

ALEXANDRE RODRIGUES SILVA

***Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. como agente tripanocida sobre
*Trypanosoma cruzi***

RECIFE

2009

ALEXANDRE RODRIGUES SILVA

***Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. como agente tripanocida sobre
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica – CCB – UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal.

Orientador:

Dr. Nicácio Henrique da Silva

Co-orientadora:

Dr^a. Regina Célia Bressan Q. Figueiredo

**RECIFE
2009**

Silva, Alexandre Rodrigues

***Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. como agente tripanocida sobre *Trypanosoma cruzi* / Alexandre Rodrigues Silva – Recife: O Autor, 2009.**

57 folhas: il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Departamento de Botânica, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Cladonia verticillaris* 2. Metabólitos liquênicos 3. *Trypanosoma cruzi* 4. Líquens | Título.

582.29

CDU (2.ed.)

UFPE

579.7

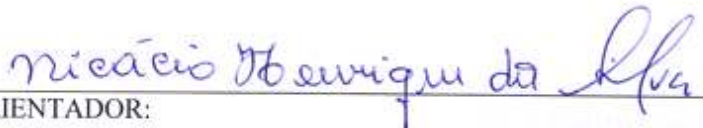
CDD (22.ed.)


CCB – 2009- 025

FICHA DE APROVAÇÃO

***Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. como agente tripanocida sobre
*Trypanosoma cruzi***

APROVADA EM 26 DE FEVEREIRO DE 2009 PELA BANCA EXAMINADORA:


ORIENTADOR:
PROF. Dr. NICÁCIO HENRIQUE DA SILVA


1.º PROF.ª. DR.ª. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO


2.º PROF.ª. DR.ª. NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS

AGRADECIMENTOS

Ao inabalável Criador da natureza, a qual a ciência se “debruça” incansavelmente para desvendar os seus mais misteriosos e intrigantes mecanismos existenciais. Minha gratidão, a esse Deus que, através de Suas obras, consegue fascinar até mesmo o mais severo e relutante cético. E pelo Seus cuidados, posso agradecer:

Ao prof. Nicácio Henrique da Silva, por ter assumido a orientação desta dissertação, por sua confiança e pelos diálogos sempre acompanhados de ricas observações e incentivos.

A minha co-orientadora prof.^a Regina Célia Bressan Q. Figueiredo, também, pela confiança cedida a mim e por sua imprescindível contribuição; os resultados deste trabalho, “curvam-se” a ela, em agradecimento.

A prof.^a Eugênia Cristina G. Pereira, pessoa de singular profissionalismo e simpatia, a qual agradeço fortemente pelas sugestões e apoio. Impossível mencionar este trabalho sem atrelá-lo a ela.

A Jana Messias Sandes pela ajuda valiosa no laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura; ao Mineo Nakazawa, possuidor de um carisma peculiar, agradeço pela inestimável assistência e idéias propostas. A Conceição, sempre disposta a auxiliar nas atividades no biotério. Ao João Virginio, cuja experiência, conferiu a este trabalho orientações laboratoriais valiosas. Aos companheiros(as) e amigos(as) de laboratório: Rafaela Tigre, Peter Falcão e Mônica Martins, agradeço pelas discussões e incentivos. A todos aqueles que, embora não nomeados, ajudaram, a alcançar o objetivo deste estudo. E finalizo os meus agradecimentos:

A Patrícia Barbosa que, de forma incontestável, demonstrou que a distância nada representa, quando realmente se deseja está próximo de alguém para compartilhar e ajudar a enfrentar os percalços da vida.

À minha família, mas, de forma especial, aos meus pais. Sem eles, eu jamais teria alcançado mais está conquista; o apoio incondicional, o anelo e a alegria inexaurível por meu sucesso, elevam a minha eterna gratidão a eles e, fortalece os “pilares” sobre os quais me sustento e, que os mesmos ajudaram a construir.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| APRESENTAÇÃO..... | 5 |
| 1. REVISÃO DA LITERATURA..... | 7 |
| 1.1 Liquens..... | 7 |
| 1.1.1 Importância farmacológica dos liquens..... | 9 |
| 1.1.1.1 Atividade antimicrobiana e anti-parasitária..... | 10 |
| 1.1.1.2 Ação antitumoral..... | 11 |
| 1.1.1.3 Ação antifúngica..... | 12 |
| 1.1.1.4 Outras aplicações com os metabólitos liquênicos..... | 13 |
| 1.2 Metabólitos liquênicos..... | 13 |
| 1.3 <i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr..... | 15 |
| 1.3.1 Características químicas..... | 16 |
| 1.3.1.1 Ácido Fumarprotocetrárico..... | 17 |
| 1.3.1.2 Ácido Protocetrárico..... | 18 |
| 1.4 Tripanossomiase americana..... | 18 |
| 1.4.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 1.4.1.1 Morfologia - Organização e Ultra-estrutura..... | 19 |
| 1.4.1.2 Sistemática..... | 20 |
| 1.4.1.3 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado..... | 21 |
| 1.4.2 Infectividade, Patologia e Terapêutica..... | 22 |
| 1.4.2.1 Infectividade..... | 22 |
| 1.4.2.2 Patologia..... | 23 |
| 1.4.2.2.1 Fase aguda..... | 23 |
| 1.4.2.2.2 Fase Crônica..... | 24 |
| 1.4.2.3 Terapêutica..... | 24 |
| 1.4.3 Compostos propostos para o combate da doença de Chagas..... | 25 |
| 2. REFERÊNCIAS..... | 27 |
| 3. MANUSCRITO A SER PUBLICADO..... | 37 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 55 |
| 5. RESUMO..... | 56 |
| 6. ABSTRACT..... | 57 |

APRESENTAÇÃO

As patologias causadas por protozoários tripanossomatídeos tais como a doença de Chagas, a doença do sono, e as diversas formas de Leishmanioses, causam grande sofrimento às populações afetadas com altos índices de morbidade e de mortalidade. A doença de Chagas, atualmente classificada como doença extremamente negligenciada (DNDi¹, 2007), é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e acomete cerca de 18 milhões de pessoas na América Latina; cinco milhões de infectados somente no Brasil e, mais de 100 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (WHO, 2002; CASTRO *et al.*, 2006).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos triatomíneos hematófagos). Logo após a infecção o indivíduo entra na fase aguda da doença que pode se estender por semanas e até meses, podendo apresentar quadro clínico assintomático ou associado com manifestações clínicas comuns a outras patologias. Na ausência de um tratamento específico, a proporção de óbitos é de 10-15% e 10-50% dos sobreviventes desenvolvem a fase crônica da doença, a qual é caracterizada nos estágios mais avançados, por uma cardiopatia potencialmente letal, podendo ainda ocorrer o desenvolvimento de megacólon ou megaesôfago (BRENER, *et al.*, 1997; REY, 2001).

O único tratamento clinicamente disponível no Brasil para a doença de Chagas é o benznidazol, tendo em vista que o outro composto, nifurtimox teve sua produção descontinuada por acarretar efeitos colaterais mais acentuados e ser menos eficaz em relação ao benznidazol. Apesar de serem eficazes na fase aguda, estas drogas causam sérios efeitos colaterais o que freqüentemente leva ao abandono da terapia. Além do mais, sua eficácia na fase crônica tem sido questionada em vários estudos (CASTRO, 1993; ESTANI *et al.*, 1998; CROFT, 1999; REY, 2001). O benznidazol é altamente tóxico, causando uma série de efeitos colaterais, como alterações no sistema imune (detectadas nos órgãos linfáticos), atividades mutagênica e carcinogênica (KIRCHHOFF, 1999).

¹ DNDi é a sigla em inglês para Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases initiative). (Fonte: http://www.dndi.org.br/Portugues/sobre_dndi.aspx).

Diante desta situação, estudos voltados para o desenvolvimento de alternativas eficazes, economicamente viáveis e que eliminem ou amenizem os efeitos colaterais durante o tratamento da tripanossomíase americana ainda se fazem necessários (TEMPONE *et al.*, 2006).

Os líquens sintetizam induzidos por sua simbiose, diversos compostos e, muitos destes, são desconhecidos quanto às suas atividades ou aplicações biológicas, especialmente as terapêuticas. Apesar do potencial desses compostos, poucos trabalhos evidenciam ou relatam sua atividade contra protozoários patogênicos, em especial contra o *Trypanosoma cruzi*. Desta forma, no presente trabalho, foi investigado o potencial tripanocida de *Cladonia verticillaris*.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Líquens

Os líquens são organismos resultantes de uma associação entre um fungo e um simbiote fotossintético, resultando em talos complexos e estáveis. Os organismos fotossintetizantes podem ser de algas unicelulares verdes ou de cianobactérias. Aproximadamente 98% dos fungos liquenizados pertencem ao Filo Ascomycota, os demais, ao Filo Basidiomycota. Em quase todos os casos o fungo produz e tem o papel determinante sobre a forma do talo liquênico, além de controlar a divisão celular da alga ou da cianobactéria. (RAVEN *et al.*, 2001). A simbiose entre fungo e alga ou cianobactéria atribui-lhes mecanismos morfológicos e fisiológicos ímpares, não comparados a nenhum outro grupo taxonômico (NASH III, 1996).

Até 2001, 13.250 espécies liquênicas estavam oficialmente catalogadas, e aproximadamente 40 gêneros de fotobiontes foram encontrados em combinação com ascomicetos. O mecanismo utilizado pelo esporo do micobionte, em germinação, para reconhecer a alga ou a cianobactéria ainda é desconhecido (NASH III, 1996; RAVEN *et al.*, 2001).

Os líquens são cosmopolitas, sendo capazes de habitar os ambientes mais inóspitos. Ocorrem desde o deserto árido às regiões geladas, crescem em solos desprovidos de cobertura vegetativa, formam-se em troncos de árvores, rochas expostas ao sol e picos alpinos. A tolerância liquênica às variações climáticas é superior a qualquer representante dos cinco reinos (KAPPEN, 1973).

Separados, tanto micobionte quanto o fotobionte seriam incapazes de viver, ou seriam raros nesses ambientes (CURTIS, 1977). *In vitro*, poucos componentes liquênicos foram separados e cresceram independentemente (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

O talo liquênico apresenta forma peculiar, onde o fotobionte e o micobionte se posicionam em camadas sucessivas. O córtex superior é composto por hifas do fungo entrelaçadas, visando proteger a camada das algas que vem logo abaixo (**Fig. 01**). Ao centro encontra-se uma camada de hifas frouxas, a medula, seguida de um outro feixe de hifas, o córtex inferior (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996). O talo do líquen pode apresentar cores e formas variadas, dependendo da espécie e das substâncias sintetizadas por ele (THOMSON, 1968).

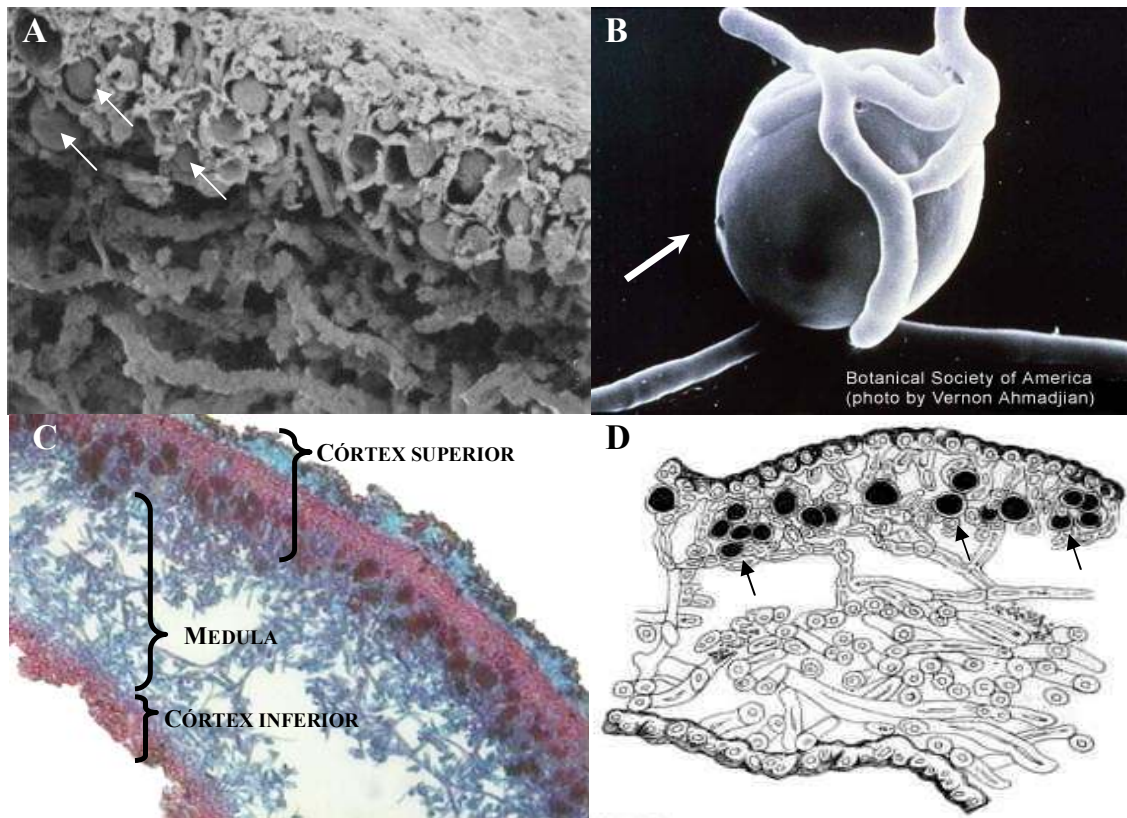


Fig 01. Arranjo morfológico liquênico. (**A**²) microscopia eletrônica de varredura (MEV) o corte transversal do córtex superior e células esféricas de algas (setas) revestidas pela matriz de hifas. (**B**³), MEV de uma alga (seta) envolvida por hinfa do micobionte. (**C**⁴), corte tranversal de um talo liquênico folhoso onde observa-se as camadas estruturais básicas de um líquen. (**D**⁵), esquema de um líquen formado por duas camadas, o córtex superior e medula, onde sua organização é do tipo paliçada. As setas indicam células da população fotobionte.

² Fonte: <http://curlygirl.naturlink.pt/fungi.htm>. (Acesso em 21/12/2008).

³ Fonte: http://bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/Plant_Interactions/Lichen/lichenBiology.shtml. Acesso em 21/12/2008).

⁴ Fonte: <http://www.cnas.smsu.edu/labimages/Biology/Bio122/week1.htm> (Acesso em 05.02.07)

⁵ Fonte: http://www.ac.wvu.edu/~fredr/Lichen_review.htm. (Acesso em 21/12/2008).

Ecologicamente, os líquens possuem grande importância nos ambientes terrestres. Através de seus metabólitos secundários, eles auxiliam o intemperismo e, conseqüentemente, na formação de solos, preparando as superfícies para germinação de sementes, e assim favorecem a sucessão biológica. São utilizados como bio-indicadores de poluição, por serem sensíveis a certas moléculas no ar derivadas da queima do carvão, e ao dióxido de enxofre que é altamente tóxico às cianobactérias. Outro fator ecológico de grande importância atribuído aos líquens, mais especificamente às associações com cianobactérias, é a de fixação de nitrogênio no solo (RAVEN *et al.*, 2001). Ainda, nas interações ecológicas, pode-se citar o potencial alelopático de muitos compostos liquênicos (LAWREY, 1995).

Devido à grande diversidade de cores, os líquens são utilizados como fontes de corantes para: vinhos, licores, óleos, graxas, além de tintas para mármore e papel. Por sua capacidade de indicar pH, eram empregados na fabricação de papel tornassol. A indústria de perfumes tem o material liquênico como um importante fixador. A existência de líquens comestíveis é largamente conhecida, sendo seu valor nutritivo devido à presença de altos teores de carboidratos (LLANO, 1951; RAVEN *et al.*, 2001). Em cosmética terapêutica, a atranorina, composto liquênico da classe dos depsídeos e, encontrada no gênero *Cladonia* é capaz de evitar o envelhecimento da pele ocasionado pela idade, ou a prolongadas exposições ao sol (PROKSA *et al.*, 1994).

1.1.1 Importância farmacológica dos líquens

Como medicamento, os líquens são utilizados desde a antiguidade (ABRAHAN & FLOREY, 1949). Os seus metabólitos secundários têm sido estudados quanto à sua ação antibiótica, antimicótica, mucolítica, analgésica, antineoplásica e antipirética (BURKHLOLDER *et al.*, 1944; NISHIKAWA *et al.*, 1974; TAKAI *et al.*, 1979). HIRABAYASHI *et al.* (1989) relataram a atividade inibitória de um polissacarídeo liquênico sulfatado contra a replicação de HIV *in vitro*. O ácido úsnico, considerado um dos compostos liquênicos mais atuante contra enfermidades e dos mais estudados, interfere nos processos de fosforilação oxidativa e, provavelmente, intervém de algum modo na estrutura das paredes bacterianas. Sabe-se, também que esse ácido atua sobre o metabolismo do DNA em células animais inibindo a fusão nuclear (MARSHAR, 1950).

1.1.1.1 Atividade antimicrobiana e anti-parasitária

Em 1941, iniciou-se a fase da terapia antimicrobiana. Inúmeras enfermidades fatais foram sanadas utilizando diversos esquemas terapêuticos com antibióticos. Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos culminou no surgimento de patógenos resistentes, tornando necessário o uso de novos fármacos (GOODMAN & GILMAN, 1990).

BURKHOLDER *et al.* (1945) publicaram os primeiros estudos qualitativos das propriedades antibióticas dos líquens. Foram testadas 100 espécies liquênicas em relação à *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, sendo que 52% das espécies liquênicas inibiram o crescimento de um destes e, até mesmo de ambos. Os compostos liquênicos podem exercer sua ação antibiótica sobre bactérias Gram-positivas (BUSTINZA, 1951) e em micobactérias (INGÓLFSDÓTTIR *et al.*, 1998). Neste estudo, o ácido úsnico e seus derivados foram os principais agentes antimicrobianos, sugerindo que estes afetaram a estrutura protéica da parede celular bacteriana. Essas modificações resultam em alterações de certas capacidades metabólicas das células infectantes como a permeabilidade de parede, de membrana plasmática, a atividade enzimática, etc., provocando, às vezes, alterações irreversíveis e até mesmo conduzindo à morte celular (GARCIA-JUNCEDA *et al.*, 1985). Bustinza, discípulo de Fleming, também foi um dos precursores neste tema de investigação, estudando a eficiência antimicrobiana do ácido úsnico, seus isômeros e derivados (BUSTINZA & CABALLERO, 1948; BUSTINZA, 1951). YILMAZ *et al.* (2004) confirmaram a atuação bactericida dos metabólitos liquênicos e, os efeitos destes, também, contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Outra hipótese considera que esses metabólitos, à semelhança de taninos e flavonóides nas fanerógamas, se comportam como agentes inibidores de enzimas com funções metabólicas primárias nos organismos invasores (VICENTE *et al.*, 1995).

Estudos sobre a ação de substâncias liquênicas contra protozoários parasitas têm sido realizados por alguns pesquisadores. FOURNET *et al.*, (1997) verificaram a eficácia do ácido úsnico contra a leishmaniose cutânea, quando aplicado intralesionalmente. Este mesmo composto obtido de *Cladonia substellata* mostrou-se efetivo contra as formas evolutivas de *T. cruzi* (CARVALHO *et al.*, 2004).

1.1.1.2 Ação antitumoral

Os carboidratos liquênicos são também potentes agentes antitumorais. Através de estudos realizados por NISHIKAWA *et al.* (1974) foi verificada notável atividade antitumoral de heteroglicanos de *Lasallia pensylvanica*, *Usnea rubescens*, *Cladonia crispata*, *C. mitis*, *Cladina ranfígeferina* e *C. squamosa*, destacando-se as duas primeiras espécies por apresentarem um percentual de 99% de inibição tumoral.

Na análise da atividade antitumoral de extratos orgânicos de *Usnea fasciata* destacou-se o extrato acetônico com uma significativa atividade de 70% frente ao sarcoma-180⁶ e para frações que continham rafinose⁷ foi observada uma atividade de 90% de inibição frente às células tumorais de Ehrlich (PEREIRA *et al.*, 1994). Extratos orgânicos de espécies da família Cladoniaceae do Nordeste brasileiro apresentaram ação inibitória contra tumores sólidos de sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich com uma relevante atividade citotóxica. Os extratos orgânicos de *Teloschistes flavicans* e *Heterodermia leucomela*, líquens da caatinga, apresentaram atividade antiproliferativa de células KB⁸ e uma marcante ação antitumoral (NASCIMENTO *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 1990).

Estudo sobre o comportamento do crescimento de sarcoma-180 quando submetido a extratos orgânicos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris*, evidenciou a influência da sazonalidade na atividade anticancerígena, verificando-se que os extratos orgânicos obtidos no período seco continham o maior teor dos princípios ativos antitumorais. Os ácidos fumarprotocetrárico e atranorina foram às substâncias ativas de natureza fenólica, e a liquenina a de natureza polissacarídica (SANTOS, 1996).

Na avaliação da atividade antitumoral dos extratos etanólicos de *Gyrophora esculenta*, *Usnea haylei* e *Cladonia mitis* obteve-se um notável efeito inibitório frente ao sarcoma-180, resultando em uma inibição tumoral superior a 90% para todas as espécies. Através dos métodos físico-químicos analisados sugere-se ser o princípio ativo de natureza polissacarídica (SHIBATA *et al.*, 1968).

⁶ Refere-se a neoplasias malignas do tecido mesenquimal, a palavra deriva do grego “sar” que significa carnosos, visto que possui pouco estroma de tecido conjuntivo e, portanto, são carnosos (COLLINS, 2000).

⁷ Carboidrato (C₁₈H₃₂O₁₆) usado em bacteriologia e na preparação de outros sacarídeos; também conhecido como melitose e melitriose.

⁸ Carcinoma de mama.

Estudos da ação antitumoral de extratos hidroalcoólicos de *Cladonia leptociada* revelou significativa atividade inibitória ao carcinoma pulmonar de Lewis, sendo caracterizado o ácido D-úsico como principal constituinte desta espécie (KUPCHAN & KOPPERMAN, 1975).

1.1.1.3 Ação antifúngica

Na natureza, árvores que servem de habitat para líquens epífitos raramente são susceptíveis aos ataques de fungos saprófitos. Experimentos *in vitro* realizados por Henningsson e Lindstron (1970) demonstraram a capacidade do ácido úsico de inibir a atividade decompositora de algumas espécies de fungos de madeira, bem como seu crescimento micelial.

PROKSA *et al.* (1996) verificaram a atividade inibitória do ácido úsico e seus derivados, sobre o crescimento de sete espécies de fungos; dentre os fortemente inibidos tem-se *Penicillium frequentans*, *P. cyclopium*, *Talaromyces flavus* e *Trycosporium cutaneum*.

Ao testar o ácido úsico purificado, substância majoritária de *Cladonia crispatella*, foi observada a inibição do crescimento do fungo ectomicorrizal *Pisolithus tinctorius* nas concentrações de 10, 25 e 50 mg.mL⁻¹; entretanto a completa inibição fúngica foi obtida pelo extrato orgânico acetona-tolueno desta espécie, sugerindo o efeito sinérgico de suas substâncias como fator inibitório do crescimento micelial (GOLDNER *et al.*, 1986).

Extratos aquosos obtidos de *Nephroma arcticum* apresentaram efeitos fungicida e fungistático contra diferentes espécies testadas. Foi observada lise celular, na fase estacionária de crescimento, com possível comprometimento da parede celular do fungo. Apesar desta espécie líquênica conter ácido úsico e zeorina em sua composição, não foi atribuída a estes compostos a ação inibitória, por serem parcialmente solúveis em água quente (LAND & LUDSTROM, 1998).

1.1.1.4 Outras aplicações com os metabólitos liquênicos

Estudos apontam, também, para os compostos liquênicos, a ação antiviral e imunomoduladora (TAKAI *et al.*, 1979; HIRAYAMA *et al.*, 1980; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2002) e, mais especificamente contra o vírus de imunodeficiência humana, HIV. (HIRABAYASHI *et al.*, 1989; NEAMATI *et al.*, 1997; NAKANISHI *et al.*, 1998). Aplicações farmacológicas como antiinflamatória, analgésica e antipirética comparável aos fármacos conhecidos foram atribuídas as substâncias liquênicas (HÜNECK, 1978; SILVA, 1997).

1.2 Metabólitos liquênicos

As substâncias químicas sintetizadas pelos líquens são classificadas, conforme sua via metabólica, em primárias e secundárias podendo ser intracelulares ou extracelulares.

Sendo o líquen uma estrutura composta, alguns metabólitos são produzidos pelo fungo e outros pela alga ou cianobactéria (HALE-JR, 1983). Vários desses metabólitos são ausentes em algas e fungos individuais, quando crescem separadamente (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001). Os compostos liquênicos possuem local específico para sua produção no talo. Alguns são de origem medular, outros corticais, enquanto outras são mais restritas, podendo se concentrar em estruturas reprodutivas do líquen, tais como os apotécios, sorédios ou isídios. A produção e a classe desses compostos dependem da natureza do fotobionte e, provavelmente estão relacionados a fatores de co-adaptação às peculiaridades do ambiente (HALE-JR, 1983; NASH III, 1996).

Os metabólitos primários abrangem as substâncias intracelulares como os carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídeos, carotenóides e vitaminas (HALER-JR, 1983). A síntese de alguns carboidratos como o peltigerosídeo e a umbilicina são exclusivos dos líquens, no entanto, carboidratos como glucose, sacarose, trealose⁹ e outros comuns em líquens, ocorrem também em plantas superiores (LINDBERG *et al.*, 1953; IACOMINI *et al.*, 2006). Os aminoácidos são similares aos encontrados em vegetais, mas não há esclarecimento

⁹ A trealose é um dissacarídeo não redutor de glicose, tal como a sacarose. Está presente na hemolinfa (sistema circulatório) de insetos, sendo uma fonte de energia rapidamente disponível para o vôo. Pode também ser sintetizada por fungos e plantas.

quanto à síntese protéica dos líquens, e poucos são os registros sobre o isolamento dessas substâncias (PATWARDHAN & BAHDE, 1973).

Os metabólitos secundários (produtos extracelulares) eram designados como “ácidos liquênicos” (XAVIER & RIZZINI, 1976). Estas substâncias estão localizadas na medula ou no córtex, e raramente ocorrem em ambas as camadas. São sintetizados em decorrência do transporte dos nutrientes entre os dois componentes liquênicos. Os produtos finais desse “intercâmbio” são exclusivos destes organismos, e responsáveis pela manutenção desta simbiose. Os metabólitos secundários são depositados em forma de cristais na superfície das hifas do fungo, atribuindo ao líquen a capacidade de adaptar-se às diversidades (CULBERSON & CULBERSON, 1977; MAcFARLANE & KERSHAW, 1984; NASH III, 1996).

Substâncias que apresentam cor, como a maioria das antraquinonas, derivados do ácido pulvínico e a liquexantonas são exemplos típicos de metabólitos secundários presentes no córtex. Entretanto, podem ocorrer em outras partes do líquen como nos apotécios (RYCROFT *et al.*, 1995). Em geral, em um espécime pode ocorrer de um a três ou mais compostos resultantes do metabolismo secundário (WHITE & JAMES, 1985).

São conhecidos cerca de 630 compostos provenientes do metabolismo secundário liquênico. São ácidos alifáticos, *meta* e *para*-depsídeos, depsídonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico. A concentração de metabólitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico, embora em alguns casos a concentração possa ser maior (HALER-JR, 1983; ELIX, 1996; HUNECK, 1999). Muitas espécies cujo fotobionte é uma cianobactéria não produzem derivados fenólicos (GALUN & SHOMER-ILAN, 1988).

1.3 *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr

Pertencente a classe dos **Ascomycetes**, ordem **Lecanorales** e família **Cladoniaceae**, *Cladonia verticillaris* (**Fig. 02**), foi classificada por Vanio em 1894, o qual a designou cladoniforme. A espécie está inserida num grupo bastante heterogêneo, apesar de leituras das subunidades de DNA ribossômico indicarem que esse grupo é monofilético. A ordem caracteriza principalmente por apresentar asco bitunicado e deiscente. (AHTI *et al.*, 1993; NASH III, 1996).



Fig. 02. Exemplar da espécie liquênica *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.

De hábito terrícola, *C. verticillaris* é considerada a mais representativa de sua família e caracteriza-se por possuir verticilos ao longo de seu talo primário, de aspecto crustoso e evanescente, a partir do qual porções semelhantes a hastes suportam o ascostroma pouco ramificado, também conhecido como podécios, que é parte dominante do talo. Os cífos são sobrepostos, curtos e amplos, com poros nas articulações que ligam ao cifo superior. Tem usualmente, 7-12 cm de altura (AHTI *et al.*, 1993; NASH III, 1996).

AHTI *et al.* (1993) consideram-na endêmica da costa brasileira, podendo ser encontrada da Paraíba ao Rio Grande do Sul (NASH III, 1996; FLEIG *et al.*, 1995). No entanto, há registros de sua ocorrência em tabuleiros arenosos do interior do nordeste, esta espécie foi registrada e utilizada em monitoramento ambiental (MOTA-FILHO *et al.*, 2007).

Segundo HAMMER (2003) a Australasia¹⁰ é o centro de endemismo do gênero *Cladonia*, sendo a diversidade claramente notável na Nova Zelândia, que possuía cerca de 60 espécies reconhecidas até 2003, ano em que oito novas espécies foram descobertas.

Possuem como fotobionte algas verdes unicelulares e quando submetida a pouca umidade apresenta cor branco-acizentada e, aspecto amarronzado quando exposta diretamente a luz solar. Em período chuvoso seu talo torna-se mesclado de verde e branco. O gênero *Cladonia* devido a forma fruticosa do talo, não possui uma rígida aderência com o solo, como ocorre em espécies liquênicas crustosas, mas contribuem para a formação do solo mediante a desintegração de fragmentos do talo (PEREIRA, 1998; ASTA *et al.*, 2001).

1.3.1 Características químicas

Os compostos aromáticos mais comumente presentes em líquens são formados pela esterificação de duas ou ocasionalmente três unidades fenólicas (GEISSMAN, 1969). Essas unidades são geralmente o orcinol e β -orcinol (Fig. 03) e, estão ligadas pela carboxila da posição 1 da primeira unidade com a hidroxila da posição 4', ou da posição 3', da segunda unidade. Os compostos resultantes são chamados de **depsídeos** e são classificados como *meta*-depsídeos e *para*-depsídeos, quando as ligações ocorrem respectivamente nas posições 3' e 4' (VICENTE, 1975).

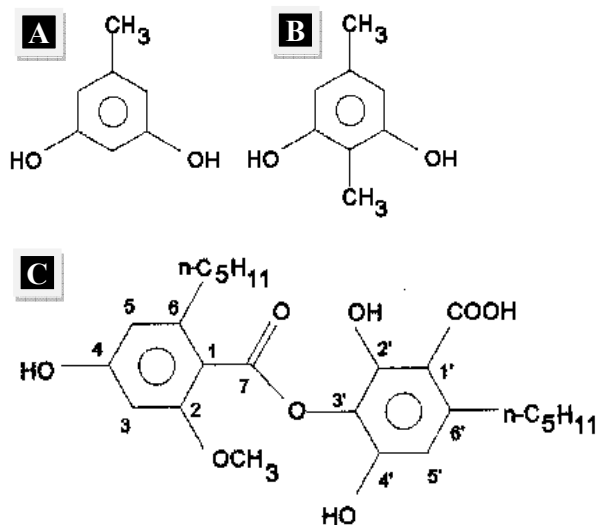


Fig. 03. Molécula de orcinol (A) e β -orcinol (B), unidades básicas na qual deriva a grande maioria dos compostos fenólicos usados na síntese dos depsídeos. (C) Ácido criptoclorofoico, exemplo de duas unidades fenólicas derivadas do orcinol formando um *meta*-depsídeo por esterificação.

¹⁰ Nome da época em que o vocábulo *Oceania* ainda não era usado e incluíam-se a Austrália, a Tasmânia e a Nova Zelândia como partes austrais da Ásia.

O grupo das depsidonas são compostos estruturalmente derivados dos depsídeos. As depsidonas originárias do β -orcinol, às quais pertencem os ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico, são mais complexas do que aquelas derivadas do orcinol. Além da ligação éster presente nos depsídeos, as depsidonas apresentam também um heterocíclico adicional resultante de uma ligação éter, geralmente entre as posições 2 e 5', mas pode ocorrer em alguns compostos um anel heterocíclico com oxigênio entre os substituintes das posições 1' e 6', se estes forem grupamentos carboxila e aldeído, respectivamente (HONDA, 1998).

1.3.1.1 Ácido Fumarprotocetrárico

Hesse em 1904, descreveu a fórmula molecular para o ácido fumarprotocetrárico (**Fig. 04**) e a hidrólise de seu principal grupo, o ácido fumárico, através da seguinte equação: $C_{62}H_{50}O_{35} = 2C_4H_4O_4 + C_{54}H_{42}O_{27}$, onde o primeiro termo dela representava o ácido fumarprotocetrárico e os dois membros do segundo termo representavam respectivamente o ácido fumárico e o ácido protocetrárico. Posteriormente Asahina e Tanase corrigiram a fórmula sugerida por Hesse e também a sua equação de hidrólise (ASAHINA & SHIBATA, 1954), através da equação:

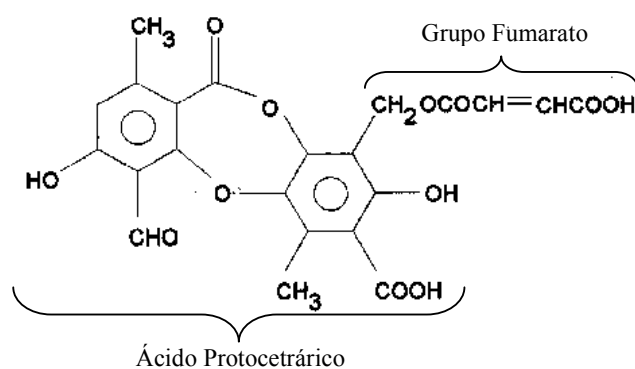
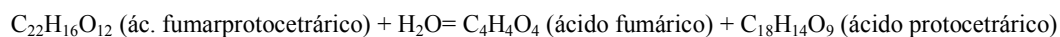


Fig. 04. Fórmula estrutural do ácido fumarprotocetrárico e seu principal grupo funcional, o ácido fumárico.

1.3.1.2 Ácido Protocetrárico

Schnedermann e Knop chamaram de ácido protocetrárico (Fig. 05) a substância relatada por Herberger, como o composto principal do líquen *Cetraria islandica* L. Hesser, posteriormente, confirmou que este produto tratava-se de um metabólito secundário armazenado pela espécie na forma de ácido fumarprotocetrárico. Simon propôs a fórmula molecular: $C_{18}H_{14}O_9$ para o ácido protocetrárico e, apoiados nessa informação Koller e Krakauer, subsequenteiramente encontraram a fórmula estrutural para este ácido (ASAHINA & SHIBATA, 1954).

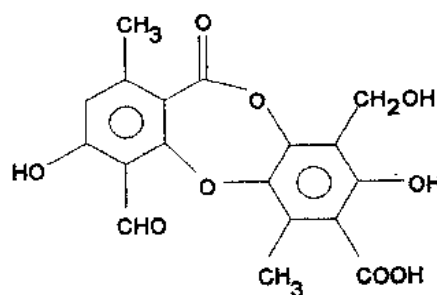


Fig. 05. Fórmula estrutural do ácido protocetrárico, precursor do ácido fumarprotocetrárico.

1.4 Tripanossomíase americana

A tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas ou mal de Chagas, foi descoberta pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas, no período em que este liderava a campanha em prol da erradicação da malária na cidade de Lassance na região norte de Minas Gerais. Neste ínterim, foi informado da existência de insetos hematófagos encontrados comumente nas residências locais. Estes apresentavam hábitos noturnos e eram conhecidos como barbeiros por picarem preferencialmente a face dos humanos. Predominavam nas habitações pobres rurais, protegendo-se durante o dia nas frestas das paredes e nas cobertas de palhas. Ao estudar o tubo digestivo deste inseto, Carlos Chagas detectou a presença de um hemoflagelado que, em homenagem ao Dr. Oswaldo Cruz, denominou *Trypanosoma cruzi* (BRENER, 2000; REY, 2001).

Face aos hábitos alimentares do inseto, Chagas sugeriu a possibilidade de se tratar de formas evolutivas de um parasito de vertebrados superiores, quiçá do próprio homem, levando-o a suspeitar que este seria o responsável em originar uma certa forma de doença freqüente na região, que acometia principalmente crianças, e que se manifestava por febre, edema e distúrbios cardíacos. Em 1909, conseguiu detectar o flagelado no sangue de uma

criança febril, ratificando assim suas suspeitas. O trabalho de Chagas é ímpar na história da ciência, destacando-se por ter sido o único pesquisador a conseguir descrever o ciclo completo de uma doença; abrangendo o agente etiológico, a clínica, a patologia, a epidemiologia, bem como aos vetores e reservatórios (TEIXEIRA, 1987; BRENER, 2000).

1.4.1 *Trypanosoma cruzi*

1.4.1.1 Morfologia - Organização e Ultra-estrutura

A morfologia do *Trypanosoma cruzi*, bem como de outros tripanossomatídeos, é baseada principalmente na observação de espécimes fixados em Bouin ou metanol e corados pelo Giemsa. Nessa preparação observa-se nitidamente o núcleo, o cinetoplasto e o flagelo. Com base na forma geral da célula (esférica, piriforme ou alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral ou posterior) e na maneira de saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral), definem-se para os tripanossomatídeos as seguintes formas evolutivas: amastigota, promastigota, epimastigota, tripomastigota, opistomastigota, esferomastigota e coanomastigota. Dessas formas descritas, a espécie *T. cruzi* apresenta em seu ciclo biológico as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Fig. 06) (BRENER, 2000; REY, 2001).

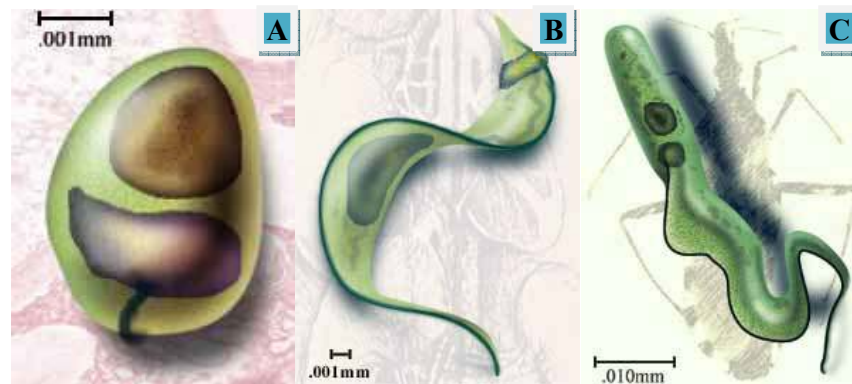


Fig. 06. Formas evolutivas do protozoário *T. cruzi*. As ilustrações **A**, **B** e **C**, representam respectivamente as células: amastigota, tripomastigota e epimastigota. Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html> (Acesso em: 27.05.2008).

As características morfológicas e a organização das organelas modificam-se de acordo com a fase evolutiva em que se encontram, com o hospedeiro que estejam a parasitar e com as condições do meio (HOARE & WALLACE, 1966).

Os tripanossomos possuem, a exemplo de outros eucariotos, organelas típicas como núcleo, membrana plasmática, sistema retículo endoplasmático liso e granular, lisossomos, ribossomo, poliribossomos, perioxissomos e etc (**Fig. 07**). Existem, entretanto, aspectos peculiares como um sistema de Golgi único, formado por quatro a seis cisternas empilhadas, outras características estruturais singulares são: **Cinetoplasto**. Corresponde a uma condensação de DNA mitocondrial e, usualmente é representado por kDNA. Nos *T. cruzi*, o cinetoplasto possui o aspecto de um disco nas formas amastigota e epimastigota, nas formas tripomastigotas, ele apresenta-se dilatado e globoso (BRENER, 2000; REY, 2001). **Glicossomos**. São organelas exclusivas dos tripanossomatídeos, medem aproximadamente 0,3µm e apresentam-se em torno de 200 a 300 unidades por célula, constituindo um total de 4% do volume do parasita. Esta organela é responsável pela glicólise deste organismo (BOOTHROYD, 1990). Citóstoma e Reservossomo. Uma estrutura que aparece como uma depressão na superfície celular do parasita, delimitado por unidade de membrana, encontrando-se recoberto por microtúbulos subpeliculares; é encontrado apenas em epimastigotas e amastigotas. Pequenas vesículas originadas no citóstoma fundem-se com os reservossomos sendo estes considerados sítio de estocagem de ingestão de macromoléculas que podem ser usadas no processo de transformação de epimastigotas em formas tripomastigotas. Estas grandes organelas (reservossomos), localizadas na porção posterior dos epimastigotas, ausentes nos amastigotas e tripomastigotas, apresentam uma matriz eletrodensa com inclusões lipídicas eletroluscentes (MILDER *et al.*, 1969; FIGUEIREDO *et al.*, 1994; DE SOUZA, 1999).

1.4.1.2 Sistemática

A sistemática tem sido baseada fundamentalmente na morfologia, mas outros critérios, como o ciclo evolutivo, os hospedeiros, origem geográfica, virulência, patogenicidade e epidemiologia, também são utilizados. A maioria das espécies gravita em torno de dois grandes gêneros: *Leptomonas* e *Trypanosoma*, mas, devido a fatores clínicos e econômicos os mais estudados são *Leishmania* e *Trypanosoma* (BRENER 2000; REY, 2001).

Com base no comportamento do parasita nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos: **Stercoraria** que inclui tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectivas pelas fezes, como ocorrem nas espécies *T. cruzi* e *T. lewisi*. O segundo, chamado de **Salivaria**, inclui tripanosomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e posteriormente, atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares, onde alojam-se as formas infectivas que são inoculadas mecanicamente. Nesse grupo estão as espécies *T. brucei*, *T. congolense* e o *T. rangeli* (BRENER *et al.*, 2000; REY, 2001).

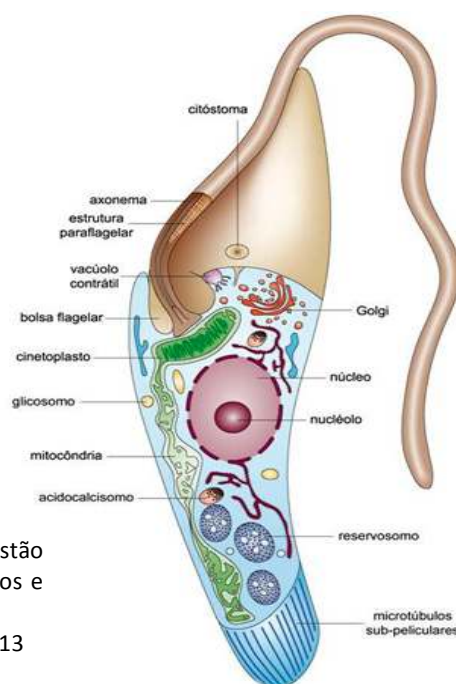


Fig. 07. Ilustração da forma epimastigota do *T. cruzi*, onde estão esquematizadas estruturas celulares comuns a outros eucariotos e estruturas peculiares a este parasita. Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13> (Acesso em: 16.01.2008).

1.4.1.3 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado

As formas tripomastigotas metacíclicas constitui o agente infectante para o vertebrado. Uma vez alojado no organismo, infectam células do sistema imunológico principalmente macrófagos mononuclear, no interior desta célula, há formação de um vacúolo fagocitário onde são seqüestrados os parasitas. Os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas (**Fig. 08**, etapa 3) e acredita-se que estes secretam uma lisina ativa em pH 5,5 que está envolvida no processo de escape do parasita do vacúolo parasitóforo, 1-2h após a invasão. Só após estarem no citosol é que iniciam sua multiplicação, ocorrendo possivelmente

após duas horas de infecção (ANDREWS & WINTLON, 1989; TANOWITZ, 1992; BURLEIGH, 1995).

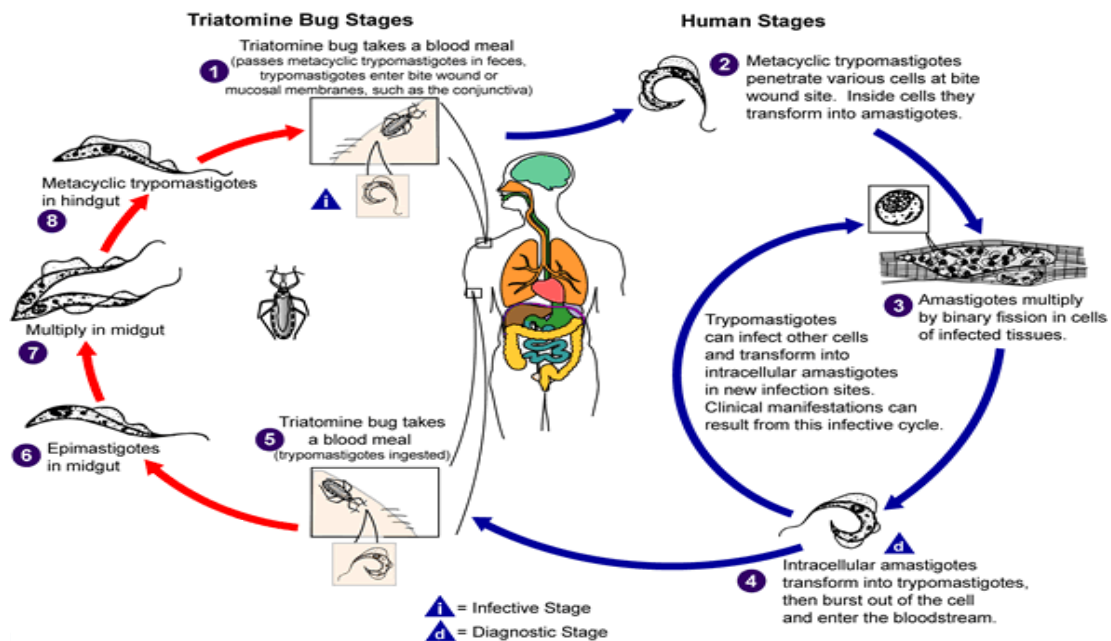


Fig 08. Ilustração do ciclo biológico de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado, onde os números 1-8 identificam as várias etapas evolutivas do parasito. Fonte: (<http://www.cbu.edu/~seisen/ParasitesOnParade.htm>). Acesso em 22.09.2008.

As células amastigotas após um período de latência multiplicam-se ativamente por divisão binária. E posteriormente evoluem novamente para a forma **trypomastigota** (Fig. 08, etapa 4), diferentemente da **trypomastigota metacíclica**. A célula hospedeira devido à sobrecarga parasitária rompe e, os trypomastigotas livres na corrente sanguínea, infectam células de diferentes órgãos ou tecidos, acarretando patologias (PEREIRA, 1990; BRENER *et al.*, 1997).

1.4.2 Infectividade, Patologia e Terapêutica

1.4.2.1 Infectividade

As formas infectantes contidas nas fezes dos insetos penetram facilmente através das mucosas, conjuntivas ou de qualquer solução de continuidade da pele. Não atravessam a pele íntegra, mas o próprio local da picada do inseto pode constituir a porta de entrada, se contaminada com as dejeções que esses hemípteros costumam emitir enquanto se alimentam.

Feridas ou escoriações causadas por coçar, motivada pela resposta alérgica à saliva do triatomíneo são outros pontos favoráveis para invasão (REY, 2001; BRENER 2000).

A transmissão materno-infantil, por via transplacentária, já foi comprovada tanto no homem como em animais. O *Trypanosoma cruzi* deve atravessar o epitélio corial e parasitar o estroma das vilosidades da placenta, antes de alcançar a circulação fetal (BRENER 2000; REY, 2001).

Em zonas endêmicas, ou nos centros para onde afluem indivíduos parasitados, as transfusões de sangue constituem sério fator de risco, quando não se faz a seleção de doadores de sangue ou a esterilização das amostras pela violeta de genciana. Outros modos de transmissão possíveis, embora mais raros, ocorrem pelo leite materno e pelo coito. Este último processo foi comprovado experimentalmente, em animais (BRENER 2000; REY, 2001).

1.4.2.2 Patologia

1.4.2.2.1 Fase aguda

No início, a doença pode apresentar uma sintomatologia atenuada e com traços característicos típicos de outras enfermidades e tão fugaz que passa inteiramente despercebida. Na maioria das vezes, em áreas endêmicas, a fase aguda é oligossintomática, decorrendo com febre pouco característica e apresentando uma reduzida resposta celular a antígenos de *T. cruzi*. Nos demais casos, os sintomas manifestam-se geralmente em indivíduos jovens, sobretudo nos primeiros anos de vida (BRENER 2000; REY, 2001).

Correspondendo ao período em que os tripanossomos são facilmente encontrados no sangue, essa fase caracteriza-se clinicamente por febre, astenia¹¹, poliadenite¹², aumento do fígado e do baço, sinal de Romaña ou outro tipo de chagoma de inoculação (BRENER 2000; REY, 2001).

¹¹ Termo utilizado na medicina para designar perda ou diminuição da força física.

¹² Processo inflamatório que acomete múltiplos gânglios.

1.4.2.2 Fase Crônica

Em alguns casos ela segue imediatamente ao período agudo; em outros, instala-se depois de um intervalo assintomático de duração variável; podendo levar alguns anos. Também pode instalar-se sem que tenha havido um quadro agudo característico, como se observa freqüentemente nas áreas endêmicas (BRENER 2000; REY, 2001).

Tais casos assintomáticos são designados por alguns autores como **formas indeterminadas**, pois têm um prognóstico incerto: tanto podem evoluir para as formas crônicas típicas, como permanecer continuamente sem sintomas. A forma indeterminada é a mais freqüente entre os chagásicos crônicos, representando 50 a 70% dos casos, nas áreas endêmicas do Brasil estudadas nas décadas de 70 e 80 (BRENER 2000; REY, 2001).

Há pacientes com sintomatologia pobre e, por isso, difíceis de diagnosticar (formas oligossintomáticas). Esses casos são descobertos ocasionalmente, pelo achado de parasitos no sangue ou por reações sorológicas positivas, durante inquéritos sistemáticos. Três formas clínicas são muito importantes pela freqüência com que ocorrem e pela gravidade que podem apresentar, são elas: a **cardiopatía chagásica crônica**, **megaesôfago** e **megacólon** (BRENER 2000; REY, 2001).

1.4.2.3 Terapêutica

Vários compostos foram utilizados como possíveis medicamentos desde a descoberta do mal de Chagas como: arsenicais, derivados de quinonas, amins, sulfas e antibióticos que se mostravam ativos entre outras infecções e doenças tropicais (DIAS, 1999). Cetoconazol (fungicida), gossipol (inibidor enzimático) e megazol (antibactericida e antiparasitário) e alopurinol (MONTAMAT *et al.*, 1982; McCABE *et al.*, 1984; FILARDI & BRENER, 1982; TANUS *et al.*, 1984). Entretanto, os únicos que revelaram alguma atuação foram nifurtimox¹³ (Lampit, Bayer) e o benznidazol¹⁴ (Rochagan, Roche), sendo os mais indicados no tratamento da tripanossomíase americana dentre os diversos compostos testados.

¹³Foster, R.; Pringle, G.; King, D.F.; Paris, J. The therapeutic activity of some nitrofurans in experimental filariasis and trypanosomiasis. **Ann Trop Med Parasitol**, 63:95-107, 1969.
Bock, M.; Gönner, R.; Haberkorn, A. Studies with Bay 2502 on animals. **Bol. Chil. Parasitol**, 24:24-47, 1969.

¹⁴Raaflaub, J.; Ziegler, W.H. **Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man.** Department of Research F. Hoffman-ha Roche & Co, Basileia, Suíça, 1976.

O primeiro, depois de amplamente usado no Brasil e em outros países latino-americanos, foi retirado do mercado farmacêutico. Tanto os testes de laboratório como os ensaios clínicos têm revelado que a eficiência dessas drogas varia com a linhagem do parasito. Por seus efeitos colaterais e necessidade de acompanhamento laboratorial, eles não podem ser utilizados nos tratamentos em larga escala, e, nos casos individuais, requerem consentimento esclarecido do paciente ou de seus responsáveis.

As pessoas tratadas com benznidazol tiveram xenodiagnóstico negativo durante a sua administração (efeito supressivo) e retorno à positividade após o tratamento, na maioria dos casos. Em alguns casos o benznidazol apresenta uma taxa de cura de 50 a 70% sendo administrado num período de 60 dias (WHO, 1990). A droga é ativa em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*, age inibindo a síntese protéica e do RNA (CANÇADO, 1985). Algumas manifestações de intolerância à droga são: polineuropatia periférica, de intensidade variável, em quase todos os pacientes adultos, depois da quarta semana, quando a dose diária excedeu 8,0 mg por quilograma; erupções cutâneas do tipo eritema polimorfo não-bolhoso, ora discreto e benigno, ora generalizado e grave; distúrbios da hematopoeise, com granulocitopenia em alguns casos e agranulocitose em outros (REY, 2001).

Nos casos agudos, o benznidazol produz remissão rápida da febre (em 24 a 48 horas) e dos outros sintomas, ao mesmo tempo que ocorre redução na parasitemia. Em 10% dos casos, entretanto, mantém-se a parasitemia, sem que se saiba se a razão está em um déficit de absorção da droga ou na resistência de algumas linhagens de *T. cruzi* (REY, 2001).

1.4.3 Compostos propostos para o combate da doença de Chagas

Segundo o MSF¹⁵ e o DNDi¹⁶, o setor farmacêutico, como mencionado, não demonstra interesse quanto ao desenvolvimento de drogas para a tripanossomíase americana, doença considerada extremamente negligenciada. Como exemplo, das 1393 drogas desenvolvidas entre 1975 e 1999, menos de 1,1% foram destinadas para doenças tropicais e tuberculose.

¹⁵ Médicos sem Fronteiras (<http://www.msf.org.br/mhome.asp>).

¹⁶ Doenças Negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases initiative) (<http://www.dndi.org.br>).

O desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária geralmente é determinada por três vias: (1) pelo uso de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, (2) pelo uso de drogas já existentes e empregadas no tratamento de outras doenças e, (3) atacando alvos específicos e típicos do metabolismo do parasito. Pesquisas recentes apontam esses alvos em *T. cruzi*, como o metabolismo de esteróis (ergosterol), o DNA e diferentes enzimas.

Dezenas de drogas foram testadas contra o *T. cruzi* em infecções experimentais *in vitro* e *in vivo*. A triagem desses compostos revelou que a maioria deles suprime a parasitemia, reduz a mortalidade e diminui o período de infecção. Desses muitos são inviáveis como quimioterápicos, principalmente pela toxicidade. Pesquisas que visam a identificação de novos compostos continuam sendo realizados (RASSI *et al.*, 2000).

URBINA *et al.* (1996) demonstraram que o DO870, um derivado azólico de quarta geração, foi capaz de induzir cura parasitológica em 70 a 100% dos camundongos tratados durante a fase crônica da infecção. Compostos de origem natural de diversas classes, como quinonas, flavonóides, terpenos, etc., foram avaliadas e propostas no desenvolvimentos de fármacos tripanocidas.

2. REFERÊNCIAS

- ABRAHAN, E. P.; FLOREY, H. W. (1949). Antimicrobial substances from lichens and algae. **Antibiotic**, v. 1, n. 13, p. 566-577.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER, F. L. (1993). The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology**, v. 7, p. 55-70.
- ANDREWS, N. W.; WINTLOW, M. B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. New York. **Mol. Bioch. Parasitol.** 33: 249-256.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. (1954). **Chemistry of Lichen Substances**. Ueno, Tokyo, Japan. p. 117.
- ASTA, J.; ORRY, F.; TOUTAIN, F.; SOUCHIER, B.; VILLEMIN, G. (2001). Micromorphological and ultrastructural investigations of the lichen–soil interface. **Soil Biol. Biochem.** 33:323–338.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. (2000). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 431p.
- BRENER Z., GAZZINELLI, R. T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p.103-110.
- BOOTHROYD, J. C. (1990). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: **Modern parasite by celular, immunological and molecular aspects** (WYLER, J. D. Ed.) New York, X. H. Freeman and Company. p. 64-67.
- BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W.; McVEIGH, I.; THORNTON, H. K. (1944). Antibiotic activity of lichens. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 30(9): 250-255.
- BURKHOLDER, P.R.; EVANS, A.W. (1945). Further studies on the antibiotic activity of lichens. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.72, n. 2, p. 157-164.

BURLEIGH, A. B.; ANDREWS, N. W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.** 49:175-200.

BUSTINZA, F. (1951). Contribución al estudio de las propiedades antibacterinas y antifúngicas del ácido úsnico y algunos de sus derivados. **Ann. Inst. Bot. A. J. Cavanilles** 10:157-175.

BUSTINZA, F.; CABALLERO, A. (1948). Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquens. **Ann. Inst. Bot. Madrid.** 7:511-548.

CANÇADO, J. R. (1985). Tratamento específico. In: RAMOS, J. R.; CHUSTER, M. **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas. p. 327.

CASTRO, S. L. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update on drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica.** 53: 83-98.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol.** 25:471-9.

CROFT, S. L. (1999). Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94:215-220.

CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. (2004). Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi in vitro*: an ultrastructural study. **MICRON**, Review Journal for Microscopy, v. 36, Issue 2, p. 155-161.

COLLINS, T. (2000) Inflamação Aguda e Crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 44-78.

CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. (1977). Second Supplement to Chemical and Botanical Guide of Lichens Products. **The American Bryological and Lichenological Society.** p. 400.

CURTIS, H. (1977). **Biologia**: Reino Fungi. Rio de Janeiro, RJ., Editora Guanabara Koogan: p. 286-290.

DE SOUZA, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 94:17-36.

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). **Doenças negligenciadas**. Disponível em: http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx. (Acesso em: 26.06.07).

ELIX, J. A. (1996). Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III, T. H. E. **Lichen Biology**. Cambridge, Cambridge University. p.154.

ESTANI, S. S.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in intermediate phase of Chagas' disease. **Amer. J. Trop. Med. Hyg**. 59:526-529.

FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; STEINDEL, M.; SOARES, M. J. (1994). The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during *in vitro* cultivation. **Parasitol Res**. 80:517-522.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. (1982). A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. Top. Med. Parasitol**. 76:239-297.

FLEIG, M.; AHTI, T.; STENROOS, S. (1995). A família Cladoniaceae (Líquens) no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. **Napaea**. 11:1-29.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS, A. A.; TORRES, O. S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M. E. (1997). Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116, p. 51-54.

GALUN, M.; SHOMER-ILAN, A. (1988). Secondary metabolic products. **CRC Handbook of Lichenology**, M. Galun. Boca Raton, Flórida, CRC Press. III: 3.

GARCIA-JUNCEDA, E.; GONZALEZ, A.; VICENTE, C. (1985). Phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*. Purification of the depsidone, physodic acid. **Phyton** (Buenos Aires). 45(2):153-158.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. (1969). **Organic Chemistry of Secondary Metabolism**; Freeman, San Francisco. p. 592.

GOLDNER, W. R.; HOFFMAN, F. M.; MEDVE, R. J. (1986). Allelopathic effects of *Cladonia cristatella* on ectomycorrhizal fungi common to bituminous strip-mine spoils. **Canadian Journal of Botany**. 64:1586-1590.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. (1990). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: Mac Millan, 1996. p. 248.

HALE-JR, M. E. (1983). **The biology of lichens**. 3th ed. Curator, Department of Botany, Smithsonian Institution. British: Edward Arnold Ltd, p. 1-49.

HAMMER, S. (2003). Notocladonia, a New Genus in the Cladoniaceae. **The Bryologist**, vol. 106, n.º 01 (Spring), p. 162-167.

HENNINGSSON, B.; LUNDSTROM, H. (1970). The influence of lichens, lichen extracts and usnic acid on wood-destroying fungi. **Mater. Org.** 5:19.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. (1993) Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. **Planta Med.** 59:195.

HIRABAYASHI, K.; IWATA, S.; ITO, M.; SHIGETA, S.; NARUI, T.; MORI, T.; SHIBATA, S. (1989). Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. **Chem Pharm Bull** (Tokyo) 37(9): 2410-2412.

HIRAYAMA, T.; FUJIKAWA, F.; KASAHARA, T.; OTSUKA, M.; NISHIDA, N.; MIZUNO, D. (1980). Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. **Yakugaku Zasshi**. 100(7):755-759.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**. 212:1385-1386.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. (1998). A Química dos Liquens. **Química Nova**, 21(6):111-116.

HUNECK, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**. 86(12):559-70.

IACOMINI, M.; REIS, R. A.; SASSAKI, G. L. (2006). Polissacarídeos de Fungos Liquezados. In: XAVIER-FILHO, L.; LEGAZ, M. E.; CORDOBA, C. V.; PEREIRA, E. C. **Biologia de Liqueus**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. p. 317-337.

INGOLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A.; SKULASON, V. G.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDOTTIR, M. (1998). Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p.141-144.

KAPPEN, L. (1973). Response to Extreme Environments. In: **The Lichens**. AHMADJIAN, V.; HALE M. E. (eds.). Academic Press. New York, p. 331.

KIRCHHOFF, L. V. (1999). Chagas' disease (American Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. In: SCHELD, W.M.; CRAIG, W. A.; HUGHES, J. M. (Eds). **Emerging Infections**, vol. 3. ASM Press, Washington, DC. p. 111-134.

KRISTMUNSDOTTIR, T.; ARADOTTIR, H. A. E.; INGOLFSDOTTIR, K.; ÖGMUNSDOTTIR, H. M. (2002). Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. **J Pharm Pharmacol**. 54:1447-1452.

KUPCHAN, S. M.; KOPPERMAN, H. L. (1975) 1-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Experientia**. 31:625-626.

LAND, C. J.; LUNDSTRÖM, H. (1998). Inhibition of Fungal Growth by Water Extracts from the Lichen *Nephroma Arcticum*. **The Lichenologist**, v.30, p. 259.

LAWREY, J. D. (1995). Lichen Allelopathy: A Review. In: DERJIT, K. T.; EINHELLIG, F. A.; DAKSHINI, F. A. Allelopathy - organisms, processes and applications. Washington, DC., **American Chemical Society**: 1-5.

LIMA, R. M. C.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C. P.; CAMPOS-TAKI, G. M. (1990). Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot.**, v. 63, n. 24, p. 339-348.

LINDBERG, B.; MISIORNY, A.; WACHTMEISTER, C. A. (1953). Studies on the chemistry of lichens. IV. Investigation of the low-molecular carbohydrate constituents of different lichens. **Acta Chem. Scand.** 7: 591.

LLANO, G. A. (1951). Economic uses of lichens. **Smithsonian Institution Publ.** 40:385-422.

MACFARLANE, J. D.; KERSHAW, K. A. (1984). Some aspects of carbohydrate metabolism in lichens. **Lichen Physiology and Cell Biology**. D. H. Brow. N. York, Plenum Press. p.1-8.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. (2001). **Cinco Reinos**. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 346-365.

MCCABE, R.E.; REMINGTON, J. S.; ARAÚJO, F. G. (1984). Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. **Science**. 201: 1018-1020.

MILDER, R.; DEANE, M. P. (1969). The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. Conorhini*. **J. Protozool.** 16(4):730-737.

MONTAMAT, E. E.; BURGOS, C.; BURGOS, N. M. G.; ROVAI, L. E.; BLANCO, A. (1982). Inhibition action of gossypol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. **Science**. 218: 288-289.

MOTA-FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C.; LIMA, E. S.; SILVA, N. H.; FIGUEIREDO, R. C. B. (2007). Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, v. 30, n.º 05, 1072-1076.

NAKANISHI, T. *et al.* (1998). Screening of anti-HIV-1 activity of North American plants. Anti-HIV-1 activities of plant extracts, and active components of *Lethalia vulpina* (L.) Hue. **Natural Medicines**. 52(6):521-526.

NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; OLIVEIRA, A. F. M.; SILVA, N. H.; BOITARD, M.; BERIEL, H. (1994). Screening de atividade citotóxica em extratos liquênicos: Cladoniaceae. **Acta Bot. Bras.**, v. 8, n. 1, p. 97-108.

NASH III, T. H. (1996). **Lichen Biology**. Cambridge USA, Cambridge University Press led, p. 303.

NEAMATI, N.; HONG, H.; MAZUMDER, A.; WANG, S.; SUNDER, S.; NICKLAUS, M.C.; MILNE, G.W.; PROKSA, B. *et al.* (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. **J Med Chem**. 40:942-951.

NISHIKAWA, Y. *et al.* (1974). Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. **Chem Pharm Bull** (Tokyo). 22(11): 2692-2702.

PATWARDHAN, P. C.; BAHDE, P. D. (1973). Contributions to the lichen flora of western india - II. **Botanique IV** (1): 13-17.

PEREIRA, M. E. A. (1990). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Modern parasite by celular, immunological and molecular aspects (WULER, J. D. Ed.). New York, X. H. Freeman and company. p. 64-67.

PEREIRA, E. C. (1998). **Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Pernambuco.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. M. C.; SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. (1994). Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. **Tokai J. of Exp. and Clin. Medicine**, v. 19 n.º 12, p. 47-52.

PROKSA, B.; ADAMCOVA, J.; STURDIKOVA, M.; FUSKA, J. (1994). Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potencial of proteolytic enzymes. **Pharmazine** 49(4): 282-283.

PROKSA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N.; LIPTAJ, T. (1996). (-) -Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**. 51:195-196.

RASSI, A.; AMATO, N. V.; GABRIEL, R. G.; FERRIOLLI, F. F.; AMATO, V.S. (2000). Tentativa de tratamento específico, por meio da ticlopidina, de pacientes com doença de Chagas em fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n.33, v.2, p. 225-226.

RAVEN. P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (2001). **Biologia Vegetal**. 6.^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 323-329.

REY, L. (2001). **Parasitologia**. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 3.^a ed., Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, p. 151-176.

RYCROFT, D. S.; CONNOLLY, J. D.; HUNECK, S.; HIMMELREICH, U. (1995). Revised structure of haemoventosin. **Z. Naturforsch.** 50(b):1557-1563.

SANTOS, N. P. (1996). **Estudo comparativo da ação antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra diferentes tumores sólidos experimentais**. 112 f. Dissertação (Curso de Mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

SIMONETTI, A. C.; SANTOS, N. P. S.; FERRAZ, M. S.; CRUZ, D. B.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; PONTES, N. T.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; TABOSA-EGITO, S. E. (2009). Antitumor activity and toxicity of fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules. **Internacional Journal Pharmaceutical**, (no prelo).

SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. (1968). Antitumor activities of lichen polysaccharides. **Zeit. Fur Krebs.**, v. 71, p. 102-104.

SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; IITAKA, Y.; SANKAWA, U. (1983). Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 4-O-methylcryptochlorophaeic acid; synthesis of monomeric arylcarboxylic acids for inhibitory activity testing and X-ray analysis of 4-O-methylcryptochlorophaeic acid. **Chem Pharm Bull.** 31:407.

SILVA, E. F.; CATANHO, M. T. J.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H. (1997). **Efeito analgésico de extratos brutos de *Cladina dendroides***. Resumos do Terceiro Encontro do Grupo Latino-Americano de Liquenólogos (GLAL-3). Campos do Jordão, SP. p. 36.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. A. C.; CARBONERO, E. R. GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. (2002). Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 691-698.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. (1979). Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **J. Med. Chem.** 22(11):1380-1384.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTENER, M. (1992). Chagas' Disease. **Clin. Microbiol.** vol: 400-419.

TANUS, R.; LAURIA-PIRES, L.; LOPES, E. R.; PRATA, A.; DIAS, R. M. (1984). Ação do alopurinol-ribose no tratamento de cães com infecção aguda experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Brasil. **Med. Trop.** 17 (Suplem.): 39.

TEIXEIRA, A. R. L. (1987). **Doenças de Chagas e outras doenças por tripanossomos**. Brasília, Universidade de Brasília. 161p.

TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. (2006). Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American Trypanosomiasis. **Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry.** 5:222-35.

THOMSON, J. W. (1968). The lichen genus *Cladonia* in North American. University of Toronto Press, Toronto. **Field-Naturalist.** 82:162-163.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. (1996). Cure of short and long term experimental Chagas disease using D0870. **Science**. v. 273, p. 969-971.

VICENTE, C. (1975). **Fisiología de las sustancias liquénicas**. Alhambra, Madrid. p. 162.

VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; PEREIRA, M. T.; PEREIRA, E. C.; PEDROSA, M. M. (1995). Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering. In: **Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann**. J. A. Daniels; M. Schulz; J. Peine (Eds.). The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, p. 97-110.

XAVIER, F. L.; RIZZINNI, C. T. (1976). **Manual de Liquenologia Brasileiro**, Recife, ed. UFPE, p. 431.

WHITE, F.; JAMES, P. (1985). A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. **Bull Br Lich Soc**. 57 (suppl.): 1-41.

World Health Organization (WHO). (2002). Chagas' disease: frequency and geographical distribution. **Weekly Epidemiological Records**. 65:257-261.

YILMAZ, M.; TÜRK, A. O.; TAY, T.; KIVANÇ, M. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. **Z Naturforsch [C]** 59(3-4): 249-254.

3. MANUSCRITO A SER PUBLICADO

Título:

EFEITOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. SOBRE CRESCIMENTO E ULTRAESTRUTURA DE *Trypanosoma cruzi*

Autores:

Alexandre R. Silva^a; Regina C.B.Q. Figueiredo^b; Eugênia C. G. Pereira^c; Nicácio H. da Silva^d

^aDepartamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil. ^bDepartamento de Microbiologia, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Recife-PE, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de

Pernambuco, Recife-PE, Brasil. ^dDepartamento de Bioquímica e Biofísica, Centro de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Revista:



Química Nova.

Indexação: Chemical Abstracts, ISI e SCIELO.

EFEITOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. SOBRE CRESCIMENTO E ULTRAESTRUTURA DE *Trypanosoma cruzi*.

Alexandre Rodrigues Silva

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50660-420 Recife – PE, Brasil.

Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo

Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, CP 7472, 50670-420 Recife – PE, Brasil.

Eugenia Cristina Gonçalves Pereira

Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, 50.740-530 Recife – PE, Brasil.

Nicácio Henrique da Silva

Departamento de Bioquímica e Biofísica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-907 Recife – PE, Brasil.

EFFECTS OF METABOLITES FROM *Cladonia verticillaris* (Raddi) FR. AND ON GROWTH AND ULTRASTRUCTURE OF *Trypanosoma cruzi*. In this framework this study have investigated the effect of, acetonic extract (ACE) from lichen *Cladonia verticillaris* and their main isolated fumaprotocetraric (FUM) acid and protocetraric (PRO) acid compounds on growth and ultrastructure of *T. cruzi in vitro*. The incubation of epimastigote with acetonic extract did not cause significant growth inhibition and wasn't able to achieve 50% of growth inhibition after 72 hours incubation. However, both FUM and PRO caused growth inhibition in dose dependent way with estimated IC_{50/72} hours of 250 and 125 µg/mL respectively. The incubation of relevant trypanomastigote forms with FUM and PRO showed that this forms is more susceptible to the drugs action than epimastigote forms. The ultrastructural analysis of both forms treated with PRO corroborate this idea. Our results suggested that PRO can be used as a potential drug against *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Cladonia verticillaris*, Chagas disease, lichen.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae, constitui um sério agravo para saúde pública (REY, 2001). A ocorrência de casos de tripanossomíase americana se dá desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile, com forte incidência no Brasil. Dezoito milhões de indivíduos se encontram infectados, com cinco milhões apenas no Brasil. Estimativas apontam ainda uma população de risco de mais de 100 milhões de pessoas (MONCAYO, 1993; WHO, 2002). A droga mais comumente usada para o tratamento desta

patologia é benznidazol a qual possui diversas limitações, visto que é altamente tóxica, possuindo eficácia limitada na fase crônica da doença, o que muitas vezes leva ao abandono do tratamento e ao aparecimento de cepas resistentes (DE CASTRO, 1993; KIRCHHOFF, 1999; REY 2001). Soma-se a isso, a falta de interesse das indústrias farmacêuticas, tendo em vista que a grande maioria dos infectados são pessoas pobres pertencentes às classes menos favorecidas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Diante deste panorama, a procura por novos compostos sintéticos ou naturais menos tóxicos, mais acessíveis às populações afetadas e, que sejam efetivos em todas as fases da doença, ainda se faz necessária (KIRCHHOFF, 1999; CANÇADO, 2000; BRENER, 2000).

Os líquens são organismos complexos formados pela associação de fungos (micobionte) e algas ou cianobactérias (fitobiontes). Os líquens e seus metabólitos secundários têm sido utilizados por humanos através dos séculos para vários propósitos, em particular no preparo de tintas, perfumes, bem como na medicina popular. (HUNECK, 2001). Estudos bioquímicos permitiram o isolamento de muitas substâncias liquênicas novas, e cerca de 800 já foram bem caracterizadas (HUNECK, 2001; MULLER, 2001). Destas substâncias, as quais compreendem compostos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos e terpenicos, várias tem demonstrado atividade farmacológica entre as quais se destacam a atividade antineoplásica, mucolítica, analgésica e antipirética (NISHIKAWA *et al.* 1974; TAKAI *et al.*, 1979; HIRABAYASHI *et al.*, 1989). Estudos prévios demonstraram que ácido úsnico, aplicado intralesionalmente, em camundongos BALB/c infectados com formas promastigotas de *Leishmania*, reduziu significativamente as lesões cutâneas (FOURNET *et al.*, 1997). Por outro lado, foi demonstrado que esta mesma substância foi efetiva contra todas formas evolutivas de *T. cruzi in vitro* (CARVALHO, *et al.*, 2004). Estes dados encorajam avaliar o potencial tripanocida do extrato acetônico (ACE) e dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) de *Cladonia verticillaris* contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração do material liquênico. Talos liquênicos de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (100g), coletada no município de Saloá, PE foram mantidos à temperatura ambiente (28

$\pm 3^{\circ}\text{C}$) até a realização dos ensaios. Para extração das substâncias liquênicas foram utilizados solventes orgânicos em seqüência eluotrópica (éter etílico, clorofórmio e acetona). As amostras foram conduzidas ao agitador mecânico por 1(uma) hora e posteriormente armazenadas à temperatura de 15°C , por 48 horas, sendo em seguida filtradas e evaporadas em rotavapor até a secura, o resíduo obtido foi acondicionado no dessecador até atingir peso constante.

Identificação e isolamento dos compostos liquênicos. Com o objetivo de detectar os compostos liquênicos e verificar o grau de pureza das substâncias isoladas, foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD). As amostras e os seus respectivos padrões (PRO e FUM) foram diluídos em concentrações de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, aplicados nas cromatoplas de sílica Gel Merck F₂₅₄₊₃₆₆ e submetidas em sistema unidirecional de solventes B (hexano:éter dietílico:ácido fórmico, 130:80:20, v/v), de acordo com a metodologia de CULBERSON (1972). Ao final da adsorção, os solventes foram evaporados e as placas posteriormente reveladas sob a luz UV curta (256 nm) e longa (366 nm). Após este procedimento as cromatoplas foram borrifadas com o ácido sulfúrico a 10% e aquecidas a 100°C para reação de coloração de bandas. Os resultados foram avaliados mediante cálculo de R_f, coloração das bandas e comparação com os padrões utilizados. Os ácidos FUM e PRO isolados do ACE, foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo a metodologia de LEGAZ & VICENTE (1983). As amostras foram analisadas no cromatógrafo Hitachi, acoplado ao detector de luz UV a 254 nm, sendo a fase móvel constituída por: metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v), sob um fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, atenuação 0,04 e temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em coluna modelo Nucleosil 10 de fase reversa C₁₈. Foram utilizados os mesmos padrões da CCD.

Parasitas. Formas epimastigotas de *T. cruzi* (clone DM28C) foram mantidas a 28°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques a cada sete dias. Para os experimentos foram utilizadas parasitas na fase exponencial de crescimento. Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas através de punção cardíaca de camundongos albinos Swiss infectados e em pico da parasitemia de sete dias. O pool de amostras de sangue infectado foi centrifugado por 15 minutos a 3000g. O sobrenadante contendo os parasitas foi mantido a 37°C e, posteriormente centrifugado por 10 min a 3000g para eliminar as plaquetas. Os parasitas isolados foram

transferidos para meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. Os ensaios envolvendo camundongos foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética da FIOCRUZ (CEUA L-001/08) e estão de acordo com a legislação vigente que regulamenta o uso de animais experimentais.

Bioensaios. Aliquotas contendo formas epimastigotas ($5,0 \times 10^6$ células·mL⁻¹) foram coletadas na fase exponencial de crescimento e incubadas em meio LIT contendo 10% de SFB na presença ou ausência do ACE e dos seus compostos majoritários o FUM e PRO nas concentrações de 75, 150 e 300 µg·mL⁻¹. O crescimento da cultura foi acompanhado a cada 24 horas de cultivos através de contagem direta em câmara de Neubauer, em um período de 72 horas. A IC₅₀ (concentração da droga atuante em 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear, usando o software SPSS® 11.0 para Windows®. Formas tripomastigotas sanguíneas ($3,0 \times 10^5$ células·mL⁻¹) foram mantidas em RPMI a 37°C e incubadas por 24 horas na presença e ausência de ACE, FUM e PRO e, diluídas nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de formas epimastigotas. As IL₅₀ (concentração necessária para lisar 50% das formas tripomastigotas) foram calculadas utilizando o mesmo procedimento adotado nas IC₅₀ de epimastigotas. Todos os bioensaios foram realizados em três experimentos independentes e em triplicata.

Microscopia eletrônica de transmissão. Células epimastigotas de *T. cruzi* controle e tratadas foram incubadas na presença e ausência de FUM e PRO nas concentrações correspondentes a IC₅₀ e 2 x IC₅₀/72 horas. Após a incubação, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2), sendo em seguida fixadas em solução contendo 2.5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 2 horas à temperatura de 25°C (±1). Posteriormente as células foram lavadas e pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio diluídos em tampão cacodilato 0,1M. Após a pós-fixação as células foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de acetona e, incluídas em resina Polybed¹⁷ 812 (KELLEY, 1974). Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo LKB e, coletados em grades de níquel, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e, observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 a 80 kV.

¹⁷ Polysciences, Warrington, PA, USA.

RESULTADOS

Através dos padrões utilizados, a cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a ausência dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) nos extratos etéreo e clorofórmico e, a presença desses no extrato acetônico. Esses ácidos foram evidenciados pelas bandas com Rf de 0,26 e Rf de 0,33 e, segundo os padrões utilizados, correspondem respectivamente aos ácidos PRO e FUM. Com a cromatografia de alta eficiência (CLAE) foi possível quantificar os compostos existentes no extrato acetônico (ACE) de *C. verticillaris*. Nesse extrato a substância de maior concentração apresentou tempo de retenção de RT = 4,13, compatível ao padrão do ácido fumarprotocetrárico de RT = 4,16. Outro pico revelado, em menor escala, no ACE apresentou RT = 3,17 e, corresponde ao mesmo valor do padrão ácido protocetrárico com RF (Fig. 02).

Bioensaios. Tratamento de formas epimastigotas com diferentes concentrações do ACE, FUM e PRO de *C. verticillaris* resultaram em inibição de crescimento das células de forma dose e tempo dependente. O grau de inibição variou significativamente entre as IC₅₀/72h dos ácidos FUM e PRO, que foram de 255 µg·mL⁻¹ e 125 µg·mL⁻¹ respectivamente. O extrato acetônico não alcançou a IC₅₀ neste mesmo período, atingindo o valor máximo de inibição em 72 horas de aproximadamente 40%. Nesta forma parasitária, o ACE e seus compostos isolados (FUM e PRO) não foram capazes de inibir 100% do crescimento nas concentrações e intervalos de tempo determinados. As formas tripomastigotas sanguíneas, tratadas com o ACE, FUM e PRO, mostraram curvas de lise semelhantes às curvas de inibição em epimastigotas, aquelas entretanto, revelaram maior susceptibilidade à ação dos metabólitos secundários de *C. verticillaris*. As IL₅₀/24h encontradas foram de 125 µg·mL⁻¹ e 210 µg·mL⁻¹ para o PRO e FUM, respectivamente. A incubação dos parasitas com 300 µg·mL⁻¹ de PRO foi capaz de causar 100% de lise após 24 horas de incubação (Fig. 03).

O PRO foi o composto mais atuante, tanto para formas epimastigotas quanto tripomastigotas de *T. cruzi*, seguido pelo FUM e ACE. Formas epimastigotas não tratadas (Fig. 4a) apresentam morfologia típica com a presença de um núcleo central e cinetoplasto em forma de bastão, localizado na região da bolsa flagelar. Perfis de mitocôndria podem ser visualizados próximos a membrana plasmática. Os reservossomos, que correspondem a compartimentos da via endocítica em formas epimastigotas, se localizam em sua região

posterior e apresentam forma característica, contendo matriz homogênea onde inúmeras inclusões lipídicas podem ser encontradas. O complexo de Golgi, único, pode ser encontrado nas proximidades do cinetoplasto e da bolsa flagelar (*inset*). O citoplasma possui aspecto homogêneo e granular. Poucas células em processo de divisão foram encontradas nos controles após 72 horas de cultivo. A incubação destas formas nas concentrações correspondentes a IC_{50} (**Fig. 4b**) e $2 \times IC_{50}$ (**Fig. 4c-d**) de PRO, causaram alterações na forma dos reservosomos e o aparecimento de vacúolos citoplasmáticos, alguns contendo material granular no seu interior (**Fig. 4b-4c**). Um achado interessante foi a presença de várias células em processo de divisão incompleto e apresentando vários flagelos, sugerindo a ausência de citocinese. Em algumas destas células era possível observar desorganização parcial do complexo de Golgi e deslocamento de organelas (**Fig. 4d**).

Formas tripomastigotas controle apresentam corpo alongado, núcleo ovalado a redondado e, citoplasma contendo inclusões lipídicas dispersas. O cinetoplasto em forma de cesta se localiza posteriormente ao núcleo (**Fig. 5a-5b**). O tratamento de PRO na concentração correspondente a sua IC_{50} mostrou alterações morfológicas mais relevantes em tripomastigotas dos que as apresentadas nas formas epimastigotas (**Fig. 4b**), tais como perda de material citoplasmático e retração da membrana nuclear. Sinais indicativos de autofagia, como o envolvimento de organelas em processo de fragmentação por perfis de retículo endoplasmático, foram comumente observados nessas células tratadas.

DISCUSSÃO

Cladonia verticillaris, líquen abundantemente encontrado em tabuleiros arenosos da Paraíba e Pernambuco (AHTI *et al.*, 1993), revelou através de ensaio químico em CCD, a presença dos ácidos FUM e PRO no extrato acetônico (ACE) e a ausência desses nos extratos etéreo e clorofórmico. A CLAE, entretanto, demonstrou a presença desses ácidos, também, nos extrato etéreo e clorofórmico, porém, em quantidades muito inferiores ao encontrado no ACE. Sabe-se que diferentes solventes, podem extrair iguais ou diferentes substâncias líquênicas e, em quantidades variáveis (HALE-JR, 1983; VICENTE *et al.*, 1995).

YILMAZ *et al.* (2004) confirmaram esse fato ao observarem que, solventes de média polaridade, tais como acetona e éter etílico foram satisfatórios para a extração de substâncias de *Cladonia foliacea*, mas solventes com alta polaridade, como o etanol, e com baixa polaridade, como o éter de petróleo, foram ineficientes na extração dos metabólitos dessa espécie. Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo aos obtidos previamente por PEREIRA (1998). Além do mais, no presente estudo foi identificado uma banda com Rf de 0,43 que pode corresponder ao ácido hipoprotocetrárico ou mais possivelmente ao seu aldeído (PEREIRA, 1998). A atranorina, um *para*-depsídeo da série do β -orcinol, sintetizada pela *C. verticillaris* é um dos compostos secundários, também, ocorrente nesta espécie, não é identificado nas cromatografias. Segundo PEREIRA (1989) e SANTOS *et al.* (1997), isso se deve pela influência sazonal, visto que o metabolismo liquênico pode variar de acordo com as características macroclimáticas e do microclima do momento, acarretando variações no teor de produtos bioativos no talo liquênico.

O extrato acetônico (ACE) e seus compostos isolados FUM e PRO provenientes de *C. verticillaris*, mostraram atividade contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo esta última a mais susceptível a ação dessas substâncias. Os maiores efeitos observados nos bioensaios foram ocasionado pelo PRO, seguido pelo FUM e ACE. A pouca eficácia encontrada demonstrada pelo ACE pode está relacionada a baixa concentração dos metabólitos secundários, especialmente de PRO. Os metabólitos liquênicos (secundários), geralmente variam entre 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo liquênico, embora possam apresentar concentrações maiores (HALE-JR, 1983). Estudos indicam que esta variação nos teores de compostos biologicamente ativos em espécies de Cladoniaceae, está diretamente relacionada a fatores sazonais (LEGAZ *et al.*, 1987; PEREIRA, 1989; SANTOS *et al.*, 1997).

O FUM e seu precursor, o PRO, pertencem ao grupo das depsidonas, os quais são formados por duas unidades, uma de ácido fenilcarboxílico e outra por β -orselínico, essas unidades são mantidas juntas através de ligações do tipo éster (HUNECK, 1978). Tanto depsídeos quando depsidonas isolados de líquens tem demonstrado atividade biológica, tais como: antimicrobiana (FALCÃO *et al.*, 2002), antifúngica (YAMAMOTO *et al.*, 1993), antiinflamatória (MAIA *et al.*, 2002); antitumoral-mutagênica, antiviral e imunomoduladora (TAKAI *et al.*, 1979; HIRAYAMA *et al.*, 1980; SHIBAMOTO *et al.*, 1984; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; KRISTMUNDSÓTTIR *et al.*, 2002), inibidora do vírus de

imunodeficiência humana (VIH) (HIRABAYASHI *et al.*, 1989; NEAMATI *et al.*, 1997; NAKANISHI *et al.*, 1998). Todavia, até o presente momento, o potencial sobre protozoários como o *T. cruzi* ainda não foi avaliado, sobretudo com o ácido protocetrárico (TAYA, 2004). Estudos prévios demonstraram a ação citostática do ácido FUM em células cancerígenas (LIMA *et al.*, 1990, SIMONETTI *et al.*, 2009) o que reforça a idéia de que este ácido atua como inibidor da divisão celular. Neste estudo demonstra-se que a incubação de formas epimastigotas na presença de FUM e PRO causa inibição do crescimento dos parasitas. A existência de um considerável número de células em processo de divisão após 72 horas de cultivo na presença de PRO e, a falta de evidências de alterações morfológicas significativas através da microscopia eletrônica de transmissão, corrobora a idéia de que estes compostos possam ter um efeito mais citostático do que citotóxico.

Formas tripomastigotas, não se dividem e diferem substancialmente em relação às formas epimastigotas tanto bioquímica quanto morfológicamente (DE SOUZA, 1999). Os resultados demonstraram que o tratamento de formas tripomastigotas sanguíneas com PRO, causou alterações morfológicas mais drásticas com evidências sugestivas de autofagia, corroborando os dados da IL_{50} obtida para esta forma nos bioensaios. E, embora estudos futuros sejam necessários para analisar o efeito destas substâncias sobre formas amastigotas intracelulares, bem como elucidar o modo de ação destes compostos, os dados sugerem fortemente o PRO como agente potencial contra *Trypanosoma cruzi*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (E. C. Pereira) e de mestrado. Ao CPqAM pela infra-estrutura e recurso disponibilizados nas análises microbiológicas.

REFERÊNCIAS

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER, F, L. (1993). The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology**, v. 7, p. 55-70.

BRENER, Z., ANDRADE, Z., BARRAL-NETTO, M. (2000). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 431.

CAMARGO, E. M. (1964). Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 6, 93-110.

CANÇADO, J.R. (2000). Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazol. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral-Neto, M. (Eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2.^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 389-405.

CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. (2004). Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi in vitro*: an ultrastructural study. **MICRON**, Review Journal for Microscopy. v. 36, Issue 2, p. 155-161.

CULBERSON, C. F. (1972). Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. **J. Chromatog.** 72:113-125.

DE CASTRO, S. L. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.** 53:83-98.

DE SOUZA, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 94:17-36.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; GUSMÃO, N.B.; Ribeiro, S. M. (2002). Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmaceutica Bonarense.** 21(1):43-49.

FOURNET, A. *et al.* (1997). Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116, p. 51.

HALE-JR, M. E. (1983). **The biology of lichens**. 3.th ed. Curator, Department of Botany, Smithsonian Institution. British: Edward Arnold Ltd, p. 1-49.

HIRABAYASHI, K.; IWATA, S.; ITO, M.; SHIGETA, S.; NARUI, T.; MORI, T.; SHIBATA, S. (1989). Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. **Chem Pharm Bull** (Tokyo) 37(9): 2410-2412.

HIRAYAMA, T.; FUJIKAWA, F.; KASAHARA, T.; OTSUKA, M.; NISHIDA, N.; MIZUNO, D. (1980). Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. **Yakugaku Zasshi**. 100(7):755-759.

HUNECK, S.; HOEFLE, G. (1978). Struktur and C-NMR Spektroskopie von chlorhaltigen Flechtenxanthonen. **Tetrahedron**, 34:2491–2502.

HUNECK, S. (2001). New results on the chemistry of lichen substances. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.** 81:1-276.

KELLY, R. O., DEKKER, R. A. F.; BLUEMINK, J. G.; HAYAT, M. A. (1974). **Principle and technique of scanning electron microscope. Biological application**. vol. 4. ed. Van Nostra and Reinhold Company.

KIRCHHOFF, L. V. (1999). Chagas' disease (American Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. In: Scheld, WM, Craig, WA, Hughes JM (Eds), **Emerging Infections**. vol. 3. ASM Press, Washington, DC. p. 111-134.

KRISTMUNSDOTTIR, T.; ARADOTTIR, H. A. E.; INGOLFSDOTTIR, K.; ÖGMUNSDOTTIR, H. M. (2002). Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. **J Pharm Pharmacol**. 54:1447–1452.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. (1983). Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant physiology, Lancaster*, v. 71, n. 2, p. 300-3001.

LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; GALLO, M.; XAVIER-FILHO, L. (1987). Lichen phenols from *Cladonia dendroides* Thalli. *Lichen Physiology and Biochemistry*, v. 2, p. 13-21.

LIMA, R. M. C.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C. P.; CAMPOS-TAKI, G. M. (1990). Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. *Bol. Soc. Brot.*, v. 63, n. 24, p. 339-348.

MAIA, M. B. S.; SILVA, N. H.; SILVA, E. F.; CASTANHO, M. T.; SCHULER, A. R. P.; PEREIRA, E. C. (2002). Antinoceptive activity of extract and atranorin obtained from the lichen *Cladonia dendroides* (Abb) Athi. *Acta Farm. Boanaerense*, v. 21, n° 04, p. 259-264.

MONCAYO, A. (1993). **Program Report of the UNPD/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)**. World Health Organization, Geneva. p. 67-75.

MULLER, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:9-16.

NAKANISHI, T. *et al.* (1998). Screening of anti-HIV-1 activity of North American plants. Anti-HIV-1 activities of plant extracts, and active components of *Lethalia vulpina* (L.) Hue. *Natural Medicines*. 52(6):521-526.

NEAMATI, N.; HONG, H.; MAZUMDER, A.; WANG, S.; SUNDER, S.; NICKLAUS, M.C.; MILNE, G.W.; PROKSA, B. *et al.* (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem*. 40:942-951.

NISHIKAWA, Y. *et al.* (1974). Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia species*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 22(11): 2692-702.

SANTOS, N. P.; PEREIRA, E. C.; LIMA, R. M. C.; HONDA, N. K.; SILVA, M. P. C.; SILVA, N. H. (1997). Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (líquen). **Rev. U. A., Série Ciências Biológicas**, v.2, n.2.

SHIBAMOTO, T.; WEI, C.I. (1984). Mutagenicity of Lichen Constituents. **Environmental Mutagenesis**. 6:757-762.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; LEÃO, A. A. C.; CARBONERO, E. R. GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. (2002). Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 691-698.

PEREIRA, E. C. (1989). **Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de *Cladonia* e *Cladina* (líquen)**. 193 f. Dissertação. (Curso de Mestrado em Criptógamos). Departamento de Micologia, Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco.

PEREIRA, E. C. (1998). **Produção de metabólitos por espécies de *Cladoniaceae* (Líquén), a partir de imobilização celular**. Recife, 240p. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Pernambuco.

REY, L. (2001). **Parasitologia**. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 3.^a ed., Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, p. 151-176.

SIMONETTI, A. C.; SANTOS, N. P. S.; FERRAZ, M. S.; CRUZ, D. B.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; Honda, N. K.; PONTES, N. T.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; TABOSA-EGITO, S. E. (2009). Antitumor activity and toxicity of fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules. **Internacional Journal Pharmaceutical**. (no prelo), 2009.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. (1979). Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **J. Med. Chem.** 22(11):1380-1384.

TAYA, T.; TÜRKB, A. Ö.; YILMAZB, M.; TÜRKA, H.; KIVANC, M. (2004). Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Acetone Extract of the Lichen *Ramalina farinacea* and its

(+)-Usnic Acid, Norstictic Acid, and Protocetraric Acid Constituents. **Z. Naturforsch.** 59(c): 384-388.

VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; PEREIRA, M. T.; PEREIRA, E. C.; PEDROSA, M. M. (1995). Immobilization of lichen cells and enzymes for bioproduction of lichen metabolites: technical requirements and optimization of product recovering. In: **Flechten Follmann. contributions to lichenology in honour of Gerhard Follmann.** J. A. Daniels; M. Schulz; J. Peine (Eds.). The Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany, p. 97-110.

World Health Organization (WHO). (2002). Chagas' disease: frequency and geographical distribution. **Weekly Epidemiological Records.** 65:257-261.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; HIGUCHI, M.; KINOSHITA, Y.; YOSHIMURA, I. (1993). Using lichen tissue cultures in modern biology. **The Bryologist**, v. 96, n. 3, p. 384-393.

YILMAZ, A. M.; TÜRKA, A. Ö.; TURGAY, T.; KIVANC, M. (2004). The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents. **Z. Naturforsch.** 59(c), 249-254.

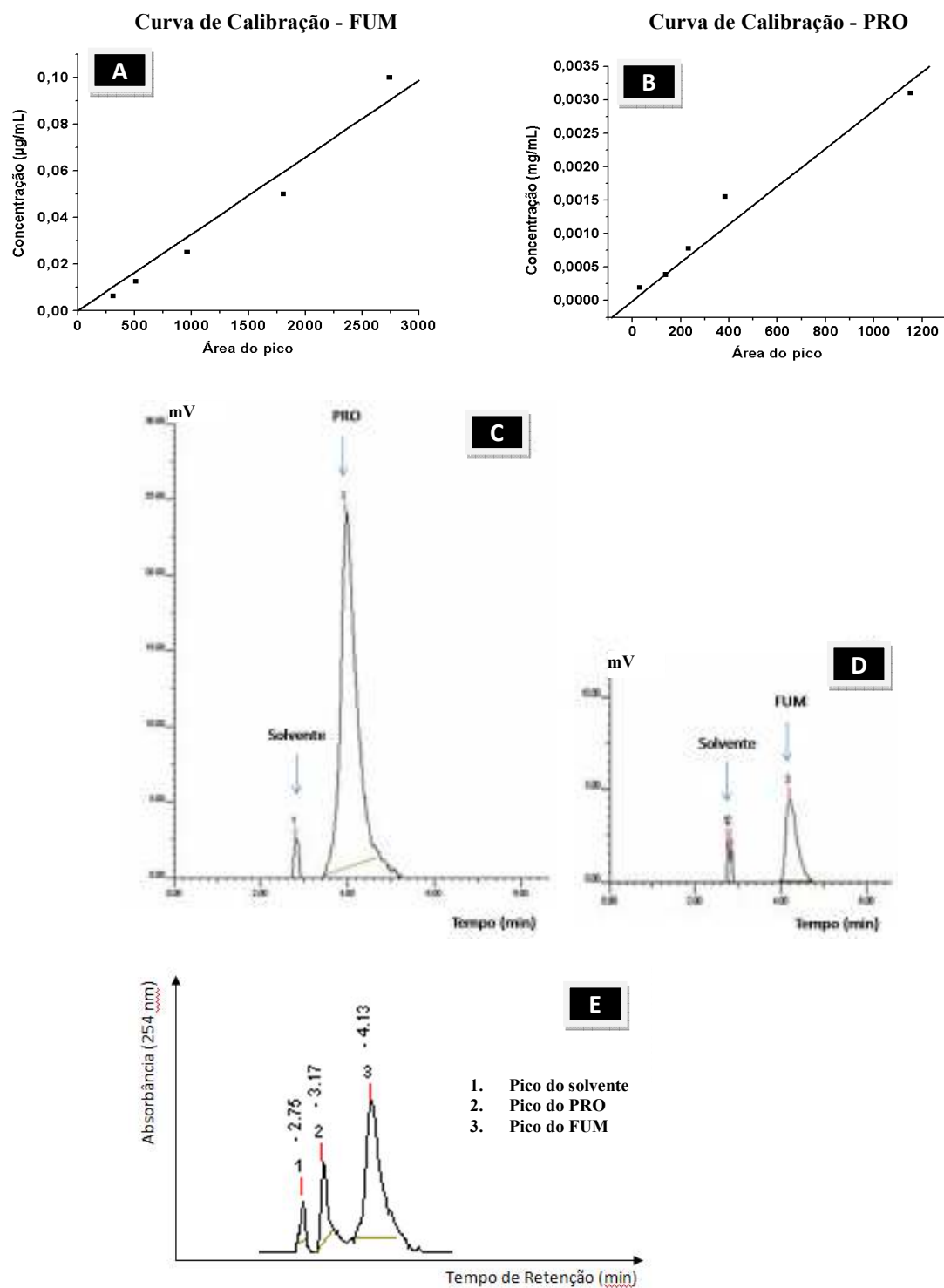


Fig. 02. “A” e “B”. Curvas de calibração dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) obtidas por CLAE. Calibração direta do FUM: $y = 26090x + 255,33$; $r^2 = 0,9766$ e do PRO: $y = 372578x - 60,256$; $r^2 = 0,9697$. “C” e “D”. Cromatogramas em CLAE dos metabólitos isolados de *C. verticillaris*, ácido protocetrárico (C) e fumarprotocetrárico (D). “E”. CLAE do extrato acetônico de *Cladonia verticillaris*. Destacando-se os picos 2 e 3 que correspondem aos ácidos protocetrárico e fumarprotocetrárico, respectivamente. O pico 1 refere-se ao solvente metanol.

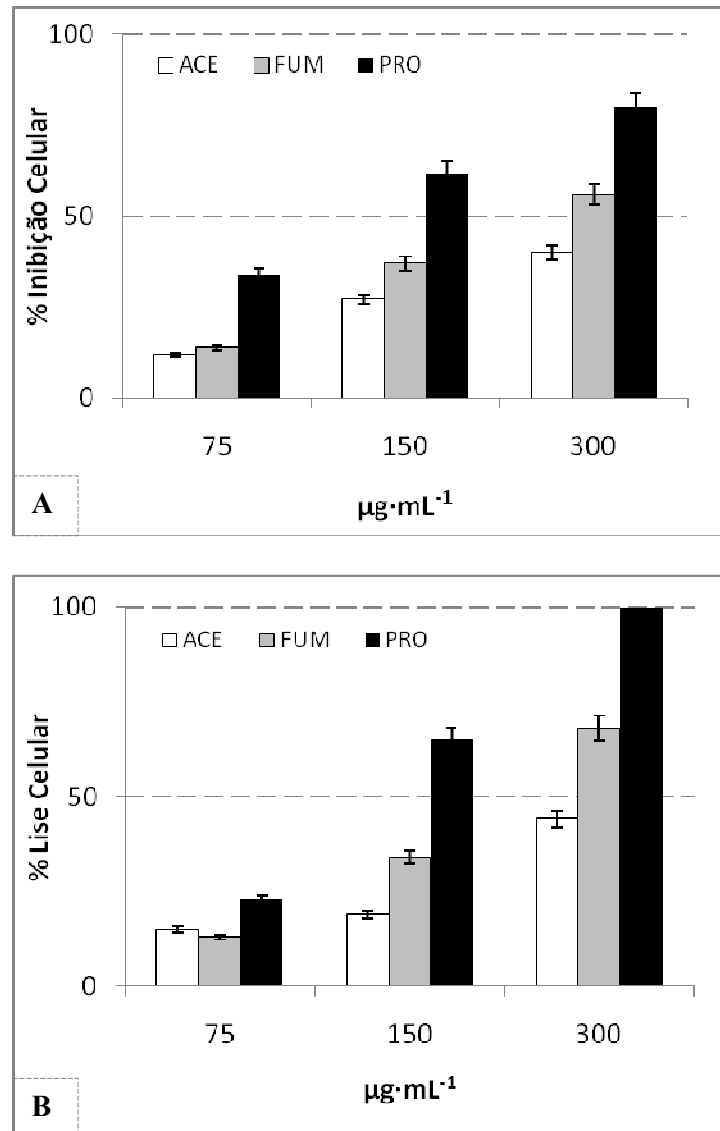


Fig. 03. Efeito de extrato acetônico (ACE) e de seus compostos isolados o ácido fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) sobre formas epimastigotas (A) e tripomastigotas (B) de formas de *T. cruzi*. Parasitas foram tratados com 75, 150 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das drogas, e a taxa de inibição de crescimento para as formas epimastigotas e de lise para as formas tripomastigotas foram determinadas. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes feitos em triplicata.

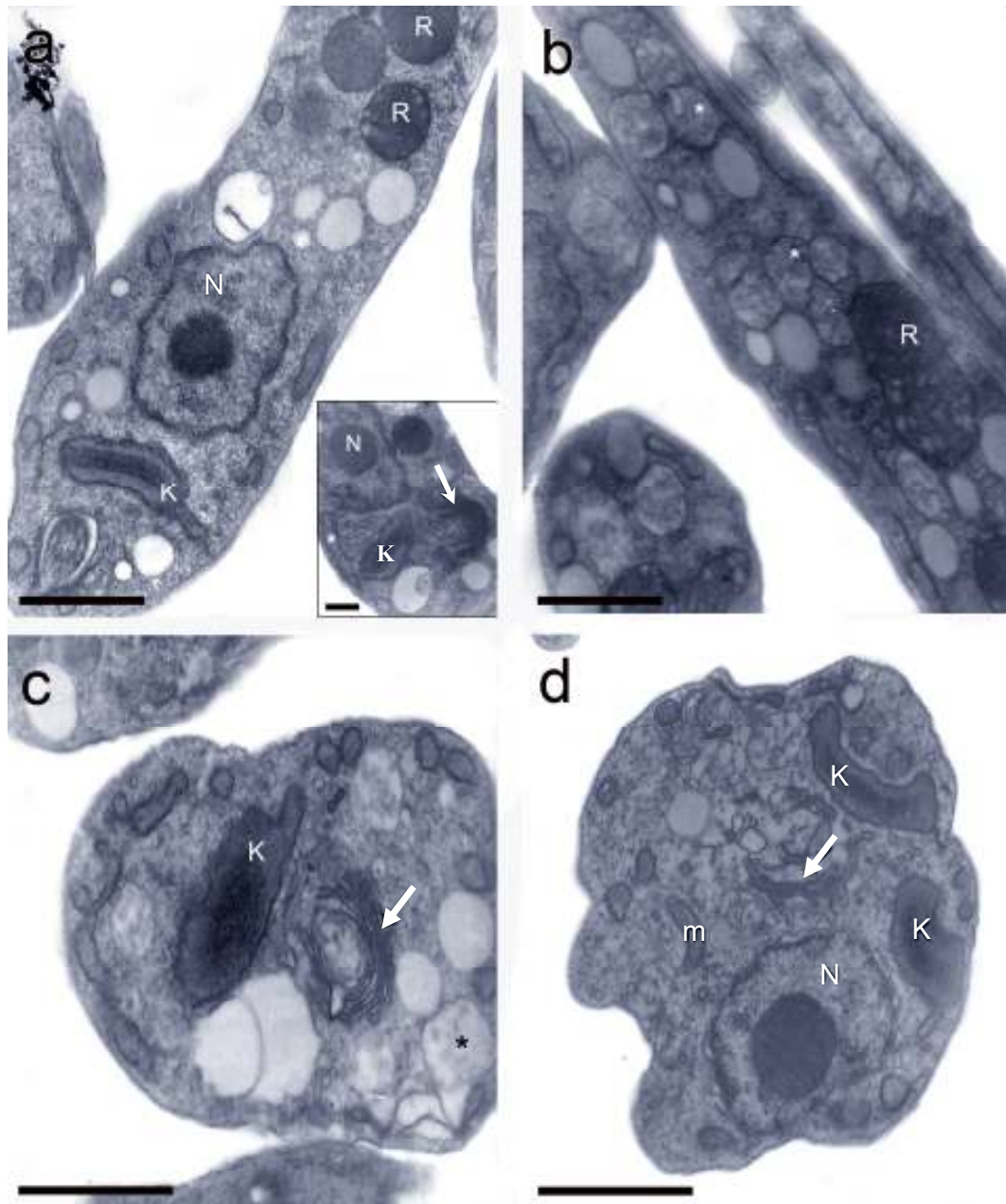


Fig. 4. Efeito do ácido protocetrárico sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. (a) formas epimastigotas não tratadas mostrando corpo alongado, núcleo (N), kinetoplasto (K) e reservossomos (R), localizados na porção posterior do parasita. O complexo de golgi (seta) pode ser evidenciado próximo ao cinetoplasto (*inset*). Perfis de mitocôndria também podem ser observados (*). (b) Parasita tratado com a IC₅₀/72h de PRO mostrando o aparecimento de inúmeros vacúolos contendo material granular no seu interior (*) e alteração da forma dos reservossomos (R). (c), Detalhe de uma forma epimastigota tratada com 2 x IC₅₀/72 de PRO, mostrando desorganização parcial do kDNA e a presença de vacúolos (*). (d) Detalhe de uma célula em divisão tratada com 2 x IC₅₀/72 de PRO evidenciando a desorganização do complexo de Golgi (seta). Note a presença de um perfil de mitocôndria próxima ao núcleo. Barras: 1µm.

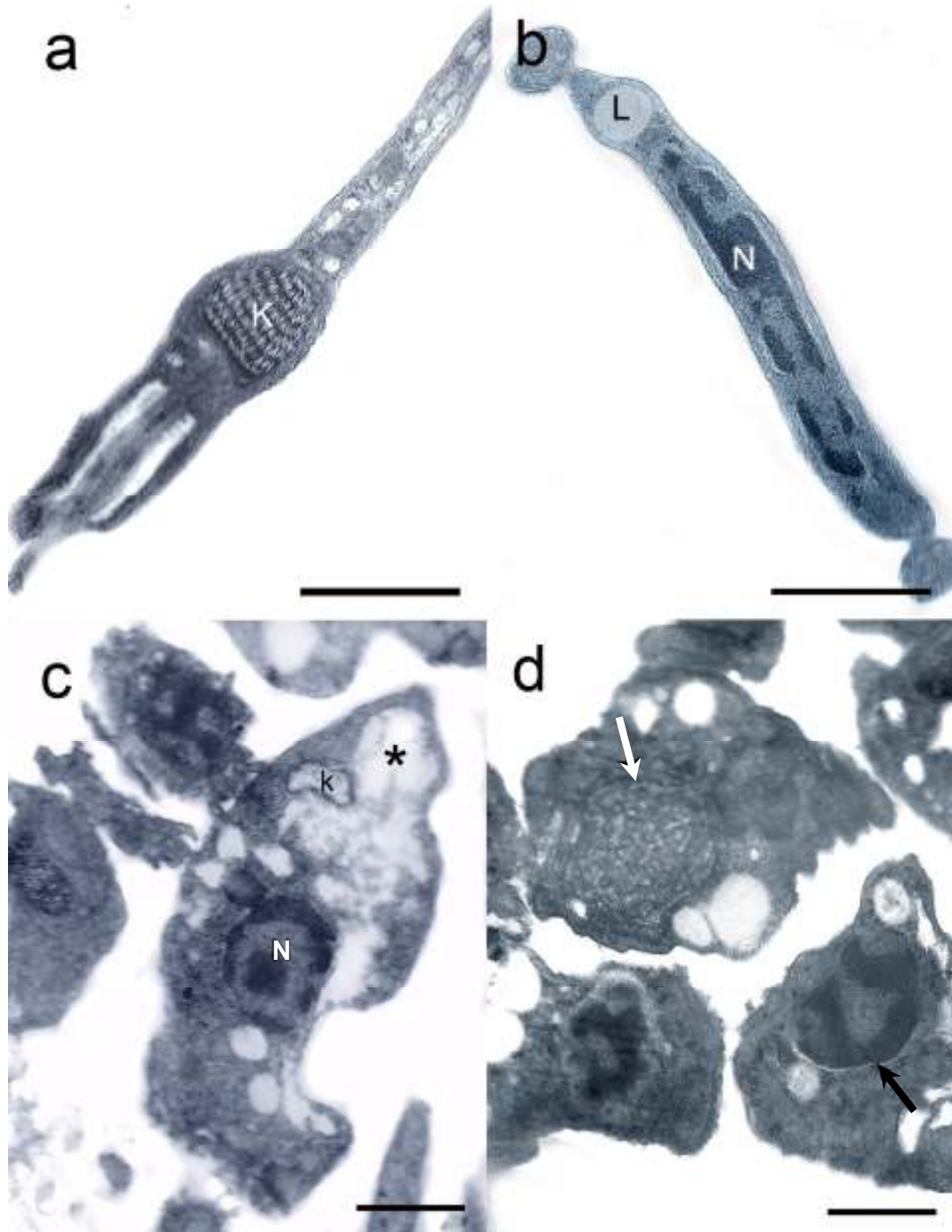


Fig. 5. Efeito do ácido protocetrárico sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*. **(a-b)** Parasitas não tratados, mostrando forma delgada, cinetoplasto (K) em forma de cesta, núcleo alongado (N) e inclusões lipídicas (L). **(c-d)** Detalhe de uma célula mostrando o aparecimento de espaços eletrólucos no citoplasma (*), desorganização do cinetoplasto (K) e perfis de retículo endoplasmático envolvendo organelas parcialmente fragmentadas (seta branca). Note também retração nuclear (seta preta). Barras: 1 μ m.

4. CONCLUSÕES

Com base nas informações obtidas neste trabalho pode-se inferir que:

- ✓ As substâncias teste, extrato acetônico e seus constituintes isolados (FUM e PRO), provenientes de *C. verticillaris*, apresentam bioatividade contra formas evolutivas de *T. cruzi*.
- ✓ Os ácidos FUM e PRO quando aplicados isoladamente, apresentam maior intensidade tripanocida, com destaque para o PRO. A atuação deste ácido pode estar relacionado com a ausência do grupo fumarato na sua estrutura molecular.
- ✓ O efeito inibitório contra formas epimastigotas e, de lise nas formas tripomastigotas, ocorreu de forma dose e tempo dependente.
- ✓ Entre as formas evolutivas de *T. cruzi* avaliadas, as tripomastigotas são mais susceptíveis à ação dos metabólitos de *C. verticillaris*. Esse tipo celular apresentou maiores danos estruturais com uma IC₅₀ inferior às obtidas nas formas epimastigotas.
- ✓ A existência de um considerável número de células em processo de divisão após 72 horas de cultivo na presença de PRO e FUM indicam que estes compostos possam ter um efeito mais citostático do que citotóxico para as formas epimastigotas.
- ✓ Por proporcionar deformações estruturais em organelas pertencentes unicamente aos *T. cruzi*, como os cinetoplastos e reservossomos, o ácido protocetrárico torna-se indicado para os estudos futuros como tripanocida.
- ✓ *Cladonia verticillaris* mostrou-se potencialmente ativa contra *T. cruzi*, o que a torna uma opção de estudo contra a doença de Chagas.

5. RESUMO

A doença de Chagas continua a ser um problema de Saúde Pública relevante e, o único tratamento, o Benznidazol, acarreta severos efeitos colaterais e possui limitações terapêuticas. Diante disso, objetivou-se analisar o efeito do extrato acetônico (ACE) e dos ácidos fumarprotocetrárico (FUM) e protocetrárico (PRO) do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. contra *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. O extrato acetônico foi obtido mediante a uma seqüência eluotrópica de solventes orgânicos. Posteriormente foram obtidos os compostos isolados (FUM) e (PRO). Foram realizados leituras cromatográficas para confirmação e determinação do grau de pureza das substâncias. Os bioensaios foram conduzidos com formas epimastigotas e tripomastigotas sanguínea incubadas durante 72 e 24 horas respectivamente, na ausência ou presença de 75 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das substâncias testes. Foram determinadas nesse período a IC_{50} e IL_{50} . As análises foram realizadas em triplicatas em três experimentos independentes. As formas tripomastigotas revelaram maior susceptibilidade aos metabólitos secundários, com 100% de lise dos parasitas tratados com 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PRO, após 24 horas de incubação. A análise ultraestrutural de tripomastigotas tratadas revelaram desorganização de organelas, retração nuclear e danos ao cinetoplasto e a mitocôndria. Estas alterações foram mais evidentes nos tratamento com PRO. Concluindo, os resultados obtidos estimulam estudos futuros para elucidar os mecanismos de ação destes compostos bem como avaliar seus efeitos sobre formas amastigotas intracelulares. Estes resultados também apontam para o uso do PRO como agente potencial contra *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: Líquen, *Cladonia verticillaris*, *Trypanosoma cruzi*.

6. ABSTRACT

Chagas disease continues to be a significant public health problem. The only available treatment, benznidazole, causes serious side effects and have therapeutic limitations. Aiming to search alternative treatment to this disease, in the present study was analyzed the *in vitro* effects of acetone extract and their isolated components fumarprotocetráric (FUM) and protocetraric (PRO) acids from *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. against *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. For obtention of acetonic extract were submitted 100g *C. verticillaris* an eluotropic series of organic solvents. After obtention of this extract and their isolated components the (FUM) and (PRO). The bioassays were carried out with epimastigotes and bloodstream trypomastigotes and this forms were incubated during 72 and 24 hours respectively in the absence or presence of 75 to 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of test compounds. The IC_{50} and IL_{50} was estimated directly by cell counting. The assays were carried out in triplicates, in three independent experiments. The treatment of epimastigotes forms resulted in cells growth inhibition, in a dose dependent way. The inhibition degree was different between the compounds. The trypomastigotes forms exhibited higher susceptibility to *C. verticillaris* secondary metabolites, with 100% of parasites lysis at 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PRO. Ultrastructural analysis trypomastigote forms treated with PRO showed organelle disorganization, nuclear retraction and kinetoplast and mitochondrial damage. Take together, the obtained results stimulate further studies in order to elucidate the mechanism of FUM and PRO action, as well as to evaluated their effects on intracellular amastigotes forms. The results also point towards the PRO as potential agent against *Trypanosoma cruzi*.

Passwords: Lichen, *Cladonia verticillaris*, *Trypanosoma cruzi*.