 5-fluorouracil e docetaxel em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e dos efeitos do ácido ascórbico. In: Brazilian Journal of Biodiversity and Biotechnology, ISSN 2447-6714. Anais do III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, v.1, n.1. Parnaíba: UFPI, 2015.
- BRAGA, A.L.; MACHADO, K.C.; SILVA, S.W.C.; DA MATA, A.M.O.F.; CARVALHO, R.M.; QUEIROZ, B.C.S.H.; FREITAS, R.M.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; SANTOS, J.V.O. Uso do sistema *Allium cepa* Fiskejo como indicador de genotoxicidade e toxidade do composto β -cariofileno. In: Brazilian Journal of Biodiversity and Biotechnology, ISSN 2447-6714. Anais do III Simpósio Latino – Americano de Biotecnologia do Nordeste – III SLAB, v.1, n.1. Parnaíba: UFPI, 2015.

Produção técnica

- QUEIROZ, B.C.S.H.; COELHO, A.G. Certificados do II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos. 2015. (Editoração/Certificados).

- QUEIROZ, B.C.S.H. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica. 2015. (Organização de Congresso).
- QUEIROZ, B.C.S.H. IV Workshop de Projetos e Dissertações. 2015. (Organização de Evento).

ANEXOS

**ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em experimentação animal –
UFPI**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

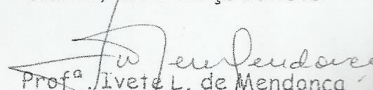


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Estudo da atividade antileishmania, antiesquistossoma, antitumoral e genotóxica do cogumelo bioluminescente *Neonothopanus gardneri***”, protocolo nº **132/16**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPI** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/03/2016**.

Vigência do Projeto	Abril/ 2016 à Dezembro/ 2017
Espécie/Linhagem	1.Camundongo <i>Balb/c</i>; 2.Camundongo <i>Swiss</i>.
Nº de Animais	70
Peso/ Idade	20 a 30 g/ ±2 meses;
Sexo	1.10 (fêmeas); 2.60 (fêmeas).
Origem	Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em plantas Mediciniais-NPPM/UFPI.

Teresina, 15 de Março de 2016.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

116