

**CAROLINE J. S. MARQUES**

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E ANTIVIRAL  
DE *Pycnopus sanguineus* (L.: Fr.) Murr.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Jr.  
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos R. Zanetti  
Prof. Dr. Mário Steindel

FLORIANÓPOLIS  
2001

**CAROLINE J. S. MARQUES**

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E ANTIVIRAL**

**DE *Pycnopus sanguineus* (L.: Fr.) Murr.**

*Assinatura*

FLORIANÓPOLIS  
2001

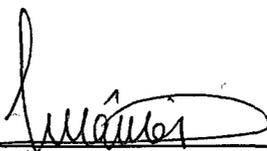
**"Atividade antiparasitária e antiviral de *Pycnopus sanguineus* (Fr.)  
Murr."**

**POR**

**CAROLINE JUNCKES DA SILVA MARQUES**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



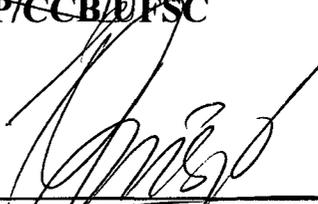
---

**Prof. Dr. Artur Smânia Júnior MIP/CCB/UFSC**  
**Orientador e Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**



---

**Prof. Dra. Sônia Gonçalves Carobrez**  
**MIP/CCB/UFSC**



---

**Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard**  
**MIP/CCB/UFSC**

**Florianópolis, março de 2001**

*Ao meu marido Roger e aos meus pais*

*Amarante e Janete pelo amor e apoio*

*incondicionais.*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Artur Smânia Júnior, pela orientação na realização deste trabalho.

Aos Professores Carlos Roberto Zanetti e Mário Steindel, pela valiosa colaboração e co-orientação desta dissertação

Ao amigo Adolfo Koga, pela imensa colaboração na realização dos ensaios antiparasitários.

Ao Professor Franco Delle Monache, pela identificação química das substâncias utilizadas neste trabalho.

À Professora Clarice Loguercio Leite, pela colaboração e treinamento para identificação e cultivo dos fungos.

À Professora Maria Risoleta, pela colaboração na liofilização das amostras de cinabarina.

Aos queridos colegas do laboratório de Antibióticos: Alexandra, Cleidson, Cíntia, Nelson, Rodrigo e Professora Elza, por toda ajuda e incentivo.

Aos queridos colegas do laboratório de Imunologia: Juliano, Kleber, Fabiano, Juliana e Jean, pela colaboração imprescindível para realização dos testes antivirais.

Aos queridos colegas do laboratório de Protozoologia: Bibiana, Léo, Mônica e Juliana, pela imensa ajuda na realização dos testes antiparasitários.

Ao Sr. João Santana, pela paciência, ajuda e por todos os serviços prestados na secretaria da pós-graduação.

A todos meus familiares que sempre apoiaram minha carreira acadêmica.

Às pessoas que mesmo indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

A Fundação CAPES pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	III
RESUMO.....	IV
INTRODUÇÃO .....	I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
OBJETIVOS .....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO .....	47
CONCLUSÕES .....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATCC** : American Type Culture Collection  
**BHK-21** : células de rim de hamsters recém-nascidos  
**BZN**: benzonidazol  
**°C**: graus centígrados  
**cm<sup>2</sup>** : centímetros quadrados  
**C6** : células de glioma de ratos  
**CCD**: Cromatografia em camada delgada  
**CDC** : Center for Disease Control and Prevention  
**CER**: células de embrião de pinto  
**DL<sub>50</sub>** : dose letal 50% em camundongos  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMSO**: dimetilsulfóxido  
**EBL** : "European Bat Lyssavirus"  
**ERO**: espécies reativas de oxigênio  
**FAT** : Fluorescent Antibody Test  
**g** : gravidade  
**g** : grama (peso)  
**G** : Glicoproteína rábica  
**Ga0**: 5 $\alpha$ -ergost-7en-3 $\beta$ ol  
**Ga1**: 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol  
**Ga2**: 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol.  
**ISE** : inibidores da síntese de esteróis

**L** : RNA-polimerase rábica  
**M** : proteína rábica de matriz  
 **$\mu$ g** : micrograma  
 **$\mu$ l** : microlitro  
**ml** : mililitro  
**N** : nucleoproteína  
**N2A** : células de neuroblastoma murino  
**NFX**: nifurtimox  
**nm** : nanômetros  
**NS** : fosfoproteína rábica  
**OMS** : Organização Mundial de Saúde  
**PBS** : salina tamponada com fosfatos  
**pH** : potencial de hidrogênio  
**PV** : Vírus Pasteur  
**R<sub>f</sub>** : fator de retenção  
**RLO** : radicais livres de oxigênio  
**RNA** : ácido ribonucléico  
**RNP** : ribonucleoproteína  
**SEM**: desvio padrão da média  
**SNC** : Sistema Nervoso Central  
**SNP** : Sistema Nervoso Periférico  
**TCDI<sub>50</sub>** : dose infectante 50% em células  
**UI** : unidades internacionais  
**VSV** : Vírus da Estomatite Vesicular  
**WHO**: World Health Organization

## RESUMO

*Pycnoporus sanguineus* é um fungo saprofítico de crescimento lento comumente conhecido como “orelha de pau” e faz parte da Família Polyporaceae, Aphyllophorales, Basidiomycetes. Esta espécie sintetiza uma variedade de metabólitos e entre esses, pigmentos de coloração vermelho-alaranjado característicos do tipo 2-amino fenoxazina e esteróis. Entre os diversos pigmentos já isolados e identificados, a cinabarina, o ácido cinnabarínico e a tramesanguina são os mais abundantes, enquanto entre os esteróis, o ergosterol e o 5,6-dihidroergosterol são os majoritários. A cinabarina é mais ativa contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas tanto de origem alimentar, quanto de origem humana. Em virtude da grande carência de drogas efetivas para o tratamento de Leishmaniose, Doença de Chagas e a inexistência de uma droga para o tratamento da raiva, neste estudo, a cinabarina e os esteróis 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga1) e 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga2) foram isolados para que as atividades antiparasitária e/ou antiviral dessas substâncias fossem testadas. A partir de basidiomas de *P. sanguineus* foram obtidos extratos em hexano e em acetona, os quais foram cromatografados em coluna de gel de sílica e as frações obtidas foram agrupadas pela análise em cromatografia em camada delgada. Após a purificação e identificação das substâncias, foram realizados os ensaios biológicos. A cinabarina reduziu em 4 vezes o título do vírus rábico, porém não se apresentou ativa contra os protozoários devido a sua alta instabilidade química. O Ga1 foi pouco solúvel em alguns solventes de baixa toxicidade biológica e não foi possível determinar a sua atividade antiviral. A substância autoclavada reduziu a quantidade de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* de modo equipotente ao controle (benzonidazol). O Ga2 não apresentou atividade antiviral sem que houvesse um efeito citopático sobre as células. Este esterol apresentou uma atividade antitripanosoma 4 vezes maior que o controle, e em um estudo preliminar apresentou atividade contra as formas tripomastigotas sanguíneas. O Ga2 apresentou elevada atividade antileishmania contra as três cepas testadas.

## ABSTRACT

*Pycnoporus sanguineus* is a slow-growing saprophytic fungus from the Basidiomycetes class and Polyporaceae Family. This species synthesizes secondary metabolites like 2-amino phenoxazin-3-one pigments and sterols. Among the several pigments that have already been isolated and identified, cinnabarin, cinnabarinic acid and tramesanguin are the most abundant, while among the sterols, ergosterol and 5,6-dihydroergosterol are the major ones. The cinnabarin is more active against Gram-positive bacteria than against Gram-negative. Besides, the bacteria isolated from human origin are more sensitive than those of alimentary origin. Due to the great lack of effective drugs for the treatment of leishmaniasis, Chagas disease and the lack of a drug for the treatment of the rabies, in this study, the cinnabarin and sterols 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga1) and 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga2) were tested for antiparasitic and/or antiviral activities. *P. sanguineus* basidiomata were obtained from tree decay and extracted with hexane and acetone. The extracts were chromatographed in silica gel column and the obtained fractions were analyzed by thin layer chromatography. After the purification and the identification of the substances, the biological activities were assayed. The cinnabarin reduced by four times the titre of the rabies virus, however, it was not active against the protozoan parasites. The sterol named as Ga1 was not soluble in some solvents that had low biological toxicity, therefore it was not possible to determine its real antiparasitic and antiviral potency. But, even so, the sterol after having been autoclaved was able to reduce the amount of epimastigotes forms of the strain Y of *Trypanosoma cruzi* in the concentration equivalent to the drug used as control (benznidazole). The Ga2 sterol did not present antiviral activity without showing cytopathic effect on the cells. The Ga2 presented activity against culture epimastigotes approximately four times higher than the control drug, and in a preliminary study showed activity against blood trypomastigotes "in vitro". The Ga2 presented high antiparasitic activity against the three tested strains of *Leishmania* spp.

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são importantes fontes de novos medicamentos, quer pelo aproveitamento de metabólitos secundários ou pelo uso de seus derivados biossintéticos e semi-sintéticos, os quais são produzidos com o intuito de aumentar a sua eficácia, melhorar a absorção, ou ainda diminuir a toxicidade. Muitos dos medicamentos atualmente disponíveis têm origem vegetal e animal, e os fungos destacam-se por representar uma fonte significativa de compostos antimicrobianos e imunomoduladores (Piraino e Brandt, 1999).

Os fungos Basidiomycetes têm sido utilizados na medicina popular por diversas comunidades desde os tempos antigos. Para uso medicinal, destacam-se as espécies que têm basidioma macroscópico (Wasser e Weis, 1999a). Dessas espécies, um grande número de metabólitos secundários já foram isolados e identificados. Além disso, muitos são os estudos que relacionam essas substâncias com diferentes atividades biológicas, credenciando algumas dessas a serem candidatas a novos fármacos. Entre as substâncias cuja atividade biológica já foi descrita é interessante citar os  $\beta$ -D-glucanos (p. ex.: lentinan, de *Lentinus edodes*) que atuam aumentando ou potencializando a resistência do hospedeiro e que estão sendo investigados para o tratamento de câncer, doenças de imunodeficiência (incluindo AIDS), ou imunodepressão generalizada pós-tratamento com drogas. Esses polissacarídeos e outras macromoléculas que ocorrem em Basidiomycetes, apresentam a capacidade de fortalecer a imunidade humoral do organismo para impedir infecções bacterianas, virais ou parasitárias (Wasser e Weis, 1999 b). Outros Basidiomycetes, também sintetizam polissacarídeos imunomoduladores, entre esses, *Tramella fuciformis*, *Schizophillum commune*, *Dendropolyporus umbellatus*, *Hericium*

*erinaceus*, *Inotus obliquus*, *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *L. edodes* e *Flammulina velutipes* (Chiara *et al.*, 1982; Jong *et al.*, 1991; Irinoda *et al.*, 1992; Mizuno, 1995a, b, 1996, 1998; Mizuno, Sarkar e Chiara, 1995; Suzuki *et al.*, 1986, 1989, 1990, Wasser e Weis, 1999b). Diversas outras substâncias biologicamente ativas já foram isoladas de espécies encontradas em Basidiomycetes e são efetivas contra vários tipos de infecções virais, bacterianas e parasitárias. Entre essas, a campestrina, um antibiótico isolado de *Pasiliota campestris* (Bose, 1955); o armillane, um sesquiterpeno antibacteriano isolado de *Armillaria mellea* (Donnelly e Hutchinson, 1990); os ácidos ganodéricos Z, Y, X, W, V e T, potentes agentes anticâncer *in vitro*, e ganoderiol A, B e F, ganodermanotriol e ácidos ganodéricos B, H e C1, que são potentes agentes anti-HIV *in vitro* inibindo o efeito citopático e a atividade de protease desse vírus (Kim e Kim, 1999). Comparando os grupos de antimicrobianos disponíveis para o uso clínico observa-se uma grande diversidade de moléculas com atividade antibacteriana, poucas com atividade antifúngicas e raras com atividades antiparasitárias e antivirais (Vlietinck *et al.*, 1997). Este fato é observado em uma das parasitoses que representa um grande problema de saúde pública no Brasil e na América Latina, isto é, a doença de Chagas, na qual apenas dois fármacos (benzonidazol e nifurtimox) são utilizados atualmente na quimioterapia específica da doença. Ambos os compostos, são efetivos em reduzir a duração e a severidade clínica da doença de Chagas aguda e congênita. Entretanto estes compostos têm limitada eficácia terapêutica na fase crônica da doença, onde os índices de cura são inferiores a 10% (Andrade *et al.*, 1991). Além da baixa eficácia, principalmente nos casos crônicos da doença, ambas as drogas apresentam alta toxicidade, o que leva a diversos efeitos colaterais, incluindo distúrbios gastrointestinais, vômito, emagrecimento, leucopenia e dermatopatia alérgica (Rassi e Luquetti, 1992).

O insucesso da terapia antiparasitária não é isolado, outros problemas também são enfrentados na terapia antiviral. Uma das mais importantes razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de drogas antivirais é devido à natureza dos agentes de infecção viral, que dependem totalmente da célula que eles infectam para a sua multiplicação e sobrevivência, por isso muitos compostos que podem causar a morte dos vírus também podem igualmente injuriar as células hospedeiras que abrigam os mesmos. Na situação ideal, a droga antiviral deve bloquear irreversivelmente a síntese viral detendo a infecção, enquanto o sistema imune se prepara para destruir as partículas virais, evitando a apoptose. A demanda por novas terapias antivirais é importante, por conseguinte, todas as abordagens possíveis na direção do desenvolvimento de novas drogas antivirais ou virucidas devem ser pesquisadas (Vlietinck *et al.*, 1997).

Apesar de todas as particularidades requeridas para o sucesso de um agente antiviral, muitos dos estudos desenvolvidos com fungos superiores apresentaram bons resultados. Por exemplo, o basidiomiceto *Fomes fomentarius* apresentou atividade antiviral *in vitro* contra o vírus do mosaico do fumo e o extrato do fungo comestível *L. edodes* apresentou inibição na replicação de diversos vírus tais como: vírus do herpes simples, vírus da encefalite eqüina ocidental, poliovírus, vírus do sarampo, vírus da caxumba e vírus da imunodeficiência humana (Piraino e Brandt, 1999). Além desses, muitos outros estudos relacionados com atividades antibacteriana, antiviral e antiparasitária de substâncias extraídas de Basidiomycetes foram descritos (Hervey, 1947; Brain, 1950; Benedict e Brady, 1972; Aoki, 1984; Ying *et al.*, 1987; Sarkar *et al.*, 1993; Smânia *et al.*, 1995 a; Amoros, 1997; Smânia *et al.*, 2000; Wasser e Weis, 1999 a, 1999 b;).

Como pode ser observado, há grande diversidade estrutural entre os metabólitos que são sintetizados por Basidiomycetes. Muitos desses metabólitos já foram estudados quanto a atividade biológica e alguns deles apresentaram bons resultados em estudos

preliminares. No entanto, há uma grande carência de drogas efetivas para o tratamento de Leishmaniose, Doença de Chagas e a inexistência de uma droga para o tratamento da raiva. Além disso, a maioria dos quimioterápicos atualmente utilizados produzem efeitos colaterais (Sepúlveda-Boza e Cassels, 1995). Essas observações salientam a importância da pesquisa sistemática por substâncias tripanocidas e antivirais a partir de fontes naturais, visando a obtenção de drogas mais eficientes e de baixa toxicidade (Iwu, 1994). Assim espera-se que muitas das plantas medicinais que são hoje conhecidas e usadas como tratamento alternativo, dêem origem no futuro aos novos agentes antivirais e antiparasitários.

Nesse sentido, e seguindo uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina coordenado pelo Professor Artur Smânia Júnior, foi dado prosseguimento ao estudo da atividade antimicrobiana do fungo *Pycnoporus sanguineus*. Esse fungo sintetiza um grupo de metabólitos secundários cuja estrutura básica é um anel fenoxazínico. Dentre as substâncias que integram esse grupo, a cinabarina é a mais abundante, e o ácido cinabarínico e a tramesanguina estão entre as minoritárias. Além dos derivados fenoxazínicos, esteróis também são isolados a partir dessa espécie (Achenbach e Blümm, 1991). Estudos sobre a biossíntese da cinabarina e sua atividade antimicrobiana já foram realizados (Smânia *et al.*, 1995 a; 1995 b; 1997). Neste trabalho, são descritos resultados referentes a promissora atividade antiparasitária e antiviral de alguns desses constituintes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Pycnopus sanguineus*

*P. sanguineus* (figura 1) é um fungo saprofitico de crescimento lento comumente conhecido como “orelha de pau” e faz parte da Família Polyporaceae, Classe Basidiomycetes (Nobles e Frew, 1962). O seu habitat é sobre madeira de angiospermas (Guzmán-Dávalos e Gúzman, 1979).

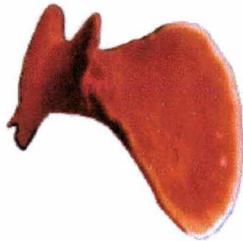


Figura 1 – *Pycnopus sanguineus*

Segundo Alexopolus e Mins (1979), o enquadramento taxonômico completo é:

Reino: Myceteae

Divisão: Amastigomycotina

Subdivisão: Basidiomycotina

Classe: Basidiomycetes

Subclasse: Holobasidiomycetidae

Ordem: Aphyllophorales

Família: Polyporaceae

Gênero: *Pycnopus*

Espécie: *Pycnopus sanguineus* (L.: Fr.) Murr. Bull. Torrey Bot. Club, **31**, 421, 1904.

Algumas sinonímias e um basinômio foram citados por Gilbertson e Ryvar den (1987) e Nobles e Frew (1962):

- Basinômio: *Boletus sanguineus* L. Ex Fr. Sp. Plant. 2nd p. 1646, 1763.

- Sinonímia: *Polyporus sanguineus* L. Ex Fr.; *Polystictus sanguineus* (L. Ex Fr.) Fr.; *Trametes sanguinea* (L. Ex Fr.) Loyd e *Coriolus sanguineus* (L. Ex Fr.) Cunningham.

*P. sanguineus* é um fungo capaz de produzir degradação branca de madeira, ou seja, é um dos organismos responsáveis pela completa degradação da lignina a dióxido de carbono e água. Em termos de biotecnologia, a capacidade de degradação da lignina é muito importante para o meio ambiente (Capelari & Zadrazil, 1997). O uso destes fungos pode ajudar na degradação de xenobióticos, aumentar a digestibilidade de alimentos lignocelulósicos, na detoxificação de alimentos contendo taninos e na biorremediação da indústria papelreira (Guzmán-Dávalos e Gúzman, 1979).

Um estudo comparativo da degradação de palha de trigo e serragem de pinho foi conduzido utilizando-se culturas de fungos para encontrar um eficiente decompositor de lignina para cada substrato. Em ambos os substratos, *Polystictus sanguineus* (sin. *P. sanguineus*) foi o melhor produtor de lacase, enzima do complexo de degradação da lignina (Arora e Garg, 1992).

Segundo Castilho e Demoulin (1997), *P. sanguineus* é muito sensível à salinidade, porém é tolerante a uma ampla variação de temperatura, suportando inclusive temperaturas superiores a 50°C. Este mesmo autor cita *P. sanguineus* como uma espécie euritêmica, o que explicaria a sua ocorrência em todas as estações, tanto dentro das florestas quanto em lugares abertos, incluindo praias. No entanto, isso não é observado na Ilha de Santa Catarina, pois o basidiocarpo é encontrado anualmente, nos meses mais quentes do ano (Loguercio-Leite, 1990).

Para o gênero *Pycnopus* são descritas 3 espécies: *P. cinnabarinus* (Jacq.:Fr.) Karst., *P. coccineus* (Fr.) Bond. e Sing. e *P. sanguineus* (L.:Fr.) Murr. As duas primeiras espécies ocorrem em regiões temperadas e o *P. sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais e é a única espécie citada para o Brasil (Nobles e Frew, 1962). Estas espécies sintetizam uma variedade de metabólitos e entre esses, os pigmentos de coloração vermelho-alaranjado característicos do tipo 2-amino fenoxazina (figura 2) e os esteróis. Entre os diversos pigmentos já isolados e identificados, a cinabarina, o ácido cinnabarínico e a tramesanguina são os mais abundantes, enquanto entre os esteróis, o ergosterol e o 5,6-dihidroergosterol são os majoritários (Tabela 1) (Achenbach e Blümm, 1991; Eggert, 1997).

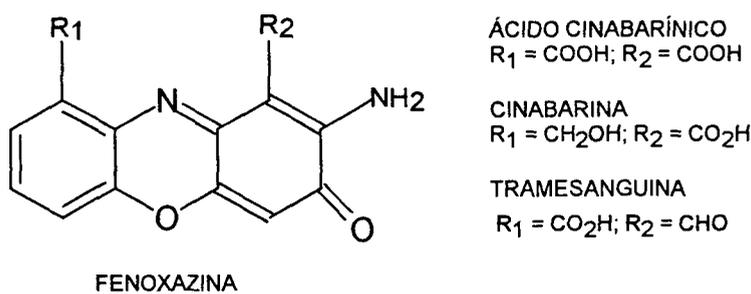


Figura 2 – Estrutura dos derivados fenoxazínicos.

Tabela 1. Constituintes majoritários de *P. sanguineus*

Classe do Composto	Composto
Esteróis	Ergosterol
	5,6- Dihidroergosterol
	Peróxido de Ergosterol
Fenoxazinas	Cinabarina
	Ácido cinnabarínico
	Tramesanguina
	O-Acetil cinabarina
	2-Amino-9-formilfenoxazona-1- ácido carbônico
	9-hidroximetil-2-metilamino-fenoxazona-1-ácido carbônico metil ester
	Fenoxazona
Pycnosanguina	

Fonte: Achenbach e Blümm, 1991.

A cinabarina é um pigmento laranja que tem uma estrutura básica de fenoxazin-3-ona, com um grupo carbonila no C-1, um grupo amino no C-2 e um grupo hidroxila no C-9 (Achenbach e Blümm, 1991). Essa substância tem mostrado ser ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas justificando o uso de *P. sanguineus* pela medicina popular no tratamento de várias doenças infecciosas de origem bacteriana (Smânia *et al.*, 1995a). Na literatura ainda é descrito que esse fungo vem sendo utilizado por nativos da América Latina e África como alimento e medicamento (Alibert, 1944; Fidalgo, 1965; Fidalgo e Hirata, 1979; Pérez-Silva *et al.*, 1988).

Esta substância tem um cromóforo de cor laranja que poderia ser transferido a alimentos (corante natural). Smânia *et al.* (1998) avaliaram a ação antibacteriana da cinabarina contra bactérias isoladas de alimentos. Neste trabalho, observou-se que as bactérias oriundas de alimentos foram mais resistentes que aquelas de fontes humanas, porém nos dois casos a cinabarina foi mais ativa contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas (Smânia *et al.*, 1995a; Smânia *et al.*, 1998).

Estudos com culturas de *P. sanguineus* mostraram que a síntese da cinabarina ocorreu principalmente entre o 18º e 23º dias de incubação, fase em que a produção de biomassa é menos acelerada (Smânia *et al.*, 1995b). Além disso, também foi constatado que as melhores condições para aumentar a produção desta substância pelo fungo são: pH inicial igual a 9,0, incubação a temperatura de 25°C, e presença de luz (Smânia *et al.*, 1997).

Além dos derivados fenoxazínicos, o *P. sanguineus* assim como outros Basidiomycetes sintetizam diversos esteróis (Tabela 1). Essas substâncias possuem um núcleo tetracíclico ciclopentanoperidrofenantreno ou esqueletos derivados deste, com uma ou mais ligações duplas ou expansões e contrações dos substituintes presentes nos anéis. Os esteróis não são encontrados apenas em fungos. Existe uma variedade de esteróis como

“produtos finais” nos vários sistemas biológicos: colesterol, sitosterol, e ergosterol (figura 3), os quais são a maioria dos esteróis frequentemente associados com animais, plantas superiores e fungos, respectivamente (Weete, 1989).

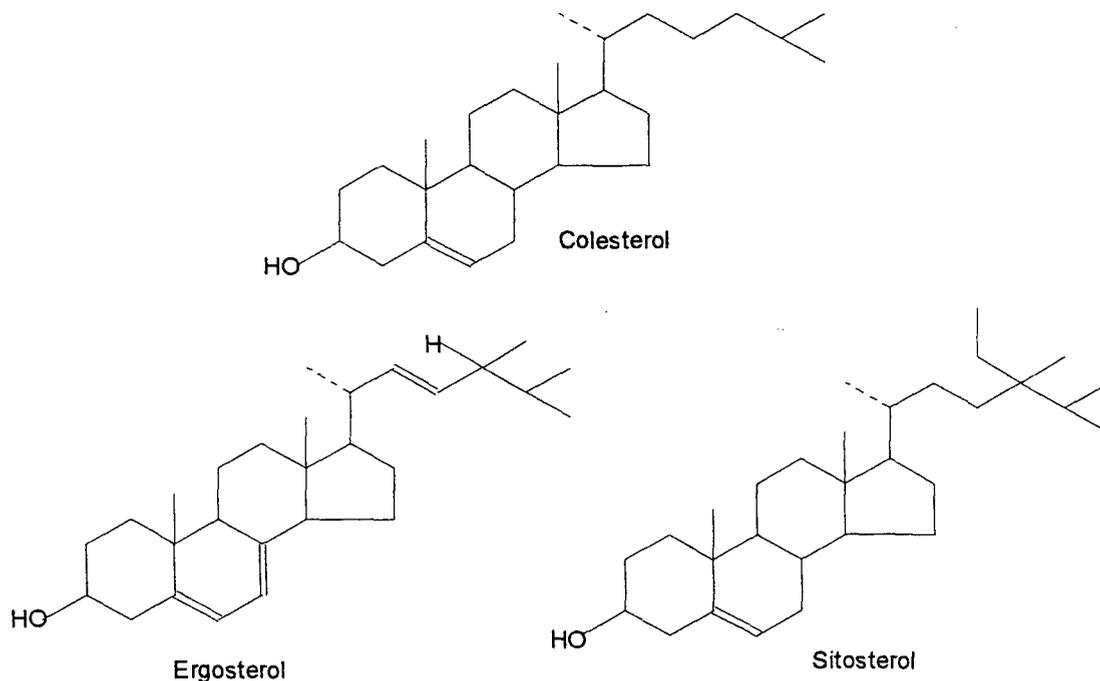


Figura 3 – Esteróis estruturais mais comuns em animais (colesterol), fungos (ergosterol) e plantas (sitosterol).

Smânia *et al.* 2000 demonstraram a atividade antibacteriana de esteróis isolados do Basidiomycetes *Ganoderma applanatum*. Três esteróis foram isolados:  $5\alpha$ -ergost-7en-3 $\beta$ ol,  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol e 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol. Entre os três esteróis estudados, o terceiro foi o mais ativo e as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis.

## 2.2 DOENÇA DE CHAGAS

Esta infecção é uma zoonose do continente americano que se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, com elevada prevalência no Brasil (Rey, 1992). A doença de Chagas também é conhecida por tripanossomíase americana, e tem por agente causal o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), um protozoário flagelado, digenético, pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (Rey, 1992).

Em condições naturais, o mecanismo de transmissão do *T. cruzi* ao homem se dá através da deposição das dejeções (fezes e urina) do triatomíneo infectado sobre a pele e as mucosas do hospedeiro por ocasião do seu repasto sanguíneo. Entretanto deve-se ressaltar outros mecanismos alternativos como a transmissão transfusional, a congênita, a acidental de laboratório, o transplante de órgãos e por via oral (Dias, 1979).

### 2.2.1 Ciclo Biológico

O *T. cruzi* apresenta um ciclo biológico bastante complexo incluindo três formas evolutivas distintas (figura 4) e requer a participação de um hospedeiro invertebrado (triatomíneo), e de um hospedeiro vertebrado, que abrange uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem.

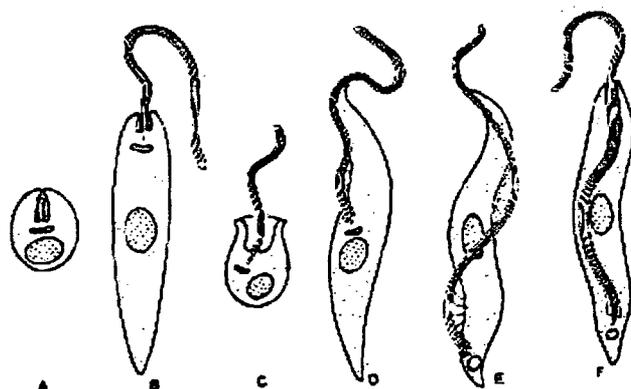


Figura 4– Principais formas sob as quais podem apresentar-se os flagelados da Família Trypanosomatidae. A, Amastigota; B, Promastigota; C, Coanomastigota; D, Epimastigota; E, Tripomastigota; F, Opistomastigota (Rey, 1992).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo do parasita envolve fenômenos de reconhecimento, adesão e interiorização celular. Uma vez no interior da célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas, as quais se evadem do vacúolo endocítico e se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Após um período de 3 a 4 dias, precedendo o rompimento da célula parasitada, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados ao meio extracelular, podendo infectar as células adjacentes ou ganhar a corrente sanguínea, de onde poderão atingir novas células em outros órgãos cumprindo um novo ciclo de multiplicação, ou permanecerem no sangue circulante do hospedeiro e serem ingeridos pelo inseto vetor por ocasião do repasto sanguíneo (figura 5). No triatomíneo os tripomastigotas presentes no sangue ingerido evoluem para formas epimastigotas, as quais sofrem intensa multiplicação ao longo do tubo digestivo do inseto e, ao atingirem a ampola retal, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, os quais se constituem nas formas infectantes para o hospedeiro mamífero (Steindel, 1993).

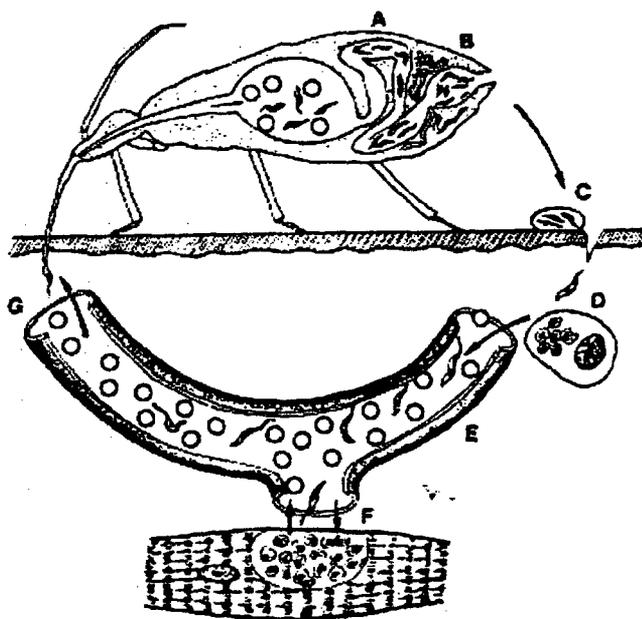


Figura 5 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. No intestino do inseto (A) há multiplicação de formas epimastigotas; na ampola retal (B), os parasitos transformam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados com as fezes (C); ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, os flagelados invadem o tecido subcutâneo (D) onde sob a forma amastigota, voltam a multiplicar-se; daí passam para o sangue, como tripomastigotas (E), e disseminam-se pelo organismo, atacando músculos e outros tecidos (F). O ciclo se fecha quando o paciente é sugado por outro triatomíneo (G) e as formas sanguíneas chegam ao intestino do inseto (Rey, 1992).

### **2.2.2 Patologia**

A doença de Chagas no homem apresenta um curso clínico bastante variado. Inicialmente o paciente desenvolve uma fase aguda, 10 a 40 dias após a infecção, que pode apresentar um considerável parasitismo sanguíneo e tecidual. Esta fase é geralmente assintomática, entretanto alguns pacientes podem desenvolver sintomas graves como miocardite (Rassi, 1979). Posteriormente, o paciente entra na fase crônica que se caracteriza por um parasitismo tecidual e sanguíneo escasso e de difícil detecção. A maioria dos pacientes na fase crônica não apresenta sintomas, podendo permanecer assintomáticos por décadas ou por toda a vida, caracterizando a forma indeterminada ou assintomática da doença. Em alguns casos, estes pacientes podem evoluir para uma forma sintomática da doença. As manifestações mais comuns são o comprometimento do sistema cardíaco (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva), ou de ambos (forma cardiodigestiva) (Brenner, 1987). A principal causa de morbidade e mortalidade da doença de Chagas é a cardiopatia inflamatória crônica. No Brasil, cerca de 50 a 60% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam a forma indeterminada da doença, 20 a 30% apresentam a forma cardíaca associada ou não a megacólon ou megaesôfago e 8 a 10% apresentam a forma digestiva (Dias, 1992).

### **2.2.3 Tratamento**

A quimioterapia da Doença de Chagas é ainda muito inadequada, apenas dois fármacos são disponíveis para o tratamento da doença, o Nifurtimox (NFX), atualmente fora do mercado devido a gravidade de seus efeitos tóxicos, e Benzonidazol (BNZ), um derivado nitroimidazólico sintetizado pela Roche e comercializado no Brasil com o nome de Rochagan® (Rezende e Rassi, 1995).

O objetivo do tratamento é suprimir a parasitemia e, conseqüentemente, seus efeitos patogênicos ao organismo. De acordo com o Ministério da Saúde dos governos do Brasil e da Argentina, o tratamento com BNZ está indicado na fase aguda da doença, em casos de transmissão congênita, na reativação da parasitemia por imunossupressão (AIDS e outras doenças imunossupressoras), e transplantado que recebeu órgão de doador infectado.

#### 2.2.4 Benzonidazol

O benzonidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida) (figura 6) é atualmente o único fármaco empregado no tratamento da Doença de Chagas no Brasil e na Argentina (Dias, 1987). Os efeitos terapêuticos do BNZ na infecção chagásica humana mostram notáveis diferenças, que se explicam em parte, pela existência de cepas de *T. cruzi* com suscetibilidade diferente frente ao fármaco, o que constitui um grande problema biológico.

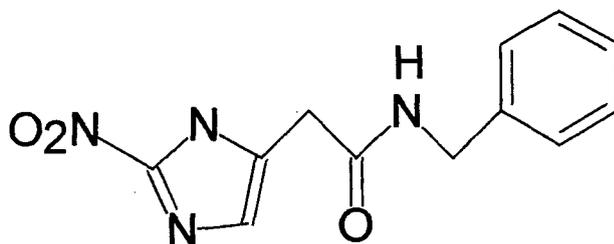


Figura 6- Estrutura do Benzonidazol

Além de inúmeros efeitos colaterais, há na literatura evidências da carcinogenicidade induzida por BNZ (Teixeira *et al.*, 1985b, 1990 a, 1990 b).

O BZN e o NFX inibem a síntese de DNA, do RNA e de proteínas de *T. cruzi*, aumentando também a degradação destas macromoléculas (Gonzalez e Gazzulo, 1989). A toxicidade do fármaco pode ser atribuída a diversos fatores: (a) ação direta do radical

nitroânion sobre moléculas suscetíveis entre elas o DNA (Docampo *et al.*, 1981); (b) geração de radicais livres de oxigênio (RLO) (Docampo *et al.*, 1979; 1981); (c) produção de moléculas reativas por redução, cuja citotoxicidade é conhecida (derivados nitroso e hidroxilamina); (d) inibição direta de enzimas.

O *T. cruzi* é um organismo deficiente em enzimas antioxidantes, por exemplo, a catalase e a superóxido dismutase (Docampo *et al.*, 1981). Esta diferença determina o efeito do fármaco sobre o parasita. Os produtos da redução dos nitroimidazois, tanto o radical nitroânion como os derivados nitroso e hidroxilaminas, bem como os RLO formados durante o processo, podem reagir com o DNA formando aductos (Olive e McCalla, 1977) que facilitam a ruptura das cadeias de nucleotídeos, causando mutagênese e alcalinização de proteínas (McCalla, 1971). Estes efeitos se somam aos do superóxido e o radical hidroxil.

A sensibilidade dos parasitas aos RLO freqüentemente depende de uma deficiência nas defesas bioquímicas contra o dano provocado pelos mesmos. Considerando estas deficiências no aspecto biológico dos parasitas, diferentes daquelas encontradas nos mamíferos, estas células são mais suscetíveis ao dano oxidativo.

De forma semelhante, a ação tripanocida do BZN parece estar relacionada à sua capacidade de sofrer redução parcial, formando radicais quimicamente reativos que determinam a produção de compostos de oxigênio tóxicos e parcialmente reduzidos, como, por exemplo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Docampo e Moreno, 1984, 1986; Morello, 1988). Aparentemente, o *T. cruzi* apresenta baixos níveis de glutatona reduzida e carece de catalase e glutatona peroxidase, tornando o parasita extremamente vulnerável ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Boveris *et al.*, 1980). A reação das ERO com macromoléculas celulares resulta em peroxidação dos

lipídios e lesões de membrana, inativação enzimática, mutagênese e carcinogênese (Moreno *et al.*, 1980).

A peroxidação lipídica é um conjunto de reações de ERO em cadeia que causam degeneração das membranas celulares (Kappus, 1987). Sabe-se que a maioria dos produtos da peroxidação lipídica apresenta propriedades mutagênicas e carcinogênicas. As ERO são produzidas por diferentes mecanismos (Dix e Aikens, 1993) e as enzimas dependentes do sistema citocromo P450, que metabolizam xenobióticos e certas substâncias endógenas, têm papel importante na produção de ERO (Bondy e Naderi, 1994). Portanto, a indução destas enzimas pode estar envolvida na indução de carcinógenos.

### **2.3 LEISHMANIOSE**

A Leishmaniose humana é causada por espécies e subespécies de protozoários do gênero *Leishmania* e Família Trypanosomatidae. A infecção ocorre em todos os continentes tropicais, exceto Austrália, e afeta cerca de 10 milhões de pessoas (WHO, 1997). Inúmeras espécies de mamíferos são reservatórios destes parasitas que são transmitidos para os seres humanos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Tracy e Webster, 1996).

Promastigotas, flagelados extracelulares livres, que vivem no trato gastrointestinal anterior do hospedeiro invertebrado são depositados sobre a pele do mamífero juntamente com a saliva do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Os parasitas são fagocitados pelos macrófagos teciduais e dentro destas células se diferenciam em amastigotas os quais se multiplicam por divisão binária e residem nos fagolisossomos. A ocorrência da doença sistêmica ou localizada depende das espécies e subespécies do parasita infectante, da distribuição de macrófagos infectados e especialmente da resposta imune do hospedeiro.

Em ordem crescente de envolvimento sistêmico e severidade clínica, a leishmaniose humana pode ser classificada nas formas cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (Calazar) (Tracy e Webster, 1996).

### **2.3.1 Tratamento**

O medicamento de escolha é a N-metil-glucamina (antimonial pentavalente, comercializado como Glucantime®). Recomenda-se a continuação do tratamento até a completa cicatrização da úlcera (Genaro, 1997).

A via de administração é geralmente intramuscular, mas pode ser feito endovenoso ou local. A droga não deve ser utilizada em pacientes cardíacos e nem em mulheres grávidas, pois o antimônio pode provocar alterações eletrocardiográficas e também é abortivo (Genaro, 1997).

Em casos de resistência ao tratamento, pode ser utilizado o isotiocianato de Pentamidina ou a Anfotericina B.

No Brasil, a imunoterapia é utilizada em diferentes esquemas de tratamento, utilizando como antígeno uma vacina preparada para imunoprofilaxia (Leishvacin®, Biobrás, Montes Claros, MG). Esta vacina representa uma alternativa terapêutica de casos “resistentes” aos antimoniais ou com a contra-indicação do seu uso, tais como cardiopatas, nefropatas, mulheres grávidas, idosos, entre outros (Genaro, 1997).

## 2.4 RAIVA

### 2.4.1 Conceito

A raiva é uma encefalite viral fatal com distribuição praticamente mundial, que afeta o homem, a maioria dos mamíferos domésticos e um grande número de mamíferos selvagens. O homem pode adquirir o vírus rábico através da saliva de animais raivosos que se deposita em arranhões na pele ou nas mucosas, por aerossóis contendo patógenos, que podem ser encontrados no ar das cavernas, e em acidentes no laboratório, durante o manuseio do vírus ou de animais infectados (BAER *et al.*, 1968; Price, 1997 e Nova *et al.*, 1996).

### 2.4.2 O vírus rábico

O vírus rábico pertence à ordem Mononegavirales, Família Rhabdoviridae (Pringle, 1991). A Família Rhabdoviridae é composta de vários gêneros, dos quais só dois infectam mamíferos: o gênero *Vesiculovirus*, onde estão os vírus que causam a estomatite vesicular (VSV), e o gênero *Lyssavirus*, onde está o vírus rábico e outros vírus "aparentados". A raiva é causada por um grupo de diferentes agentes do gênero *Lyssavirus*, os quais foram classificados segundo parâmetros sorológicos e antigênicos em 4 sorotipos e 6 genotipos.

O sorotipo 1 engloba as amostras clássicas de vírus rábico (as chamadas amostras selvagens e amostras fixas) (Schneider *et al.*, 1973; Bourhy *et al.*, 1990). Nos outros sorotipos ( 2, 3 e 4) estão agrupados os vírus denominados "aparentados" (Boulger e Portefield, 1958; King e Tuner, 1993; Familusi *et al.*, 1972; Shope *et al.*, 1970; Meredith *et al.*, 1971).

### **2.4.3 Estrutura e morfologia**

A maioria dos Rhabdovirus são cilíndricos, tem forma de "bala de fuzil", com uma extremidade arredondada e outra plana. O vírus rábico possui em média 180 nm de comprimento e 75 nm de diâmetro (Murphy, 1991), sendo constituído por dois elementos estruturais principais, a ribonucleoproteína (RNP) e o envelope viral que envolve a RNP.

A ribonucleoproteína (RNP) ou nucleocapsídeo apresenta-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples associado a uma nucleoproteína (N) e a uma fosfoproteína (NS) (Sokol *et al.*, 1971), assim como a RNA polimerase-RNA dependente, a proteína L (Kawai, 1971). A proteína N é a mais importante no processo de encapsidação estando intimamente ligada ao genoma (Tordo *et al.*, 1986 a, 1986 b). A proteína NS possui papel importante na replicação viral, já que esta é inibida por anticorpos monoclonais específicos para essa proteína (Lafon e Wiktor, 1985). É uma proteína interna, não estrutural (nonstructural – NS) (Delagneau, Perrin, Atanasiu, 1981). A proteína L é responsável pela transcrição e replicação do genoma (Tordo *et al.*, 1988).

O genoma do vírus é constituído por RNA de fita simples e de polaridade negativa, isto é, não é diretamente traduzido pela maquinaria enzimática, mas serve de molde para uma transcrição autônoma dando origem a moléculas complementares positivas capazes de produzir novas partículas virais (Tordo, 1991).

### **2.4.4 PATOGENIA**

O vírus rábico penetra no organismo geralmente pela via subcutânea, por mordida ou arranhadura de animal infectado, ou pelo contato da saliva contaminada com mucosas ou ferimentos recentes. Uma outra via possível de penetração do vírus é o contato estreito com mucosas, especialmente a respiratória. A contaminação por via aérea foi demonstrada,

em condições naturais, quando animais sadios foram colocados dentro de grutas onde viviam colônias de morcegos contaminados (Constantine, 1962). A contaminação por via oral se mostrou possível quando cães se contaminaram ao comer carcaça de raposas infectadas na região do Ártico (Mansel, 1951).

O vírus pode ser detectado durante um breve período de tempo no sítio de inoculação (Dean, Evans, McClure, 1963). Assim o tratamento humano pós-exposição, que inclui limpeza do ferimento e uso de soro e vacina, fornece resultados excelentes desde que seja iniciado dentro de poucos dias após o acidente. É necessário que haja tempo de remover ou neutralizar o vírus antes que ele penetre nos nervos periféricos onde estará protegido de uma resposta imune do hospedeiro (King e Tuner, 1993).

Após um breve período de persistência no local da infecção o vírus entra em fase de eclipse traduzida pela impossibilidade de detectá-lo em qualquer tecido (Baer *et al.*, 1968; Schneider, 1969 a, 1969 b). O vírus deve se replicar nas fibras musculares antes de invadir o sistema nervoso central (SNC). Essa etapa representa uma amplificação, necessária para que se tenha uma quantidade de vírus suficiente para invadir o sistema nervoso periférico (Murphy e Bauer, 1974). Em seguida o vírus percorre os nervos periféricos, por transporte axonal centrípeto, até o SNC, onde se multiplica e se propaga (Murphy, 1985; Cecaldi *et al.*, 1989). Finalmente ele se dissemina de maneira centrífuga, via nervos, em direção a diversos órgãos inclusive as glândulas salivares, tornando possível uma nova contaminação por mordida (Murphy, 1985).

A possibilidade de um animal raivoso transmitir a doença esta relacionada com os títulos de vírus da saliva e a quantidade de saliva que penetra no ferimento. Alguns animais são mais sensíveis à doença que outros e conseqüentemente muito mais fáceis de transmitir a doença (Souza, 1976).

Ocorrem diferenças na patogenicidade de diferentes variantes do vírus da raiva. As diferenças das manifestações clínicas nas duas formas da doença sugerem variantes de vírus e ainda alguns fatores humanos modificam o risco de adoecer de raiva, quais sejam: quantidade de terminais nervosos no local da mordedura, diferenças genéticas, profilaxia pré e pós-exposição (Souza, 1976).

Na ausência de vacinação prévia, são administradas imunizações passiva (globulina imune anti-rábica de origem animal) e ativa (vacinas de células diplóides). Sem vacinação, a consequência de uma contaminação com o vírus rábico é, na maioria das vezes, a morte. A doença do SNC permanece essencialmente intratável (Souza, 1976).

#### **2.4.5 Tratamento e prognóstico da raiva humana**

A infecção rábica induz a produção de interferon (Wiktor *et al.*, 1972). O interferon produzido pela infecção rábica é do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ , fato observado pelo aumento da produção de 2-5Asintetase e da proteína quinase-RNA-dependente no cérebro e baço de animais infectados (Marcovistiz *et al.*, 1984).

O tratamento antiviral pelo interferon só é eficaz se o interferon ou um indutor da sua síntese (como o poli-IC) for administrado antes que o vírus atinja as terminações nervosas. Após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença, a administração de interferon- $\alpha$  não alterou a evolução da mesma (Hilfenhaus *et al.*, 1975).

Foram tentados vários tratamentos para a raiva após a manifestação da sintomatologia, porém sem sucesso. O uso do interferon por diferentes vias e dosagens não se mostrou eficaz (Merigan *et al.*, 1984; Gode *et al.*, 1976).

Com as técnicas de suporte avançado de vida em unidades de terapia intensiva, conseguiu-se prolongar a sobrevivência destes pacientes, porém, ainda não o suficiente para a

recuperação dos mesmos (Hatchett, 1991). Portanto, considera-se que a raiva evolui invariavelmente com o óbito de 100% das vítimas.

#### 2.4.5.1 Agentes químicos inibidores do transporte axonal do vírus rábico

O transporte do vírus rábico para o SNC ocorre ao longo das vias nervosas, sendo que tanto as fibras motoras quanto as sensitivas estão implicadas no curso pelo SNP, porém nada permite excluir um transporte eventual por estruturas perineurais (Células de Schwann e fibrócitos) (Ceccaldi, 1989).

A aplicação de compostos inibidores do transporte axonal, tais como, a colchicina e a vinblastina, no ponto de inoculação permite a inibição da migração do vírus ao longo das vias periféricas (Tsiang, 1979).

A colchicina, princípio ativo de *Colchicum autumnale* é um derivado tropolônico que compreende 3 ciclos chamados A, B e C que se ligam de maneira reversível à tubulina, impedindo assim a polimerização dos microtúbulos. De uma maneira geral, a inibição do transporte axonal pela colchicina foi confirmada por numerosas experiências: no SNP, no SNC e *in vitro* sobre culturas celulares de pintos (Ceccaldi, 1989).

Outros agentes inibidores do transporte axonal do vírus rábico já foram estudados: vinblastina, podofilina, lumicolchicina, picropodofilina, taxol, anticorpos monoclonais anti-tubulina (Ceccaldi, 1989).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Obter cinabarina e esteróis a partir de *Pycnoporus sanguineus* e avaliar a atividade antiparasitária dessas substâncias contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. e antiviral contra o vírus da raiva.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os derivados fenoxazínicos e esteróis de basidiomas de *P. sanguineus*.
- Purificar e identificar a cinabarina e os esteróis 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol e 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol, dos extratos citados acima, através de cromatografia líquida de coluna.
- Avaliar a atividade antiparasitária “*in vitro*” da cinabarina e esteróis sobre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. .
- Comparar a eficácia tripanomicida e leishmanicida da cinabarina e dos esteróis com a de fármacos antiparasitários.
- Avaliar a eficácia antiviral da cinabarina e dos esteróis contra o vírus rábico .

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Experimentos com *Pycnoporus sanguineus*

#### 4.1.1 Coleta

Basidiomas com características macromorfológicas de *P. sanguineus* foram coletados de troncos de madeira em decomposição na região da cidade de Florianópolis. Após a coleta, os basidiomas foram secos a temperatura ambiente e então identificados pela Professora Clarice Loguercio-Leite do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, segundo descrições de Ryvar den e Johansen (1980) e Gilbertson e Ryvar den (1987). Dos basidiomas foram feitas culturas e as características culturais dos isolados foram confirmadas por comparação com aquelas descritas por Nobles e Frew (1962) e Stalpers (1978). Posteriormente os basidiomas foram processados com o intuito de se obter as substâncias a serem estudadas.

#### 4.1.2 Isolamento

Fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> foram retirados do carpóforo do fungo, e sob condições assépticas, foram transferidos para o ágar batata dextrose distribuído em tubos de ensaio. As culturas foram incubadas por 10 dias a 25°C. O controle de pureza foi feito a olho nu pelas características macroscópicas e ao microscópio óptico DYASTAR IV, OLYMPUS com aumento de 1000 vezes para a observação de fibulas no micélio. As culturas puras foram mantidas na geladeira e repicadas a cada 3 meses.

### 4.1.3 Extração e Purificação das Substâncias de Interesse Biológico

Os basidiomas do fungo foram triturados e colocados em extrator Soxhlet. Para a extração das substâncias foram utilizados dois solventes: o hexano e a acetona. O hexano foi usado durante 72 horas, em seguida procedeu-se a extração com acetona por mais 96 horas. Os solventes presentes nos extratos brutos foram evaporados e os resíduos foram acondicionados em dessecador sob vácuo e ao abrigo da luz para que posteriormente fossem purificados.

#### 4.1.3.1 Purificação dos Esteróis

O resíduo do extrato em hexano (1,0 g) foi cromatografado em coluna de vidro (64 x 2 cm) com 50 g de gel de sílica (Carlo Erba) ativada, utilizando-se sistemas com gradiente crescente de polaridade (CHCl<sub>3</sub>:Hexano 8:2; CHCl<sub>3</sub>; CHCl<sub>3</sub>:Metanol 98:2-7:3). Foram coletados volumes de 10 ml monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) – (fase estacionária: placas analíticas de gel sílica 60F<sub>254</sub> com 0,20 mm de espessura, Merck; fase móvel: clorofórmio: hexano (9:1), clorofórmio e clorofórmio: metanol (98:2); revelação: luz visível, luz ultravioleta e ácido p-anisaldeído a quente). No desenvolvimento das CCDs foram incluídos os seguintes esteróis isolados de outras espécies de fungos: 5 $\alpha$ -ergost-7 $\beta$ -3 $\beta$ ol (Ga0), 5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga1) e 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga2). Os eluatos, cujos componentes majoritários apresentaram valor de R<sub>f</sub> compatível aos padrões (Ga1 e Ga2) foram então agrupados. As frações resultantes foram cromatografadas novamente, em sistemas semelhantes aos usados anteriormente na tentativa de separar os esteróis de outras substâncias com R<sub>f</sub> muito próximos.

Na tentativa de reduzir ao máximo os contaminantes, as frações contendo os esteróis foram submetidas a cristalização. A cristalização para a obtenção de Ga1 foi feita em

acetona à quente e a recristalização foi feita em etanol à quente. A cristalização para a obtenção de Ga2 foi feita em hexano à quente e a recristalização foi feita em etanol à quente. Desta maneira obteve-se cristais em forma de agulhas brancas e cor palha para Ga1 e Ga2 respectivamente. Os cristais foram armazenados adequadamente a temperatura ambiente para que posteriormente fossem usados nos testes de atividade biológica. A confirmação da composição desses cristais foi feita pelo professor Franco Delle Monache do Istituto di Chimica da Università Cattolica del Sacro Cuore em Roma, por meio de espectros de ressonância magnética nuclear, confrontando os dados obtidos com os descritos na literatura (Achenbach e Blümm, 1991; Delle Greca *et al.*, 1990; Kac *et al.*, 1984; Smânia *et al.*, 2000).

#### 4.1.3.2 Purificação da Cinabarina

O resíduo do extrato em acetona (2,5 g) foi adsorvido em 5 g de sílica e então cromatografado em coluna de vidro (64 x 2 cm) com 65 g de gel de sílica (Carlo Erba) ativada, utilizando-se sistemas com gradiente crescente de polaridade (acetato de etila: metanol:ácido acético 98,5:1:0,5 – 88:1:4). Foram coletados volumes de 15 ml monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) – (fase estacionária: placas analíticas de gel sílica 60F<sub>254</sub> com 0,20 mm de espessura (Merck); fase móvel para o extrato acetona: acetato de etila: ácido acético (9:1); revelação: luz visível, luz ultravioleta e ácido sulfúrico a quente). Os eluatos, cujo componente majoritário apresentou valor de R<sub>f</sub> semelhante ao composto padrão (cinabarina), foram então agrupados.

Os solventes das frações do extrato em acetona foram evaporados e os resíduos foram ressuspensos em pequenas quantidades de hidróxido de amônio 0,1N. O excesso de base foi removido por evaporação e o material foi congelado e então liofilizado. As

ampolas foram fechadas a vácuo e mantidas em geladeira para que posteriormente fossem usadas nos testes de atividade biológica.

## 4.2 EXPERIMENTOS COM TRIPANOSSOMATÍDEOS:

### 4.2.1 Parasitas

Para o estudo de atividade dos compostos foram utilizadas as seguintes cepas de tripanosomatídeos:

- *Trypanosoma cruzi*:

- Cepa Y (isolada de um caso humano em São Paulo).

- *Leishmania* sp. :

- Lb 2904 de *L. braziliensis* (isolada de um caso humano no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará);

- H1 de *L. amazonensis* (isolada de um caso humano em Santa Catarina);

- BH-46 de *L. chagasi* (isolada de um caso humano em Minas Gerais).

### 4.2.2 Drogas

Os compostos denominados como Ga1 e Ga2 e a cinabarina foram solubilizadas com DMSO, filtradas (filtro 0,45 µm) e mantidas na geladeira a 4°C até seu uso. Como controles foram utilizados benzonidazol (Rochagan<sup>®</sup>) nos experimentos com *T. cruzi* e anfotericina B (Fungison<sup>®</sup>) nos experimentos com as espécies de *Leishmania*.

### 4.2.3 Meios de Cultura

Os parasitas foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e meio Schneider (Sigma®) utilizados para o cultivo de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. respectivamente, e mantidos 28°C através de repiques semanais. O cultivo e a manutenção das cepas foram realizados pelos alunos Leonardo e Bibiana do Laboratório de Protozoologia da UFSC, coordenado pelos Professores Mário Steindel e Edmundo Grisard.

### 4.2.4 Preparo do Parasita

#### a) *Trypanosoma cruzi*

Para os ensaios de atividade de drogas, a cepa Y de *T. cruzi* foi crescida em 10 ml de meio LIT distribuídos em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a temperatura de 28°C. Epimastigotas obtidos na fase exponencial de crescimento foram lavados 3 vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4 a 1.500 x g por 10 minutos e mantidos em banho de gelo. Os parasitas foram suspensos em meio LIT e o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. A seguir o número de parasitas foi ajustado para 2 x 10<sup>6</sup> parasitas/ml.

#### b) *Leishmania* spp.

Para os ensaios de atividade de drogas as três cepas de *Leishmania* sp. foram crescidas em 10 ml de meio Schneider distribuídos em frascos de 25 cm<sup>2</sup> e suplementado com 5% de SBF, a temperatura de 28°C. Promastigotas de cultura foram coletados na fase exponencial de crescimento, lavados 3 vezes em PBS pH 7,4 a 1.500 x g por 10 minutos e mantidos em banho de gelo. O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. A seguir o número de parasitas foi ajustado para 1x10<sup>6</sup> parasitas /ml.

#### 4.2.5 Montagem do experimento

As concentrações das drogas foram ajustadas em ordem decrescente ( $\mu\text{g/ml}$ ): 25, 10, 5, 1, 0,5 e 0,25 para a montagem do experimento com *Leishmania* sp. e 500, 250, 125, 50, 25, 10, 5, 1 ( $\mu\text{g/ml}$ ) para *T. cruzi*. Para realização dos experimentos, 200 $\mu\text{l}$  da solução de parasitas foram distribuídos em placas de cultura com 96 orifícios (Costar<sup>®</sup>), contendo diferentes concentrações dos compostos a serem testados e das drogas padrões. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos 3 vezes. Após a adição do composto as amostras foram homogeneizadas e incubadas à 28°C por 72 horas. Após a incubação as placas foram avaliadas visualmente em microscópio invertido para verificação de motilidade dos parasitas. Após homogeneização uma alíquota de 10 $\mu\text{l}$  de cada amostra foi retirada para contagem do número de parasitas em câmara de Neubauer.

Como controle nos experimentos os parasitas foram crescidos na ausência de drogas em meio contendo 2,5% de DMSO concentração final e presença de 200, 100 e 50 de benzonidazol para *T. cruzi* e de 0,5, 0,1 e 0,001  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina B para *Leishmania* spp. A contagem dos parasitas foi feita como descrito anteriormente.

#### 4.2.6 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média, exceto as DL<sub>50</sub> (concentrações das drogas que reduzem a resposta a 50 % em relação ao grupo controle), que são apresentados como médias geométricas acompanhadas de seus limites de confiança em nível de 95%. Valores de  $p < 0,05$  ou menor são considerados como indicativos de significância. As DL<sub>50</sub> são estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica no programa Graph Prism Instat<sup>®</sup>.

## **4.3 EXPERIMENTOS COM VÍRUS RÁBICO**

### **4.3.1 Meio de Cultura**

Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12) – o qual se destinou ao cultivo de células para produção do vírus rábico.

### **4.3.2 Células**

C6 (ATCC:CCL107) e BHK-21 (ATCC:CCL10) foram mantidas em monocamadas em meio DMEM-F12 acondicionados em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 25 mM de bicarbonato de sódio, contendo 10% de SBF. As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O repique de células foi efetuado duas vezes por semana com solução de tripsina-EDTA.

N2A (ATCC:CCL 131) foram mantidas em monocamadas em meio DMEM – F12, contendo 10% de SBF e aminoácidos não-essenciais em frascos de 25 cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas em estufa a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O repique foi efetuado duas vezes por semana com solução de tripsina-EDTA.

### **4.3.3 Vírus rábico**

A amostra viral empregada foi a PV (Pasteur vírus), gentilmente cedida pelo Instituto Pasteur de São Paulo. A amostra PV foi mantida em cultura de células BHK-21 e o sobrenadante da cultura foi coletado após 48/72 horas de infecção e utilizado como fonte de vírus. As alíquotas foram armazenadas à -80°C.

#### 4.3.4 Determinação da atividade antiviral

##### 4.3.4.1 Atividade antiviral da cinabarina

Para se analisar a ação da substância cinabarina sobre a replicação do vírus rábico em cultura celular, foi utilizada a técnica de titulação deste vírus, em condições assépticas conforme descrita por Smith *et al.* (1996), com as seguintes modificações:

1) A cinabarina liofilizada foi dissolvida em tampão PBS, filtrada com filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore®) e então diluída a partir de uma concentração inicial de 10 mg/ml até 39  $\mu\text{g/ml}$ . As diluições foram reservadas para uso posterior;

2) Uma placa de 96 orifícios foi preparada adicionando-se 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultura em cada orifício para fazer a diluição do vírus na placa;

3) As células N2A foram adicionadas de tripsina, suspensas em de meio de cultura, a uma suspensão celular ajustada para conter  $5 \times 10^4$  células/50  $\mu\text{l}$ . 50  $\mu\text{l}$  de células foram adicionados em cada orifício. e então a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>;

4) Após 30 minutos, a placa foi retirada da estufa e 100  $\mu\text{l}$  das diferentes diluições da cinabarina foram adicionados em cada uma das diluições virais. A placa foi incubada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas;

5) Após as 24 horas de incubação, a placa foi observada em microscópio óptico invertido para verificar o efeito citopático da cinabarina sobre as células N2A e em seguida procedeu-se a preparação da placa para o teste de imunofluorescência;

6) O meio de cultura foi desprezado com cuidado para que as células não se soltassem do fundo da placa e então 200  $\mu\text{l}$  de acetona 80% gelada foram adicionados em

todos os orifícios para a fixação do tapete celular por 15 minutos a 4°C. Depois disso, a acetona foi desprezada e a placa secada com auxílio de secador de cabelo;

7) 50 µl de conjugado anti-rábico fluorescente foram adicionados em todos os orifícios e a placa foi incubada a 37°C por 45 minutos. Após esse período o conjugado foi desprezado e a placa foi lavada 2 vezes com 200 µl de PBS. e 2 vezes com 200 µl de água destilada em cada orifício. A placa foi escurrida em papel absorvente e depois secada com auxílio de secador de cabelos;

8) cerca de 18 a 20 µl de glicerina tamponada foi adicionada em cada orifício cobrindo todo o fundo para melhor visualização dos resultados ao microscópio de imunofluorescência.

A atividade antiviral da substância testada foi obtida pela comparação da diluição viral do controle na qual 50% das células estavam infectadas, com aquelas diluições obtidas com as diferentes concentrações da substância.

Afim de melhorar os resultados obtidos com o ensaio antiviral da cinabarina, esta foi pré-incubada com o vírus antes da adição das células ocasionando uma inversão da ordem dos itens 3 e 4 deste protocolo, no entanto o restante do ensaio não foi alterado.

#### 4.3.4.2 Atividade antiviral dos esteróis

Os esteróis testados (Gal e Ga2) são insolúveis em diluentes aquosos e solúveis em alguns poucos solventes orgânicos. Neste caso foi necessário a realização de um teste de viabilidade celular frente ao DMSO e etanol, usados como solventes nesse estudo, para verificar um possível efeito citopático dos mesmos sobre as células N2A e C6:

1) Em condições assépticas, foram adicionados em uma placa de 24 orifícios, 500µl de meio de cultura com 20, 10, 5 e 2,5% de DMSO e em outros orifícios, 500µl do mesmo meio com 20, 10, 5 e 2,5% de etanol. Sobre estes orifícios foram adicionados mais 500µL de suspensão celular ( $10^6$  células/ml) diluindo as concentrações iniciais de DMSO e etanol: 10, 5, 2,5 e 1,25%. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e às células foram adicionadas 300µl de tripsina em cada orifício. Após 5 minutos, foram adicionados 700µl de soro bovino fetal para deter o processo de tripsinização.

2) As células em cada uma das diluições de DMSO e etanol foram contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan para verificar a viabilidade das células (50µl de suspensão celular mais 50µl de azul de Trypan).

3) Após a verificação da concentração ideal de etanol e DMSO na qual o crescimento das células não era prejudicado, procedeu-se ao seguinte teste de atividade antiviral:

- a) O Ga2 foi dissolvido em DMSO a uma concentração inicial de 10 mg/ml, filtrado com filtro de 0.45 µm (Millipore®) e então diluído e a uma concentração igual a 200µl/ml e reservado para uso posterior;
- b) Uma placa de 96 orifícios foi preparada adicionando-se 100 µl de uma diluição viral 1:2 em meio de cultura (DMEM – F12) em todos os orifícios com exceção os do controle;
- c) O controle (ausência de Ga2) foi feito com diluições virais de 1:2 até 1:256;
- d) 100 µl da diluição reservada de Ga2 (200µg/ml) foram adicionados ao primeiro orifício e repassados sucessivamente aos orifícios seguintes até atingir a

concentração de 1,18 µg/ml, então a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>;

- e) As células foram adicionadas de tripsina, suspensas em de meio de cultura, a uma suspensão celular ajustada para conter 5X10<sup>4</sup> células/50 µl. Após 30 minutos, a placa foi retirada da estufa e 50µl de células foram adicionados em cada orifício. A placa foi incubada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas;
- f) Após as 24 horas de incubação, a placa foi observada em microscópio óptico invertido para verificar o efeito citopático do Ga<sub>2</sub> sobre as células N2A e C6 e em seguida procedeu-se a preparação da placa para o teste de imunofluorescência da mesma forma que foi feita com a cinabarina.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Pycnoporus sanguineus*

#### 5.1.1 Coleta, isolamento e identificação dos basidiomas

Todos os basidiomas coletados foram identificados como sendo *P. sanguineus*.

#### 5.1.2 Extração e Purificação das Substâncias de Interesse Biológico

Com a extração de 100g de basidiomas do fungo foram obtidas 1g de extrato em hexano e 2g de extrato em acetona rendendo 1% e 2%, respectivamente.

##### 5.1.2.1 Purificação dos Esteróis

O resíduo do extrato em hexano (1,0 g) cromatografado resultou em 16 frações agrupadas por similaridades de  $R_f$ . As frações, cujo componente majoritário apresentaram valor de  $R_f$  igual aos compostos autênticos foram as correspondentes aos tubos de eluatos 11-28 (340 mg) e 36-41 (500 mg), para Ga1 e Ga2 respectivamente (figura 7). As frações recromatografadas e cristalizadas resultaram em cristais em forma de agulhas brancas de Ga1 puro (40 mg, rendimento = 0,04%) e agulhas de cor palha de Ga2 puro (80 mg, rendimento = 0,08%). Estes cristais de esteróis foram identificados (item 4.1.3.1) como sendo  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien- $3\beta$ ol (Ga1) e 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien- $3\beta$ ol (Ga2).

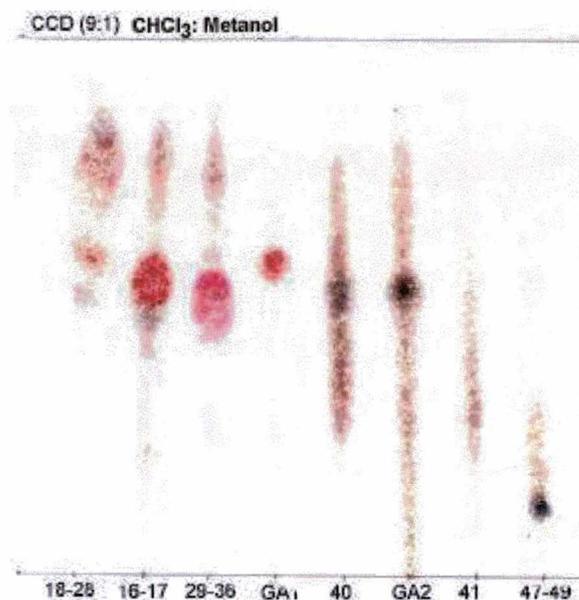


Figura 7– Cromatografia de camada delgada do extrato em hexano de *P. sanguineus*.

#### 5.1.2.2 Cinabarina

A fração 6-20 obtida da cromatografia em coluna do extrato em acetona apresentou valor de  $R_f$  semelhante à amostra autêntica de cinabarina (figura 8). O peso da fração liofilizada foi de 150 mg correspondendo a 0,15% do peso dos basidiomas utilizados no processo de extração.

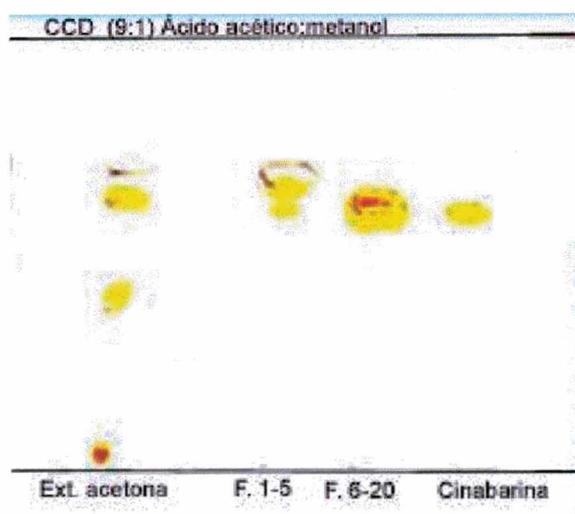


Figura 8 – Cromatografia de camada delgada do extrato em acetona de *P. sanguineus*.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA:

### 5.2.1 *T. cruzi*

A atividade antiparasitária do benzonidazol (usado como controle positivo) e dos esteróis Gal 1 e Gal 2 estão apresentados nas tabelas 2 a 6. Estes dados expressam a média de três experimentos, os quais foram realizados em triplicata.

A solubilidade do Gal 1 foi testada em diversos solventes utilizados em ensaios biológicos (DMSO, PBS, glicerol, Tween 80, azeite de oliva, meio de cultura LIT, acetona 50%, etanol 50% e etanol puro). Nos solventes hidrofílicos, o Gal 1 foi insolúvel e nos solventes lipofílicos foi parcialmente solúvel. Então, esta substância foi testada após ser parcialmente solubilizada em DMSO e submetida a duas condições de esterilização: filtração (tabela 3) e autoclavação (tabela 4).

Tabela 2 - Número de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas de incubação a 28°C, com diferentes concentrações de benzonidazol (Rochagan®)

[Benzonidazol] µg/ml	Média do número de parasitas x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	62,6	1,76
1	54	0,57
5	44	0,57
10	22,6	1,2
25	4	0,57

DL50 calculada = 11 µg/ml (p < 0,001)

Tabela 3 - Número de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas de incubação a 28°C, com diferentes concentrações de Gal **filtrado**.

[Gal] µg/ml	Média do n° de parasitas x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	60	1,15
10	41,3	0,33
50	38,3	0,88
100	32,3	1,45
250	15,3	1,02

DL50 calculada = 119 µg/ml (p < 0,001)

Tabela 4 - Número de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas de incubação a 28°C, com diferentes concentrações de Gal **autoclavado**.

[Gal] µg/ml	Média do nº de parasitas x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	60	1,15
10	32,3	1,45
50	17	0,57
100	11	0,57
250	-	-

DL50 calculada = 11 µg/ml (p < 0,001)

Tabela 5 - Número de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas de incubação a 28°C, com diferentes concentrações de Ga2 **filtrado**.

[Ga2] µg/ml	Média do nº de parasitas x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	62,6	1,76
1	26,6	0,88
5	13	1,15
10	0,3	0,33
25	-	-

DL50 calculada = 3 µg/ml (p < 0,001)

Tabela 6 - Número de epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 72 horas de incubação a 28°C, com diferentes concentrações de Ga2 **autoclavado**.

[Ga2] µg/ml	Média do nº de parasitas x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	62,6	1,76
1	55	1,52
5	32,3	1,76
10	3,3	0,66
25	-	-

DL50 calculada = 5 µg/ml (p < 0,001)

\*SEM = desvio padrão da média

Conforme pode ser observado acima, nas tabelas de 3 a 6, as concentrações dos esteróis Gal e Ga2 necessárias para matar todos os parasitas foram diferentes entre si (250 µg/ml para Gal e 10 µg/ml para Ga2). Deve ser ressaltado que a DL50 do Ga2 foi de 3 µg/ml enquanto a do benzonidazol foi de 11 µg/ml. Para facilitar a visualização dos dados obtidos, os mesmos estão sendo apresentados nas figuras 9 e 10.

Estudos preliminares de atividade antiparasitária contra as formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* mostraram que a incubação de sangue de animal infectado com Ga2 nas concentrações iguais ou superiores a 10 µg/ml ocasionou uma redução do número de parasitas de 90%.

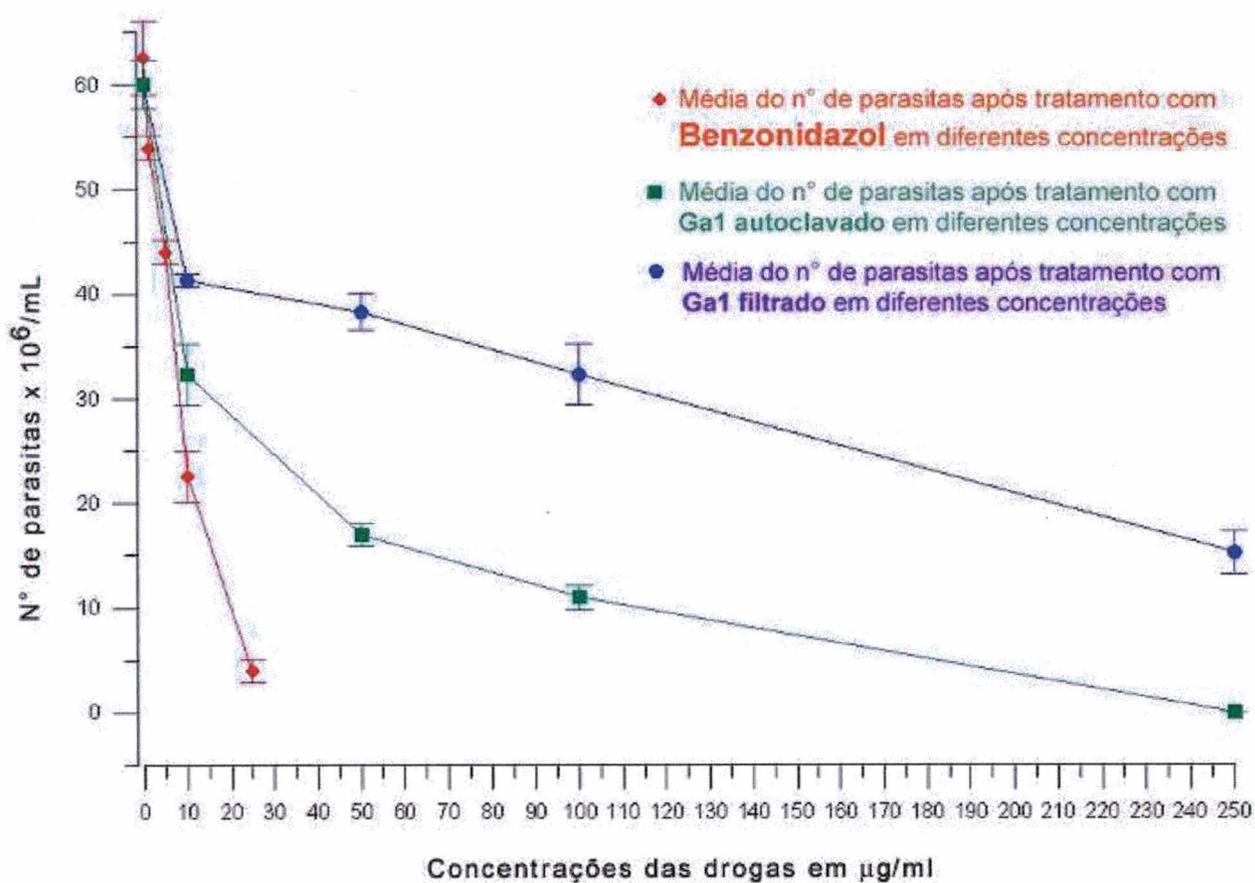


Figura 9- Atividade antiparasitária do benzonidazol e Ga1 (filtrado e autoclavado) contra as formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações, após 72 horas de incubação a 28°C.

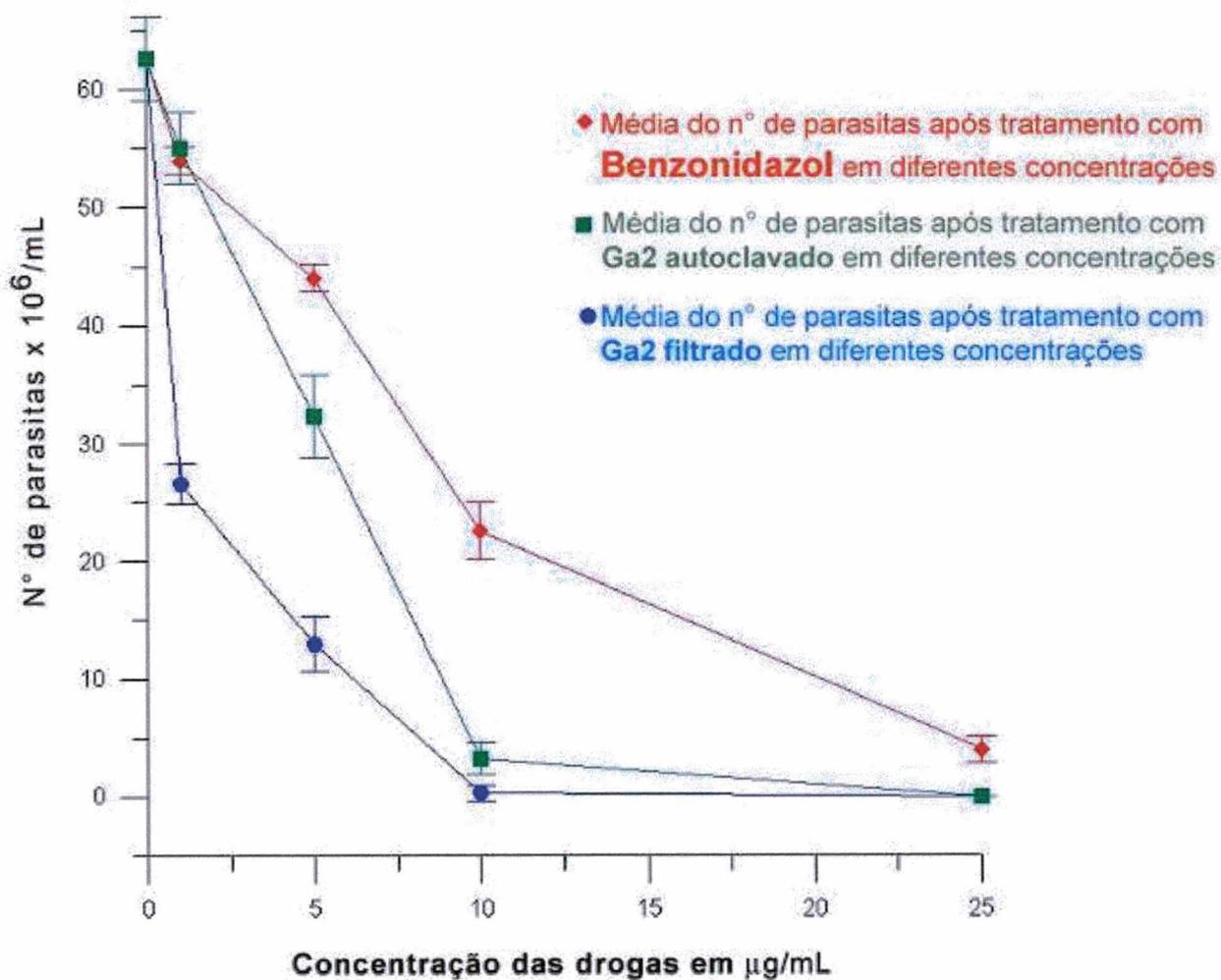


Figura 10 - Atividade antiparasitária do benzonidazol e Ga2 (filtrado e autoclavado) contra as formas epimastigotas de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações, após 72 horas de incubação a 28°C.

### 5.2.2 *Leishmania* spp.

Os ensaios de atividade anti-leishmania com Ga1 não foram realizados em virtude da baixa solubilidade do mesmo em DMSO.

Os resultados referentes à atividade antiparasitária da substância teste Ga2 e da utilizada como controle, a Anfotericina B, contra *Leishmania* spp., estão apresentados nas tabelas 7 e 8 e ilustrados nas figuras 11 e 12.

Tabela 7 - Número de parasitas após incubação de 72 horas a 28°C, com diferentes concentrações de Ga2 filtrado.

[Ga2] µg/ml	Média do nº de <i>L. amazonensis</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*	Média do nº de <i>L. brasiliensis</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*	Média do nº de <i>L. chagasi</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	8	0,28	12,6	0,16	9,66	0,72
0,1	8	0,76	12	0,57	4	0,66
0,5	5	0,23	5	0,20	2,6	0,05
1	0,9	0,10	1	0,11	0,56	0,06
DL50 calculada	0,61 µg/ml		0,51 µg/ml		0,11 µg/ml	

\*SEM = desvio padrão da média (p < 0,001)

Tabela 8 - Número de parasitas após incubação de 72 horas a 28°C com diferentes concentrações de Anfotericina B.

[Anfotericina B] µg/ml	Média do nº de <i>L. amazonensis</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*	Média do nº de <i>L. brasiliensis</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*	Média do nº de <i>L. chagasi</i> x 10 <sup>6</sup> /ml	SEM*
Zero	8	0,28	12,6	0,16	9,66	0,72
0,01	7,46	0,52	10,5	0,57	7,3	0,16
0,05	3	0,11	7	0,11	3,9	0,29
0,1	1	0,05	4,5	0,29	0,7	0,05
DL50 calculada	0,05 µg/ml		0,16 µg/ml		0,04 µg/ml	

\*SEM = desvio padrão da média (p < 0,001)

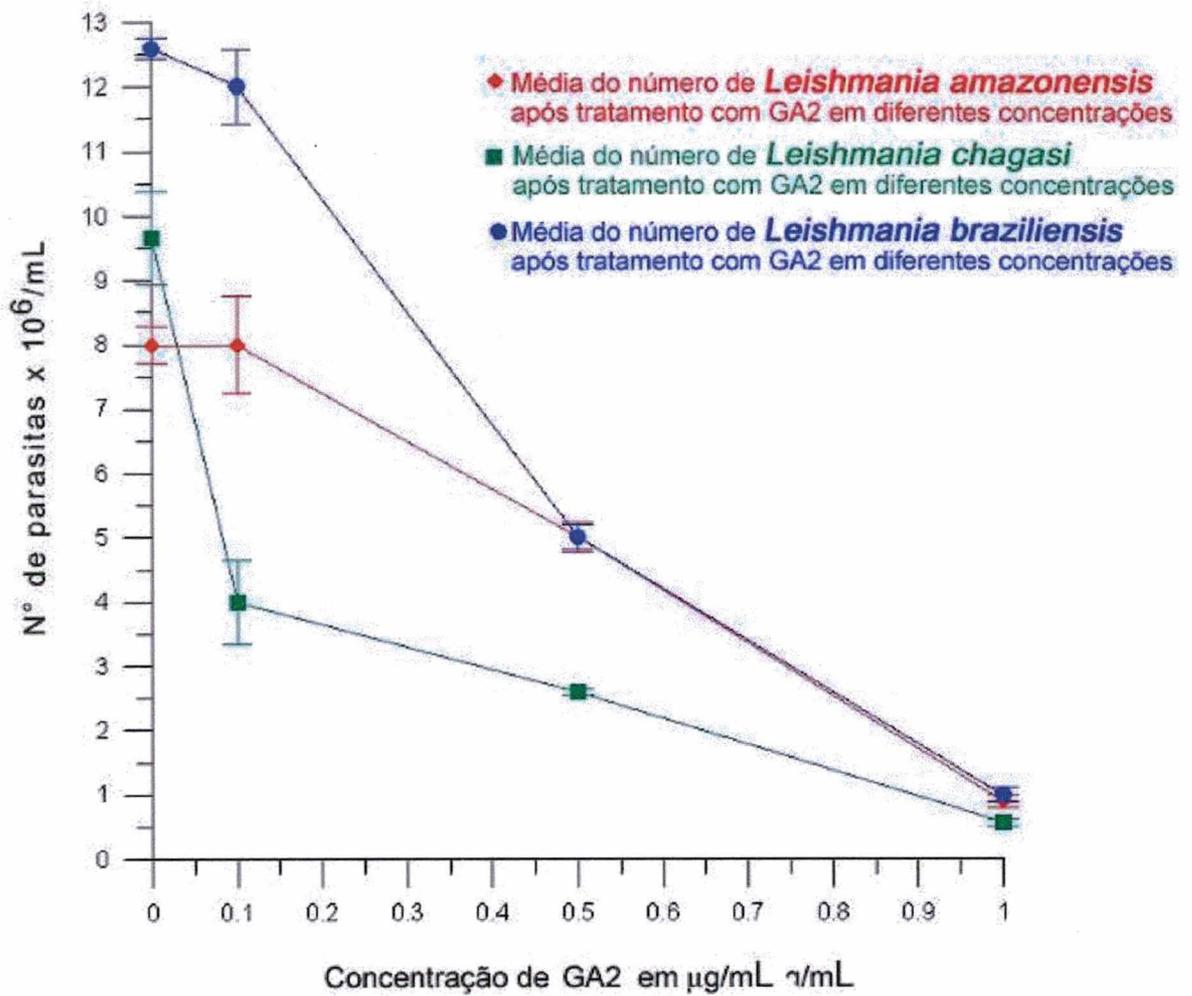


Figura 11- Atividade antiparasitária do Ga2 contra as formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. chagasi* em diferentes concentrações, após 72 horas de incubação a 28°C.

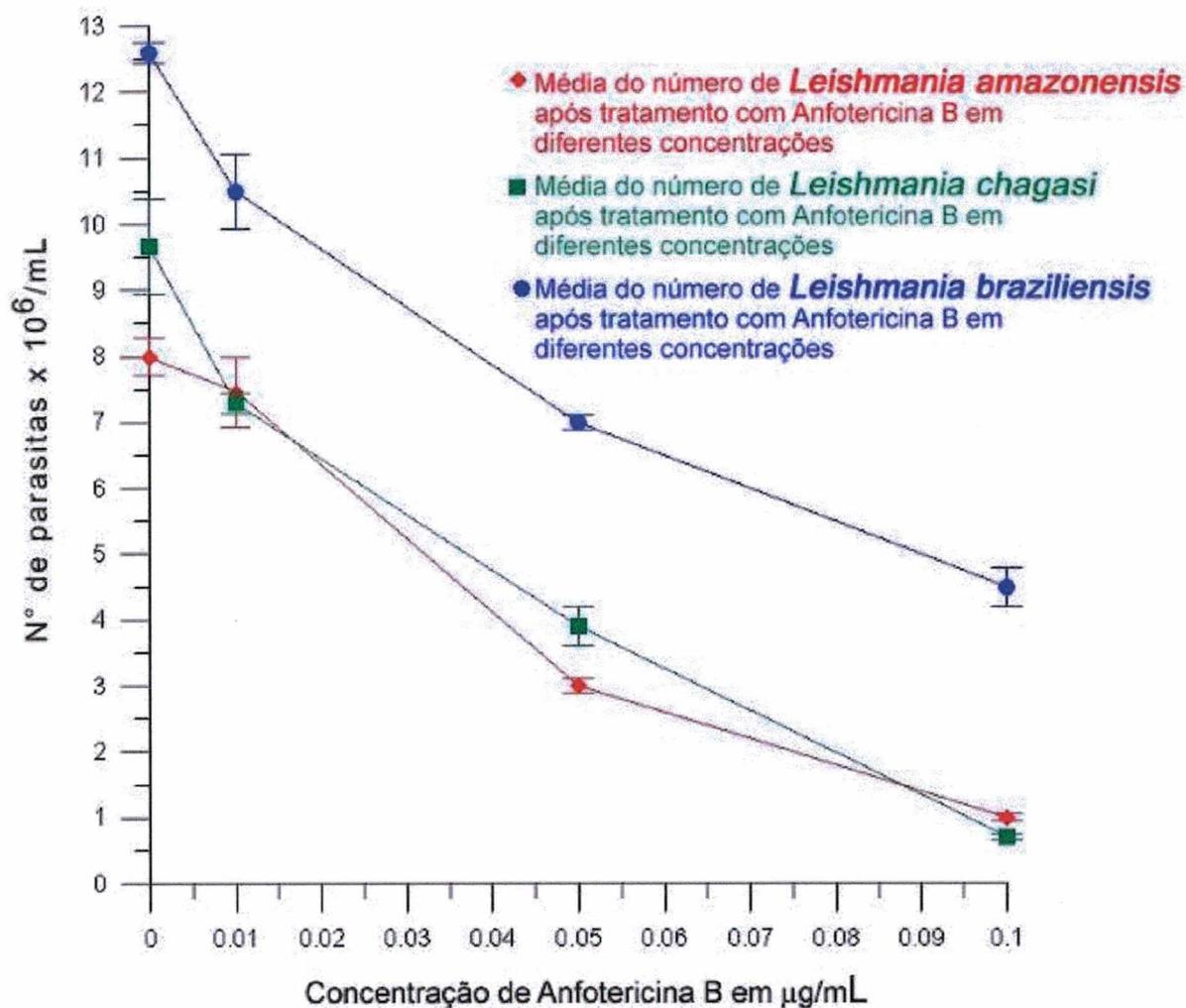


Figura 12- Atividade antiparasitária da anfotericina B contra as formas promastigotas de cultura de *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. chagasi* em diferentes concentrações, após 72 horas de incubação a 28°C.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL

#### 5.3.1 Atividade antiviral da cinabarina

Precedente ao estudo da atividade antiviral da cinabarina, o seu efeito citopático foi observada sobre as células N2A. Nesta etapa pode-se constatar que: na ausência da cinabarina ou na presença de baixas concentrações da substância (155 e 310 µg/ml), o crescimento das células formaram um tapete celular perfeito; com o uso de concentrações um pouco maiores (0,62 e 1,25 mg/ml) havia menor quantidade de células semelhantes ao controle e um leve efeito citopático; nas maiores concentrações de cinabarina utilizadas (2,5 e 5 mg/ml) foi observado maior porcentagem de células apresentando efeito citopático (tabela 9).

Tabela 9- Efeito citopático da cinabarina sobre as células N2A.

Concentrações de cinabarina (mg/ml)	Efeito citopático
Zero (controle)	- *
0,155	-
0,310	-
0,620	+
1,25	++
2,5	+++
5	++++

\* (-) células sem alterações; (+) até 10% de células lesadas; (++) 10 a 25% de células lesadas; (+++) 26 a 50% de células lesadas; (++++) mais de 50% de células lesadas

A tabela 10 apresenta a ação de diferentes concentrações da cinabarina sobre a estirpe PV do vírus rábico. Os dados abaixo representam a média dos resultados de três experimentos visualizados ao microscópio de imunofluorescência .



Tabela 10 – “Título viral” representado através da diluição viral, no qual as células N2A aparentavam 50% de infecção em relação ao controle nas diferentes concentrações de cinabarina, após incubação por 24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Concentrações de cinabarina (mg/ml)	Diluição viral
Zero (controle)	1/128
0,155	1/64
0,310	1/32
0,620	1/32
1,25	1/32
2,5	1/16
5	1/16

A menor diluição viral (representativa do título viral) obtida com uma concentração de cinabarina não citopática às células foi de 1/32 e para o controle negativo (ausência de cinabarina) foi de 1/128.

Os resultados apresentados foram idênticos nas duas versões da metodologia utilizada, isto é, quando a célula foi infectada com o vírus rábico primeiro e depois tratada com a cinabarina e quando esta foi adicionada ao vírus antes de infectar a célula.

### 5.3.2 Atividade antiviral dos esteróis

As tabelas 11 e 12 apresentam as médias de três experimentos referentes a ação dos solventes usados nos ensaios com esteróis, sobre células N2A e C6, respectivamente. A ação dos solventes foi observada através do teste de viabilidade celular com azul de Trypan. Foi observado que todas as células contadas estavam viáveis, porém o crescimento dessas foi diminuindo a medida que aumentavam as concentrações dos solventes (porcentagem de solventes em meio de cultura).

Tabela 11 – Média do número de células N2A após incubação com diferentes concentrações de DMSO e etanol.

% de DMSO	Células N2A/ml	% de Etanol	Células N2A/ml
Zero (controle)	$6,75 \times 10^5$	Zero (controle)	$6,4 \times 10^5$
10%	$2 \times 10^5$	10%	$1,75 \times 10^5$
5%	$3,1 \times 10^5$	5%	$4,4 \times 10^5$
2,5%	$3,15 \times 10^5$	2,5%	$5 \times 10^5$
1,25%	$6,7 \times 10^5$	1,25%	$7,45 \times 10^5$

Outra linhagem celular (C6) foi também testada para verificar sua resistência a concentrações maiores de DMSO e etanol em meio de cultura:

Tabela 12 – Média do número de células C6 após incubação com diferentes concentrações de DMSO e etanol.

% de DMSO	Células C6/ml	% de Etanol	Células C6/ml
0% (controle)	$7,5 \times 10^4$	0% (controle)	$7,5 \times 10^4$
5%	$1 \times 10^5$	5%	$7,5 \times 10^4$
10%	$1,25 \times 10^5$	10%	$3,75 \times 10^4$
20%	$7,5 \times 10^4$	20%	$3,75 \times 10^4$
30%	$6,25 \times 10^4$	30%	$1,25 \times 10^4$

O efeito citopático dos esteróis Ga1 e Ga2 sobre a cultura celular foi semelhante a ação da cinabarina. No entanto, esse efeito foi obtido com o uso de concentrações muito menores das substâncias.

O Ga1 foi pouco solúvel e precipitou na forma de cristais, impossibilitando a leitura do teste.

Na ausência de Ga2, o crescimento das células após 24 horas formou um tapete celular perfeito (tabela 13). Na presença de baixas concentrações de Ga2 (6,5 a 1,6 µg/ml para N2A e 12,5 a 1,6 µg/ml para C6) as células apresentaram-se semelhantes ao controle, em concentrações um pouco maiores (12,5 µg/ml para N2A e 25 µg/ml para C6) havia menor quantidade de células semelhantes ao controle e um leve efeito citopático. Nas maiores concentrações de Ga2 utilizadas (25 a 100 µg/ml para N2A e 50 a 100 µg/ml para C6) foi observado maior porcentagem de células apresentando efeito citopático.

Todas as células infectadas com vírus rábico e incubadas com Ga2 em concentrações não citopáticas, não apresentaram redução visível ao microscópio de fluorescência sobre a quantidade de vírus e portanto não se pode observar nenhum efeito protetor de Ga2 sobre as células.

Tabela 13- Efeito citopático do Ga2 sobre as células N2A e C6.

Concentrações de Ga2 (µg/ml)	Efeito citopático sobre N2A	Efeito citopático sobre C6
Zero (controle)	-	- *
1,6	-	-
3,2	-	-
6,5	-	-
12,5	+	-
25	+++	+
50	+++	++
100	++++	++++

\* (-) células sem alterações; (+) até 10% de células lesadas; (++) 10 a 25% de células lesadas; (+++) 26 a 50% de células lesadas; (++++) mais de 50% de células lesadas.

## 6 DISCUSSÃO

*Pycnoporus sanguineus* é um fungo facilmente encontrado na Ilha de Santa Catarina. Os basidiomas utilizados neste trabalho foram coletados de árvores cortadas ou madeira em decomposição, coincidindo com as descrições de Guzmán-Dávalos e Gúzman (1979) que afirmam que o habitat desta espécie é sobre madeira de angiospermas em decomposição.

Os basidiomas coletados que apresentaram características macromorfológicas compatíveis com as de *P. sanguineus* tiveram a identificação ratificada pela Professora Clarice Loguercio-Leite (item 4.1.1), coincidindo com Nobles e Frew (1962) que afirmam que esta é a única espécie citada para o Brasil.

A metodologia usada para a extração das substâncias ativas a partir a partir dos basidiomas foi desenvolvida de acordo com a descrita por Smânia e colaboradores (1995 a). O rendimento obtido foi de 1g de extrato em hexano e 2g de extrato em acetona para cada 100g de basidiomas do fungo (1% e 2%, respectivamente), e foi semelhante ao obtido por Smânia e cols. (1995a).

A purificação por cromatografia das substâncias contidas no extrato hexano revelou a presença de esteróis que foram identificados pelo Professor Franco Delle Monache (item 4.1.2.1), como sendo  $5\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga1, rendimento de 0,04%) e 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol (Ga2, rendimento de 0,08%). Segundo Griffin (1994), é esperado que certos extratos obtidos de fungos contenham misturas complexas de esteróis com 27 a 29 unidades de carbono. A presença desses esteróis já foi verificada por diversos autores em outras espécies de fungos da classe Basidiomycetes (Smânia *et al.*

2000; Kim e Kim, 1999), entretanto a presença desses esteróis em *P. sanguineus* não havia sido descrita anteriormente.

A cinabarina purificada a partir do extrato em acetona (item 4.1.2.2) correspondeu a 150 mg aproximadamente, coincidindo com os rendimentos (0,15%) obtidos por Smânia *et al.* (1995b).

Quanto a atividade antiparasitária, a cinabarina apresentou resultados pouco reprodutíveis, possivelmente devido a sua alta instabilidade química, tanto para os testes de atividade anti- *T. cruzi*, quanto para os testes antileishmania. Entretanto, nos testes de atividade antiviral, os resultados foram reprodutíveis. Segundo Smânia *et al.* (1995b), a cinabarina tem estabilidade somente quando mantida liofilizada e acondicionada à vácuo. O processo de liofilização utilizado neste trabalho não apresentou boa performance quanto ao fechamento das amostras sob vácuo, e esse pode ter sido um dos motivos do insucesso de parte dos testes de atividade biológica. Por outro lado, a estabilidade dos cristais dos esteróis e as metodologias bem definidas para purificação e identificação desses, fez com que, optássemos por continuar os experimentos de atividade antiparasitária somente com os esteróis. Convém ressaltar que, os experimentos com Gal também foram prejudicados em virtude da pouca solubilidade do mesmo em solventes de baixa toxicidade biológica.

Gal e Ga2 são facilmente solúveis em  $\text{CHCl}_3$  porém este é um solvente altamente tóxico para os sistemas biológicos. Além disso, devido ao processo de recristalização das amostras feito com o intuito de diminuir as impurezas, esses esteróis tiveram a sua solubilidade diminuída para alguns solventes (Franco Delle Monache – comunicação pessoal). Esse fato refletiu diretamente na solubilidade do Gal em dimetilsulfóxido (DMSO) que foi o solvente eleito para ser usado nos testes. Assim, a esterilização dos esteróis passou a ser de dois modos: por filtração (filtro 0,45 $\mu\text{m}$ ) e autoclavação (121°C por 20 minutos).

A escolha do método de autoclavação para esterilizar o composto antes de utilizar nos experimentos foi feita em função da baixa solubilidade do Ga1. Visto que grande quantidade do composto ficava retida no filtro, o processo de autoclavação foi escolhido para esterilizá-lo sem que houvesse perda da substância. Observa-se claramente este fato quando comparamos a DL50 do Ga1 filtrado (119 µg/ml) com a do Ga1 autoclavado (11 µg/ml). Esta diferença de 10 vezes na eficácia do Ga1 deve-se a solubilidade deste que era muito baixa em DMSO, ao contrário do Ga2 que além de solúvel, apresentou boa reprodutibilidade dos resultados. Apesar disso, o Ga1 autoclavado apresentou-se equipotente ao benzonidazol, mesmo sofrendo as alterações provenientes do processo de autoclavação.

O Ga2 filtrado apresentou uma dose letal de 50% dos parasitas igual a 3 µg/ml para formas epimastigotas de *T. cruzi*, muito inferior à do benzonidazol (DL50 = 11 µg/ml). Isto demonstra que a eficácia antitripanosoma *in vitro* do Ga2 foi cerca de 4 vezes maior que a do medicamento de escolha atualmente utilizado na clínica (tabelas 2, 5 e 6). Foi também utilizado nos experimentos o Ga2 esterilizado por autoclavação. O processo de autoclavação alterou o aspecto físico do Ga2, ou seja, alterou a coloração (de 4D para 6F – Her Majesty, 1969) e solubilidade, deixando-o mais solúvel em DMSO após a autoclavação. Com relação a ação antiparasitária foi observado uma diminuição da sua ação quando comparado com o Ga2 filtrado. Esta redução de da sua ação pode ser observada através da DL50, que para o Ga2 filtrado foi de 3 µg/ml e para o Ga2 autoclavado foi de 5 µg/ml, isto é, ocorreu uma perda de atividade de pelo menos 1,5 vezes.

O mecanismo de ação do Ga2 em *T. cruzi* não é conhecido e estudos neste sentido necessitam ser realizados. É possível que este composto atue na biossíntese de membranas ocasionando o rompimento da membrana plasmática da célula. Estudos de Urbina *et al.*

(1996) utilizando um análogo de um esteroide de membrana com um anel AZA como cadeia lateral (22, 26 azasterol) apresentaram uma potente inibição do crescimento de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Análogos de esteróides com cargas positivas em locais específicos da cadeia lateral têm apresentado efeitos inibidores da S-adenosil-L-metionina:  $\Delta^{24/25}$  esteroide metiltransferase [24(25)SMT], uma enzima encontrada em fungos, leveduras, protozoários e plantas, que catalisa um passo essencial na biossíntese de esteróides nesses organismos. Esta enzima representa um alvo ideal para intervenção quimioterapêutica em doenças causadas por estes grupos biológicos (Urbina *et al.*, 1996).

As enzimas da via biossintética dos esteróides em *T. cruzi* e *Leishmania* sp. são alvos de numerosos agentes antifúngicos. Quando um fungo é exposto a um inibidor da síntese de esteróides (ISE), a síntese do produto final normal do metabolismo do esteroide, isto é, o ergosterol, é bloqueada e isto resulta no acúmulo de esteróides anormais com um grupo  $14\alpha$ -metil. Estes esteróides  $14\alpha$ -metil quando acumulados, interrompem a função normal da membrana porque a estrutura não-planar deste grupo interfere com a configuração normal da membrana. A quantidade reduzida do esteroide normal pode também adicionar-se a desconfiguração da membrana (Chance e Goad, 1997).

Os produtos finais da biossíntese de esteróides em *Leishmania* sp., o ergosterol ou esteróides tipo ergosterol, são um importante alvo de um dos mais potentes agentes antileishmania de uso clínico, a Anfotericina B, que age formando complexos com esteróides de membrana que fazem poros (Chance e Goad, 1997).

Os testes de atividade antileishmania do Ga2 foram feitos com controle positivo de Anfotericina B (Fungison®) (item 3.2.2), no entanto, nos experimentos clássicos o medicamento de escolha para controle é o antimonial pentavalente Glucantime®. A opção

pela Anfotericina B foi feita em função ausência de atividade antileishmania *in vitro* do Glucantime®.

Os resultados obtidos nos experimentos com as cepas de *Leishmania* spp. (tabelas 8 e 9) demonstraram que concentrações Ga2 inferiores a 1 µg/ml ocasionaram a mortalidade de 50% das formas promastigotas *in vitro* das diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas. Comparando a eficácia tripanomicida (DL50 = 3 µg/ml) e leishmanicida (DL50 = 0,61 µg/ml) do Ga2 filtrado, pode-se verificar uma diferença de no mínimo 5 vezes na concentração necessária para reduzir a quantidade de parasitas em 50%. Isto sugere uma atividade relevante mesmo quando comparada a Anfotericina B que foi utilizada nos testes antileishmania como controle e apresentou uma elevada atividade. Apesar de ser utilizada na clínica para o tratamento de micoses sistêmicas e da leishmaniose mucocutânea a anfotericina B ocasiona efeitos colaterais severos podendo ser administrada apenas em ambiente hospitalar.

Quanto aos experimentos com o vírus rábico, preliminarmente o Ga2 foi testado com outra linhagem celular para verificar a capacidade das células resistirem a uma maior concentração de solventes orgânicos (tabela 11). As células C6 foram mais resistentes aos solventes DMSO e etanol, sendo também as que apresentaram menor efeito citopático pelo Ga2. No entanto, tanto os experimentos realizados com as células C6 quanto aqueles com N2A, não apresentaram nenhuma redução de título viral em células íntegras, isto é, só foram observados reduções de títulos virais onde havia efeito citopático.

Em relação à atividade antiviral da cinabarina, verificou-se que, em células, houve uma redução máxima dos títulos virais, de 1:128 (controle) para 1:32, quando esta foi utilizada em concentração de 310 µg/ml (tabela 9). Em concentrações menores, a redução de infecção foi proporcionalmente menor, enquanto que em concentrações maiores que

310 µg/ml, a cinabarina causava nítidos efeitos citopáticos, invalidando a redução nos títulos virais observados.

No presente trabalho, não fizemos uma titulação clássica do vírus rábico. Nestas, os títulos virais são expressos como PFU (Unidades Formadoras de Placa) ou CCID<sub>50%</sub> (dose infectante de 50% em cultura celular) (Aubert, 1996). Ao invés destas técnicas optamos por uma técnica de triagem, onde o “título” viral era estimado através das diluições seriadas. Caso tivéssemos obtido resultados significativos de redução da infecção com as drogas testadas, a etapa sucessiva seria proceder uma análise mais acurada dos títulos pelo método descrito por Smith *et al* (1996).

No entanto, conforme já exposto, o melhor resultado foi uma redução de 4 diluições (1:128 para 1:32) com cinabarina a 310 µg/ml. Reduções desta ordem devem ser analisadas com cuidado antes de serem feitas conclusões definitivas, por vários fatores:

- 1) As titulações baseadas em diluições apresentam reprodutibilidade apenas razoável, já que variam com as condições de realização do teste, tais como o tempo de realização, temperatura ambiente, calibração de micropipetas, entre outros.
- 2) As células em cultura apresentam variações de comportamento, que escapam do controle, mesmo quando repicada e mantidas em condições uniformes. A variabilidade biológica, vista através do aspecto morfológico e a velocidade de crescimento, certamente influem na taxa de replicação viral. Por isso, variações nos títulos de até 2 vezes, quando observadas através de diluição não são consideradas importantes em laboratórios de Raiva (comunicação pessoal – Carlos Roberto Zanetti).
- 3) Testes clássicos de avaliação da potência de vacinas anti-rábicas realizadas em camundongos (Habel, 1996; Wilbur e Aubert, 1996), consideram uma vacina eficaz,

quando esta é capaz de proteger animais vacinados contra doses de 10.000 vezes mais vírus do que animais controles não imunizados.

No presente estudo, no entanto, ficam difíceis as comparações já que não se pode comparar tratamentos baseados em imunização com tratamentos farmacológicos. Além disso, não foram encontrados trabalhos sobre a utilização de fármacos com atividade anti-rábica na literatura. Hilfenhaus *et al.* (1975), Merigan, *et al.* (1984) e Gode *et al.* (1976) testaram a inoculação de INF  $\alpha$  e  $\beta$  diretamente no SNC, não obtendo sucesso. Um grupo de pesquisadores do Instituto Pasteur de Paris, liderados pelo Dr. Tsiang, tem estudado a utilização de drogas como a colchicina e a vinblastina, no transporte axonal do vírus rábico *in vitro* (item 2.4.7.1) (Tsiang, 1979; Ceccaldi, 1989). Nos trabalhos de Ceccaldi *et al.* (1989), os autores só obtiveram algum sucesso quando as células foram tratadas com colchicina antes da infecção. No nosso modelo, embora *in vitro*, a droga foi testada em células já infectadas, o que de certa forma, mimetiza melhor uma infecção natural. Na tentativa de melhorar os resultados, o vírus foi incubado com a cinabarina antes que este infectasse as células, no entanto, os resultados permaneceram os mesmos.

Apesar dos fatores complicadores levantados anteriormente e da ausência de literatura científica para comparações, consideramos os resultados obtidos com a cinabarina, embora limitados, no mínimo promissores. Deve-se salientar a absoluta ausência de alternativas para tratamento contra o vírus rábico, uma vez manifestados os sintomas clínicos. Os dados obtidos abrem a possibilidade de que os efeitos antivirais da cinabarina sejam testados *in vivo*.

## 7 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Apesar da diversidade dos basidiomas coletados, todos foram identificados como *Pycnoporus sanguineus*;
- Os componentes identificados nos extratos dos basidiomas de *P. sanguineus* foram a cinabarina e os esteróis Ga1 (5 $\alpha$ -ergost-7,22-dien-3 $\beta$ ol) e Ga2 (5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergost-6,22-dien-3 $\beta$ ol);
- O composto Ga1 apresentou baixa solubilidade em todos os solventes utilizados em ensaios biológicos, impedindo a avaliação da existência de atividade antiparasitária e antiviral;
- O composto Ga2 mostrou-se cerca de 4 vezes mais potente que o Rochagan<sup>®</sup>, em experimentos realizados *in vitro*, contra formas epimastigotas de *T. cruzi* e apresentou atividade tripanocida contra as formas tripomastigotas sanguíneas;
- O composto Ga2 apresentou elevada atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania* spp.
- A cinabarina mostrou baixa estabilidade química impedindo a avaliação da existência de atividade antiparasitária.
- A cinabarina causou uma redução de 4 vezes na infecção de células N2A pelo vírus rábico, sem causar efeitos citopáticos significativos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHENBACH, H. e BLÜMM, E. Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus* – Pycnosanguin and New Phenoxazin-3-ones. **Arch. Pharm.**, Weinheim, **324**: 3-6, 1991.
- ALEXOPOLUS, J.C. e MINS, C.W. In: **Introductory Mycology**. 3 edn. New York: John Wiley, 1979.
- ALIBERT, H. Note sur les champignons dans le bas Dahomey et sur deux agaricinées des indigènes de cette même région. **Notes Africaines**, Dakar, **22**: 11-12, 1944.
- AMOROS, M. Antiviral Activity of Homobasidiomycetes: Evaluation of 121 *Basidiomycetes* extracts on four viruses. **International Journal of Pharmacognosy**, **35** (4): 255-260, 1997.
- ANDRADE, S.G.; FREITAS, L.A.R.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A.R. e SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of antigens and positive sorology in parasitologically cured mice. **Bull. World Health Organiz.**, **69**: 191-197, 1991.
- AOKI, T. Antibodies to HTLV 1 and HTLV II in sera from two Japanese patients, one with possible pre-AIDS. **Lancet**, **20**: 936-937, 1984.
- ARORA, D.S. e GARG, K.K. Comparative degradation of lignocellulosic residues by different fungi. **Bioresource Technology**, **41** (3): 279-280, 1992.
- AUBERT, M.F.A. Methods for the calculation of titers. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H., ed. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.445-59.
- BAER, G. M.; SHANTHAVEERAPPA, T.R. e BOURNE, G. H. Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats. **Org. Mond. Sante**, **38**: 119-25, 1968.
- BENEDICT, R.C. e BRADY, L.C. Antimicrobial activity of mushrooms metabolites. **J. Pharm. Sci.**, **61**: 180-182, 1972.
- BONDY, S. e NADERI, S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. **Biochem. Pharmacol.**, **48**: 155-159, 1994.
- BOIANAIN, E. Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. **Rev. Goiana Med.**, **25**: 1-60, 1979.
- BOSE, S. R. Campestrin, the antibiotic of *Psalliota campestris*. **Nature**, **175**: 468, 1955.
- BOSE, S.R. Antibiotics in a polyporus (*Polysticus sanguineus*). **Nature**, **158**: 292-296, 1946.

- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J.F. e STOPPANI, A.O. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, **188**: 643-648, 1980.
- BOULGER, L.R. e PORTEFIELD, J. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **52**: 421-4, 1958.
- BOURHY, H.; SUREAU, P. e TORDO, N. From rabies to rabies related viruses. **Vet. Microbiol.**, **23**: 115-28, 1990.
- BRAIN, P.W. Antibiotics produced by fungi. **Bot. Rev.** **17**: 357-430, 1950.
- BRENER, Z. e ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.
- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 205-212, 1987.
- CAPELARI, M. e ZADRAZIL, F. Lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw treated with brazilian tropical species of white rot fungi. **Folia Microbiol.**, **42(5)**: 481-487, 1997.
- CASTILHO, G. e DEMOULIN, V. NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. **Mycologicae Research**, **101**: 341-344, Parte 3, 1997.
- CECCALDI, P-E. Inhibition du transport axonal du virus rabique dans le systeme nerveux central, Paris, 1989 (Tese de Doutorado – Universite Paris 6).
- CECCALDI, P-E.; GILLET, J. P. e TSIANG, H. Inhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system. **J. Neurophatol. Exp. Neurol.**, **48**: 620-30, 1989.
- CHAGAS, C. Nova Tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi*: n.gen., n. sp, agente biológico de nova morbidade do homem. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, **1**:(2), 159-218, 1909.
- CHANCE, M.L. e GOAD, L. J. Sterol metabolism and trypanosomes: potential for chemotherapeutic exploitation. In: HIDE, G.; MOTHAM, J.C.; COOMBS, G.H. e HOLMES, P.H. (eds.) **Trypanosomiasis and leishmaniasis - Biology and control**. Oxon: CAB International, 1997. p.163-176.
- CHIARA, G.; MAEDA, Y.Y. e HAMURO, J. Current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin. **Int. J. Tissue React.** **4**: 207-225, 1982.
- CONSTANTINE, D. G. Rabies transmission by nonbite route. **Publ. Health Rep.**, **77**: 287-89, 1962.
- COX, J. H. I.; DIETZSCHOLD, B. e SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. 2. Biological and serological characterization. **Infect. Immun.**, **16**: 754-9, 1977.

- CRICK, J. e KING, A. Culture of rabies virus in vitro. In: CAMPBELL, J. B. e CHARLTON, K. M., eds. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988, p.47-66.
- DEAN, D. J.; BAER, G. M. e THOMPSON, W. R. Studies on the local Treatment of rabies-infected wounds. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, **28**: 477-86, 1963.
- DEAN, D.; EVANS, W. e McCLURE, R. C. Pathogenesis of rabies. **Bull. Org. Mond. Sante.**, **29**: 803-11, 1963.
- DELAGNEAU, J.F.; PERRIN, P. e ATANASIU, P. Structure of the rabies virus: spatial relationship of the proteins G, M1, M2 and N. **Ann Virol., Inst. Pasteur**, **132**: 473-93, 1981.
- DELLE GRECA, M.; MANGONI, L.; MOLINARI, A.; MONACO, P. e PREVITERA, L.  $5\alpha$ ,  $8\beta$ -epidioxyergosta-6,22-dien- $3\beta$ -ol from *Typha latifolia*. **Gazzetta Chimica Italiana**, **120**: 391-92, 1990.
- DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão. In: BRENER, Z. e ANDRADE, Z. (eds) **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, p.152-174.
- DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, **3**: 336-341, 1987.
- DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, ME e RASSI, A. (eds). **Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil 92, 1992, p. 49-80.
- DIX, T.A. e AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chem. Res. Toxicol.**, **6**: 2-18, 1993.
- DOCAMPO, R. e STOPPANI, A.O.M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Arch Biochem Biophys**. **197**: 317-321, 1979.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. e STOPPANI, A.O.M. Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. **Arch Biochem**. **207**: 316-324, 1981.
- DOCAMPO, R. e MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, **6**: 223-238, 1984.
- DOCAMPO, R. e MORENO, S. N. J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed. Proc.**, **45**: 2471-2476, 1986.
- DONNELLY, D.M.X. e HUTCHINSON, R.M. Armillane, a saturated sesquiterpene ester from *Armillaria mellea*. **Phytochemistry**, **29**: 179-182, 1990.
- EGGERT, C. Laccase-catalysed formation of cinnabaric acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. **Microbiological Research** **152**: 315-318, 1997.

- FAMILUSI, J.B.; OSUNKOYA, B.O.; MOORE, D.L.; KEMP, G.E. e FABIYI, A. A fatal human infection with Mokola virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **21**: 959-63, 1972.
- FIDALGO, O. Conhecimento micológico dos índios brasileiros. **Rickia**, São Paulo, **8**: 1-6, 1965.
- FIDALGO, O. e HIRATA, J.M. Etnomicologia caibi, txcão e txucarramãe. **Rickia**, São Paulo, **8**: 1-6, 1979.
- GARDINER, G.R. e STOCKDALE, H. Adaptation of a established line of *Spodoptera frugiperda* to a simple tissue culture medium. **Abstracts of the proceedings of the 6<sup>th</sup> annual meeting of invertebrate pathology**, Oxford, **20**, 1973.
- GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. e cols. **Parasitologia Humana**. 9 ed. Atheneu: São Paulo, 1997, 524 p.
- GILBERTSON, R.L. e RYVARDEN, L. **North American polypores – Megasporoporia-Wrightoporia**. Oslo: Fungiflora, V.2 p. 687-691, 1987.
- GODE, G.R.; RAJU, A.V.; JAYALAKSHIMI, T.S.; KAUL, H.L. e BHIDE, N.K. – Intensive care in rabies therapy - clinical observations. **Lancet**, **2** (1975): 6-8, 1976.
- GONZALEZ, N.S. e CAZZULO, J.J. Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis *in vitro* and *vivo* by *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Pharmacol.** **39**: 2873-2877, 1989.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 458.
- GUZMÁN-DÁVALOS, L. e GÚZMAN, G. Estudio ecológico comparativo entre los hongos (macromicetos) de los bosques tropicales y los de coníferas del sureste de Mexico. **Boletín de la sociedad mexicana de micología**, Monterrey, **13**: 89-126, 1979.
- HABEL, K. Habel test for potency. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M.M. e KOPROWSKI, H., ed. **Laboratory techniques in rabies**. 4<sup>th</sup> edition. Geneva: World Health Organization, 1996, p.369-373.
- HATCHETT, R.P. Rabies: The disease and the value of intensive care treatment. **Int. Care Nurs.**, **7**: 53-60, 1991.
- HERVEY, A. H. A survey of 500 basidiomycetes for antibacterial activity. **Bull. Torrey Bot. Club**, **74**: 476-503, 1947.
- HER MAJESTY'S STATIONARY OFFICE. Flora of British Fungi. **Colour identification chart**. Edinburg: Royal Botanic Garden, 1969. (Cartão de cores).
- HILFENHAUS, J.; THIERFELDER, H. e BARTH, R. Sensitivity of various primate cells and animal viruses to antiviral activity of human leukocyte interferon. **Archives of virology**, **48**: (3) 203-211, 1975.
- IRINODA, K.; MASIM, K.N.; CHIARA, G.; KANEKO, Y. e KATORI, T. Stimulation of microbicidal host defense mechanisms against aerosol influenza virus infection by Lentinan. **International Journal of Immunopharmacology**, **14**: (6) 971-977, 1992.

- IWU, M.M. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology today**, [s.l.], **10** (2): 65-68, 1994.
- JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J.M. e PAI, S.H. Immunomodulatory substances of fungal origin. **J. Immunol. Immunopharmacol.**, **9** (3): 115-122, 1991.
- KAC, D.; BARBIERI, G.; FALCO, M.R.; SELDES, A.M. e GROS, E.G. The major sterols from three species of Polyporaceae. **Phytochemistry**, **23** (suppl.3): 686-687, 1984.
- KAPPUS, H. A. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chem. Phys. Lipids.**, **45**: 105-115, 1987.
- KAWAI, A. Transcriptase activity associated with rabies virion. **J. Virol.**, **24**: 826-35, 1977.
- KIM, H.W. e KIM, B.K. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.:FR.) P. Karst (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, **1** (2): 121-138, 1999
- KING, A. A. e TURNER, G. S. Rabies : a review. **Journal of Comparative Pathology**. **108** (1): 1-39, 1993.
- LAFON, M. e WIKTOR, T. J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non structural protein. **J. Gen. Virol.**, **66**: 2125-33, 1985.
- LAPLUMÉ, H.; BAROUSSE, A. P. e CABRERA, H. Efectos indeseables del nifurtimox y benznidazol. **Medicina.**, **42**: 223, 1982.
- LOGUERCIO-LEITE, C. *Polyporus* (Basidiomycotina) Xilófilos de La Isla de Santa Catarina, Brasil. Buenos Aires, 1990b (Tese de Doutorado – FCNE, UBA).
- MANSEL, G. A. **Royal Canadian Mounted Police Report**, Quebec, 1951.
- MARCOVISTZ, R.; TSIANG, H. e HOVANESSIAN, A.G. Production and action of interferon in mice infected with rabies virus. **Ann. Virol. Inst. Pasteur**, **135E**: 19-33, 1984.
- McCALLA, D. R.; REUVERS, A. e KAISER, C. Activitation of nitrofurazone in animal tissues. **Biochem. Pharmacol.**, **20**: 3532-3538, 1971.
- MEREDITH, C.D.; PROSSOUW, A.P.; KOCH, H.van P. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **S. Afr. Med. J.**, **45**: 767-9, 1971.
- MERIGAN, T.C.; BAER, G.M. e WINCKLER, W.C. Human leucocyte interferon administration to patients with syntomatic and suspected rabies. **Ann. Neurol.** **16**: 82-84, 1984.
- MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: Food function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Rev. Intern.**, **11** (1): 7-21, 1995a.
- MIZUNO, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. **Food Ingrid. J. (Japan)**, **167**: 69-85, 1996.

- MIZUNO, T. Yamabushitake, *Hericum erinaceum*: bioactive substances and medicinal utilization. **Food Rev. Intern.**, **11** (1): 177-178, 1995b.
- MIZUNO, T. Bioactive substances in Yamabushitake: *Hericum erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. **Food Incred. J.** (Japan), **167**: 69-85, 1998.
- MIZUNO, T.; SAKAI, H e CHIARA, G. Health foods and medicinal usage of mushrooms. **Food Rev. Intern.**, **11** (1): 69-82, 1995.
- MORELLO, A. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **86**: 101-106, 1997.
- MORELLO, A. The biochemistry of de mode of action of drugs and detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **90c**: 1-12, 1988.
- MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; MASSON, R.P.; LEON, W. e STOPANI, A.O.M. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys.**, **218**: 585-591, 1982.
- MORENO, S. N. J.; PALMERO, D. J.; PALMERO, K. E.; DOCAMPO, R. e STOPPANI, A.O. Stimulation of lipid peroxidation and ultrastructural alterations induced by nifurtimox in mammalian tissues. **Medicina.**, **40**: 553-559, 1980.
- MURPHY, F. A. Morphology and morphogenesis. In: BAER, G. M. (ed.) **The Natural History of Rabies**. Boca Raton: CRC. Press, 1991, p.33-61.
- MURPHY, F. A. The pathogenesis and pathology of rabies virus infection. **Ann Virol. (Inst. Pasteur)**, **136**: 373-86, 1985.
- NOBLES, M.K. e FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomyces. V. The genus *Pycnoporus* Karst. **Can. J. Botany**, **40**: 987-1016, 1962.
- NOVA, A. N.; RENGELL, F. S. e HINRICHESEN, S. L. Raiva In: VERONESI, R. e FOCACCIA, R. (eds.) **Veronesi Tratado de Infectologia V.2** São Paulo: Atheneu, 1996. p.476-487.
- OLIVE, P.L. e McCALLA, D.R. Cytotoxicity and dna damage to mammalian-cells by nitrofurans. **Chem. Biol. Interact.**, **16**: 223-233, 1977.
- PAWAN, J.L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* - Wagner, 1840). **Caribbean Med J.**, **21**: 110-36, 1959.
- PÉREZ-SILVA, E.; AGUIRRE-COSTA, E. e PÉREZ-AMADOR, C. Aspectos sobre el uso y la distribuicion de *Pycnoporus sanguineus* (*Polyporaceae*) en Mexico. **Rev. Mex. Mic.** **4**: 137-144, 1988.
- PERRIN, P.; LAFON, M. e SUREAU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of the glycoprotein content of rabies vaccines. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M.M. e KOPROWSKI, H., ed. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p.383-387.

- PIRAINO, F. e BRANDT, C. R. Isolation and partial characterization of an antiviral RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. **Antiviral Research**, **43**: 67-78, 1999.
- PRICE, R.W. "Raiva" In: BENNETT, J.C.; PLUM, F. eds. **Cecil Tratado de Medicina Interna** 20.ed. V.2 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.2313-2314.
- PRINGLE, C.R. The order Mononegavirales. **Arch. Virol.**, **117**: 137-40, 1991.
- RASSI, A. e LUQUETTI, A.O. Therapy of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E. e RASSI, A. (eds.) **Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brasil, 1992, pp 237-247.
- RASSI, A. Clínica: Fase aguda. In: BRENER, Z. E ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1979, p.251-264.
- REZENDE, J.M. e RASSI, A. Doença de Chagas (Capítulo 3), In: CASTRO, L.P.; CUNHA, A.S.; REZENDE, J.M. e col. **Protozooses humanas**, 2º tiragem, BYK: São Paulo, 1995. pp. 38-72.
- REY, L. "Tripanosomiase devida ao *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas". **Bases da Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1992. p.25-37.
- RYVARDEN, L. e JOHANSEN, I. **A preliminary polypore flora of East Africa**. Oslo: Fungiflora. 1980, p.636.
- SACRAMENTO, D.R.V. Etude structurale et fonctionnelle du pseudogène rabique psi: implications dans la répllication et l'épidémiologie du virus de la rage. Paris, 1991. (Tese de Doutorado. Université ParisVI - Pierre et Marie Curie).
- SARKAR, S.; KOGA, J.; WHITLEY, R.J. e CHATTERJEE, S. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, **20**: (4) 293-303, 1993.
- SCHNEIDER, L.G. The pathogenesis of rabies in mice. I The spread of the viruses from the site of infection towards in CNS. **Zent . bl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.**, **211**: 281-308, 1969a.
- SCHNEIDER, L. G. The rabies pathogenesis in mice. II Spread of the virus in CNS. **Zent . bl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.**, **212**: 1-13, 1969b.
- SCHNEIDER, L. G.; DIETZSCHOLD, B.; DIERKS, R. E.; MATTHAEUS, W.; ENZMANN, P. J. e STROHMAIER, K. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. **J. Virol.**, **11**: 748-55, 1973.
- SEPÚLVEDA-BOZA, S. e CASSELS, B.K. Plants metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta medica**, **62**: 98-105, 1995.

- SHOPE, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O.R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I. e MOORE, D.L. Two African viruses serologically and morfologically related to rabies virus. **J Virol.**, **6**: 690-2, 1970.
- SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C. e CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. (Fr.) **Murr. J. Ethnopharmacol.** **45**: 177-181, 1995a.
- SMÂNIA, A. Jr.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C. e CRUZ, F.S. Growth and production phases of *Pycnoporus sanguineus*. **Rev. Microbiol.** **26**: 302-6, 1995b.
- SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUERCIO-LEITE, C.S. e GIL, M.L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **70**: 57-59, 1997.
- SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A. Jr. e LOGUERCIO-LEITE, C.S. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Rev. Microbiol.** **29**: 317-320, 1998.
- SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A. e CUNEO, R. Antibacterial Activity of compounds isolates from *Ganoderma applanatum* fruit body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, **1** (4): 325-330, 2000.
- SMITH, A L. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. **Intervirology**, **9**: 359-361, 1978.
- SMITH, A. L. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CFT cells. **Intervirology**, **8**: 92-99, 1977.
- SMITH, J.S.; YAGER, A. e BAER, G.M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H., ed. **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 181-191.
- SOKOL, F.; STANCEK, D. e KOPROWSKI, H. Structural proteins of rabies virus. **J. Virol.**, **7**: 241-9, 1971.
- SOUZA, M. M. Estudo imunológico da raiva. Dissertação de Mestrado. Instituto de Microbiologia da UFRJ. Rio de Janeiro, 1976.
- STALPERS, J. A. Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. **Studies in mycology**, **16**: 1-248, 1978.
- STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isolados de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de SC. Belo Horizonte, 1993 (Tese de Doutorado – UFMG).
- SUZUKI, H. *et al.* Immunological activities of high-molecular-weight fractions purified from *Lentinus edodes* mycelia extract (LEM) macrophage activating effect and mitogenic activity. **Igaku no Ayumi**, **138**: 441-442, 1986.

- SUZUKI, H.; IYAMA, K.; YOSFEDA, O. e YAMAMOTO, X. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia extract (LEM). **Agricultural Biological Chemistry**, **254**: 479- 487, 1990.
- SUZUKI, H.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K.; NUTSUYA, H. e TODA, S. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **160**: (1) 367-373, 1989.
- TEIXEIRA, A.R.L.; CALIXTO, M.A.; RIZZO, L.V.; CORDOBA, J.C. e TEIXEIRA, M.L. Cancerigênese em camundongos tratados com compostos nitroderivados. **Programa e Resumos do XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.** p.48-49, 1985.
- TEIXEIRA, A.R.L.; CORDOBA, J.C.; SOUTO MAIOR, I.C. e SOLORZANO, E. Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benzimidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **43**: 146-158, 1990a.
- TEIXEIRA, A.R.L.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J.M. e RIZZO, L.V. Malignant non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes. **J Comp Pathol.** **103**: 37-48, 1990b.
- TEIXEIRA, A.R.L.; CALIXTO, M.A. e TEIXEIRA, M.L. Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. **Mutation Res.** **305**: 189-196, 1994.
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A. e KEITH, G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome; segmented homology with VSV. **Nucleic Acids Res.**, **14**: 2671-83, 1986a.
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. e ROUGEON, F. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **83**: 3914-8, 1986b.
- TORDO, N. e POCH, O. Structure of rabies virus. In: CAMPBELL, J.B. e CHARLTON, K. M. ed. **Rabies**. Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 25-45.
- TORDO, N. Contribution of molecular biology to vaccine development and molecular epidemiology of rabies disease. **Mem. Inst. Butantan**, **53**: 31-51, 1991.
- TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G. e ROUGEON, F. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA-viruses. **Virology**, **165**: 565-76, 1988.
- TRACY, J.W. e WEBSTER, L.T, Jr. , Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections (continued). In: MOLINOFF, P.B. e RUDDON R.W. (eds.) **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 9th.ed. New York: MacGraw-Hill, 1996, p. 988.

- TSIANG, H. Evidence for an intra-axonal transport. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **38**, 286-296, 1979.
- URBINA, J.A.; VIVAS, J.; LAZARDI, J.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; PIRAS, M.M. e PIRAS, R. Antiproliferative effects of  $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *In vitro* and *in vivo* studies. **Chemotherapy**, **42**: 294-307, 1996.
- VENTERS, H. D.; HOFFERT, W. R.; SCATTERDAY, J. E. e HARDY, A. V. Rabies in bats in Florida. **Am. J. Public Health**, **44**: 182-5, 1954.
- VLIETINCK, A.J.; BRUYNE, T. e BERGHE, D.A.V. Plant Substances as Antiviral Agents. **Current Organic Chemistry**, **1**: 307-344, 1997.
- WASSER, S.P. e WEIS, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspectives. **Critical Reviews in Immunology**, **19**: 65-96, 1999 a.
- WASSER, S.P. e WEIS, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review) **International Journal of Medicinal Mushrooms** **1**: 31-62, 1999 b.
- WASSER, S.P. The fungus among us. **Eretz Magazine**, 52-55, 1997.
- WEETE, J. D. Structure and Function of Sterols in Fungi. **Advances in Lipid Research**: **23**, 115-167, 1989.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Special programme for research and training in tropical disease (TDR): progress 1995-1996. 13<sup>th</sup> programme report of the UNDP/World Bank/WHO, 1997.
- WIKTOR, T. J. e CLARCK, H. F. Growth of rabies virus in cell culture. In: BAER, G. M. ed. **The natural history of rabies**, Vol.1. New York: Academic Press, 1975, p. 155-179.
- WIKTOR, T. J.; GYORGY, E.; SCHLUMBERGER, H.D.; SOKOL, F. e KOPROWSKI, H. Antigenic properties of rabies virus components. **J Immunol.**, **110**: 269-76, 1973.
- WIKTOR, T. J.; POSTIC, B. e HO, M. Role of interferon in the protective activity of rabies vaccines. **J. Infect. Dis.**, **126**: 408-18, 1972.
- WILBUR, L. A. e AUBERT, M. F. A. The NIH test for potency. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M.M. e KOPROWSKI, H. (eds.) **Laboratory techniques in rabies**. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization., 1996, p. 360-368.
- WUNNER, W. R. The chemical composition and structure of rabies viruses. In: BAER, G. M. ed. **The Natural**, **161**: 370, 1968.
- YING, J. *et al.* **Icons of medicinal fungi from China**. Yuehan X, trans. Science Press: Beijing, 1987, p. 575.