

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA “*IN VITRO*” DO EXTRATO ORGÂNICO
E DO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia salzmannii* Nyl.**

RECIFE

2005

CARLOS FERNANDO BRASILEIRO DE VASCONCELOS

**ATIVIDADE TRIPANOSSOMICIDA “IN VITRO” DO EXTRATO ORGÂNICO
E DO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia salzmannii* Nyl.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Co-orientador: Prof^{ea}. Dr^a. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Co-orientador: Prof^{ea}. Dr^a. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira

RECIFE

2005

Vasconcelos, Carlos Fernando Brasileiro de
Atividade tripanossomicida *in vitro* do extrato
orgânico e do ácido barbático de *Cladonia salzmannii*
Nyl. / Carlos Fernando Brasileiro de Vasconcelos. –
Recife : O Autor, 2005.

xi, 55 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica – Macromoléculas. 2. *Cladonia salzmannii* Nyl. – Ácido barbático– Extração, purificação e aplicação no *Tripanossoma cruzi in vitro*. 3. Microscopia eletrônica – Alterações morfológicas. I. Título.

543.635.62
547.633

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-239

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIATURA	vii
LISTA DE TABELA	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Generalidades sobre os líquens	01
<i>1.1.2. Morfologia e fisiologia líquênica</i>	02
<i>1.1.3. Cladonia salzmännii Nyl.</i>	05
<i>1.1.4. Substâncias líquênicas</i>	06
1.2. Tripanossomíase americana	08
1.3. Quimioterapia	15
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	35
6. CONCLUSÕES	54

AGRADECIMENTOS

A Deus. Mais do que nunca durante esse Mestrado percebi Sua mão soberana atuando em minha vida. Sua misericórdia e graça me conduziram durante toda esta trajetória. Aumentei a fé e a consciência que sou dependente de Sua vontade. Ao Senhor seja toda a Glória.

A Héliida, Dinha, meu amor, tudo que você fez foi imensurável. Sua dedicação, companheirismo e zelo foram presentes em todo instante, sua sabedoria trouxe a palavra certa nas horas mais difíceis, teu ombro foi refúgio para o meu cansaço e muitas das minhas lágrimas. Seu sorriso e alegria não me deixaram fraquejar. Pois tudo que fizeste foi com espontaneidade e paciência mostrando-me o teu Amor. A você ofereço esta tese. Te amo.

A Paulo e Aldira meus queridos pais. Agradeço a Deus por vocês estarem presentes em minha vida e pelo amor sem medida. Amo vocês. A Filipe e André, meus irmãos, pela força nas batalhas diárias e pela admiração que tenho por vocês. A todos os meus familiares, tia Janilde, tia Adelma e tia Zilda, sinônimo de amor sempre presente na minha vida. Todos vocês são a minha riqueza.

Em especial a Sr. João, Dona Lourdinha, Dona Rita e Marcela Maranhão pelo convívio e carinho sempre presente.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Naval do Recife. Dr. Leandro, Dr. Gustavo, Dr. Barbosa, Dr. Magalhães, Simone, Cristina, Alexandro, Conceição, Sub-Tenente Irene, Sargentos: Walquíria, Mirta – Na força imprescindível para conclusão deste trabalho. A todos vocês meu carinho especial.

Ao Chefe do Laboratório do Hospital das Clínicas - Dr Luiz Loureiro, pessoa digna de admiração, regado de profissionalismo e humanidade, cuja sensatez proporcionou-me o desenvolvimento e conclusão desta etapa.

Aos colegas do curso de mestrado pelo companheirismo, amizade e convivência nestes dois anos. Com vocês o que aprendi excedeu o campo da bioquímica. Concluo que a união faz a grande diferença.

Ao amigo Aurelino (Lino) pelo companheirismo, apoio e incentivo. Tenho em você um exemplo profissional e de amizade incondicional.

Eduardo (Duda): Sua ajuda se fez presente mais uma vez neste trabalho, sua amizade remete aos tempos de faculdade. 'Em todo tempo ama o amigo; e na angustia nasce o irmão'. Pv. 17:17.

A Raimundo (Laboratório de Biologia celular e ultraestrutura / Aggeu Magalhães) pelo profissionalismo na confecção das fotografias deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia celular e ultraestrutura / Aggeu Magalhães pelo convívio e auxílio prestados.

Aos amigos Dr. Luiz Alves, Dr. Fábio, Sérgio Santos e Rafael Padilha (Laboratório de Microscopia/LIKA) pelo profissionalismo e orientação na minha pesquisa.

A Márcio e Mônica pelo empenho ao ajudar-me.

Ao Prof. Dr. Nicácio pela oportunidade que me concedeu acreditando no desempenho e desenvolvimento do meu trabalho. Seu profissionalismo é consequência de um trabalho sério com dedicação.

A Dra. Regina Figueiredo pelo crédito em mim depositado em meio a tantos obstáculos. Seu profissionalismo, dedicação e orientação nas minhas atividades estiveram presentes no decorrer de todo o trabalho. Sua compreensão deu-me a oportunidade de prosseguir. Serei eternamente grato.

A Profa. Dra. Eugênia pelo direcionamento dado na abordagem e execução do trabalho, colocando-me à disposição do seu vasto conhecimento.

A Profa. Dra. Vera Menezes, coordenadora do curso de Mestrado em Bioquímica, sua maneira de conduzir o mestrado demonstra amor e liderança ao desempenhar sua função.

A Miron e Djalma, secretários do curso de Mestrado em Bioquímica, por todo o auxílio, atenção e amizade.

A João Virgílio pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos Doutores Fernando e Simone, colegas de plantão do Hospital das Clínicas, pelo profissionalismo, companheirismo e ajuda.

LISTA DE ABREVIATURA

DMSO – Dimetilsulfóxido

LIT – Liver Infusion Triptose

N – Núcleo

M – Mitocôndria

K – Cinetoplasto

R – Reservossomo

GC – Complexo de Golgi

LISTA DE TABELA

Tabela 01 – Cromatografia em Camada Delgada	42
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Modelo esquemático da ultraestrutura do talo liquênico	2
Figura 02 – Modelo esquemático de um isídio	3
Figura 03 – Modelo esquemático de sorédios	3
Figura 04 – Estrutura química do ácido barbático segundo Huneck & Yoshimura (1996).	6
Figura 05 – Fórmula estrutural do ácido barbático	37
Figura 06 – Cromatografia em Camada Delgada	42
Figura 07 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	43
Figura 08 – Efeito inibitório do extrato etéreo (A) e ácido barbático purificado (B) de <i>C. salzmannii</i> .	45
Figura 09 – Formas epimastigotas tratadas com extrato etéreo	46
Figura 10 - Formas epimastigotas tratadas com ácido barbático	47
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48

RESUMO

Os líquens são associações simbióticas entre algas e fungos que produzem uma variedade de produtos altamente complexos e peculiares, com marcada ação antimicrobiana. As substâncias liquênicas têm demonstrado importante atividade biológica, tornando-se viável o seu estudo contra protozoários parasitas. A doença de Chagas, uma doença parasitária endêmica, representa um sério problema de saúde pública em toda a América Latina, particularmente no Brasil. A quimioterapia disponível atualmente é insatisfatória por ter eficácia limitada, principalmente no estágio crônico da doença, e por induzir efeitos colaterais tóxicos no hospedeiro. Além disso, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta resistência a uma variedade de drogas. Neste trabalho o extrato orgânico etéreo e o ácido barbático purificado de *Cladonia salzmannii* Nyl. foram testados em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 40 µg/mL) contra formas epimastigotas do *T. cruzi* para verificação de sua atividade tripanosomicida *in vitro*. O efeito inibitório do extrato etéreo na proliferação do parasita foi estatisticamente significativo apenas após 72h de cultivo, para todas as concentrações. As culturas tratadas com ácido barbático purificado não apresentaram inibição significativa nas concentrações mais baixas e no mesmo tempo de incubação acima descrito. A análise ultraestrutural da forma epimastigota tratada com extrato etéreo e ácido barbático purificado, demonstrou alterações nas organelas citoplasmáticas. Danos mais severos, incluindo formação de bolhas e ruptura da membrana plasmática, foram observados nas concentrações mais altas. A microscopia eletrônica de varredura confirma os dados obtidos na microscopia eletrônica de transmissão, particularmente quanto a desestruturação da membrana plasmática e flagelar. Os resultados apontam o uso do ácido barbático como uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas contra o *T. cruzi*.

ABSTRACT

Lichens are symbiotic association between algae and fungi, which produces a number of highly complex and peculiar products, with remarkable antimicrobial activity. The lichen substances shows important biological activity, being viable their study against parasite protozoans. Chagas' disease, an endemic parasitary disease, which represents a serious healthy problem in all Latin America, particularly in Brazil. The present available chemotherapy is not satisfactory due to its limited efficacy, mainly at chronic stage of disease, and by inducing toxic side effects on the host. Besides, the *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, shows resistance to a large drugs variety. In this study, the organic ether extract and purified barbatic acid from *Cladonia salzmännii* Nyl. were tested in different concentrations (5, 10, 20 and 40 µg/mL) against the epimastigote forms of *T. cruzi* in order to verify their *in vitro* tripanosomicide activity. The inhibitory effect of ether extract on parasite proliferation was statistically significant at all concentrations tested, only after 72h of cultivation. The cultures treated with pure barbatic acid did not show significant inhibition for the lower concentrations, in the same period of incubation described above. The ultrastructural analysis of treated epimastigote forms showed remarkable alterations on cytoplasm organelles. More severe injuries, including blebbing formation and plasma membrane rupture were observed at the highest concentrations. The scanning electron microscopy corroborate the data obtained by transmission microscopy, particularly on plasma and flagellar membranes. Our results, point towards the barbatic acid as an alternative for development of new drugs against *T. cruzi*.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades sobre os Líquens

Os líquens são a associação de dois organismos compostos por uma parte fúngica (o micobionte) e por uma ou mais espécies fotossintetizantes, algas verdes ou cianobactérias (os fotobiontes). Esta associação resulta em talos estáveis de estrutura específica, representando uma simbiose mutualística, onde ambas as partes se beneficiam. Em aproximadamente 98 % dos líquens, o micobionte pertence à divisão Ascomycota. Nos demais líquens, o micobionte pertence aos Basidiomycotas. Como fotobionte, os líquens geralmente possuem algas verdes unicelulares (RAVEN *et al.*, 2001), sendo mais comuns as clorofíceas e as cianofíceas (XAVIER-FILHO & RIZZINNI, 1976; ALEXOPOULOS & MIMS, 1979; NASH III, 1996).

Os líquens são encontrados numa infinidade de substratos, sua distribuição se dá em toda superfície terrestre, desde desertos até regiões polares (VICENTE, 1975; NASH, 1996). Desde a antiguidade, são utilizados como plantas medicinais. Reporta-se ter sido encontrado em um vaso de 18^a dinastia egípcia (1700 a 1600 a.C.), um fragmento de líquen identificado como *Evernia furfuracea*, espécie que não ocorre naquela região, ou mesmo o “*Manah*” dos desertos citados na Bíblia, que se supõe ser a *Aspicilia esculenta*, líquen comum nas dunas dos desertos e utilizados por habitantes da área, sob forma de farinha para pão e bolo. Dioscorides, cirurgião grego do exército de Nero, aplicou o termo “líquens verdadeiros” por semelhança desses organismos às doenças de pele, para as quais eram indicados como remédio, visto que as plantas medicinais eram prescritas pelos médicos com base na “doutrina dos sinais”, sendo utilizadas de acordo com a semelhança que elas tivessem com determinadas enfermidades, ou com órgãos afetados. Assim, os longos filamentos de *Usnea barbata* eram indicados para fortalecer os cabelos; a *Lobaria pulmonaria*, por sua superfície reticulada, era designada para problemas pulmonares; a *Xanthoria parietina*, por sua cor amarela, era usada para o tratamento da icterícia e, *Peltigera aphthosa*, cujo talo é dotado de verrugas, era recomendada para crianças com erupções na boca como afta e estomatite (ABRAHAN & FLOREY, 1949).

1.1.2. Morfologia e Fisiologia Liquênica

O talo liquênico apresenta forma peculiar, onde o fotobionte e o micobionte se posicionam em camadas sucessivas (Figura 1). O córtex superior é composto por hifas do fungo entrelaçadas, visando proteger a camada gonidial (de algas) que vem logo abaixo. Centralmente encontra-se uma camada de hifas frouxas, a medula, seguida de um outro feixe de hifas, o córtex inferior (HALE, 1983; NASH, 1996). O talo do líquen pode apresentar cores e formas variadas, dependendo da espécie e das substâncias que ele contém (THOMSON, 1968).

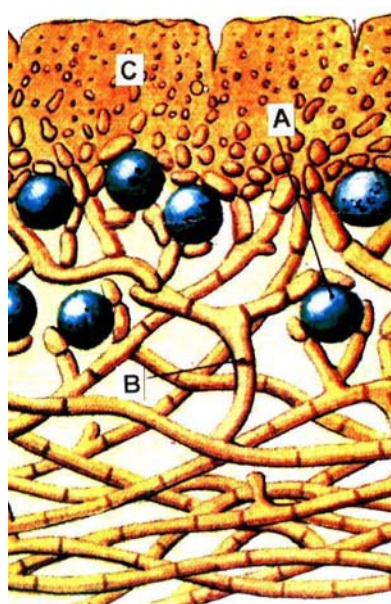


Figura 1 - Modelo esquemático da ultraestrutura do talo liquênico. (A) Fotobionte, ou camada gonidial; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.

Nos líquens a reprodução normalmente se processa de forma vegetativa, através da fragmentação do talo, que por vezes apresenta protuberâncias, macroscopicamente semelhantes a verrugas, formadas pelas partes alga e fungo. Essas estruturas são denominadas isídios, que ao se destacarem do talo, são disseminadas para formação de novos talos liquênicos (Figura 2). Outra forma de reprodução assexuada é a liberação de massas de hifas envolvendo células de algas. Estas estruturas especializadas liberadas pelas (interrupções) ou perfurações do talo denominadas sorédios (Figura 3). Os isídios e os sorédios são geralmente disseminados por agentes dispersantes como água, vento e insetos (XAVIER FILHO & RIZZINI, 1976).



Figura 2 - Modelo esquemático de um isídio

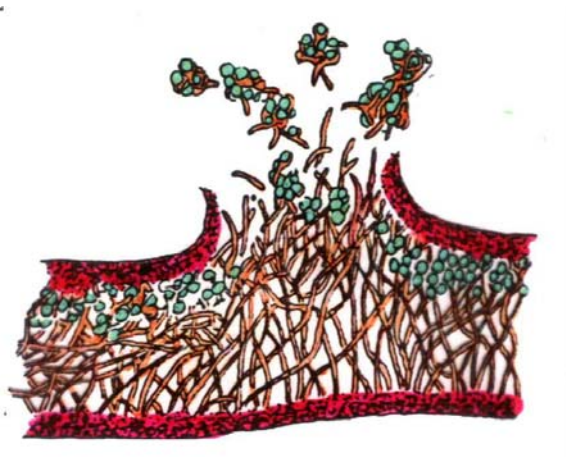


Figura 3 - Modelo esquemático de sorédios

O contato alga/fungo facilita a transferência de nutrientes e produtos da fotossíntese do fotobionte para o micobionte. Este último requer altos teores de açúcares elaborados a partir da fotossíntese da alga, para derivar biotroficamente seus carboidratos (HALE, 1983; NASH, 1996). O metabolismo primário nos líquens consiste na produção específica de um único carboidrato pela alga, a partir da fotossíntese, cuja transferência ao micobionte é rápida, e em quantidade substancial para sua transformação e acúmulo. No micobionte, o processamento do carboidrato gera manitol, transformado a partir de um poliol, cujo tipo depende da espécie de alga constituinte do líquen: as do gênero *Trebouxia* geram ribitol, *Hyalococcus* produz sorbitol e, *Trentepohlia* o eritritol; enquanto as

cianobactérias produzem glicose. O fungo, por sua vez, é capaz de quebrar moléculas grandes, face à sua enorme capacidade enzimática. A transferência de açúcar é tão característica na relação alga/fungo que o efluxo rápido e massivo deste produto cessa imediatamente após isolamento da alga do talo líquênico (HALE, 1983). É também comprovado que a parede celular do fotobionte é muito mais permeável para perda de carboidratos, quando comparada à da alga em estado de vida livre, ou não liquenizada (NASH, 1996).

Os líquens absorvem dos substratos os sais minerais necessários para sua nutrição. Utilizam os depósitos cristalizados de suas substâncias para quelar os íons exteriores e incorporá-los ao talo, podendo extrair dos seus substratos os íons requeridos pelo seu metabolismo (NASH, 1996).

Existem dois grupos de componentes líquênicos, um é proveniente do metabolismo primário (intracelular), representado pelas proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas, sendo essas substâncias encontrada tanto na parede celular quanto no citoplasma de fungos e algas. Tais compostos são geralmente hidrossolúveis e extraídos em água fervente. O segundo grupo é representado por substâncias provenientes do metabolismo secundário dos fungos (extracelular), são usualmente hidrofóbicos podendo apenas ser extraídos utilizando solventes orgânicos, muitos unicamente encontrados em líquens. Estes compostos recebem a designação geral de substâncias líquênicas e são geralmente encontrados nas paredes das hifas (HALE, 1983).

As substâncias líquênicas eram designadas antigamente como “ácidos líquênicos” (XAVIER & RIZZINI, 1976), sendo na maioria, compostos fenólicos, dentre eles os benzilésteres, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenóides, derivados do ácido pulvínico, ácidos alifáticos, para e meta depsídeos e depsidonas. Os depsídeos são uma classe distinta de compostos derivados de líquens nos quais são formados por condensação de dois ou mais ácidos hidroxibenzóicos através da esterificação do grupo carboxila de uma molécula com o grupo hidroxila fenólica presente na segunda molécula (MÜLLER & KUMAR, 1999).

No interior do talo, esses compostos tomam forma cristalina e são extracelulares, depositados sobre as hifas do micobionte. Tal fato confere ao líquen capacidade de adaptação às adversidades, visto que esses cristais funcionam como fotorreceptores e/ou fotoindutores, selecionando o tipo de radiação que lhes é conveniente. As substâncias líquênicas são responsáveis pela utilidade econômica e benefícios curativos advindos dos

liquens, tanto para o homem como para os animais (CULBERSON, 1970; NASH, 1996; VICENTE, 1975). A concentração destes compostos pode variar de 0,1 a 5 % em relação ao peso seco do talo liquênico e, em alguns casos, mais do que isto (FAHSELT, 1994; HALE, 1983)).

Até o presente, mais de 630 substâncias foram identificadas em liquens. Todas elas oriundas de três vias metabólicas principais: a) a via do acetato polimalonato, originando ácidos graxos de cadeia longa, e compostos fenólicos como depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas e antraquinonas; b) via do ácido mevalônico, que gera produtos como esteróis e terpenos; e por último, c) via do ácido chiquímico, gerando derivados do ácido pulvínico (HONDA & VILEGAS, 1998).

As substâncias liquênicas têm local específico no interior do líquen para sua produção. Algumas são de origem medular, outras corticais. A localização pode ser ainda mais restrita, como apotécios, sorédios ou himênio, e depende da natureza do fotobionte (HALE, 1983; NASH, 1996) e provavelmente está relacionado a fatores de co-adaptação às peculiaridades do ambiente (HALE, 1983).

1.1.3. *Cladonia salzmannii* Nyl.

O gênero *Cladonia* é cosmopolita, possuindo espécies em qualquer ecossistema. No Brasil sua representatividade é muito grande, chegando a ocorrer quase trezentas espécies (CULBERSON, 1970). A *C. salzmannii* distribui-se geograficamente no Nordeste brasileiro, principalmente nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Paraíba, nos solos arenosos de Sergipe e em Pernambuco, onde algumas espécies da família Cladoniaceae foram catalogadas na região do agreste. Embora *C. salzmannii* tenha geralmente estruturas dilatadas, ela pode ser morfológicamente similar a *Cladonia crispatula*, mas sempre pode ser distinguida bioquimicamente por sua abundante produção do ácido barbático, cuja estrutura está representada na figura 4 (CAVALCANTI *et al.*, 1983; AHTI *et al.*, 1993).

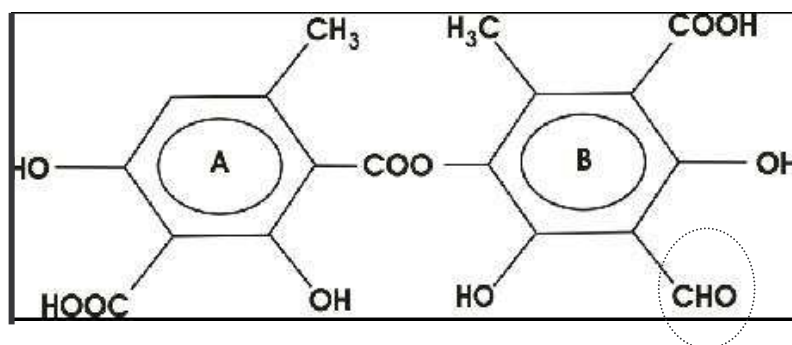


Figura 4 - Estrutura química do ácido barbático, segundo Huneck & Yoshimura (1996).

Em *C. salzmannii*, a substância predominante é o ácido barbático, sendo os ácidos taminólico, D-taminólico e o ácido 4-O-dimetilbarbático, apenas ocasionalmente encontrados (AHTI *et al.*, 1993). O ácido barbático é um depsídeo de fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_7$. Seus cristais são de cor amarelo-pálido, seu ponto de fusão é em torno de 187 °C e o solvente mais adequado para extração é o éter, mas, também é solúvel em etanol, acetona e clorofórmio (ASAHINA & SHIBATA, 1954; HUNECK & YOSHIMURA, 1996). O ácido taminólico é um meta-depsídeo de cristais amarelo-pardo, com ponto de fusão em torno de 223 °C, solúvel em acetona quente e etanol e parcialmente solúvel no éter (ASAHINA & SHIBATA, 1954).

1.1.4. Substâncias Liquênicas

Os líquens e seus metabólitos têm sido usados por muito tempo pela humanidade por apresentarem uma gama de atividades biológicas, entre elas: antiviral, antibiótica, antineoplásica, anti-herbívora, inibidor do crescimento de plantas superiores e como inibidor enzimático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

Entre 1920 e 1945, Asahina e Shibata, elucidaram as características estruturais de numerosos compostos liquênicos. Burkholder & Evans (1945) iniciaram testes elaborando um trabalho de detecção de compostos liquênicos antibacterianos. A introdução de novos métodos analíticos (cromatografias de camada delgada e líquida de alta eficiência, espectros em ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética, de massa e cristalografia de raios X) tem levado ao isolamento e purificação de muitas substâncias liquênicas novas (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

Pesquisas baseadas na utilização de substâncias liquênicas contra a proliferação de vírus têm se mostrado bastante promissoras. Cohen *et al.* (1996) verificaram a ação anti-HSV-1 da antraquinona e derivados de hipericina encontrados em alguns liquens. Perry *et al.* (1999) demonstraram que extratos de diferentes espécies de liquens da Nova Zelândia e, algumas substâncias isoladas como os ácidos úsnico e estético, além da antranorina, mostraram-se eficazes contra o mesmo vírus. A *Umbilicaria esculenta* contém um composto β -(1 $\rightarrow$ 6) de glucana parcialmente acetilada, com atividade citopática contra o vírus da imunodeficiência humana (ASAHINA & SHIBATA, 1954).

Numerosas substâncias liquênicas inibem o crescimento de bactérias e fungos. Por crescerem lentamente, os liquens requerem esses metabólitos como antibióticos. O metil e etilorselinato e o metil β -orselinato mostraram-se eficazes contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (INGOLFSDOTTIR *et al.* 1985; GOLLAPUDI *et al.*, 1994).

Ingolfdottir *et al.* (1998) isolaram a antranorina e o ácido lobárico de *Stereocaulon alpinum*, ácido salazínico de *Parmelia saxatilis* e ácido protoliquesterínico de *Cetraria islandica* e verificaram que todos os três ácidos possuíam atividade antimicrobiana. Da mesma forma, Esimone & Adikwu (1999) verificaram atividade antimicrobiana, citotóxica e antifúngica de extratos provenientes da *Ramalina farinacea*.

O ácido úsnico é a substância liquênica mais conhecida e estudada, sendo sintetizado exclusivamente por liquens. Essa substância possui várias propriedades biológicas como atividade antibiótica, principalmente em bactérias Gram positivas, micobactérias e bactérias anaeróbicas (LANTERWEIN *et al.*, 1995; INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1998; COCCHIETTO *et al.*, 2002; INGOLFSDOTTIR, 2002). Por outro lado, sabe-se que extratos liquênicos contendo outras substâncias fenólicas possuem ação contra bactérias Gram negativas (BURKHOLDER & EVANS, 1945).

A capacidade anti-neoplásica das substâncias liquênicas tem sido amplamente descrita. Os primeiros trabalhos sobre o assunto foram publicados no final da década de cinquenta, demonstrando a eficácia do ácido polipórico de *Sticta coronata* contra leucemia linfocítica (CULBERSON, 1970). No Brasil, liquens nordestinos e amazônicos vêm sendo avaliados quanto a presença de compostos antineoplásicos e a produção sazonal de compostos bioativos. Lima *et al.* (1994), comprovaram a eficiência de diferentes extratos obtidos de Cladoniaceae contra tumores sólidos do tipo sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich com até 80% de inibição (NASCIMENTO *et al.*, 1994). Os ácidos barbático, 4-O-

dimetilbarbático, difractaico, evérnico e liquesterínico também mostraram atividades antitumorais (YAMAMOTO *et al.*, 1995).

Muitas substâncias e extratos liquênicos são inibidores do crescimento de plantas superiores (RAMAUT & CORVISIER, 1975). O ácido úsnico inibe a mitose no *Allium cepa*. Extratos de *Cladonia gracilis* inibe a germinação das sementes do *Pinus sylvestris*. O ácido barbático inibe o crescimento das mudas de *Lactuca sativa* (NISHITOBA *et al.*, 1987; HUOVUNEN & LAMPERO, 1989).

Recentemente, estudos sobre a ação de substâncias liquênicas contra protozoários parasitas têm sido realizado por alguns pesquisadores. Fournet *et al* (1997) verificaram a eficácia do ácido úsnico contra a leishmaniose cutânea utilizado intralesionalmente. Carvalho *et al* (2004), demonstraram que o ácido úsnico extraído de *C.substelatta* é efetivo contra todas as formas evolutivas de *T. cruzi*.

1.2.Tripanossomíase Americana

- **Histórico**

A Tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanossoma cruzi* (WHO, 1991). Essa doença foi descoberta em 1909, na cidade de Lassance-MG por Carlos Chagas, um cientista brasileiro que lá se encontrava trabalhando no combate à malária. Nesse período, ele foi informado da existência de um inseto hematófago que residia nas habitações humanas sugando as pessoas durante o sono. Estes apresentavam hábitos noturnos e eram conhecidos como barbeiros por picarem, preferencialmente, a face dos humanos (CHAGAS, 1909).

Examinando amostras daquele inseto, o pesquisador descobriu um protozoário desconhecido e enviou alguns exemplares infectados ao Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. A inoculação destes protozoários em animais de laboratório foi capaz de desenvolver a infecção. Em homenagem ao Doutor Oswaldo Cruz, o protozoário foi denominado *Trypanossoma cruzi* (CHAGAS, 1909).

A partir daí, o pesquisador verificou a presença do mesmo protozoário no sangue periférico de animais domésticos e, posteriormente, em crianças com sintomas de febre, anemia, edema, distúrbios cardíacos, esplenomegalia e perturbações funcionais diversas

(TEIXEIRA, 1987). Isso o levou a suspeitar que este protozoário fosse o responsável por originar uma certa forma de doença presente naquela região (CHAGAS, 1909).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* nas Américas, desde o México, ao norte, até a Argentina e Chile, ao sul. A doença de Chagas causa altíssimas taxas de morbidade e mortalidade, sendo atribuídos a ela, aproximadamente, de 23.000 a 43.000 óbitos nesses países (WHO, 1991). Em acréscimo, um grande ônus causado é causado aos governos de países endêmicos, não é só pela incapacidade de trabalho dos que apresentam os sintomas, mas também pelo aumento dos atendimentos hospitalares, utilização dos equipamentos e administração de drogas (BRENER *et al.*, 2000).

No Brasil, a doença de Chagas foi considerada como a causa mais freqüente de morte súbita na cidade de Uberaba em 1980, correspondendo a 24% dos casos, dos quais 31% dos falecidos eram assintomáticos. Apesar de uma situação melhor em 1990, ainda assim 6,8% dos casos de morte súbita foram atribuídos ao *T. cruzi* (LOPES *et al.*, 1986; MORALES *et al.*, 1989; LIPES *et al.*, 1995).

- **Aspectos Clínicos da Doença de Chagas**

A fase aguda da doença de Chagas compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dois a quatro meses de infecção (LARANJA, 1953). O período de incubação varia entre quatro e dez dias, tempo necessário para o desenvolvimento de uma ou duas gerações de parasitos, respectivamente (CHAGAS, 1936). Clinicamente, a infecção chagásica se inicia com um conjunto de manifestações, variáveis em freqüência e intensidade formada pelo sinal localizado na entrada da infecção, sintomas gerais e alterações sistêmicas. A porta de entrada da infecção apresenta-se de forma aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular como o sinal de Romana, ou cutânea, como o chagoma de inoculação (ROMANÃ, 1935).

Como sintoma geral e aparecimento precoce, destaca-se a febre, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia (CHAGAS, 1916). Dentre as alterações sistêmicas, que costumam aparecer em torno da segunda e terceira semanas de doença, destaca-se o edema subcutâneo, o aumento de volume dos linfonodos, a hepatomegalia e esplenomegalia, podendo ser observados ainda, manifestações de comprometimento

cardíaco e de meningoccefalíte. Apesar disso, a forma aguda da doença apresenta uma baixa mortalidade, menos que 5% dos infectados (CROWELL, 1923).

A existência de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* sem apresentar o quadro clínico da doença de Chagas foi reconhecida desde 1916 por Carlos Chagas, que utilizou o termo “forma crônica indeterminada” para designar a infecção na “ausência de qualquer das síndromes clínicas predominantes” da doença (CHAGAS, 1916).

Nos dias de hoje, entende-se por forma indeterminada da doença de Chagas a presença comprovada da infecção chagásica na ausência de manifestações clínicas, eletrocardiografias ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo (IANNI & PEREIRA-BARRETO 1994). Os pacientes nesta forma clínica apresentam, de um modo geral, bom estado de saúde e excelente capacidade laborativa, desconhecendo muitas vezes a presença da infecção, mesmo as provas sorológicas apresentando-se positivas. Sendo assim, a importância da forma indeterminada é primordialmente epidemiológica (LARANJA *et al.*, 1956) e estima-se que 50% dos infectados chagásicos apresentem essa forma da doença (MACEDO, 1980). Embora o prognóstico destes pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses indivíduos podem evoluir, a cada ano, para as formas determinadas da doença (DIAS, 1989).

A forma crônica caracteriza-se pela presença de poucos parasitas no sangue, os quais são detectáveis apenas através de xenodiagnóstico, hemocultura ou pela técnica de reação de cadeia da polimerase (PCR). É uma fase afebril, que pode evoluir para as formas cardíacas e digestivas após um período de latência de dez ou mais de vinte anos (DIAS, 1999; WHO, 1990).

A cardiopatia crônica manifesta-se por combinação sindrômica de insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares graves, crescimento do coração em cerca de 20 a 30% dos casos e tromboembolismo pulmonar e sistêmico (MARIN-NETO *et al.*, 1997). As alterações anátomo-patológicas do megaesôfago e megacólon são conhecidas há bastante tempo (HURST, 1930). Os achados incluem a hipertrofia da camada muscular circular do esôfago, intensa fibrose dos plexos mioentéricos, com desaparecimento ou diminuição dos neurônios, e as reações inflamatórias focais, tanto próximas aos plexos quanto em plena camada muscular do esôfago e cólon (ESPINOSA *et al.*, 1985; KÖBERLE, 1958).

- **Transmissão da Doença de Chagas**

Os insetos hemípteros da família *Reduviidae* com probóscida especializada para a sucção sanguínea foram agrupados na subfamília *Triatominae*, onde estão os vetores do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DIAS, 1979). Os mecanismos de transmissão consistem na via vetorial (80 a 90% da transmissão), na via transfusional (5 a 20%) e na via congênita (0,5 a 8%) (WHO, 1991). As demais vias são realmente excepcionais como a experimental, a oral, sexual, por transplante de órgãos e até mesmo a transmissão por outros vetores não-triatomíneos, sem representarem importância significativa na saúde pública (AKHAVAN, 1997).

A transmissão vetorial depende da capacidade intrínseca da cepa do parasito em se diferenciar no interior do vetor, da frequência, do volume e do número de dejeções do inseto, do tempo decorrido entre o repasto sanguíneo e a dejeção e do local de depósito de dejeções (BRENER, 1997; ZELEDÓN, 1974). A implementação de mecanismos e estratégias para o controle da transmissão transfusional da doença, diminui progressivamente o contágio por esta via. A transmissão congênita pode ocorrer desde o terceiro mês de gestação, incidindo especialmente do terceiro ao quinto mês, sempre dependendo da lesão placentária (MOYA & MORETTI, 1997; WANDERLEY, 1994; WENDEL, 1997).

- **Morfologia do *Trypanossoma cruzi***

De acordo com sua morfologia e localização no hospedeiro o *T. cruzi* pode ser classificado em epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As formas epimastigotas são encontradas no inseto vetor e também de modo preponderante durante o cultivo em meio rico de nutrientes. Neste estágio, o protozoário possui corpo alongado, fusiforme, e a emergência do flagelo se dá lateralmente ao corpo celular (HOARE & WALLACE, 1996), percorrendo a superfície do organismo e tornando-se livre na porção final anterior (PAN, 1978). O cinetoplasto, região onde se concentra o DNA mitocondrial, é anterior ao núcleo (VIKERMAN & PRESTON, 1992) e apresenta forma de bastão (PAN, 1978). O envelope nuclear é interceptado com nucleosporos e a membrana externa do envelope é contínua com o retículo endoplasmático rugoso (PAN, 1978). A mitocôndria, com numerosas cristas

mitocôndriais, estende-se no citoplasma perfazendo um contorno tortuoso (DE SOUZA, 1984). As formas tripomastigotas, que representam o estágio infectivo no hospedeiro vertebrado, apresentam corpo delgado, com cinetoplasto mais volumoso, em forma de cesta, localizado posteriormente ao núcleo onde se dá a emergência do flagelo, que por sua vez ocorre lateralmente ao corpo celular, formando uma membrana ondulante. As formas amastigotas correspondem ao estágio multiplicativo intracelular no hospedeiro vertebrado. Apresentam forma arredondada, cinetoplasto em forma de bastão e, um pequeno flagelo no interior da bolsa flagelar (HOARE & WALLACE, 1996; VIKERMAN & PRESTON, 1992).

A superfície dos tripanossomatídeos é composta por três estruturas celulares principais: o glicogálix, a membrana plasmática e o citoesqueleto. O glicogálix é muito delgado nas formas epimastigotas e amastigotas e um pouco mais espesso nas tripomastigotas. Na superfície do corpo celular e do flagelo, os glicoconjugados são uniformemente distribuídos, porém apresentam-se mais concentrados na região próxima ao citóstoma (DE SOUZA, 1999). O citóstoma corresponde a uma estrutura que aparece como uma depressão na superfície do parasita, delimitado por unidade de membrana, encontrando-se recoberto por microtúbulos subpeliculares, sendo encontrados apenas em epimastigotas e amastigotas. Estudos sobre endocitose têm demonstrado que o citóstoma representa o principal sítio de endocitose mediada por receptor. Pequenas vesículas originadas no citóstoma fundem-se com os reservossomos, sendo esses considerados sítios de estocagem de macromoléculas que são usadas no processo de transformação de formas epimastigotas em tripomastigotas. Os reservossomos medem aproximadamente de 0,4-0,5 μm de diâmetro e estão localizados, predominantemente, na porção posterior das formas epimastigotas (FIGUEIREDO & SOARES, 2000).

A estrutura da membrana plasmática é bastante semelhante às demais células eucarióticas, contendo algumas especializações de proteínas intramembranares no citóstoma, na base do flagelo, e na região onde ocorre a adesão entre o flagelo e o corpo celular. Os lipopeptídeofosfoglicanos encontram-se ancorados à membrana via glicosil-fosfatidil-inositol, com distribuição variável nas diferentes formas evolutivas. O citoesqueleto do *T. cruzi* é formado por uma camada de microtúbulos localizada abaixo da membrana plasmática, os quais são conectados uns aos outros, à membrana plasmática e às cisternas do retículo endoplasmático por meio de pequenas pontes protéicas (DE SOUZA 1999, 2002).

Ao ser analisado internamente, o *T. cruzi* é formado por várias estruturas celulares comuns às células eucarióticas tais como núcleo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, e outras que são peculiares aos tripanossomatídeos, tais com o complexo cinetoplasto-mitocôndria, os glicossomos, o acidocalcissoma e os reservossomos. Estas últimas organelas são encontradas apenas nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e, em tripanossomos do sub-gênero *Schizotrypanum*, isolados de morcegos (DOCAMPO & MORENO, 2001). O núcleo do *T. cruzi* mede cerca de 2,5 μm . No início da divisão apresenta cromatina dispersa, o que lhe confere aspecto homogêneo; posteriormente ocorre fragmentação do nucléolo, seguida de seu desaparecimento. A divisão também se caracteriza pela presença de microtúbulos no interior do núcleo e pela permanência do envoltório nuclear (ANDRADE & ANDRADE, 1996). O complexo de Golgi é sempre encontrado na porção anterior da célula, próximo ao cinetoplasto e a bolsa flagelar, apresentando maior número de cisternas nas formas epimastigotas (FIGUEIREDO & SOARES, 1995).

O complexo cinetoplasto-mitocôndria é formado por uma condensação de DNA extranuclear encontrado numa região bem definida da mitocôndria, acima da base do flagelo. O DNA do cinetoplasto (k-DNA) pode conter cerca de 30% do DNA total da célula, com aproximadamente 20.000 a 30.000 minicírculos, em adição aos maxicírculos, sendo estes últimos, os mais bem conhecidos dos DNA mitocondriais dos eucariontes (DOCAMPO & MORENO, 2001). O agrupamento desses círculos numa região da mitocôndria próxima à base do flagelo dá origem ao que se chama cinetoplasto (MILDER & DEANE, 1969). Os glicossomos são organelas arredondadas, pertencentes ao grupo dos peroxissomos, apresentando no seu interior enzimas envolvidas na via glicolítica, que são responsáveis pela glicólise neste organismo (DOCAMPO & MORENO, 2001). Medem aproximadamente 0,3 μm e apresentam-se em torno de 200-300 por célula, constituindo um total de 4% do volume do parasita (BOOTHROYD, 1990). Os acidocalcissomas são organelas membranares, contendo depósitos eletrondensos devido a alta concentração de cálcio (Ca^{+2}) e fósforo (P), sendo responsáveis pela homeostase destes íons no parasita (DOCAMPO & MORENO, 2001).

- **Ciclo de Vida do *T. cruzi***

No sangue periférico dos hospedeiros mamíferos, as formas tripomastigotas do *T. cruzi* apresentam-se como uma população pleomórfica, consistindo em duas morfologias básicas, descritas como delgada ou larga. Conseqüentemente, o inseto adquire essa população pleomórfica e até 10% de amastigotas no repasto sanguíneo feito em mamíferos infectados (ANDREWS *et al.*, 1987; LEY *et al.*, 1988). Assim, os parasitas se dirigem ao intestino médio do inseto, onde se diferenciam em formas amastigotas. As formas tripomastigotas delgadas transformam-se em amastigotas por meio de um intermediário de forma larga. Uma vez no intestino, as amastigotas se convertem em epimastigotas, que como aquelas, são replicativas. Inicialmente, as amastigotas aumentam e estendem seus flagelos, tornando-os visíveis. Neste estágio, as formas são algumas vezes referidas como esferomastigotas. Essas, têm seu corpo celular e flagelo alongando-se com o aumento da densidade celular, dando origem a forma epimastigota clássica. As formas amastigotas, esferomastigotas e epimastigotas são proliferativas e a transição de uma dessas formas para outra é um evento contínuo (TYLER & ENGMAN, 2000).

Epimastigotas alongadas interagem hidrofobicamente com a cutícula cerosa da parede posterior do intestino do inseto, para serem convertidas em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (BONALDO *et al.*, 1988, KLEFFMANN *et al.*, 1998). Este processo é denominado metaciclogênese e é desencadeado pela interação hidrofóbica entre o flagelo e o substrato, sendo mediado pelo AMP cíclico (BONALDO *et al.*, 1988). Uma vez formados, os metacíclicos se destacam da cutícula cerosa e são excretados. A contaminação mediada pela excreta do inseto, tanto na ferida proveniente da picada quanto na membrana mucosa do hospedeiro mamífero, conduz à infecção (BONALDO *et al.*, 1988; GONZALES-PERDOMO *et al.*, 1988; RANGEL-ALDAO *et al.*, 1988).

Tripomastigotas metacíclicos são capazes de parasitar uma grande variedade de células nucleadas de mamíferos. A invasão ocorre por meio de um mecanismo parasitário único, no qual microtúbulos do citoesqueleto das células dos mamíferos direcionam lisossomos para o local do ataque parasitário (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; TARDIEUX *et al.*, 1992). Estes lisossomos fundem-se com a membrana plasmática, primeiro formando uma junção com o parasita e depois um compartimento vacuolar permitindo a entrada do parasita (RODRIGUEZ *et al.*, 1997). A acidificação do vacúolo parasitóforo, resultante da fusão lisossomal, também serve para ativar uma molécula semelhante a porina, a Tc-Tox,

que é secretada pelo parasita e facilita sua saída do vacúolo (ANDREWS, 1993). Os tripomastigotas então, escapam do vacúolo e se diferenciam em formas amastigotas. Estas proliferam no citoplasma da célula para formar um pseudocisto (ANDREWS, 1993; DVORAK, 1976). Uma vez formadas, as tripomastigotas geralmente escapam do pseudocisto e vão para a corrente sangüínea e linfática como formas delgadas, as quais podem invadir novas células de maneira similar à invasão metacíclica. Formas delgadas de tripomastigotas que falham ao invadir novas células sofrem uma mudança morfológica, primeiro para a forma larga e depois para amastigota, sendo esta a causa do pleomorfismo observado nas formas tripomastigotas do sangue periférico (LEY *et al.*, 1988).

Células que são lisadas prematuramente podem também liberar amastigotas, que são observadas na corrente sangüínea durante a fase aguda da infecção. As amastigotas propagam a infecção quando infectam células fagocitárias, por um mecanismo diferente das tripomastigotas. Finalmente, a mistura de tripomastigotas e amastigotas presentes no sangue do mamífero infectado, serve para completar o ciclo de vida do *T. cruzi*, no momento em que o inseto adquire essas formas através do repasto sangüíneo (LEY *et al.*, 1988).

1.3. Quimioterapia

As drogas mais freqüentemente usadas para o tratamento da doença de Chagas são os compostos nitroheterocíclicos, um nitrofurano, o nirfutimox e benznidazol um derivado do nitroimidazol cujas atividades anti-*T. cruzi* foram descobertas há mais de três décadas. Os estudos básicos têm mostrado a base molecular da atividade anti-*T. cruzi* e toxicidade destes compostos. O nirfutimox age via a redução de grupos nitro para instabilizar radicais nitroânions, os quais tornam-se reativos e produzem alta toxicidade, originando metabólitos do oxigênio (anion superóxido e peróxido de hidrogênio). O *T. cruzi* tem demonstrado ser deficiente em mecanismos de detoxificação, particularmente para o peróxido de hidrogênio, e assim mais sensível ao estresse oxidativo, quando comparado às células dos vertebrados (DOCAMPO, 1990). O benznidazol parece atuar por um mecanismo diferente, o qual envolve modificações covalentes de macromoléculas, por nitroredução dos intermediários. Ambos têm atividade significativa na fase aguda, com até 80% de cura parasitológica (CANÇADO, 1999). Entretanto, suas eficácias variam de acordo com a área geográfica devido a diferença de susceptibilidade às drogas entre as diferentes cepas de *T.*

cruzi (ANDRADE, 1992; KIRCHOFF, 1999). Tem sido demonstrado que a interleucina (IL-12) e o interferon (IFN- γ) constituem o eixo essencial do sistema imunológico para a cura parasitológica induzida por drogas (BAHIA-OLIVEIRA, 2000; ROMANHA, 2002). Ambas drogas apresentam efeitos colaterais significativos, provavelmente como consequência dos danos de oxidoredução nos tecidos do hospedeiro. Esses efeitos colaterais incluem anorexia, vômitos, polineuropatia periférica, leucopenias e dermatopatias alérgicas (KIRCHOFF, 1999).

A maior limitação desses compostos é sua baixa atividade antiparasitária na forma crônica da doença. 80% dos pacientes tratados não são curados parasitologicamente (CANÇADO, 1999; KIRCHOFF, 1999). Isso é constatado na positividade persistente apresentada na sorologia dos pacientes e na evolução clínica dos mesmos (CANÇADO, 1999). As razões para as diferenças na eficácia entre as fases aguda e crônica poderiam ser relatadas como propriedades farmacocinéticas insatisfatórias nos estágios crônicos (URBINA, 2002). Contudo, alguns estudos demonstram que pacientes sujeitos ao tratamento com benznidazol, embora não curados parasitologicamente, tiveram reduções nas mudanças do eletrocardiograma e na frequência de deterioração da sua condição clínica (BAHIA-OLIVEIRA, 2000; VIOTTI, 1994).

O conhecimento crescente da biologia celular e das vias biossintéticas básica do *T. cruzi* tem permitindo a produção de novas terapias específicas e promissoras para a doença de Chagas, como descritas a seguir.

O *T. cruzi* requer esteróis específicos para a viabilidade e proliferação das suas células em todos os estágios do seu ciclo de vida, e é extremamente suscetível frente aos inibidores da biossíntese do ergosterol *in vitro*. O cetoconazol e o itraconazol não são poderosos o bastante para eliminá-lo na forma crônica da doença (URBINA, 2002). Em contraste, estudos realizados no Chile com itraconazol, demonstraram que doses diárias de 6mg/kg durante 120 dias reduziram marcadamente o número de xenodiagnósticos positivos (50% dos casos) e diminuíram em 97,8% as anormalidades do eletrocardiograma (APT, 2003). Aliada a essa redução marcante da carga parasitária somam-se efeitos colaterais leves ou ausentes. Derivados de triazol como o D0870 e o posaconazol, também inibidores da síntese do ergosterol, foram capazes de induzir cura parasitológica total em modelos murinos nas fases crônica e aguda da doença. Além do mais, tais compostos foram capazes de erradicar cepas resistentes ao nitroimidazol e ao nitrofurano presentes em ratos infectados, até se o hospedeiro estivesse imunossuprimido (URBINA, 2002).

Recentemente, outros triazólicos tais como ravuconazol, TAK-187 e UR-9825, também têm mostrado atividade tripanossomicida *in vivo* e *in vitro* (URBINA, 2003).

O *T. cruzi* contém uma L-catepsina semelhante à protease cisteína denominada cruzipain, a qual é responsável pela maior atividade proteolítica em todos os estágios de vida do parasita (CAFFREY, 2000; CAZZULO, 2001). Inibidores específicos desta protease bloqueiam a proliferação de ambas as formas epimastigotas extracelular e amastigotas intracelular, além de inibir a metaciclogênese *in vitro*, indicando que essa enzima desempenha papel essencial para a sobrevivência e crescimento do parasita. Esses inibidores podem prolongar a sobrevivência e induzir a cura parasitológica em modelos murinos nas fases aguda e crônica da doença, com toxicidade mínima (ENGEL, 1998; CAFFREY, 2000; CAZZULO, 2001).

Muitos desses compostos, incluindo o N-metil-piperazina-uréia-F-hF-vinil-sulfonil, foram ativos em baixa concentração, na faixa nanomolar, contra a molécula pura de cruzipain, demonstrando atividade contra amastigotas intracelulares *in vitro* (DU, 2002).

Os tripanossomatídeos contêm organelas especializadas denominadas acidocalcissomas, que estão envolvidas no estoque de cálcio e polifosfatos, e na adaptação desses microrganismos ao ambiente de estresse. O cálcio que entra e sai da matriz do acidocalcissoma é regulado por uma série de mecanismos incluindo Ca^{+2} ATPase, o trocador Na^+/H^+ e as pirofosfatases das bombas de prótons (DOCAMPO & MORENO, 2001). Os Bisfosfonatos, que são metabólitos inorgânicos inertes semelhantes ao pirofosfato, são seletivamente acumulados no parasita e podem inibir enzimas envolvidas nas reações de pirofosfatases orgânica e inorgânica, tais como a esqualeno sintase, a farnesil-pirofosfato sintase ou as pirofosfatases das bombas de prótons (MONTALVETTI, 2001). Esses compostos têm uma atividade potente e seletiva *in vivo* e *in vitro* (DOCAMPO & MORENO, 2001).

Os tripanossomas são absolutamente deficientes na biossíntese de purinas. Eles conseguem esses compostos essenciais no meio de crescimento. Uma enzima chave desta via é a hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT), alvo bioquímico nesses organismos. Nos tripanossomatídeos, o alopurinol age como um análogo de purina e é incorporado, através da HGPRT no DNA dos parasitas e assim, interrompendo a síntese de RNA e proteínas. O alopurinol apresenta diferenças marcantes de susceptibilidade entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (STOPPANI, 1999).

Várias outras vias bioquímicas têm sido identificadas como alvos potenciais para a quimioterapia do *T. cruzi*, incluindo as enzimas envolvidas na síntese e metabolismo redox do trypanotione [N¹, N⁸-bis (glutationil)-espermidina]. Essa via é única no protozoário e requer glutatona e glutatona reduzida no sistema tioredox intracelular (SCHMIDT & KRAUTH-SIEGEL, 2002).

A diidrofolato redutase, uma enzima que catalisa o passo crucial na neossíntese de nucleotídeos do DNA, é outro alvo potencial. Embora alguns inibidores dessa via tenham atividade anti-*T. cruzi* seletiva *in vitro*, a significância e seletividade *in vivo*, ainda precisam ser demonstradas (SARAIVA, 2002).

Outros compostos com promissora atividade anti-*T. cruzi* são: análogos dos lisofosfolipídeos como o miltefosine, que tem destacada atividade oral contra leishmanias e atividade *in vivo* nas infecções experimentais de *T. cruzi*; e inibidores do fenil e N-miristoil transferase, como potenciais agentes tripanossomicidas (GELB, 2003).

2.0. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A doença de Chagas é uma doença parasitária endêmica que afeta mais de 20 milhões de pessoas na América Latina. A maior parte das pessoas infectadas apresenta-se com a forma crônica da doença estabelecida, acarretando em 30-40% dos casos, lesões cardíacas e gastrointestinais irreversíveis como consequência de um processo inflamatório associado à persistência parasitária (BRENER, 1997; TARLETON, 2001).

A quimioterapia disponível atualmente, baseada no nitroimidazol (benzonidazol) e no nitrofurano (nifurtimox) é insatisfatória porque ambas as drogas têm eficácia limitada no estágio crônico, induzindo efeitos colaterais tóxicos no hospedeiro. O nifurtimox após ter sido amplamente usado no Brasil e em outros países latino-americanos foi retirado do mercado farmacêutico (DOCAMPO & URBINA, 2003; FERREIRA, 1990; SOSA *et al.*, 1999).

A citogenotoxicidade induzida pelas drogas pode limitar a dose e duração do tratamento, afetando a qualidade de vida dos pacientes. Os efeitos colaterais aliados à toxicidade tecidual induzem em longo prazo alterações no sistema imune e evidência de malignidades, provavelmente devido aos danos genéticos induzidos pelo tratamento com as drogas (GUPTA *et al.*, 1996).

As substâncias liquênicas têm demonstrado importantes atividades biológicas sendo utilizadas desde a antiguidade. Todavia, trabalhos sobre o efeito das substâncias liquênicas sobre parasitas para saúde pública ainda são escassos.

Recentemente, estudos de substâncias liquênicas contra protozoários parasitas têm demonstrado a eficácia do ácido úsnico contra a leishmaniose cutânea quando utilizado intralesionalmente, (FOURNET *et al.*, 1997), e o ácido úsnico extraído da *Cladonia substelatta* mostrou-se efetivo contra todas as formas evolutivas do *T. cruzi* (CARVALHO *et al.*, 2004). Desta forma, torna-se viável e promissor analisar os efeitos *in vitro* de extratos orgânicos de *Cladonia salzmannii* contra o *T. cruzi*.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a atividade “*in vitro*” do extrato orgânico e do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* Nyl. sobre a forma evolutiva epimastigota do *T. cruzi*.

3.2. Específicos

- Identificar, isolar e purificar o ácido barbático, principal composto de *C. salzmannii* Nyl.
- Identificar as possíveis modificações morfológicas do ácido barbático sobre a forma evolutiva epimastigota de *T. cruzi*, através da análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

4.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAN, E.P., FLOREY, H.W. Antimicrobial substances from lichens and algae. **Antibiotic**, v. 1, n. 13, p. 566-577, 1949.

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

AKHAVAN D. Análise do custo-efetividade do programa do controle da doença de Chagas no Brasil. Brasília: **Ministério da Saúde/FNS**, p. 33,1997.

ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. **Introductory Micology**, New York, J. Wiley e Sons, p.632, 1979.

ANDRADE, P.P. & ANDRADE, C.R. **Etiologia**. IN: Doença de Chagas (MALTA, J. ed.). São Paulo, edt. Savier. p. 1-11, 1996.

ANDREWS N.W, HONG K.S, ROBBINS E.S, NUSSENZWEIG V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 474-484, 1987.

ANDREWS N.W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biological Research**, v. 26, p. 65-67, 1993.

ANDRADE S.G. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 624-626, 1992.

APT W. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of eletrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 23-29, 2003.

ASAHINA, Y. & SHIBATA, S. Chemistry of Lichen Substances. **Japan Society for the Promotion of Science**, Tokio, p.240, 1954.

BAHIA-OLIVEIRA L.M.G. Immunological and clinical evaluation of Chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 634-638, 2000.

BONALDO M. C, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W, GOLDENBERG S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 1349-1358, 1988.

BOOTHROYD, J. C. 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, 1990.

BRENER Z., ANDRADE Z. A & BARRAL-NETO M. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. 2^a edição, Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara koogan S.A, p.1-126,2000.

BRENER Z, GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p.103-110, 1997.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. IN: ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*** (BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. eds.) Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2^a ed. p. 379-388, 2000.

BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Em: Dias JCP, Coura (eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, p. 29-32, 1997.

BURKHOLDER P.R. & EVANS A.W. Further studies on the antibiotic activity of lichens. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.72, n. 2, p. 157-164, 1945.

CAFFREY C.R. Cysteine proteinases of *Trypanosoma* parasites: novel target for chemotherapy. **Current Drug Targets**, v. 1, p. 155-162, 2000.

CANÇADO J.R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 331-336, 1999.

CARVALHO E.B.C., ANDRADE P.P., SILVA N.H., PEREIRA E.C., FIGUIREDO R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study. **Micron**, JMIC 782- 21/10/2004-17:23-SATHYA-122630-XML MODEL 5-PP.1-7.

CAVALCANTI L.H.S., MAIA R.F. Atividade antimicrobiana in vitro da antranorina. **Revista Microbiológica**, São Paulo, 14 (3): 168-171, 1983.

CAZZULO J.J. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1143-1156, 2001.

CHAGAS C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, p. 159-218, 1909

CHAGAS C. Tripanossomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 37-60, 1916.

CHAGAS E. Infection expérimentale de l'homme par le *Schizotrypanium cruzi* **CR. Social Biology**, v. 121, p. 769-771, 1936.

COCCHIETTO M, SKERT N, NIMIS P.L. & SAVA G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, n.4, p.137-146, 2002.

COHEN P. A, HUDSON J.B & TOWERS G.H. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. **Experientia**, v. 52, p. 180-183, 1996.

CROWELL BC. The acute form of America Tripanosomiasis. Notes on its pathology, with autopsy report and observations on tripanosomiasi cruzi in animals. **American of Journal Tropical Medicine**, 3:425-452, 1923.

CULBERSON, C. F. Supplement to chemical and botanical guide to lichen products. **The Bryologist**, v. 73, p. 177-377, 1970.

DE SOUZA, W. Cell Biology of Trypanogoy cruzi. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

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

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanossoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n.4, p. 269-285, 2002.

DIAS, J.C.P, BORGES DIAS, R. Aspectos econômicos sociais e culturais na doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, 31 (supl): p. 105-117, 1979.

DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas'disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 147-156, 1989.

DIAS, J.C.P. Tratamento específico para doença de Chagas. <http://www.vergentes.com.br/chagas/otrutam.htm>, 1999.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, p.1-27,1990.

DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, p. 151-159, 2001.

DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. **Current Drug Targets Infectious Disorders**, v. 1, p. 51-61, 2001.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1157-1164, 2001.

DOCAMPO, R. & URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**. v.19, n.11, 2003.

DU, X. Syntesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DVORAK, J.A.. New approach to qualification of Trypanosoma cruzi-vertebrate interactions, In: American Trypanosomiasis Research. **PAHO** Scientific Publication No. 318 Session II. A. The Parasite and the Host's Response. **PAHO**, Washington, DC, 109-120, 1976.

ENGEL, J.C. Cysteine protease inhibitors cure exiperimental Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 725-734, 1998.

ESIMONE C.O & ADIKWU M.U. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. **Fitoterapia**, v.70, p. 428-438, 1999.

ESPINOSA R, CARRASCO HÁ, BELANDRIA F, FUENMAYOR A.M, MOLINA C, GONZÁLES R, MARTÍNEZ O. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease:prognosis after one decade (1973-1983). **International Journal of Cardiology**, v. 8, p. 45-56, 1985.

FAHSELT, D. Secondary Biochemistry of Lichens. **Symbiosis**, v. 16, p.117-165, 1994.

FERREIRA H.O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.23, n. 4, p. 209-211, 1990.

FIGUEIREDO, R.C.B.Q. & SOARES, M.J. The golgi complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. J. Submicrosc. **Cytology Pathology**, v. 27, n. 2, p. 209-215, 1995.

FIGUEIREDO, R.C.B.Q. & SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213-1218, 2000.

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

GELB, M.H. Protein farnesyl and N-myristoyl transferases:piggy-back medical chemistry targets for the developments of antitrypanosomatid and antimalarial terapheutics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.155-163, 2003.

GOLLAPUDI, S.R., TELIKEPALLI, H., JAMPANI, H.B., MIRHOM, Y.W., DRAKE, S.D., BHATTIPROLU, K.R., VAN DER VELDE, D., MITSHER, L.A. Aleptosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen *Alectoria samentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 934, 1994.

GONZALES-PERDOMO, M., ROMERO, P., GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 66, p. 205-212, 1988.

GUPTA, R.L., VATS, V., JUNEJA, T.R. Activation of tinidazole, an antitrypanosomal drug to a mutagen by mammalian liver S9. **Mutation Research**, v. 370, p.195-201, 1996.

HALE M.E, J.R. **The biology of lichens**. 3^a edição. Curator, Department of Botany, Smithsonian Institution. British: Edward Arnold Ltd, p. 1-49, 1983.

HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. Developmental stages of tripanosomatid flagellates; a new terminology. **Nature**, v. 212, p. 1385-1386, 1966.

HONDA, N.K. & VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química nova**, v. 21, n.6, p. 110-125, 1998.

HUNECK, S. & YOSHIMURA, Y. **Identification of lichen substances**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1996.

HUOVINEN K, LAMPERO M. Usnic acid as a mitotic inhibitor in the *Alum* test. **Planta Medica**, v. 55, p. 98, 1989.

HURST, A.F., RAKE, G.W. Achalasia of the cardia (so called cardiospasm). **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 23, p. 491-508, 1930.

IANNI, B. M. & PEREIRA-BARRETO, A.C. A forma indeterminada da doença de Chagas: Conceito e implicações médico legais. **Revista da Sociedade de Cardiologia Estado de São Paulo** v. 4, p. 129-32, 1994.

INGÓLFSDÓTTIR, K., BLOOMFIELD, S.F. & HYLANDS, P.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potencial preservatives. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutic**, p. 289-292, 1985.

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

INGOLFSÐÓTTIR, K. Molecules of Interest, Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

KIRCHOFF L.V.Chagas disease (American Trypanosomiasis): A tropical disease now emerging in the United States. In *Emerging infections 3* (Scheld, W.M. et al., eds), p.111-134, **ASM Press**, 1999.

KLEFFMANN, T., SCHMIDT, J., SCHAUB, G.A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, p. 548-555, 1998.

KÖBERLE, F. Cardiopatía chagásica. **O Hospital**, v. 53, p. 311-346, 1958.

LARANJA FS. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, p. 482-491, 1953.

LARANJA, F.S., DIAS, E., NÓBREGA, M.D., MIRANDA, A. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic, and pathological study. **Circulation**, v. 14, p.1035-1060, 1956.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K. ;PETERS, T. & MARRE, R. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2541-2543, 1995.

LEY, V., ANDREWS, N.W., ROBBINS, E.S., NUSSENZWEIG, V. Amastigotis of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 649-659, 1988.

LIMA, R.C., SILVA, N.H., SANTOS, N.P., ALCANTARA, S.R., PEREIRA, E.C., Atividade antitumoral de *Heterodermia leucomela* e *Teloschistes flavicans* (Liquens). **XIII Simpósio de Plantas Medicinais no Brasil**, UFC, Ceará, Resumo. p.173, 1994.

LIPES, E.R., MARCAL, M.V.L., SIADÉ, C., ASAI, K.R., ARAÚJO, F.R., RIVAS, L.G., MORAES, R.R. ET AL. Estudo comparativo da frequência de morte súbita por doença de Chagas, em Uberaba nos de 1980 e 1990. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 109-112, 1995.

LOPES E.R., CHAPADEIRO E. Doença de Chagas no Triângulo Mineiro. **Revista Goiana de Medicina**, v. 32, p.109-113, 1986.

MACEDO V. Forma indeterminada da doença de Chagas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 38, p. 34-40, 1980.

MARTIN-NETO, J.A., MACIEL, B.C., SIMÕES, M.V. Clinical aspects of Chagas' heart disease. Em: Rose BD, PODRID PJ, GERSH BJ (eds).UpToDate in Cardiovascular Medicine, a **CD-ROM textbook**. Wellesley, MA, USA: UpToDate in Medicine, Inc, 1997.

MILDER, R. & DEANE, M. P. The cytostome of *Trypanosome cruzi* and *T. Conorhini*. **The Journal of Protozoology**, v. 16, n. 4, p. 730-737, 1969.

MONTALVETTI, A. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33930-33937, 2001.

MORALES J.R., MARCH, C.M., ABREGO, D.G. Situación epidemiológica actual de la enfermedad de Chagas en la Provincia de Mendoza. **Revista da Faculdade de Ciencias Medicas da Universidade Nacional Cuyo, Argentina**, v. 11,p. 17-22, 1989.

MOYA P., MORETTI, E.R.A.Doença de Chagas congênita. Em: Dias JCP, Coura (eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, p. 383-410, 1997.

MÜLLER, K. & KUMAR S. Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B₄ biosynthesis in HaCaT, cell growth. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34,p. 1035-1042, 1999.

NASCIMENTO, S. L., PEREIRA, E.C., OLIVEIRA, A.F.M., SILVA, N. H., BOITARD, M., BERIEL, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: *Cladoniaceae*. **Acta Botânica Brasílica** 8 (1): 97-108, 1994.

NASH, T.H. Lichen Biology. British: **Cambridge University Press**, p.1-240, 1996.

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

NISHITOBA, Y, NISHIMURA, H, NISHIYAWA, T, MIZUTANI, J. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3181, 1987.

PAN, S.C. *Trypanosoma cruzi*: intracelular stages grow in a cell-free medium at 37 °C. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 45, p. 215 – 224, 1978.

PERRY, N.B., BENN. M.H., BRENNAN, N.J., BURGESS, E.J., ELLISS, G., GALLOWAY, D.J., LORIMER, S.D., TANGNEY, R.S. Antimicrobial antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichen. **Lichenologist**, v. 31. p. 627-636, 1999.

RAMAUT J-L, CORVISIER M. Effects inhibitors; des extraits de *Cladonia impexa* Harm., *C. Gracilis* (L.) Wild. et *Cicularia muricata* (Ach.) Ach. Sur la germination des graines de *Pinus sylvestris* L. **Oecol Plant** v. 10, p. 295, 1975.

RANGEL-ALDAO, R., TRIANA, F., COMACHE, G., ABATE, T., FERNANDEZ, V., McMAHON-PRATT, D. Intracellular signaling transduction in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*: role of cAMP. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, v. 21, p. 403-408, 1988.

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

RODRIGUEZ, A., WEBSTER P., ORTEGO, J., ANDREWS, N.W. Lysosomes behave as calcium-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, p. 93-104, 1997.

ROMAÑA, C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). **Public MEPRA**, v. 22, p.16-28, 1935.

ROMANHA, A.J. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitological cure. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p.823-828, 2002.

SARAIVA, V.B. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocoline (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemotherapeutic**, v. 46, p. 3472-3477, 2002.

SCHIMDT, A. & KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the Trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p.1239-1259, 2002.

SOSA, ESTANI, S., SEGURA, E.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, (Sup.1), p. 363-365, 1999.

STOPPANI, A.O.M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina** **59** (Suppl. 2), p. 147-165, 1999.

TARDIEUX, I., WEBSTER, P., RAVESLOOT, J., BORON, W., LUNN, J.A., HEUSER, J.E., ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion mammalian cells. **Cell** v. 71, p. 1117-1130, 1992.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 550-554, 2001.

TEIXEIRA, A. **Doença de Chagas e Outras Doenças por Trypanossomos**. Brasília, DF: Editora Universidade de Brasília, p.13-26, 1987.

THOMSON, J.W. The lichen genus *Cladonia* in North American. **University of Toronto Press**, Toronto, 1968.

TYLER, K.M, ENGMAN, D.E. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 46, p. 269-278, 2000.

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 287-295, 2002.

URBINA, J.A. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 39-48, 2003.

VICENTE, C. **Fisiologia de Las Sustancias Liguênicas**. Madrid: Allanbra, p.162, 1975.

VICKERMAN, K., PRESTON, T.M. Biology of kinetoplastida. Comparative cell biology of kinetoplastid flagellates. New York: WHR & Evans DA Eds. **Academic Press**, v.1, p. 35-128, 1992.

VIOTTI R. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, p. 151-162, 1994.

XAVIER-FILHO, L. & RIZZINNI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**, Recife, Edit. UFPE, p.431, 1976.

YAMAMOTO, Y., MIURA, Y., KINOSHITA, Y., HIGUCHI, M., YAMADA, Y., MURAKAMI, A., OHIGASHI, H., KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of some lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. **Chemistry Pharmacology**. Bull v. 43, p.1388, 1995.

ZELEDÓN, R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. Geneva: **Ciba Foundation Symposium**, v. 28, p. 51-77, 1974.

WANDERLEY, D.M.V. Perspectiva de controle da doença de Chagas no Estado de São Paulo. **Tese de Doutorado**. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 89, 1994.

WENDEL, S. Doença de Chagas Transfusional. Em: Dias JCP, Coura (eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, p. 411-428, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Model Prescribing Information**. World Health. p. 25, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. **WHO Technical Report Series** 811, Geneve p. 96, 1991.

5. ARTIGO A SER PUBLICADO

***In vitro* effects of organic extract and pure barbatic acid from *Cladonia salzmannii* Nyl on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms**

Carlos Fernando, B. Vasconcelos^a; Regina, C.B.Q. Figueiredo^b; Eugênia, C. Pereira^c; Nicácio, H. da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Mores Rego S/N, 50660-420 Recife, PE, Brazil. ^b Departamento de biologia celular e ultraestrutura, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. ^c Departamento de Ciências Geográficas; Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50.740-530, Recife-PE, Brazil.

Abstract

Chemotherapy for Chagas' disease is still unsatisfactory due to toxicity and limited effectiveness of the available drugs. In this work we have investigated the effect of ether extract and barbatic acid isolated from lichen *Cladonia salzmanni* Nyl., against *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Both compounds were tested at 5, 10, 20 and 40 µg/mL, with daily evaluation of growth rate, during 4 days. The results showed the ether extract more effective against the parasite in all tested concentration, while the barbatic acid showed no significant inhibition under 5 and 10 µg/mL. The highest effectiveness of ether extract can be due to other compounds in the extract, as D-barbatic, thamnolic and D-thamnolic acids. Morphological changes, as well as induction aberrant-shaped cells in drug treated parasites observed by transmission and scanning electron microscopy. Despite of needing further about pathophysiological effects of *Cladonia salzmannii* products, the results point towards the potential use of barbatic acid as chemotherapeutic agent against Chagas' disease.

KEY WORDS – *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, *Cladonia salzmannii*, barbatic acid.

1. Introduction

Chagas' disease is a serious health problem in South America, particularly in Brazil. More than 5 million brazilians are affected, with major losses in work ability and life quality (WHO, 1990; MONCAYO, 1993). Etiological agent of this disease is the haemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans and other mammals by triatomine bugs, with further human infection occurring by blood transfusion and transplacentally. Therapy for Chagas' disease is unsatisfactory, due to the significant

toxicity of the available drugs (nifurtimox and benznidazole). Although both compounds may reduce the acute phase and decrease mortality; parasitological cure is achieved in only 60% of acute patients and their use during the chronic phase is a matter of considerable discussion (DE CASTRO, 1993; ESTANI *et al.*, 1998). Furthermore, differences in the susceptibility of *T. cruzi* strains to these drugs have been reported (FILARDI *et al.*, 1987).

Lichens are organisms composed by a fungus and one or more algae. These slow-growing organisms produce secondary metabolites, and many of them are known for presenting biological and/or pharmacological activities (YAMAMOTO *et al.*, 1995). Even though these activities of lichen metabolites have now been recognized, their therapeutic potential has not yet been fully explored. Depsides, as barbatic and diffractaic acids, are distinct class of lichen-derived compounds, which are formed by condensation of two or more hydroxybenzoic acids whereby the carboxyl group of one molecule is esterified with a phenolic hydroxyl group of a second molecule (Figure 5). (KUMAR *et al*, 1999-a) Diffractaic acid is one of the most common secondary metabolites of many lichen species. This compound has been shown to exhibit antiviral, antitumor, analgesic and antipyretic activity (HUNEK & YOSHIMA,1996). On the other hand, the biological activity of barbatic acid is rarely reported in the literature. The aim of this study was to analyze, *in vitro*, the potential trypanosomal activity of ether extract and pure barbatic acid from *Cladonia salzmannii*. on growth and ultrastructure of *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease.

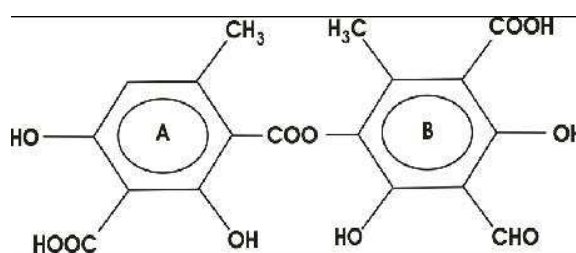


Figure 5 - Structural formula of barbatic acid

2. Materials and methods

2.1 Parasites

T. cruzi epimastigotes (Dm28c clone) were axenically maintained at 28,8 °C in LIT medium supplemented with 10% fetal bovine serum (CAMARGO, 1964) and harvested at the exponential phase of growth.

2.2 Lichen material

Collection and storage *Cladonia salzmannii* Nyl., occurred in Bonito County, NE of Brazil, was collected (150g) and kept in paper bags at room temperature (28° C ± 3° C), until biological and chemical assays.

The species was identified by one of the authors (E. C. PEREIRA) through morphological and chemical thallus characteristics.

The lichen material was deposited at UFP herbarium (Universidade Federal de Pernambuco).

2.3 Obtation of organic extracts

2.3.1 Exhaustion extraction

Thalli of powdered *C. salzmannii* (50g) were submitted to two sucessive extractions in mechanical shaker with diethyl ether. The material was kept at 2 to 4 °C, for 24h. After reaction, the lichen compound was extracted with choloform by the same procedure, with a final extraction with acetone. The extracts were evapored at room temperature and kept in dessecator until achieve constant weight (PEREIRA *et al.*, 1996).

2.3.2 Hot exhaustion extraction

Thalli of powdered *Cladonia salzmannii* (50g) were extracted sucessively with dyethyl ether, chloroform and acetone in a Soxlet apparatus during 8h at 40 °C. The extratcs were maintained at the same conditions mentioned above.

2.3.3 Barbatic acid isolation and purification

The major compound of *C. salzmännii*, barbatic acid, was isolated and purified from ether extract. After concentration, the extract was successively washed with chloroform in a G4 funnel, according to Asahina & Shibata (1954) modified by Pereira (1998).

2.3.4 Thin layer chromatography (TLC)

Qualitative data from organic extracts and purified barbatic acid from *C. salzmännii* were obtained through TLC.

Diluted extract and barbatic acid were applied in silica Gel 60 F₂₅₄+₃₆₆ plates (Merk) de 20cm x 20cm developed on A solvent system (toluene/dioxane/acetic acid, 180: 45: 5, v/v). After solvents evaporation the plates were visualized under UV short (254nm) and long (366nm) wavelengths. In the next step the plates were sprayed with H₂SO₄ (10%) and heated at 100°C for 40 min for spots color reaction (CULBERSON, 1972).

The results were evaluated by spots colors and their R_f values was compared with commercial barbatic acid standard.

2.3.5 High performance liquid chromatography (HPLC)

The organic extract (1,0 mg/mL) and barbatic acid (0,1 mg/mL) were analysed by HPLC in a Hitachi liquid chromatograph, coupled to an UV detector at 254nm.

The samples were injected in a reverse phase column (C18) with mobile phase methanol/water/acetic acid (80: 19,5: 0,5, v/v), flow 1,0 mL.min⁻¹, injection volume 20 µL, attenuation 0,04 and room temperature (28 ± 3 °C).

The results were evaluated by peak area of compounds and retention time (RT) in the column compared to the standard barbatic acid.

2.3.6 Effect of ether extract and barbatic acid on epimastigotes

Ether extract and pure barbatic acid were diluted in LIT medium at final concentration of 5, 10, 20, 40 µg/mL, and added to cell culture flasks containing 1×10^6 cells/mL. Aliquots (1 mL) were daily collected during four days and the culture growth was spectrophotometrically estimated at 630 nm, in triplicate. Optical density was assumed to be directly correlated to parasite number in culture medium. Epimastigotes growing in LIT medium containing 1% DMSO (solvent) were used as a control. Results were expressed as mean $\pm$ SE and analyzed by ANOVA and Newmam Keuls test. After 4 days, control and treated parasites were harvested by centrifugation and processed for transmission and scanning electron microscopy.

2.3.7 Electron microscopy

Control and treated culture epimastigotes, were harvested, at room temperature by centrifugation at 1500g, washed twice in PBS and fixed for 2 h at 4 °C in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. After washing in this same buffer, cells were post-fixed for 1 h in a solution containing 1% OsO₄, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The cells were then dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM 109 transmission electron microscope. For scanning electron microscopy, control and treated epimastigote were fixed as describe above. After fixation cells were washed in this same buffer, and allowed to adhered for 15 min. to the surface of glass previously coated with 0.1% poly-L-lysin. After incubation the coverlips were rinsed in cacodylate buffer, post-fixed, dehydrated in ethanol, dried at critical point with CO₂, coated with gold and observed in a JEOL scanning electron microscopy.

3.0 Results

3.1 Yield of organic extracts and purified barbatic acid

The yield of exhaustion organic extractions from 50g of dried lichen thalli is shown in table 1.

The total yield of extractions were 4,35% and 2,38% of dried thalli, respectively. The ether extract showed the highest content in both procedures.

The purification of barbatic acid from 500mg of ether extract (hot) corresponded to a yield of 98,6%.

Table 1. Yield of organic extracts of *Cladonia salzmanii* obtained by different Methodology.

<i>Hot Exhaustion Extraction</i>			<i>Exhaustion Extraction</i>		
<i>Extracts</i>	<i>Yield</i>		<i>Extracts</i>	<i>Yield</i>	
	<i>(G)</i>	<i>(%)</i>		<i>(G)</i>	<i>(%)</i>
Ethereous	1.342	2.68	Ethereous	0.920	1.84
Chloroformic	0.428	0.85	Chloroformic	0.081	1.63
Acetonic	0.412	0.82	Acetonic	0.182	0.37
Total	2.182	4.35	Total	1.082	2.38

3.2 Thin layer chromatography (TLC)

The organic extracts and purified barbatic acid were submitted to TLC (Figure 6). The barbatic acid was recognized as major compound (R_f 0,34) of *C. salzmanii*, in agreement with standard barbatic acid, identified and characterized through spectroscopic tests.

This acid was present in all extracts, alone in the chloroformic one, besides another unidentified spots.

Since the highest yield of hot ether extract, this sample was selected for subsequent assays.



Figure 6 - Thin layer chromatogram of organic extracts and purified barbatic acid from *Cladonia salzmännii* captions: 1) Extraction with chloroform; 2) Hot exhaustion extraction with chloroform; 3) Extraction with acetonic; 4) Hot exhaustion extraction with acetonic; 5) Extraction with ether; 6) Hot exhaustion extraction with ether; 7) Standard of barbatic acid.

3.3 High performance liquid chromatography

Through HPLC analysis was possible to determine the barbatic acid concentration on ether extract, as well as the purity of isolated material.

The ether extract chromatogram showed four peaks, whose major compound (RT 17,66 min) corresponded to standard barbatic acid . This result ratifies the TLC assays. The other peaks can be other refered compounds for *C. salzmännii* as D-barbatic, thamnolic and D-thamnolic acids (AHTI *et al.*, 1993).

The purified barbatic acid showed retention time similar to comercial barbatic acid used as standard , with a high purity degree (97%), (Figure 7).

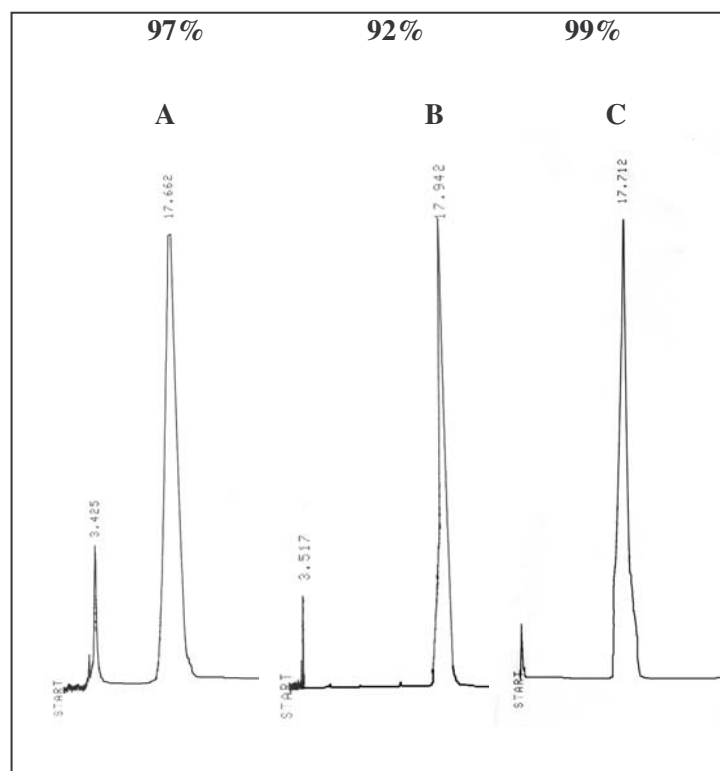


Figure 7. - High performance liquid chromatograms of purified barbatic acid (a), ether extract (b), and standard barbatic acid (c) obtained from *Cladonia salzmännii*

3.4 Effect of ether extract and barbatic acid on *Trypanosoma* growth and ultrastructure

Ether extract and pure barbatic acid from *Cladonia salzmännii* were tested for their *in vitro* anti-trypanosomal activity toward *T. cruzi* epimastigote forms. Incubation of epimastigote cultures of *T. cruzi* with different concentrations of both ether extract and pure barbatic acid resulted in a decrease of O.D. values. Although the ether extract (Figure 8A) has been shown more effective against *T. cruzi*, their inhibitory effect on parasite proliferation was statistically significant only after 72 hours of cultivation, for all tested concentration. In barbatic-treated cultures, no significant inhibition could be observed with 5 and 10 µg/mL concentrations at any time of cultivation (Figure 8B).

Observation of untreated epimastigotes by transmission electron microscopy showed a centrally located nucleus, a single elongated mitochondrion running along the cell body, a compact condensation of mitochondrial kinetoplast DNA and reservosomes, the latter corresponding to the prelysosomal compartments in this parasite, and located at the

posterior end of parasites (Figure 9A). Ultrastructural analysis of both ether extract (Figure 9B-C) and barbatic acid- treated-epimastigotes (Figure 10) showed marked changes including swelling and vacuolation of mitochondria and kinetoplast, as well as loss of the mitochondrial cristae organization. Appearance of empty space in the cytoplasm with loss of ribosomes and blebbing formation at plasma membrane (Figure 10A) were usually observed. These morphological changes were present in all samples and the number of affected cells was directly correlated to drug concentration. Severe cell damage was observed at higher drug concentrations. Blebbing formation and plasma membrane rupture (Figure 10B), are also commonly observed. Large aberrant shaped vesicles, presenting membranous and condensed material were observed in the cytoplasm of these parasites (Figure 10C). Marked vacuolation of mitochondrial matrix with the presence of large vesicles containing membranous profiles and particulate material at the posterior end of parasite (Figure 10D).

Scanning electron microscopy confirmed the data obtained by transmission electron microscopy, particularly concerning the organization of plasma and flagellar membranes. Using 40 µg/mL of barbatic acid was observed portions of membrane formed blebs, which in some cases completely detached from parasite body (Figure 11B). Aberrant dividing cell presenting more than two flagella were seen in all tested concentrations (Figure 11C). Treated epimastigote forms showing an altered plasma and flagella membranes with corrugated appearance and bleb formation (Figure 11D).

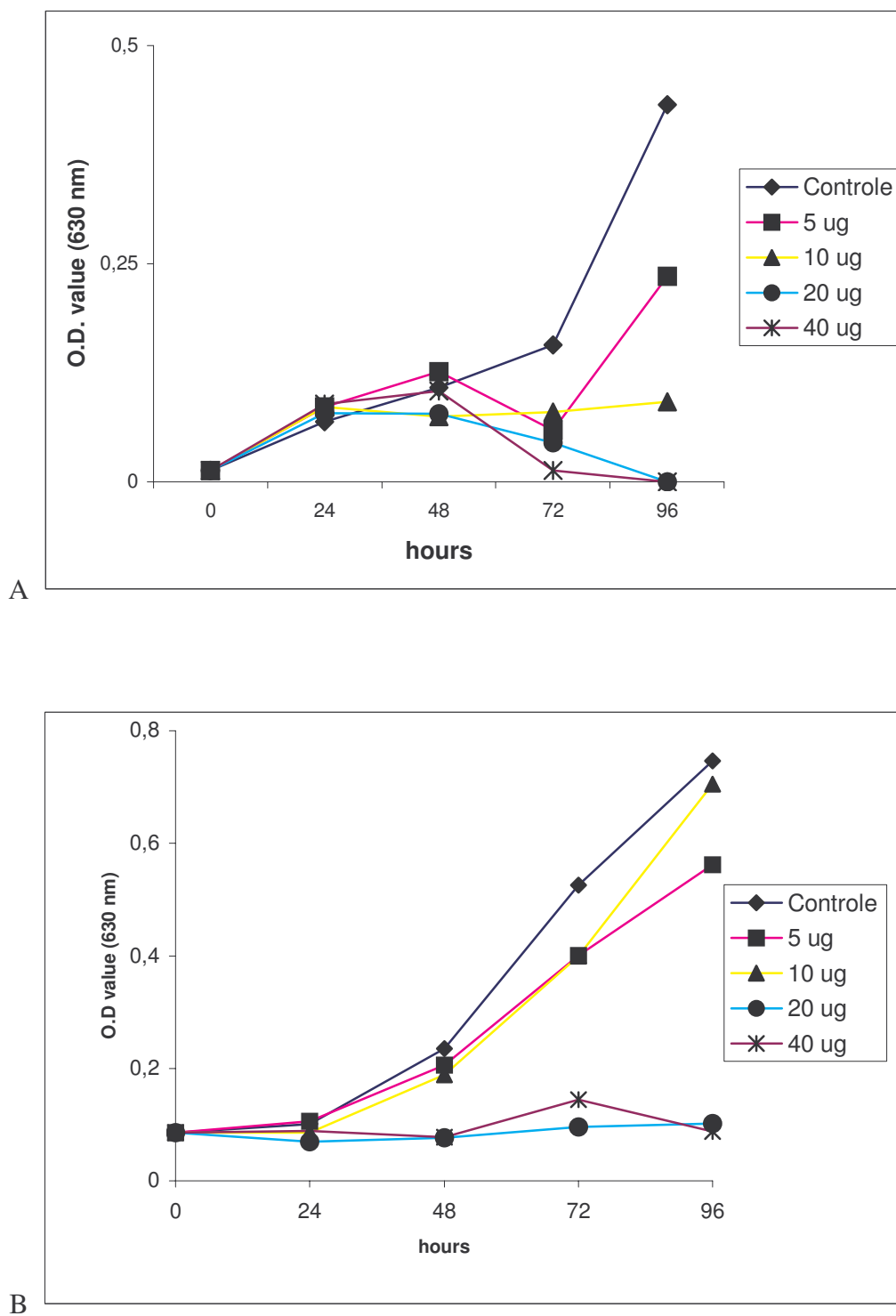


Figure 8 - Inhibitory effect of ether extract (a) and pure barbatic acid (b) from *Cladonia salzmannii* on epimastigote growth: (♦) control; (■) 5 µg/mL; (▲) 10 µg/mL; (●) 20 µg/mL; (*) 40 µg/mL. The points represent the mean value of three independent measurements

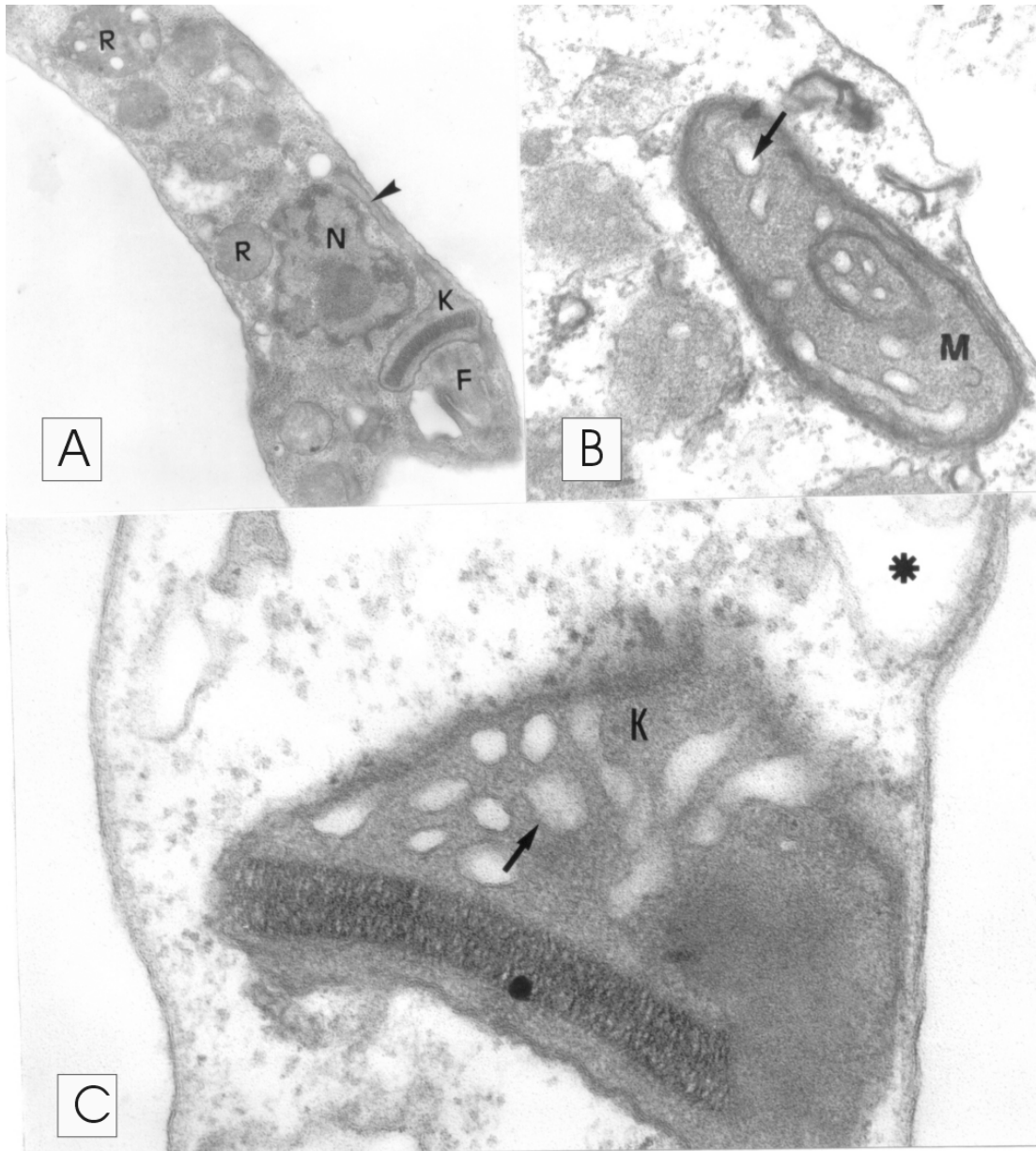


Figure 9. Ether extract-treated epimastigote forms. (A) Ultrastructure of control epimastigote form grown in LIT medium. Longitudinal section showing reservosomes (R) at the posterior end, the centrally located nucleus (N) and rod-shaped kinetoplast (K). Mitochondrial profiles (arrowhead) are observed immediately beneath the plasma membrane. X 33,000. (B) High magnification of epimastigote culture treated with 40 $\mu\text{g/mL}$ of barbatic acid showing swelling and vacuolation (arrow) of mitochondria matrix (M), Reservosomes (R) are spread throughout the cytoplasm. X 100,000. (C) – Treated-epimastigote form showing a vacuolation (arrow) of kinetoplast, loss of cytoplasmic and ribosomal content and presence of large vesicles beneath the plasma membrane (*) X 150,000.

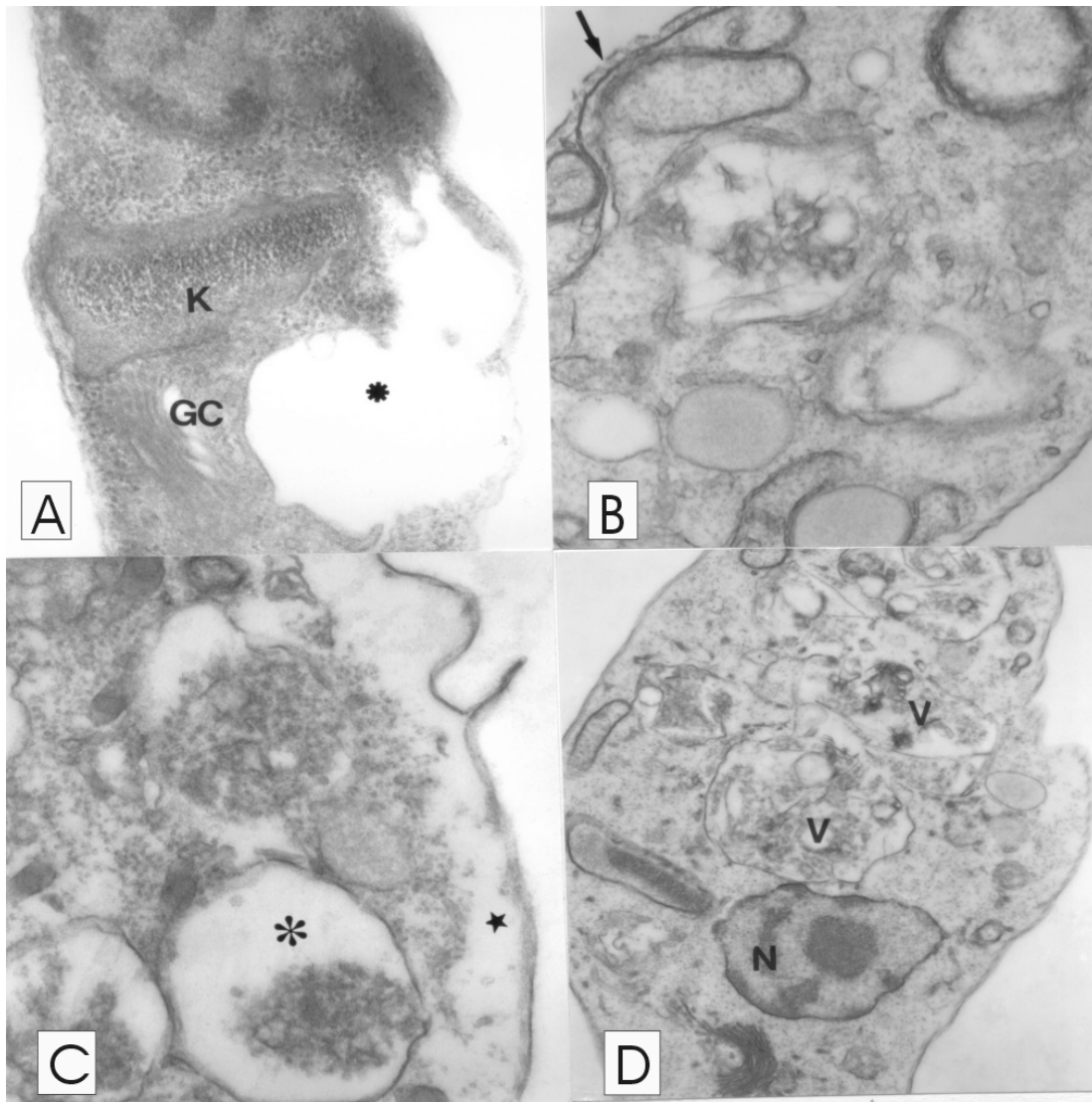


Figure 10 - Barbatic acid-treated epimastigote forms. (A) - Epimastigote culture treated with 5 µg/mL of barbatic acid large empty area in the cytoplasm (*). The nucleus (N), Golgi complex (GC) and Kinetoplast (K) presented a well preserved structure x 33,000. (B) - Large magnification of epimastigote treated with 20 µg/mL barbatic acid epimastigote showing rupture of cell membrane (arrow) and disorganization of organelle structures. Appearance of myelinic structures was also observed (arrowhead) x 33,000. (C) - Electron microscopy of epimastigote form treated with 40 µg/mL barbatic showing large vesicles in the cytoplasm presenting high material condensation (*). Note the corrugated aspect of plasma membrane which was partially detached (★). No subpellicular microtubules could be observed in this area x 33,000. (D) - marked vacuolation of mitochondrial matrix. General aspect of 40 µg/mL barbatic acid-treated cells. Note the presence of large vesicles containing membranous profiles and particulate material at the posterior end of parasite x 33,000.

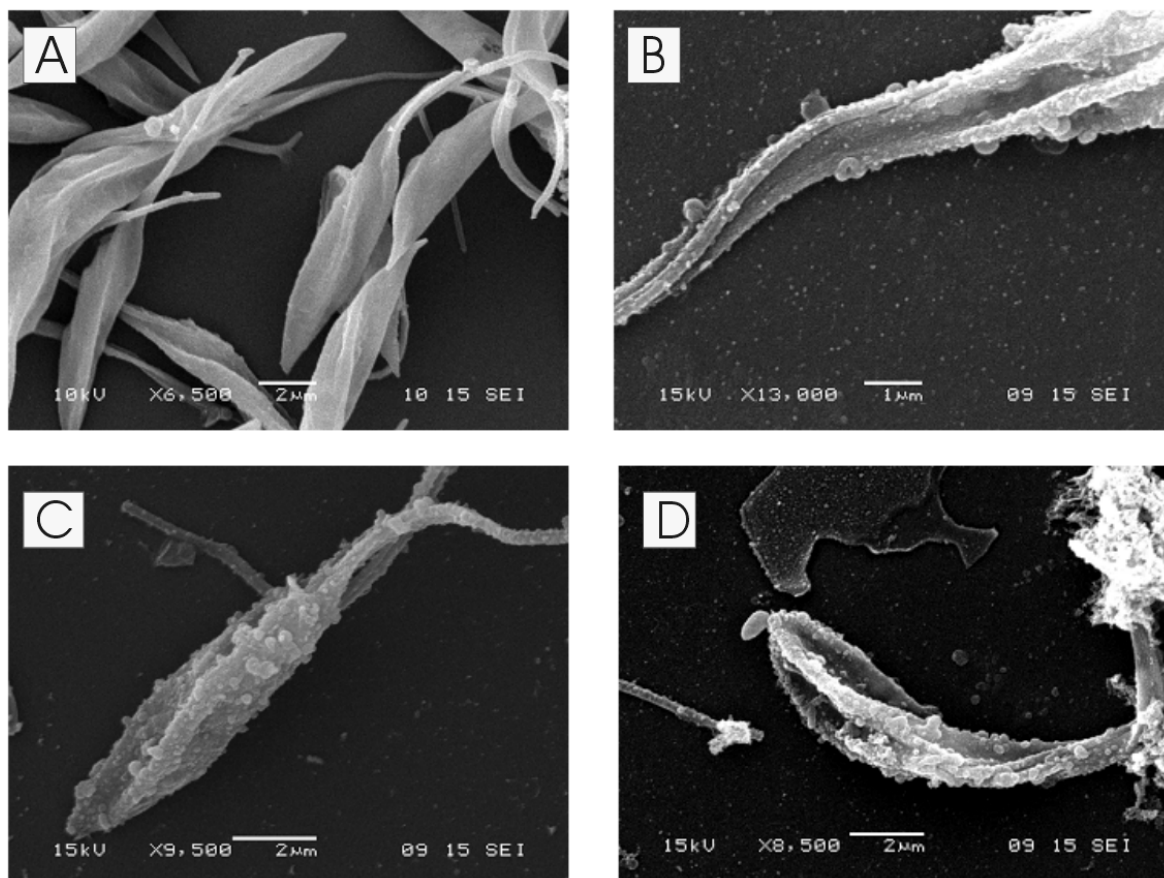


Figure. 11 - Scanning electron microscopy (SEM) of *Trypanosoma cruzi* epimastigote 40µg/mL of barbatic acid.. (A) - *T. cruzi*, without any drug treatment (control), showing a spindle shape and smooth plasma membrane. (B) Portions of membrane formed blebs, which in some cases were completed detached from parasite body. (C) Aberrant dividing cell presenting more than two flagella. (D) - Treated epimastigote forms showing an altered plasma and flagella membranes with corrugated appearance and bleb formation.

4.0 Discussion

Due to the high yield of compounds extracted by diethyl ether, as well as the increasing of temperature, the hot ethereous extract was used to biological assays.

The strong decrease of O.D. values found in both ether and pure barbatic acid treated cultures points to an effect on both growth and viability of epimastigote forms, mainly at 20 and 40 µg/mL concentrations. However the growth inhibition pattern was not similar for these two treatments. The ether extract have been shown more effective against epimastigote forms of *T. cruzi* when compared with barbatic acid alone. It is possible that other substances as, D-barbatic, thamnolic and D-thamnolic acids present in the extract, may act in synergism with barbatic acid. On the other hand, the weak effect on

cell proliferation at the first 48 hours of incubation, can be due to the lower permeability of *T. cruzi* plasma membrane to these compounds. A common feature of lichen compounds is their hydrophobic nature (MULLER, 2001). In our study, we identified the plasma membrane as a primary target for barbatic acid aciton. The increase in both cell and organelle volumes and loss of cytoplasm electrondensity corroborate this hypothesis. In this way, barbatic acid may accumulate in microbe cell membranes and increase their permeability, resulting in leakage of enzymes and metabolites. Diffractaic and barbatic acids have been identified as a non-redox inhibitors of the biosynthesis of leukotrienes in mammalian cells. Leukotrienes are derived from the biotransformation of arachidonic acid through the action of 5-lipoxygenase, and play a important role in a variety of phatophysiological states in humans (KUMAR *et al.*, 1999-b,c). In *Trypanosoma brucei*, archidonic acid has been demonstrated to be important in calcium influx regulation. The inhibition of arachdonic pathway can impair the calcium influx through the plasma membrane, leading to cell collapse and death (EINTRACHT *et al.*, 1998) Thus, another possibility is that barbatic acid act in some step of arachdonic biosynthesis pathway. The weak inhibitory effect on *T. cruzi* growth, observed at low concentrations may be due to existence of acidocalcosome in *T. cruzi*, which are organelles involved in calcium homeostasis. It's possible that at lower drug concentrations, acidocalcosome counterbalance the loss of Ca^{++} caused by drug treatment.

In addition to the above mentioned morphological effects it was observed that epimastigote treatment with barbatic acid and ether extract from *C. salzmännii* induced aberrant-shaped cells, most of them presented abnormal mitosis process, with displaced organelles. These data strongly suggest an additional inhibitory effect on microtubules, resulting in cytokinesis impairment.

In conclusion, although further studies are needed in order to elucidate the pathophysiological effects of ether extract and barbatic acid from *C. salzmännii*, either *in vivo* or *in vitro*, our results point towards the potential use of barbatic as a chemotherapeutic agent for Chagas' disease.

5.0 References

AHTI, T., STENROOS, S. & XAVIER-FILHO, L., 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. *Trop. Briol.*, v. 7, p. 55-70.

ASAHINA, Y. & SHIBATA, S., 1954. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, p. 240.

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*, v. 6, p. 93-100.

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

DE CASTRO, S., 1993. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, v. 53, p. 83-98.

EINTRACHT, J., MAATHAI, R., MELLORS, ALAN., RUBEN, 1998. Calcium entry in *trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid. *Biochemistry Journal* v. 336, p. 659-666.

ESTANI, S.S., SEGURA, E.L., 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in indeterminate phase of chagas' disease. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, v. 59, p. 526-529.

FILARDI, L.S., BRENNER, A., 1987. Susceptibility and natural resistance of *trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 755-759.

HUNECK S, YOSHIMURA Y., 1996. Identification of lichen substances. Springer, Berlin Heidelberg New York.

KUMAR, K.C., MULLER, K., 1999 a. Lichen metabolites, antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. Journal of Natural Products, v. 62, 821-823.

KUMAR, K.C., MULLER, K., 1999 b. Depsides as non–redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. EUR. J. Med. Chem., v. 34, p. 1035-1042.

KUMAR, K.C., MULLER, K., 1999 c. Depsides as non–redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 2. Novel analogues of obtusatic acid. EUR. J. Med. Chem. v. 35, p. 405-411.

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 pp. 67-75.

MULLER, K., 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 56, p. 9-16.

PEREIRA, E.C., SILVA, N. H., BRITO, E.S.A., SILVA, M.I.L., 1996. Atividade antimicrobiana de liquens amazônicos. Rev. U. A. Série Ciências Biológicas, v. 1, n. 1, p. 65-77.

YAMAMOTO Y, MIURA Y, KINOSHITA Y, HIGUCHI M, YAMADA Y, MURAKAMI A, OHIGASHI H, KOSHIMIZU K. Screening of tissue cultures and thalli

of some lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. Chem. Pharm. Bull, v. 43, p.1388, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Model Prescribing Information. World Health. p. 25, 1990.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr Raimundo Nazareno C. Pimentel for his technical assistance. This work was supported by CPqAM/FIOCRUZ, and UFPE.

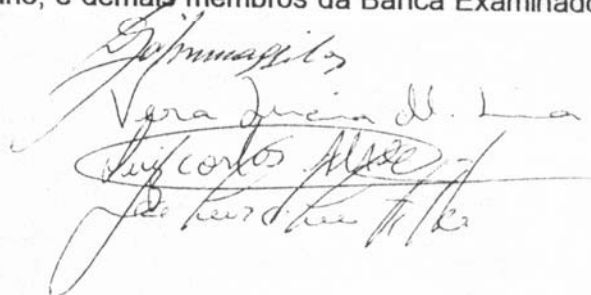
6.0 CONCLUSÕES

- Devido ao maior rendimento obtido, o processo de extração a quente provou ser a metodologia de escolha para obtenção do ácido barbático.
- O efeito inibitório do extrato etéreo foi mais evidente quando comparado ao do ácido barbático purificado. Isso pode ser devido provavelmente à presença de substâncias como os ácidos D-barbático, taminólico e D-taminólico que podem agir em sinergismo com o ácido barbático, potencializando sua ação. A ausência de efeitos nas primeiras 48h de tratamento com o extrato orgânico sugere uma menor permeabilidade do *T. cruzi* a esses compostos.
- Apesar das alterações morfológicas em organelas como reservossomos, mitocôndrias e cinetoplasto, nossos resultados apontam a membrana plasmática como o principal alvo da ação do ácido barbático. As ondulações presentes na superfície e a formação de bolhas na membrana plasmática, seguida da sua ruptura e perda da eletrondensidade citoplasmática, corroboram esta idéia.
- O fraco efeito inibitório no crescimento de *T. cruzi*, observado nas baixas concentrações, pode ser devido ao acidocalcisoma, organela envolvida na homeostase do cálcio, que compensa a perda de cálcio causada pelo tratamento com a droga.
- Os tratamentos com ácido barbático e extrato etéreo de *C. salzmannii* induzem o aparecimento de células com formas aberrantes, muitas delas apresentando processo mitótico anormal, com desprendimento de organelas. Estes dados sugerem um efeito inibitório adicional nos microtúbulos, resultando no impedimento da citocinese.

- O ácido barbático e o extrato orgânico de *C. salzmännii* mostraram-se promissores agentes tripanossomicidas, embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar seus efeitos nas formas tripomastigota e amastigota, assim como determinar seus alvos intracelulares específicos.

Ata da defesa de dissertação do mestrando **Carlos Fernando Brasileiro de Vasconcelos**, realizada em 24 de fevereiro de 2005, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 24 de fevereiro de 2005, foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, a defesa de dissertação de **Carlos Fernando Brasileiro de Vasconcelos**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Coordenadora do Curso supra citado), fez a apresentação do aluno, de seu orientador, Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, de suas Co-orientadoras, Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo, Profa. Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Nicácio Henrique da Silva, na qualidade de Presidente, Vera Lúcia de Menezes Lima, José Luiz de Lima Filho, os três do Depto. de Bioquímica/UFPE, e Luiz Carlos Alves, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Atividade Tripanossomicida in vitro de Extratos Orgânicos e do Ácido Barbático de *Cladonia salzmannii* NyL.**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a sua apresentação em 45 (quarenta e cinco) minutos. Após a defesa, o Sr. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para o Prof. Dr. Luiz Carlos Alves, em seguida para o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho e finalmente para a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima. Concluídas suas arguições, deram-se por satisfeitos, deram algumas sugestões e parabenizaram o mestrando e seus orientadores. Daí o Sr. Presidente, na qualidade de orientador, fez algumas considerações e a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso, na presença da coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de fevereiro de 2005.



The block contains three handwritten signatures. The top signature is of Vera Lúcia de Menezes Lima. The middle signature is of Luiz Carlos Alves. The bottom signature is of José Luiz de Lima Filho.