

Ada Amália Ayala Urdapilleta

**Atividade de substâncias isoladas de
liquens sobre formas promastigotas de
Leishmania (L.) amazonensis
e *Leishmania (V.) braziliensis*.**

Brasília, DF.

2006.

Ada Amália Ayala Urdapilleta

**Atividade de substâncias isoladas de
líquens sobre formas promastigotas de
Leishmania (L.) amazonensis
e *Leishmania (V.) braziliensis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do programa Multiinstitucional em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Raimunda N. Ribeiro Sampaio.

Brasília, DF.
2006.

DEDICATÓRIA

Com amor, aos meus queridos pais e irmãos que sempre apoiaram minhas escolhas. Ao meu amado Rodrigo, que esteve sempre ao meu lado em mais este trecho de minha vida...

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a DEUS, presente em todos os momentos de minha vida.

Agradeço à Prof^a Dr^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio pela confiança depositada em mim e especialmente pelo apoio dado para desenvolver esta dissertação. Pela amizade e também pelas críticas, muitas vezes severas, mas que foram necessárias para meu crescimento como pessoa e como cientista.

Agradeço à Prof^a Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval, a Beth, por ter me incentivado e dado um sólido conhecimento científico. Agradeço também pelos incentivos, oportunidades e pela convivência agradável durante o tempo que estive no seu laboratório em Campo Grande, MS.

À Prof^a Dr^a Laila Salmen Espindola, agradeço pelo convívio, pela gentileza e auxílio em todos os momentos que solicitei. Por permitir o meu acesso ao seu laboratório sempre que necessário. Obrigada por ter enriquecido nossas conversas, sugerindo alternativas ao encaminhamento dos experimentos e especialmente pela sua disponibilidade.

À Prof^a. Dr^a. Neli Honda pela contribuição neste trabalho e também pela amizade.

Às “meninas”, Jac, Thaís, Mari, Marina e Joana, colegas de apartamento, presentes nas minhas longas noites frente ao computador, escrevendo esta dissertação, pelas conversas e pela ótima convivência.

Aos amigos Evelin, Fabio, Michel, Gustavo, Marcio e Dani; pelos bons momentos e incentivo, especialmente pelos momentos de descontração. Aos amigos “da Candanga”, pela amizade e incentivo.

Aos técnicos Tércio Rodrigues e Viviane Medeiros pela atenção, prestatividade e, principalmente, pela amizade durante estes dois anos.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia da UnB pelos bons momentos e incentivo, especialmente à Nashira, Ellen, Dani e Karla pela ajuda e momentos de descontração.

Em especial, agradeço à minha família e ao meu querido Rodrigo, que sempre me incentivaram a seguir meus ideais. Foram meu consolo e meu amparo nos momentos tristes e difíceis desta estrada e a alegria da minha vida.

E agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer deste trabalho.

À Universidade de Brasília pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVOS.....	32
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1- Extração das substâncias líquênicas e seus derivados.....	34
3.2- Cepas de <i>Leishmania</i>	34
3.3- Contagem do meio de cultura.....	35
3.4- Diluição Seriada.....	36
3.5- Ensaio in vitro das sobre as formas promastigotas.....	36
3.5.1- Testes in vitro das substâncias isoladas de líquens.....	36
3.5.1.1- Leitura da viabilidade em microscópio invertido.....	37
3.5.1.2- Leitura da viabilidade pelo MTT.....	37
3.6. Análise estatística.....	39
4- RESULTADOS.....	41
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÃO.....	54
7- PERSPECTIVAS.....	56
8- REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA SSP.....	15
FIGURA 2 – FORMAS DE LEISHMANIA SPP. FORMA PROMASTIGOTA (A) E FORMA AMASTIGOTA (B).....	16
FIGURA 3 – EVOLUÇÃO DE CASOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - BRASIL, 1980-2005.....	17
FIGURA 4 – CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR MUNICÍPIOS EM 2001 E CIRCUITOS DE PRODUÇÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL DE 1998 A 2000.....	18
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA PENTAMIDINA.....	22
FIGURA 6 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA ANFOTERICINA B.....	23
FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA MILTEFOSINA.....	24
FIGURA 8 – LIQUEN NO TRONCO DE UMA ÁRVORE.....	28
FIGURA 9 – CÂMARA DE CONTAGEM ADAPTADA PARA MICROSCÓPIO DE CAMPO CLARO OU DE CONTRASTE DE FASES. A ÁREA MARCADA COM L CORRESPONDE A PARTE DA CÂMARA PARA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	35
FIGURA 10 – PLACA DE 96 POÇOS CONTENDO AS SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS, MEIO ESTÉRIL E 10^6 FORMAS PROMASTIGOTAS DOS PARASITOS EM TRIPLICATA APÓS 4 H DE INCUBAÇÃO COM MTT.....	38
FIGURA 11 – PLACA DE 96 POÇOS NO LEITOR DE ELISA A 570 NM PARA LEITURA DA AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LIQUÊNICAS SOBRE FORMAS DE LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS APÓS ADIÇÃO DE SDS 10%.....	39
FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO DO B- METIL ORSELINATO DE METILA (19) QUE INIBE 50 % DO CRESCIMENTO DOS PARASITOS(IC ₅₀) DE L. (L.) AMAZONENSIS.....	47
FIGURA 13 -. CONCENTRAÇÃO DO ORSELINATO DE N-BUTILA (14) QUE INIBE 50 % DO CRESCIMENTO DOS PARASITOS (IC ₅₀) DE L. (L.) AMAZONENSIS.....	48

FIGURA 14 – CONCENTRAÇÃO DO ORSELINATO DE N-PROPILA (12) QUE INIBE 50 % DO CRESCIMENTO DOS PARASITOS (IC ₅₀) DE L. (L.) AMAZONENSIS.....	48
FIGURA 15. ÁCIDO PERLATÓLICO.....	84
FIGURA 16. ÁCIDO ÚSNICO.....	84
FIGURA 17. ÁCIDO NORSTÍTICO.....	84
FIGURA 18. LIQUEXANTONA.....	84
FIGURA 19. ÁCIDO SALAZÍNICO.....	84
FIGURA 20. ATRANORINA.....	84
FIGURA 21. ÁCIDO LECANÓRICO.....	85
FIGURA 22. ÁCIDO PROTOCETRÁRICO.....	85
FIGURA 23. ÀCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO.....	85
FIGURA 24. ORSELINATO DE METILA.....	85
FIGURA 25. ORSELINATO DE ETILA.....	85
FIGURA 26. ORSELINATO DE N-PROPILA.....	85
FIGURA 27. ORSELINATO DE ISO-PROPILA.....	85
FIGURA 28. ORSELINATO DE N-BUTILA.....	85
FIGURA 29. ORSELINATO DE SEC-BUTILA.....	86
FIGURA 30. ORSELINATO DE TERC-BUTILA.....	86
FIGURA 31. ORSELINATO DE N-PENTILA.....	86
FIGURA 32. ORSELINATO DE N-HEXILA.....	86
FIGURA 33. BETA-METIL-ORSELINATO DE METILA.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATIVIDADE DO ÁCIDO PERLATÓLICO, ÁCIDO ÚSNICO, ÁCIDO NORSTÍTICO, LIQUEXANTONA, ÁCIDO SALAZÍNICO, ATRANORINA, ÁCIDO LECANÓRICO, ÁCIDO PROTOCETRÁRICO, ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO, ORSELINATO DE METILA, ORSELINATO DE ETILA, ORSELINATO DE N-PROPILA, ORSELINATO DE ISO-PROPILA, ORSELINATO DE N-BUTILA, ORSELINATO DE SEC-BUTILA, ORSELINATO DE TERC-BUTILA, ORSELINATO DE N-PENTILA, ORSELINATO DE N-HEXILA E β -METIL-ORSELINATO DE METILA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> PELO MÉTODO DE NÚMERO DE PARASITOS VIVOS.....	42
TABELA 2 - ATIVIDADE DO B-METIL ORSELINATO DE METILA (19), ORSELINATO DE N-PROPILA(12), ORSELINATO DE N-BUTILA(14) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> PELO MÉTODO DE NÚMERO DE PARASITOS VIVOS.....	44
TABELA 3 - ATIVIDADE DO ORSELINATO DE N-BUTILA (14), ORSELINATO DE SEC-BUTILA (15), ORSELINATO DE TERC-BUTILA (16) E ORSELINATO DE N-PENTILA (17) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> PELO MÉTODO DE NÚMERO DE PARASITOS VIVOS.....	45
TABELA 4 - ATIVIDADE DO ORSELINATO DE SEC-BUTILA (15), ORSELINATO DE N-PENTILA (17) E ORSELINATO DE N-HEXILA (18) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) BRAZILEINSIS</i> PELO MÉTODO DE NÚMERO DE PARASITOS VIVOS.....	46
TABELA 5 - CÁLCULO DO IC ₅₀ DO B- METIL ORSELINATO DE METILA (19) , DO ORSELIATO DE N-PROPILA(12),DO ORSELINATO DE ISO-PROPILA (13) E DO ÁCIDO SALAZÍNICO (5), SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. (L.) AMAZONENSIS</i> PELO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS.

CAPES	-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	-cromatografia em camada delgada
CLAE	-cromatografia líquida de alta eficiência
DEPT	-Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	-dimetilsulfóxido
FM	-Faculdade de Medicina
FS	-Faculdade de Ciências da Saúde
IC ₅₀	-concentração inibitória de 50% dos parasitos
LEISH	- leishmania
LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
mg	-miligrama
MILTEF	-miltefosina
mL	-mililitro
MTT	-metil-tiazol-tetrazólio
µg	-microgramas
µg/mL	-microgramas por mililitro
µL	-microlitro
nm	-nanômetro
NPV	-número de parasitos viáveis
PCR	- reação em cadeia de polimerase
RMN	-ressonância magnética nuclear
RPMI	-Roswell Park Memorial Institute
SDS	-duodecil sulfato de sódio
UnB	- Universidade de Brasília.

RESUMO

Leishmaniose é uma infecção parasitária e endêmica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Cerca de 1,5 milhões de pessoas são acometidas pela leishmaniose cutânea que atinge 88 países e tem notificação compulsória em apenas 30 deles. Apresenta-se em todo Continente Americano e o Brasil é o país que têm a maior prevalência de casos. Este estudo foi realizado com dezenove substâncias líquênicas. Foram testadas *in vitro* para avaliar a atividade leishmanicida em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*. A atividade anti-leishmania foi comparada com a ação do fármaco Miltefosina. Substâncias de seis espécies testadas (*Parmotrema tinctorum*, *Parmotrema dilatatum*, *Cladonia verticillaris*, *Cladina confusa*, *Ramalina peranceps* e *Parmotrema lichexanthonicum*) mostraram atividade no intervalo de concentrações de 100 a 12,5 µg/mL. Dentre as substâncias líquênicas testadas, o orselinato de *n*-pentila mostrou a maior atividade, apresentou-se ativo até a concentração de 12,5 µg/mL frente as formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* e na concentração de 50 µg/mL frente as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Os resultados obtidos são promissores e as substâncias líquênicas ativas podem ser fonte de substâncias contra *Leishmania ssp.*

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, substâncias líquênicas, promastigotas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitary and endemic infection caused by *Leishmania* parasites. About 1,5 million people are attacked for cutaneous leishmaniasis, reaching 88 countries, being of obligatory notification in only 30 of them. Presented in all American continent and has Brazil the country with the biggest prevalence of cases. This study it was carried through with nineteen extracted substances of lichens. It was tested *in vitro* to evaluate the leishmanicida action on forms promastigote of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The anti-*leishmania* activity was compared with the activity of Miltefosine drug. Substances of lichens from six species tested (Parmotrema tinctorum, Parmotrema dilatatum, Cladonia verticillaris, confused Cladina, Ramalina peranceps and Parmotrema lichexanthonicum) showed activity in concentrations ranging from 100 to 12,5 µg/mL. Among the tested substances of lichens, the orselinato of *n*-pentila showed the best activity up to the concentrations of 12,5 µg/mL for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and the concentrations of 50 µg/mL for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The results obtained are promising and the substances of lichens may represents a source of active substances against *Leishmania* ssp.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, substances of lichens, promastigotes.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Várias doenças infecciosas que acometem, primordialmente os países em desenvolvimento, são consideradas negligenciadas por diversos aspectos, mas, principalmente, pela falta de auxílio na investigação de novos medicamentos para o seu tratamento (DESJEUX, 2001).

Entre essas doenças, encontra-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que consiste em uma zoonose endêmica não contagiosa que acomete pele e mucosa (LAINSON e SHAW, 1973; MAGALHÃES et al., 1990, ALZATE et al., 2006).

A LTA é um severo problema de saúde pública, tendendo a aumentar devido a fatores de risco ambiental como migração em massa, desmatamento, urbanização da doença, e também, a fatores de risco individuais como HIV e genética (DESJEUX, 2001).

É uma doença de difícil controle e encontra-se amplamente distribuída nas Américas, Ásia e África. Afeta, principalmente, indivíduos de países em desenvolvimento. Acarreta problemas físicos e psíquicos, causando sérios prejuízos socioeconômicos ao país por comprometer o indivíduo em sua fase mais produtiva (LAINSON e SHAW, 1973; MAGALHÃES et al., 1990; BARRAL et al., 1991; DESJEUX, 2004; RODRIGUES et al., 2002, RODRIGUES, 2006).

A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomos fêmeas dos gêneros *Lutzomya* (novo mundo) e *Phlebotomos* (velho mundo). As duas formas principais encontradas no ciclo (**Figura 1**) do parasito são: a forma flagelada promastigota (**Figura 2A**) e a amastigota (**Figura 2B**). A primeira é encontrada no tubo digestivo e na saliva do inseto vetor, o flebotomíneo, um díptero, e pode ser mantida em meio de cultura artificial. A forma amastigota, após ser inoculada no mamífero pelo vetor hematófago,

desenvolve-se dentro do vacúolo fagolisossômico dos macrófagos nos tecidos de hospedeiros vertebrados (homem e outros mamíferos). Raramente se multiplica em outras células (GUERIN, 2002; DESJEUX, 2004, ALZATE *et al.*, 2006).

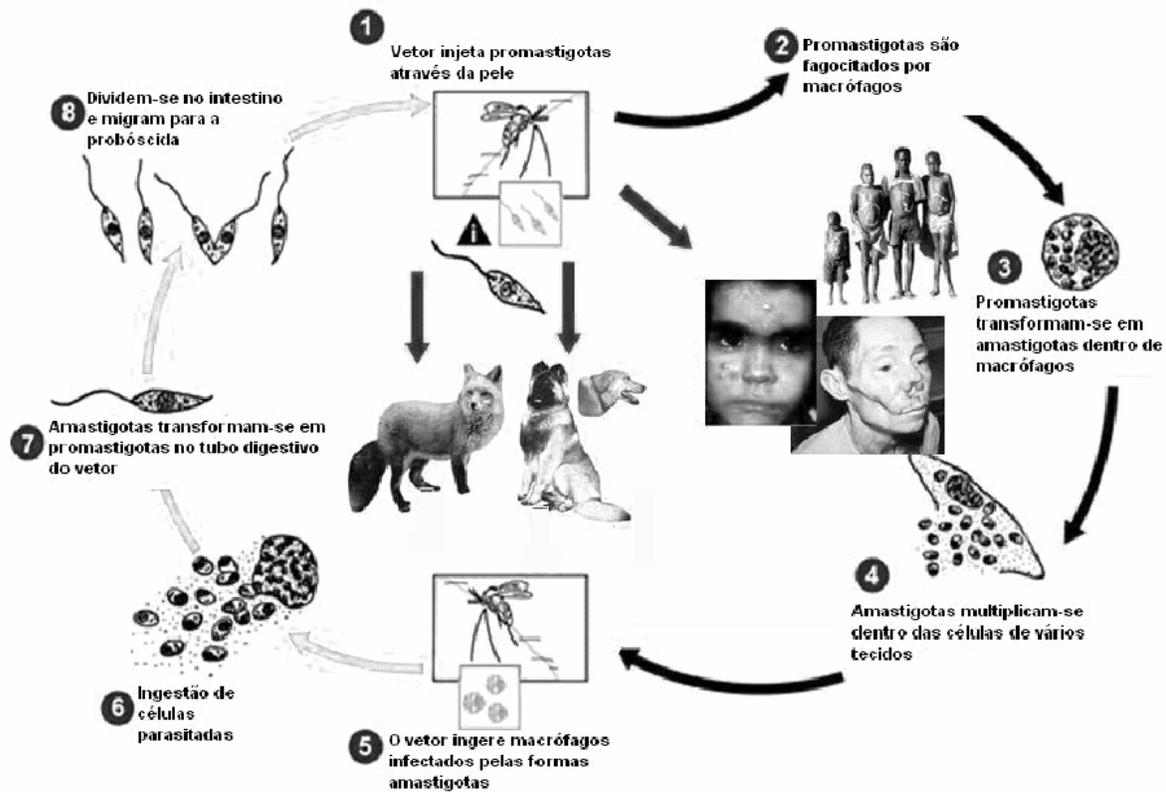


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania ssp.* (Fonte: adaptado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Leishmaniasis.asp?body=Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm).

Estima-se que a leishmaniose afeta 12 milhões de pessoas em 88 países, com 350 milhões em risco de contaminação (MAES *et al.*, 2004). A cada ano, ocorrem cerca de 2 milhões de novos casos da doença, sendo de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea. No entanto, apenas 600.000 casos são oficialmente notificados anualmente, pois a declaração é obrigatória somente em 32 dos 88 países afetados pela doença. O Brasil tem a maior prevalência de casos (GRIMALDI *et al.*, 1984; DESJEUX, 1999; WHO/TDR, 2003).

Estudos realizados no Brasil demonstram a ocorrência de, aproximadamente, 20.000 novos casos anuais da doença. Entre 1985 e 2004, a LTA apresentou no Brasil coeficientes de detecção variando de 3,8 a 22,9 por 100.000 habitantes, sendo que em 1994/1995 foram registrados os coeficientes mais elevados atingindo 22,83 e 22,94 por 100.000 habitantes respectivamente (**Figura 3**). Nos dias de hoje, em todas as unidades federativas há notificação de casos autóctones da doença (CARVALHO e FERREIRA, 2001; MINISTERIO DA SAÚDE, 2006).

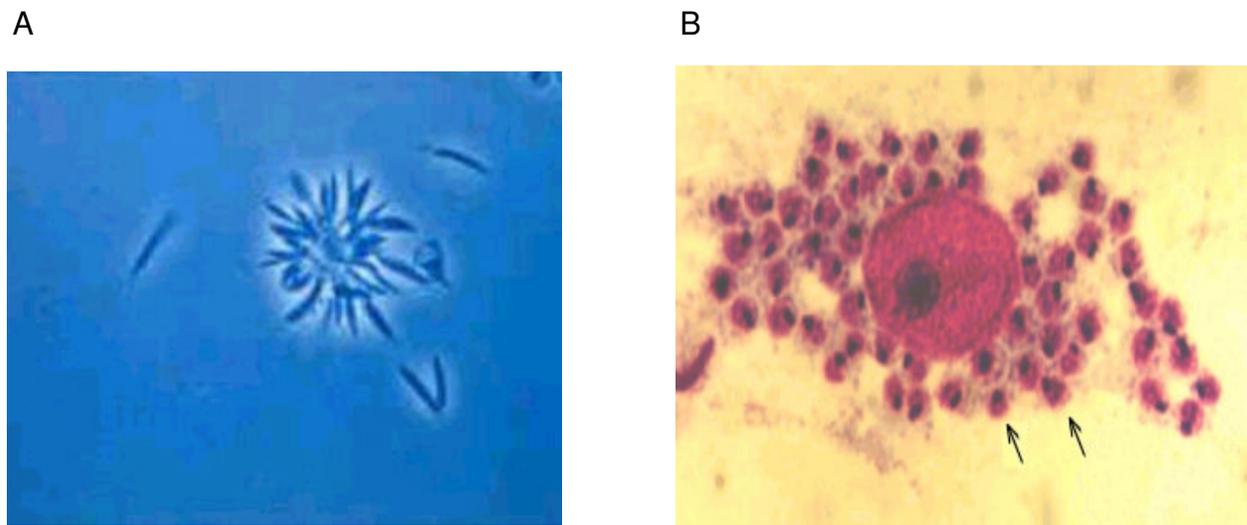


Figura 2. Formas de *Leishmania spp.* Forma promastigota (A) e forma amastigota (B).

(Fonte_A:

http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/fevereiro/13_02_06_01.htm

Fonte_B: <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>).

Ao analisar a evolução da LTA no Brasil, observa-se uma expansão geográfica. No início da década de 80 foram registrados casos em 20 unidades federadas (UF) e a partir de 2001 todas as UF registraram casos autóctones da doença (**Figura 4**). No ano de 1994 houve um registro de casos autóctones em 1.861 municípios, o que representa 36,9% dos municípios do País; em 2002 houve uma expansão da doença para 2.302 municípios (41,1%). Vale destacar que até

o ano de 1999 as variáveis disponíveis para análise no nível nacional eram somente casos por Unidade Federada (FUNASA, 2002).

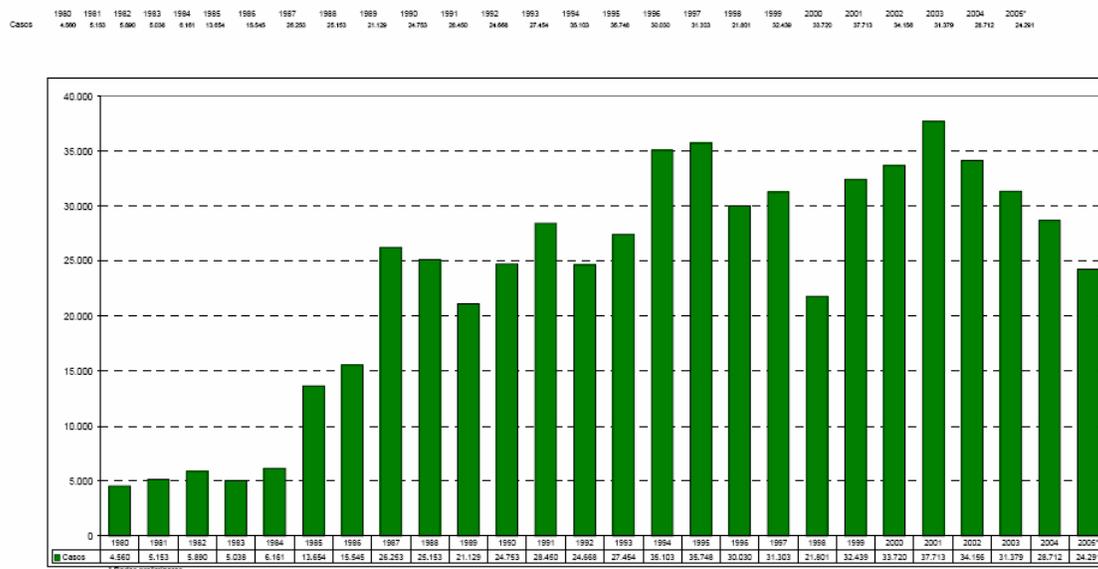


Figura 3. Evolução de casos da Leishmaniose Tegumentar Americana - Brasil, 1980-2005.

(Fonte: Ministério da Saúde. Disponível em <http://www.saúde.gov.br>. Acessado em 18/11/2006).

A Região Norte tem os coeficientes mais elevados, apresentando 93,84 por 100.000 habitantes, é seguida pela região Centro-Oeste com 42,70 por 100.000 habitantes (MIRANDA *et al.*,1996; FUNASA 2002, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O número de casos de LTA variou de 3.000 para 37.000 no período de 1970 a 2001. A partir da década de 90, os casos apresentaram pequeno aumento, com grande variação anual.

Dentre as cinco regiões do Brasil, a Centro-Oeste figura como a segunda maior região em coeficiente de detecção. Esta região apresenta expansão da doença, correspondendo a um aumento de 10% em relação aos últimos oito anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

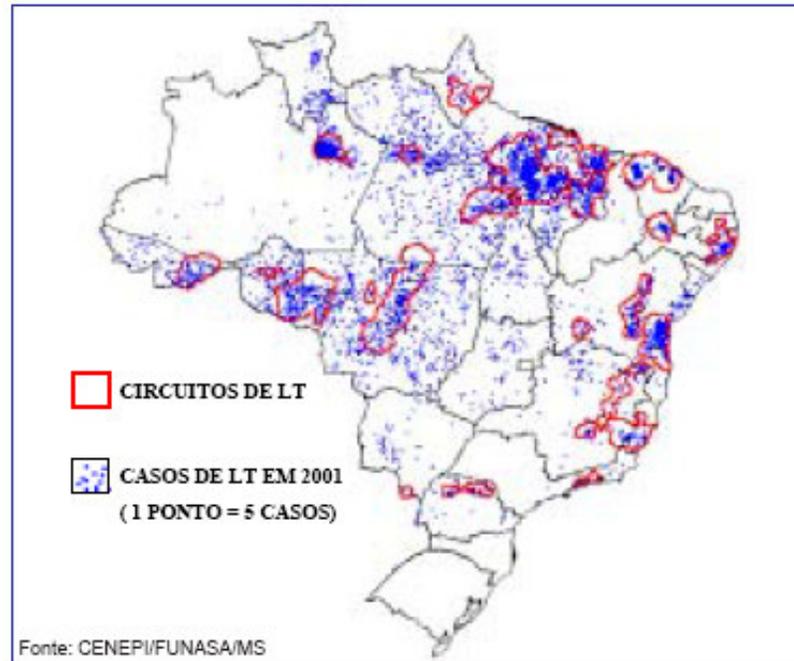


Figura 4. Casos de Leishmaniose Tegumentar por municípios em 2001 e circuitos de produção de Leishmaniose tegumentar no Brasil de 1998 a 2000.

(Fonte: Boletim eletrônico EPIDEMIOLÓGICO-13/12/2002 - ANO 02- N° 05 – FUNASA).

As espécies responsáveis pela LTA apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas. Ocorrem desde lesões únicas ulceradas ou nodulares, forma mais comum, que pode cicatrizar espontaneamente, à casos de múltiplas lesões disseminadas. Também pode se manifestar de modo mais grave, como a forma cutânea difusa que apresenta grande número de lesões. O comprometimento da mucosa com lesões destrutivas e mutilantes é freqüente, gerando deformidades e transtornos emocionais aos pacientes (MAGALHÃES *et al.* 1990; GRIMALDI JR e TESH, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Nas diversas formas de manifestação da LTA estão envolvidas pelo menos 10 espécies ou subespécies de parasitos, sendo que, no Brasil, são identificadas seis espécies que atuam na etiologia de casos humanos: *Leishmania (Viannia) guyanensis* FLOCH, 1954; *Leishmania (Viannia) lainsoni* SILVEIRA, SHAW, BRAGA & ISHIKAWA, 1987; *Leishmania (Viannia) naiffi* LAINSON & SHAW,

1989; *Leishmania (Viannia) shawi* LAINSON, BRAGA, SOUZA, POVOA & ISHIKAWA, 1989; *Leishmania (Viannia) braziliensis* VIANNA, 1911 e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* LAINSON & SHAW, 1972 (DEDET, 1993, FUNASA 2000, GONTIJO, 2003, PORTO, 2004).

Descrevemos a seguir essas espécies de *Leishmanias*:

1- *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

Esta espécie de *Leishmania* causa a forma cutâneo-localizada. Tem como reservatórios naturais roedores (*Proechimys sp.* e *Oryzomys sp.*) e freqüentemente marsupiais (*Didelphis sp.*, *Philander sp.*, *Marmosa sp.*, *Caluromys sp.* e *Metachirus sp.*). Também é responsável pela forma cutânea difusa (LCD), caracterizada por: infiltrações, pápulas e tubérculos, envolvendo extensas áreas cutâneas. É transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca* (SHAW, 1975; FUNASA, 2000). As manifestações atribuídas a *L. (L.) amazonensis* têm sido assinaladas na região Amazônica, no Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e no Sul do país (PORTO, 2004) .

2- *Leishmania (Viannia) braziliensis*:

A Leishmaniose Tegumentar, cuja etiologia é atribuída a *L. (V.) braziliensis*, é o principal agente da forma cutânea-mucosa, produzindo também a forma cutânea-localizada e a forma disseminada. Apresenta ampla distribuição no Brasil e já foi identificada em todas as áreas endêmicas do país (SILVEIRA *et al.*, 1990; BARRAL *et al.*, 1991; PASSOS *et al.*, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; GRISARD *et al.*, 2000, PORTO, 2004).

Esta doença acomete pele e mucosa e é caracterizada por úlcera, única ou múltipla. É a forma mais predominante no humano. Sua transmissão está associada aos vetores *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermédia* (LAINSON e SHAW, 1973; FUNASA, 2000; GONTIJO, 2003, PORTO, 2004). Seus hospedeiros naturais são mamíferos silvestres, tendo sido

registrada em roedores (*Proechimys sp.*, *Rhipidomys sp.*, *Oryzomys sp.*, *Akodon sp.* e *Rattus sp.*) e em marsupiais (*Didelphis sp.*). O homem, assim como os roedores domésticos, cães, eqüinos, gatos e mulas são hospedeiros acidentais (FUNASA, 2000).

3- *Leishmania (Viannia) guyanensis*:

A *Leishmania (V.) guyanensis* causa a leishmaniose cutânea-localizada e mais raramente a forma mucosa. É encontrada principalmente em florestas de terra firme, onde são encontrados seus hospedeiros naturais como marsupiais, preguiça, tamanduá e roedores. Acomete principalmente a pele. É caracterizada por lesões únicas ou múltiplas. A sua transmissão se dá pelos vetores *Lutzomya umbratilis*, *Lutzomya anduzei* e *Lutzomya whitmani* (LAINSON e SHAW, 1987; FUNASA, 2000; GONTIJO, 2003).

4- *Leishmania (Viannia) naiffi*:

A sua transmissão se dá por flebotomínios das espécies *Lutzomya squamiventris*, *Lutzomya paraensis* e *Lutzomya ayrozay*. Tem o tatu como reservatório natural e causa lesões de curso benigno. É encontrada no Amazonas e Pará (FUNASA 2000; GONTIJO, 2003).

5- *Leishmania (Viannia) shawi*:

Ocorre esporadicamente na Amazônia (Amazonas e Pará). Seus principais hospedeiros naturais são macacos e preguiça. É transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomya whitmani* (FUNASA 2000; GONTIJO, 2003).

6- *Leishmania (Viannia) lansoni*:

É transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomya ubiquitous*. O seu provável reservatório natural é a paca (*Agouti paca*). Ocorre na Amazônia (FUNASA 2000; GONTIJO, 2003).

O diagnóstico de LTA inclui aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, e

a associação de alguns desses elementos se torna freqüentemente necessário para se chegar ao diagnóstico conclusivo. A suspeita clínica está baseada nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos obtidos durante a anamnese do paciente. O diagnóstico de certeza obtém-se somente pela demonstração do parasito através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e/ou indireta (FURTADO 1980; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Tratamento:

O antimonial trivalente foi o primeiro medicamento utilizado em 1912. Após, entre 1920 e 1930 foram introduzidos os antimoniais pentavalentes na terapêutica da leishmaniose visceral, demonstrando menor toxicidade (MURRAY, 2000; SUNDAR, 2001; SOTO *et al.*, 2005).

Até o momento, não existe terapêutica ideal para as leishmanioses, contudo os antimoniais têm representado a base principal nas últimas décadas, com cura de 60 a 90% dos casos, apresentando-se como a melhor opção terapêutica disponível (BERMAN, 1986; HERWARDT, 1999; NAME, 2005).

As maiores incidências de leishmaniose são encontradas nas zonas rurais e a administração parenteral da droga é cara e de difícil acompanhamento. Apresentam ainda, outros inconvenientes como alterações eletrocardiográficas, elevação dos níveis de transaminase, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, hepatotoxicidade e cardiototoxicidade (KATAKURA, 1999; SAMPAIO, 2003; NAME, 2005).

A necessidade de administração parenteral e a toxicidade da droga, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas, dificultam o seu emprego. Embora raros, existem relatos de morte súbita desencadeada pela cardiotoxicidade dos antimoniais (SAMPAIO, 1988; SAMPAIO, 2003; NAME, 2005).

Apesar da efetividade comprovada dos antimonias pentavalentes, como o N-metil-glucamina deve-se levar em conta o custo, o longo período de tratamento, e a resistência, que é um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose, com relatos cada vez mais freqüentes de tratamentos não responsivos (SAMPAIO, 1990; SAMPAIO, 1991; BRENDLE *et al.*, 2002).

A pentamidina (**Figura 5**), utilizada como tratamento de segunda escolha em casos não responsivos aos antimoniais, é uma diamina aromática utilizada inicialmente no tratamento de infecções por *Pneumocystis carinii* (SINGH, 2004; SIVAKUMAR, 2004).

Esse composto parece atuar no DNA do cinetoplasto do parasito onde é capaz de inibir suas funções. Entretanto, os percentuais de cura declinaram, o que sugere o desenvolvimento de resistência dos parasitos a este fármaco (DONKOR *et al.*, 2001, ANDERSEN *et al.* 2005).

Apresentam problemas de toxicidade, entre estes, pancreatite, hipotensão, disglícemia e anormalidades cardíacas (BLENDE *et al.*, 2002; SAMPAIO, 2003).

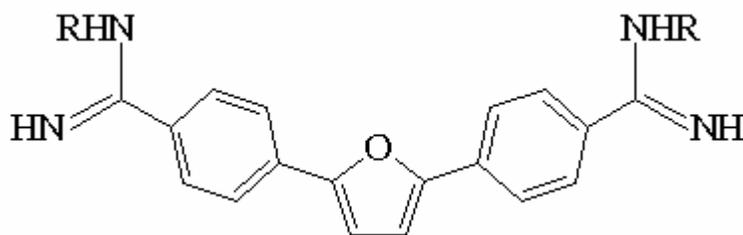


Figura 5. Fórmula estrutural da pentamidina.

(Fonte: <https://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0548-1/index.html>).

A Anfotericina B (**Figura 6**) é um antibiótico, utilizado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos, e apresenta atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*.

Acredita-se, que assim como nos fungos, a anfotericina B atue ligando-se ao ergosterol da membrana celular do parasito *Leishmania*, o que explica sua eficácia no tratamento (SINGH, 2004; SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR *et al.*, 2004).

Suas outras formulações, especialmente a forma lipossomal são consideradas ativas e apresenta menor toxicidade. É constituída por pequenas vesículas unilamelares feitas a partir de uma membrana dupla de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e distearolfosfatidilglicerol estabilizado com colesterol em uma relação de 2:0.8:1 combinada com anfotericina B . Ela é melhor tolerada que a anfotericina B convencional (HIEMENZ,1996; SINGH, 2004; SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR *et al.*, 2004)

Ela age especificamente sobre as células alvo (macrófagos), sendo incorporada ao meio intracelular e, assim, reduz os efeitos colaterais com maior eficácia terapêutica, inclusive em pacientes sem resposta terapêutica ao antimonial. Seu uso é limitado pelo alto custo e administração endovenosa. Apresentam eventos adversos como febre, dor de cabeça e nefrotoxicidade (BRYCENSON, 1987; SAMPAIO, 1989; DAVIDSON, 1991; TORRES-CISNEROS, 1993; HASHIM, 1995; BRENDLE *et al.*, 2002).

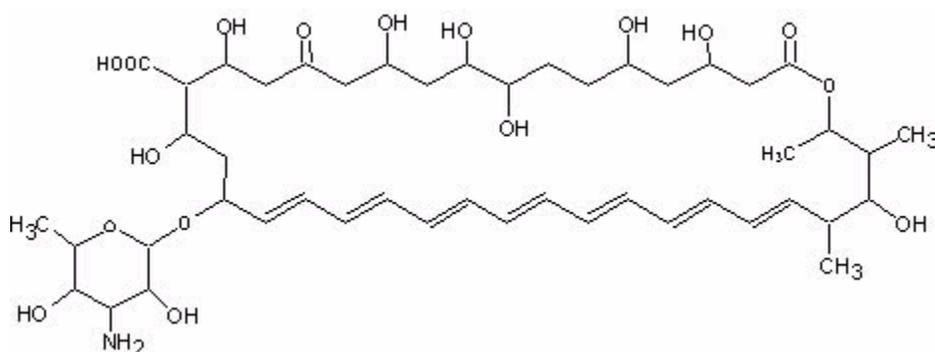


Figura 6. Fórmula estrutural da anfotericina B.

(Fonte:http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Arias_Z_R/generalid.htm)

A miltefosina (**Figura 7**) é um alquil-fosfolipídio, inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico, que nos últimos anos, foi identificado como o primeiro tratamento oral para leishmaniose. Esta droga foi responsável por 95% de curas em pacientes tratados em ensaios clínicos e é ativo sobre parasitos resistentes aos antimônios. Seu uso é desaconselhável em mulheres grávidas e pode causar esterilidade em cães machos (BELLIARD *et al.*, 2003; SEIFERT & CROFT, 2006).

Por ser um medicamento recentemente aprovado para o tratamento da leishmaniose, não se tem muitos dados em relação a resistência dos parasitos; porém, pode ser induzido *in vitro* facilmente (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2003).

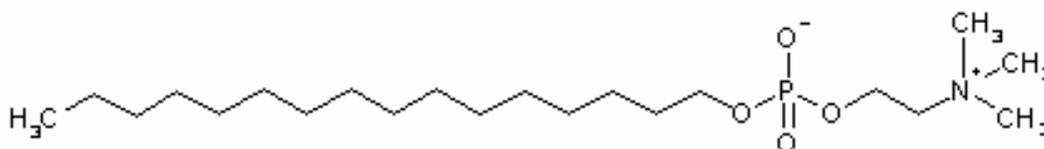


Figura 7. Fórmula estrutural da miltefosina.

(Fonte: <http://www.prous.com/images/moleculas/144760.gif>)

Outros medicamentos:

O aluporinol, análogo da hipoxantina, apresenta atividade citotóxica seletiva aos parasitos. Estes parasitos são incapazes de sintetizar purinas e necessitam, portanto, de purinas pré-formadas do hospedeiro para sobreviver (SINGH, 2004; SIVAKUMAR, 2004).

Embora este fármaco seja pouco eficaz como terapia isolada na leishmaniose cutânea, o aumento de sua eficácia é observado em combinação com outras drogas (KOUTINAS *et al.*, 2001; PASA *et al.*, 2005).

Um antibiótico aminoglicosídeo, a paramomicina, produzido pelo *Streptomyces rimosus*, utilizado em infecções bacterianas, demonstrou capacidade de inibir o crescimento de protozoários do gênero *Leishmania*. Esta tem sido usada no

tratamento da leishmaniose visceral, tanto sozinha quanto em combinação com agentes antimoniais (OLLIARO *et al.*, 2005).

Outra classe de antifúngicos, os azóis, o itraconazol e o cetoconazol, têm demonstrado ser efetivos no tratamento das leishmanioses cutâneas (ALRAJHI *et al.*, 2002).

Outras formas de controle da disseminação da leishmaniose é a eliminação das prováveis fontes de transmissão. E as medidas adotadas para esse controle consistem no uso de inseticidas nos domicílios, peridomicílios e em coleiras de cães, e o uso de repelentes para proteção individual (ALEXANDER e MAROLI, 2003).

A resistência do parasito aos medicamentos disponíveis e os longos períodos de tratamento justificam a urgente necessidade de busca de substâncias alternativas, esquemas mais curtos e de baixo custo (SAMPAIO, 2003).

Essa resistência dos protozoários do gênero *Leishmania*, em muitos casos, é devida a expressão da bomba de efluxo ABC. Existem várias classes de transportadores ABC nos parasitos de *Leishmania ssp.*, resultando em diferentes fenótipos na resistência aos fármacos (LEANDRO e CAMPINO, 2003).

Além dos distintos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de se obter drogas mais eficazes e menos tóxicas para o paciente. Deste modo, a base da pesquisa na busca de novos medicamentos com ação leishmanicida tem sido desenvolvida com técnicas primárias, testes *in vitro* utilizando formas promastigotas, e para os testes *in vitro* utilizando formas amastigotas poucos estudos estão disponíveis (ACESTOR, 2003; DAVIS *et al.*, 2004).

Produtos encontrados na natureza são importantes fontes de compostos biologicamente ativos e muitos deles constituem modelos para síntese de vários fármacos. (WALL e WANI, 1996).

As fito-moléculas representam aproximadamente 60% das substâncias antimicrobianas e antitumorais encontradas atualmente no mercado farmacêutico (CALIXTO, 2000).

Produtos naturais desempenham há anos uma importante fonte de moléculas para o tratamento e profilaxia de doenças permitindo o desenvolvimento de novos medicamentos. Plantas, animais e microorganismos são as fontes de uso. Entre 1981 e 2001, uma análise realizada por NEUMAN *et al.* (2003), mostrou que 52% das novas substâncias químicas disponíveis no mercado são derivadas ou sintetizadas de produtos naturais.

Estes produtos são indicados para o tratamento de 87% de todas as categorias de doenças em humanos com ação antibacteriana, anticoagulante, antineoplásica, antiparasitária e imunossupressora (NEUMAN *et al.* 2003).

Os líquens surgem como uma promissora fonte de estudo e muitos dos quais são exclusivos, não sendo encontrados em nenhum outro grupo de organismos (MATEOS *et al.*, 1993). Grande número destes compostos apresenta ação: antimicrobiana (XAVIER FILHO *et al.*, 1990; YAMAMOTO *et al.*, 1993; ESIMONE e ADIKWU, 1999); antifúngica (YAMAMOTO *et al.*, 1993); antiinflamatória (HIGUCHI *et al.*, 1993; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2000); antitumoral, antiviral e imunomoduladora (HIRABAYASHI *et al.*, 1989; CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002), mostrando um potencial valor econômico.

Líquens:

Os líquens (**Figura 8**) são definidos como organismos simbióticos de crescimento lento que se compõe por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte) (NASH, 1996; OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). Estimam-se 13.500 espécies de fungos liquenizados (cerca de 600 gêneros), correspondendo a 20% dos fungos conhecidos (HAWKSWOTH, 1984; SMITH, 1987).

O talo liquênico é o resultado do crescimento da alga e do fungo juntos, e quando cultivados separadamente não há semelhança com a alga ou com o fungo. A constituição do talo liquênico se dá em sua maior parte pelas hifas do fungo (micobiontes) e pelos filamentos da alga (fotobionte) em menor proporção; apresenta uma forma definida que pode ser crustosa, foliosa ou fruticosa (JOLY, 1975; HALE, 1979; AHMADJIAN e HALE, 1993).

As espécies de fungos mais freqüentemente observadas em líquens pertencem às classes Ascomycetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Cerca de 98% dos fungos liquênicos são Ascomycetos sendo que desses, 46% são liquenizados. Assim, a liquenização é uma regra e não uma exceção nesse grupo de fungos (CANAANI *et al.*, 1984; HONDA e VILEGAS, 1999).

Já os fotobiontes, aproximadamente 40 gêneros de algas verdes e cianobactérias foram descritos como fotobiontes liquênicos. Entre os mais freqüentes estão as clorófitas do gênero *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Cocomyxa* e *Dictyochloropsis* e as cianobactérias do gênero *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gloeocapsa* e *Calothrix* (FRIEDL e BÜDEL, 1996).



Figura 8. Líquen no tronco de uma árvore.

Características morfológicas dos líquens: o talo é o resultado do crescimento da alga e do fungo juntos. Sua constituição se dá em sua maior parte pelas hifas do fungo (micobiontes) e pelos filamentos da alga (fitobionte) em menor proporção. O fotobionte e o micobionte crescem portanto, em equilíbrio, formando um talo íntegro (JOLY, 1975; HALE, 1979; SMITH 1992).

O talo é constituído de um córtex, uma medula e uma camada de algas (fotobionte). O córtex é um tecido resistente periférico que protege as células fotobiontes do ressecamento e da iluminação excessiva, enquanto que a medula é um tecido mais interno que facilita a troca gasosa (AHMADJIAN, 1993).

O talo liquênico apresenta uma forma definida que pode ser crustosa, foliosa ou fruticosa, resultando em uma grande diversidade de espécies liquênicas (JOLY, 1975; HALE, 1993; AHMADJIAN, 1993).

Constituintes químicos dos líquens: as substâncias produzidas pelos líquens são classificadas em produtos intracelulares e extracelulares, isto de acordo com a localização no talo. Os produtos intracelulares são denominados de metabólitos primários e estão ligados na parede celular, podendo citar os carotenóides,

aminoácidos, proteínas, glicolipídeos e carboidratos (HALE, 1983; HONDA e VILEGAS, 1999).

Os produtos extracelulares são chamados de metabólitos secundários, e são encontrados na medula ou córtex, raramente nas duas camadas. Constituem uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, principalmente ácidos fenólicos fracos (ELIX, 1996; HONDA e VILEGAS, 1999).

O papel fisiológico dos carotenóides no talo líquênico é de fotoproteção, pois estes compostos secundários possuem a capacidade de reduzir a quantidade de luz que atinge a alga filtrando determinados comprimentos de ondas (RODERIC, 1997).

São conhecidos aproximadamente 630 compostos provenientes do metabolismo secundário dos fungos liquenizados. Entre estes estão os ácidos alifáticos (meta e para) – depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácido úsnico, terpenos e derivados do ácido púlvínico. Alguns metabólitos secundários também são produzidos por fungos de vida livre e por plantas superiores, no entanto, a maior parte é considerada exclusiva dos fungos liquenizados (ELIX, 1996).

Tais compostos estão sendo utilizados com propósitos taxonômicos. São utilizados como critério na identificação das espécies para vários grupos (por exemplo: Parmeliaceae e Cladoniaceae), devido à sua capacidade de reação com substâncias químicas específicas, produzindo reações coloridas, e à sua grande especificidade de ocorrência nos fungos liquenizados (HONDA e VILEGAS, 1998).

Estimam-se 13.500 espécies de fungos liquenizados (cerca de 600 gêneros), correspondendo a 20% dos fungos conhecidos (HAWKSWOTH, 1984; SMITH, 1987).

Cerca de 98% dos fungos liquênicos são Ascomicetos sendo que desses, 46% são liquenizados. Assim, a liquenização é uma regra e não uma exceção nesse grupo de fungos (HONDA, 1999). Os Ascomicetos compreendem umas 30 mil espécies descritas, sendo o maior dos filos do reino. As leveduras ou fermentos são ascomicetos unicelulares que se reproduzem por brotamento. A maioria dos fungos azul-esverdeados, vermelhos e pardos que estragam alimentos é representada por ascomicetos, incluindo a *Neurospora*, um bolor do pão de coloração salmão, o qual tem desempenhado notável papel na história da genética moderna. Embora sejam muito comuns os ascomicetos bem desenvolvidos e comestíveis (como as famosas trufas européias), existem também algumas espécies microscópicas, como o *Penicillium notatum*, produtor do antibiótico penicilina, e o *Saccharomyces cerevisiae*, que é a levedura da cerveja.

Na indústria de antibióticos, os fungos também têm papel de destaque. Afinal, foi do *Penicillium notatum* que Alexander Fleming, em 1929, extraiu a penicilina, antibiótico responsável pela salvação de milhares de vidas durante a Segunda Guerra Mundial. Hoje, muitos outros antibióticos largamente aplicados são conseguidos a partir de culturas de fungos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de substâncias liquênicas sobre formas promastigotas de *Leishmania*, visando contribuir para a descoberta de novas substâncias com potencial atividade anti-*Leishmania*.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Investigar a atividade de 9 substâncias líquênicas naturais (ácido perlatólico, ácido úsnico, ácido norstítico, liquexantona, ácido salazínico, atranorina, ácido lecanórico, ácido protocetrário, ácido fumarprotocetrário) e 10 substâncias líquênicas semi-sintéticas (orselinato de metila, orselinato de etila, orselinato de *n*-propila, orselinato de *iso*-propila, orselinato de *n*-butila, orselinato de *sec*-butila, orselinato de *terc*-butila, orselinato de *n*-pentila, orselinato de *n*-hexila e β -metil-orselinato de metila) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Objetivos Específicos

- Fazer uma triagem de 19 substâncias líquênicas *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* pelo método de observação da viabilidade em microscópio invertido, seguido da observação pelo método colorimétrico metil-tiazol-tetrazólio (MTT).

- Determinar a concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC₅₀) das substâncias líquênicas ativas sobre *Leishmania (L.) amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- Extração das substâncias líquênicas e seus derivados

As substâncias líquênicas foram extraídas e fornecidas (**Anexo I**) pelo grupo da pesquisadora Prof^a Dr^a Neli Kika Honda do Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

3.2- Cepas de *Leishmania*

Foram utilizadas cepas MHOM/BR/94/MI5176 de *L. (V.) braziliensis*, isolada de humano, cedida pelo Instituto Evandro Chagas de Belém e MHOM/BR/PH8 de *L. (L.) amazonensis* procedentes de Belo Horizonte, identificadas por anticorpos monoclonais, izoensimas e reação em cadeia de polimerase (PCR); e criopreservadas no laboratório de Dermatômico da UnB.

Uma alíquota do material foi inoculada nas patas traseiras de camundongos C57Bl/6, mantidos no Biotério da FM/FS e após aparecimento de lesões os parasitos forma coletados com auxílio de uma seringa de 1 mL contendo 0,2-0,5 mL de solução salina. O material aspirado foi adicionado ao meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN), pH 7,2 a 22 °C por uma semana. Após esse período, a cultura foi transferida ao meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco® Laboratório, BRL), suplementado com 7,5% de bicarbonato de sódio, 50 mg/mL de gentamicina e 20 % de soro fetal bovino (SFB), em pH final de 7,2.

O SFB usado foi inativado a 56°C por 45 minutos em banho-maria e submetido a alíquotas em frascos de vidros estéreis, estocados a – 20°C e, no momento do uso, descongelado. O RPMI foi estocado a 4°C.

3.3- Contagem dos parasitos.

Após replicação das formas promastigotas a contagem foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Os parasitos, em fase logarítmica de crescimento, foram suspensos em uma diluição contendo 10 μL do meio de cultura e 90 μL de PBS, homogeneizada e uma pequena alíquota dessa suspensão foi utilizada para preencher a câmara de Neubauer.

A contagem dos parasitos foi feita na parte da câmara utilizada para contagem de leucócitos (**Figura 9**).

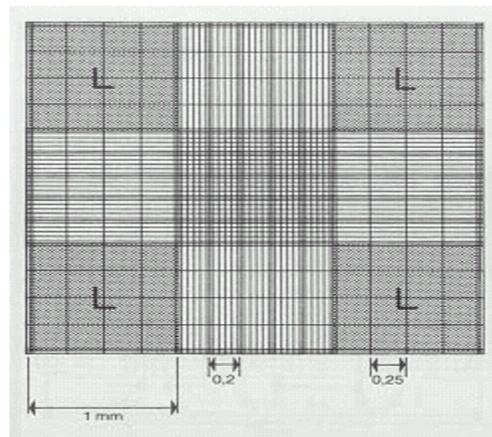


Figura 9. Câmara de contagem adaptada para microscópio de campo claro ou de contraste de fases. A área marcada com L corresponde à parte da câmara para contagem de leucócitos.

Foram contados dois quadrantes opostos (área marcada com L) e calculada a média, dividindo o número de parasitos por dois.

Os critérios para contagem: Não foi contado rosetas ou emaranhados, foi contado como dois as formas promastigotas em divisão avançada, foi contado como um as formas no início da divisão, formas que estavam em cima da linha e muito próximos do quadrante também foram contados.

Após três contagens em câmara de *Neubauer* e obtenção da média das formas promastigotas, foi obtido a quantidade em volume de meio de cultura que contem 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis* por poço.

3.4- Diluição Seriada

Na primeira fileira da placa de 96 poços (A) foi adicionado 8 µL de uma solução da substância líquênica, previamente preparada, com 192 µL de meio RPMI, e volume final de 200 µL por poço.

Nas demais fileiras (B à H), foram adicionados 100 µL de RPMI em todos os poços. A seguir, foi realizada a diluição seriada como segue:

- Da fileira A foi retirada 100 µL e transferido para fileira B;
- Após misturar e homogeneizar o material na fileira B, retirou-se 100 µL e foi transferido para a próxima fileira, e assim sucessivamente até a fileira G;
- No final da diluição, em G, restaram 100 µL que foi desprezado;
- Na fileira H foram adicionou-se os controles, portanto, não recebeu a solução líquênica.

3.5- Ensaio *in vitro* sobre as formas promastigotas

3.5.1- Testes *in vitro* das substâncias isoladas de líquens

As substâncias testadas foram dissolvidas em RPMI 1640 e DMSO e colocados em placas de 96 poços em concentrações decrescentes de 100 a 1,56 µg/mL. Em cada poço, foram adicionadas 10⁶ formas promastigotas e completado o volume com RPMI 1640 suplementado, obtendo-se o volume final de 200 µL por poço. A droga Miltefosina (2 µL) foi usada para o controle positivo numa concentração de 40 mg/mL, e como controle negativo DMSO 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade das amostras foi avaliada após 24 e 48 h em microscópio invertido e comparada com o controle. O efeito inibitório foi determinado por meio da porcentagem de redução do número de parasitos vivos (NPV) em relação ao grupo controle (SAUVAIN *et al.* 1993).

3.5.1.1- Leitura da viabilidade em microscópio invertido.

A motilidade dos parasitos nos poços foi observada após 24 e 48 horas. Seus movimentos foram estimados de acordo com WENIGER *et al.* (2001):

0 = quando 100% dos parasitos estavam em movimento (substância considerada inativa).

+ = quando mais de 50% dos parasitos apresentavam movimento (substância considerada pouco ativa).

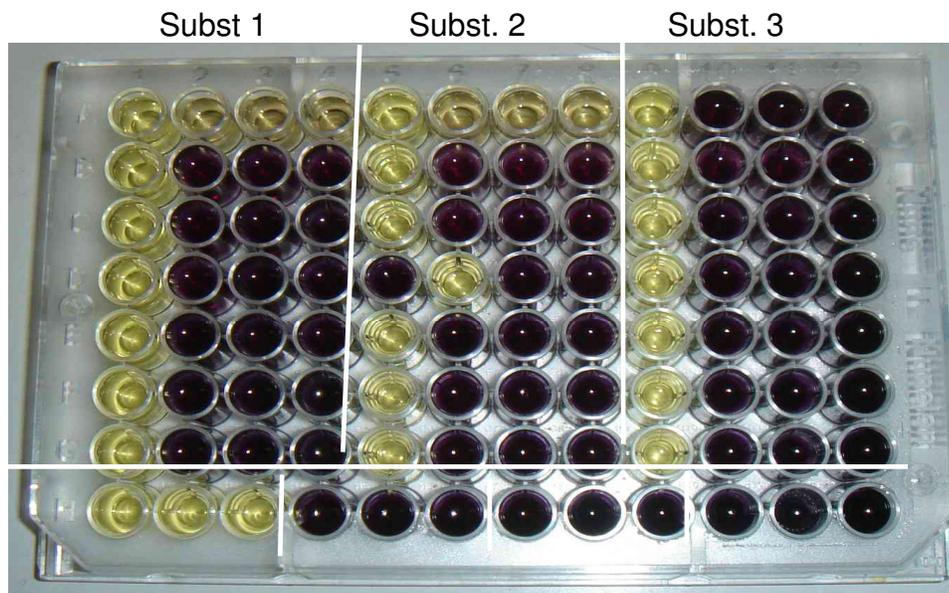
++ = quando menos de 50% dos parasitos estavam em movimento (substância considerada ativa).

+++ = quando 100% dos parasitos não apresentavam movimento (substância considerada muito ativa).

3.5.1.2- Leitura da viabilidade pelo MTT.

O brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, conhecido como metil-tiazol-tetrazólio (MTT), permite medir o metabolismo celular. Baseia-se na redução deste sal por ação dos succinato-desidrogenase mitocondrial, ocorrendo à formação dos cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas (MOSMAN *et al.*, 1983).

Realizou-se a diluição seriada (concentrações decrescentes de 100 a 1,56 µg/mL) das substâncias e a placa foi incubada por 48 h de 22 a 27°C em estufa. Após este período 20µl de uma solução de MTT (5mg/ml) foram adicionados a todos os poços e a placa foi incubada por 4 h à 22°C protegida da luz (**Figura 10**). Depois deste período, foram utilizados 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS)10% para liberação dos cristais de formazan.



Controles: RPMI DMSO MILTEF LEISH

Figura 10. Placa de 96 poços contendo as substâncias liquênicas, meio estéril e 10^6 formas promastigotas dos parasitos em triplicata após 4 h de incubação com MTT.

A leitura da placa foi feita em leitor de placa de Elisa a 570 nm (**Figura 11**). Para o controle positivo, foram utilizados 2 μ L de miltefosina na concentração de 40 mg/mL. Como controle negativo, DMSO a 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata. O IC_{50} foi determinado com auxílio do software Microsoft Excel (ZHAI *et al.*, 1999).



Figura 11. Placa de 96 poços no Leitor de ELISA a 570 nm para leitura da ação das substâncias líquênicas sobre formas de *Leishmania (L.) amazonensis* após adição de SDS 10%.

3.6- Análise estatística.

No presente estudo foi utilizado o coeficiente de correlação de Person para verificar estatisticamente a existência de uma relação linear entre as variáveis percentual de morte (%) e concentração($\mu\text{g/mL}$) da substância líquênica .

O valor de correlação varia de -1 a $+1$. O sinal do coeficiente indica o sentido da associação e pode ser direta ou inversa.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Avaliação da ação das 19 substâncias líquênicas (ácido perlatólico, ácido úsnico, ácido norstítico, liquexantona, ácido salazínico, atranorina, ácido lecanórico, ácido protocetrárico, ácido fumarprotocetrárico, orselinato de metila, orselinato de etila, orselinato de *n*-propila, orselinato de *iso*-propila, orselinato de *n*-butila, orselinato de *sec*-butila, orselinato de *terc*-butila, orselinato de *n*-pentila, orselinato de *n*-hexila e β -metil-orselinato de metila) **sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*, através da leitura em microscópio invertido:**

Uma primeira triagem (**Tabela 1**) realizada com 10 das 19 substâncias líquênicas permitiu selecionar cinco substâncias ativas sobre *L. (L.) amazonensis*: ácido salazínico (5), orselinato de metila (10), orselinato de *n*-propila (12), orselinato de *n*-butila (14) e β -metil orselinato de metila (19).

As substâncias orselinato de *n*-propila (12) e orselinato de *n*-butila (14) apresentaram-se muito ativas (+++) na concentração de 100 μ g/mL e não apresentaram atividade nas demais concentrações. β -metil orselinato de metila (19) foi ativo (++) na concentração de 100 μ g/mL e inativo nas demais concentrações (**Tabela 2**).

Essas três substâncias ativas: orselinato de *n*-propila (12), orselinato de *n*-butila (14) e β -metil orselinato de metila (19) foram selecionadas para verificação da atividade dos parasitos pelo método MTT.

Tabela 1. Atividade do ácido perlatólico, ácido úsnico, ácido norstítico, liquexantona, ácido salazínico, atranorina, ácido lecanórico, ácido protocetrário, ácido fumarprotocetrário, orselinato de metila, orselinato de etila, orselinato de *n*-propila, orselinato de *iso*-propila, orselinato de *n*-butila, orselinato de *sec*-butila, orselinato de *terc*-butila, orselinato de *n*-pentila, orselinato de *n*-hexila e β -metil-orselinato de metila sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo método de número de parasitos vivos.

Substâncias ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	Controle Mitelfosina 40 mg/mL
ácido perlatólico (1)	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
ácido úsnico (2)	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
ácido norstítico (3)	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
Liquexantona (4)	0	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
ácido salazínico (5)	+	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
Atranorina (6)	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
Lecanórico (7)	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
ácido protocetrário (8)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
ácido fumarprotocetrário (9)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++

orselinato de metila (10)	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de etila (11)	+	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
	0	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de n-propila (12)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de iso-propila (13)	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
	+	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de n-butila (14)	+++	+	0	0	0	0	0	+++
	+++	+	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de sec-butila (15)	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
orselinato de terc-butila(16)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
orselinato de n-pentila(17)	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
	+++	+++	+	0	0	0	0	+++
orselinato de n-hexila (18)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
β-metil-orselianto de metila (19)	++	+	0	0	0	0	0	+++
	++	0	0	0	0	0	0	+++
	++	0	0	0	0	0	0	+++

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++) : ativo; (+++): muito ativo. Controle positivo: 2µL(40 mg/mL) Mitelfosina(+++). Controle negativo: DMSO 1% (0).

Tabela 2. Atividade do β -metil orselinato de metila (19), orselinato de *n*-propila(12), orselinato de *n*-butila(14) sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo método de número de parasitos vivos.

Substâncias ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	Controle Mitelfosina 40 mg/mL
β - metil	++	0	0	0	0	0	0	+++
Orselinato de metila(19)	++	+	0	0	0	0	0	+++
	++	0	0	0	0	0	0	+++
Orselinato de <i>n</i> -propila(12)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	+	0	0	0	0	0	+++
Orselinato de <i>n</i> -butila(14)	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++
	+++	0	0	0	0	0	0	+++

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++): ativo; (+++): muito ativo. Controle positivo: 2 μL (40 mg/mL) Mitelfosina(+++). Controle negativo: DMSO 1% (0).

O ácido salazínico e o orselinato de metila não apresentaram ação anti-leishmania nas concentrações de 100 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$.

Uma segunda triagem com nove substâncias líquênicas (orselinato de metila (10), orselinato de etila (11), orselinato de *iso*-propila (13), orselinato de *n*-butila (14), orselinato de *sec*-butila (15), orselinato de *terc*-butila (16) , orselinato de *n*-pentila (17), orselinato de *n*-hexila (18) e β -metil orselinato de metila(19)) permitiu selecionar o orselinato de *sec*-butila (15) e o orselinato de *n*-pentila (17), que foram muito ativas (+++) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e pouco ativa (+) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ frente às formas *L. (L.) amazonensis* (**Tabela 3**).

As substâncias orselinato de *n*-butila (14) e orselinato de *terc*-butila (16) foram muito ativa (+++) apenas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e nas demais concentrações foram inativas. As demais substâncias (orselinato de metila, orselinato de etila e orselinato de *iso*-propila) foram inativas ou pouco ativas em todas as concentrações frente a *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 3. Atividade do orselinato de *n*-butila (14), orselinato de *sec*-butila (15), orselinato de *terc*-butila (16) e orselinato de *n*-pentila (17) sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo método de número de parasitos vivos.

Substâncias ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	Controle Mitelfosina 40 mg/mL
Orselianto de <i>n</i> -butila (14)	+++ +++ +++	+ 0 +	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++ +++ +++
Orselinato de <i>sec</i> -butila(15)	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+ + +	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++ +++ +++
Orselinato de <i>terc</i> -butila(16)	+++ +++ +++	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++ +++ +++
Orselinato de <i>n</i> -pentila(17)	+++ +++ +++	+++ +++ +++	+ + +	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	+++ +++ +++

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++) : ativo; (+++): muito ativo. Controle positivo: 2 μL (40 mg/mL) Mitelfosina (+++). Controle negativo: DMSO 1% (0).

A avaliação da ação das substâncias líquênicas orselinato de *n*-butila (14), orselinato de *sec*-butila (15), orselianto de *terc*-butila (16), orselinato de *n*-pentila (17) e orselinato de *n*-hexila (18) sobre as formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, através da leitura em microscópio invertido, demonstrou atividade até a concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

As substâncias orselinato de *sec*-butila (15) e orselinato de *n*-hexila (18) foram muito ativas (+++) a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e ativas (++) em 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 4**).

O orselinato de *n*-pentila (17) foi muito ativa (+++) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e ativa (++) em 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 4**).

Tabela 4. Atividade do Orselinato de sec-butila (15), Orselinato de *n*-pentila (17) e Orselinato de *n*-hexila (18) sobre formas promastigotas de *L. (L.) braziliensis* pelo método de número de parasitos vivos.

Substâncias (µg/mL)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	Controle Mitelfosina 40 mg/mL
Orselinato de sec-butila(15)	+++	+++	++	+	0	0	0	+++
	+++	+++	++	+	0	0	0	+++
	+++	+++	++	+	0	0	0	+++
Orselinato de <i>n</i> -pentila (17)	+++	+++	+++	++	0	0	0	+++
	+++	+++	+++	++	0	0	0	+++
	+++	+++	+++	++	0	0	0	+++
Orselinato de <i>n</i> -hexila(18)	+++	+++	++	0	0	0	0	+++
	+++	+++	++	0	0	0	0	+++
	+++	+++	++	0	0	0	0	+++

(0): inativo; (+): pouco ativo; (++) : ativo; (+++): muito ativo. Controle positivo: 2µL(40 mg/mL) Mitelfosina(+++). Controle negativo: DMSO 1% (0).

- Resultados da avaliação da viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* através do método MTT:

A determinação da viabilidade celular do ácido salazínico (5), orseliato de *n*-propila(12) , orselinato de *n*-butila(14) e β- metil Orselinato de metila (19) foi avaliada pelo método do MTT com auxílio de um leitor de ELISA, com comprimento de onda de 570 nm.

Com os valores das absorbâncias obtidos pelo leitor de ELISA (**Anexo II**), foi possível calcular o valor mais próximo do IC₅₀ (**Tabela 5**), indicando a concentração das substâncias líquênicas que diminuem 50% dos parasitos, substâncias 5, 12, 14 e 19 citadas acima com auxílio do software Microsoft Excel pelo coeficiente de correlação de Pearson.

A avaliação da atividade leishmanicida pelo MTT do β-metil Orselinato de metila (19) demonstrou valor de IC₅₀ 79,73 µg/ml (**Figura 12**); contra as formas de *L. (L.) amazonensis*, tendo ação anti-leishmania razoável.

O valor obtido do IC₅₀ do orselinato de n-butila (14) foi de 58,20 µg/ml (**Figura 13**) e para o orselianto de n-propila (12) foi 57,73 µg/ml (**Figura 14**). Estas substâncias foram consideradas como os melhores resultados frente às formas de *L. (L.) amazonensis* na metodologia do MTT por terem as menores concentrações, demonstrando uma boa ação *anti-leishmania*.

Tabela 5. Cálculo do IC₅₀ do β- metil orselinato de metila (19) , do orseliato de n-propila(12),do orselinato de iso-propila (13) e do ácido salazínico (5), sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Substâncias(µg/mL)	Cálculo do IC ₅₀	Resultado do IC ₅₀
β-metil orselinato de metila(19)	$y = 1,2666 \cdot 50 + 16,407$	79,73 µg/mL
Orselianato de n-butila (14)	$y = 0,8359 \cdot 50 + 16,407$	58,2 µg/mL
Orselinato de n-propila (12)	$y = 0,8606 \cdot 50 + 16,407$	57,73 µg/mL

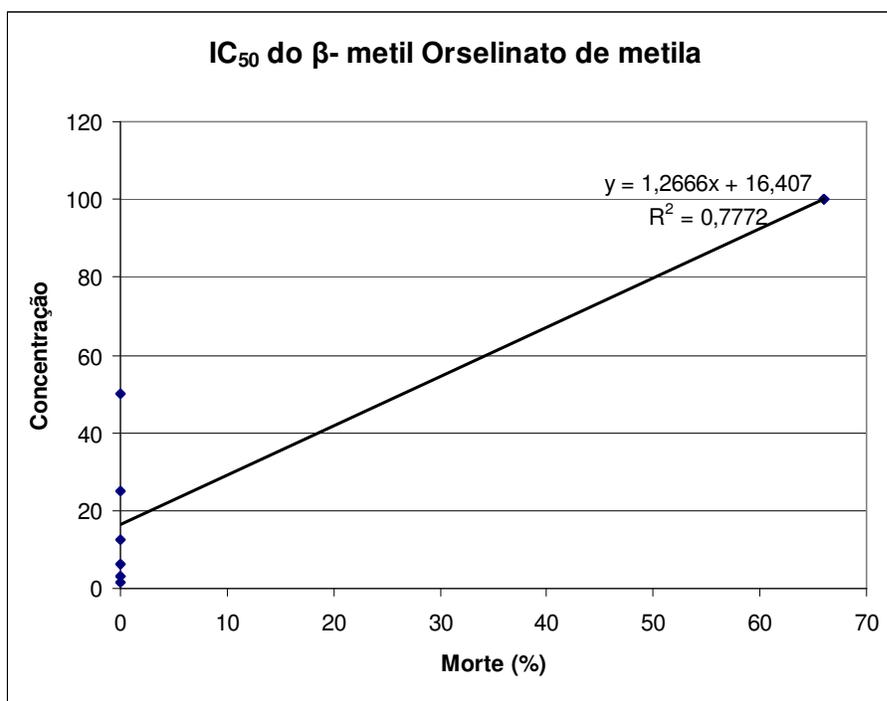


Figura 12. Concentração do β- metil Orselinato de metila (19) que inibe 50 % do crescimento dos parasitos(IC₅₀) de *L. (L.) amazonensis*.

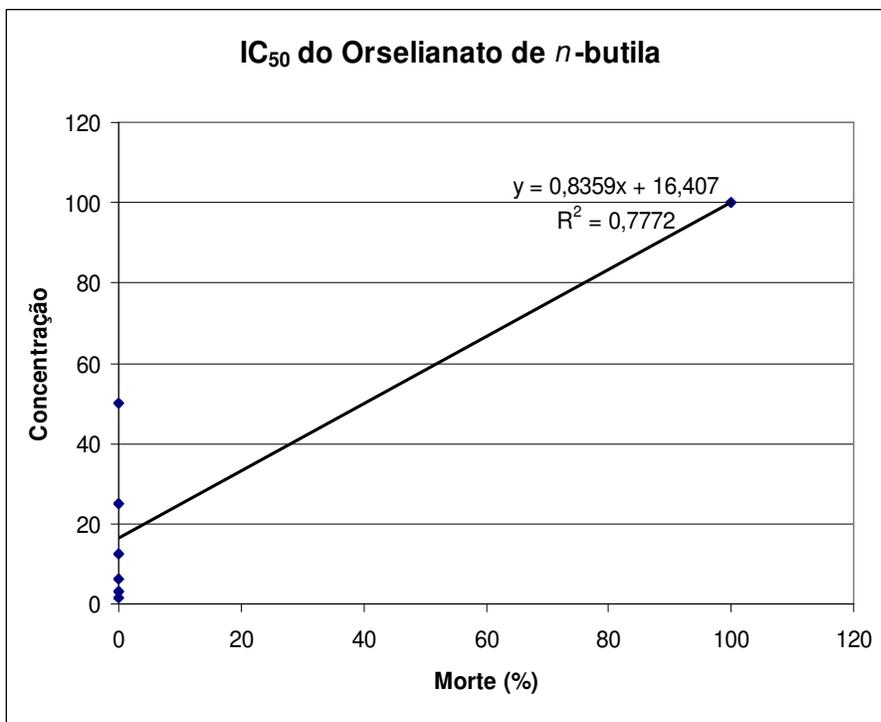


Figura 13. Concentração do orselinato de *n*-butila (14) que inibe 50 % do crescimento dos parasitos (IC₅₀) de *L. (L.) amazonensis*.

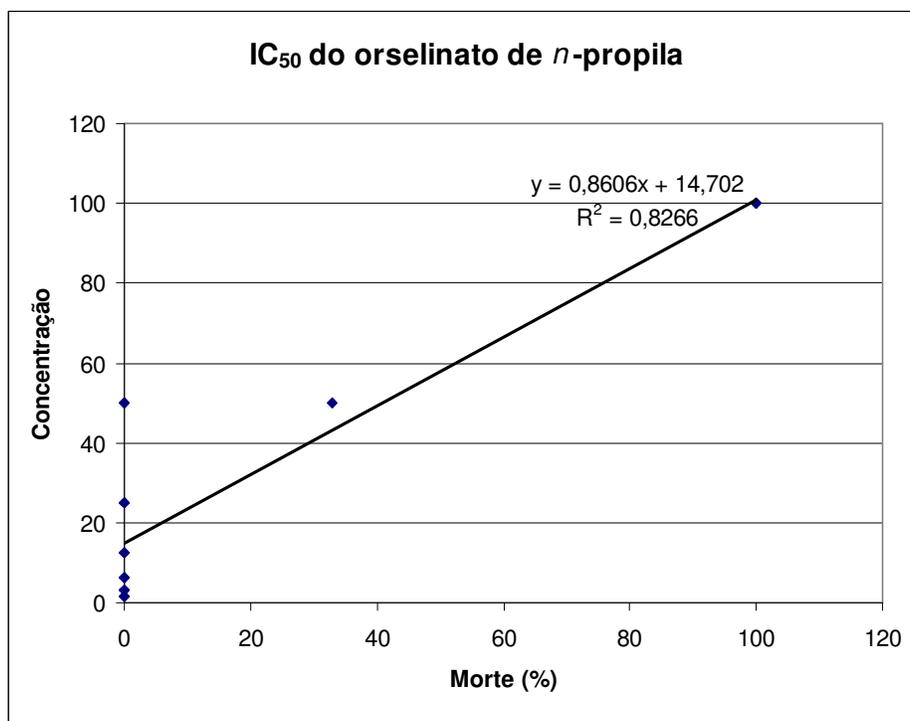


Figura 14. Concentração do orselinato de *n*-propila (12) que inibe 50 % do crescimento dos parasitos (IC₅₀) de *L. (L.) amazonensis*.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Os eventos adversos provenientes do uso das drogas atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos (CROFT, 2003; NAME, 2005). O presente estudo descreve a atividade *in vitro* de substâncias líquênicas frente às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) braziliensis* com os controles positivo (Miltefosina 40 mg/mL) e negativo (DMSO 1%).

Foram utilizadas formas promastigotas na fase estacionária de cultivo, onde se espera maior quantidade de formas metacíclicas (forma infectante). Os inóculos de cultura de material utilizados foram coletados da pata de camundongo com lesão clínica. Este procedimento de “passagem” pelo animal e cultivo de tecido infectado foi realizado para recuperar a virulência das cepas utilizadas no presente estudo, mantidas em estoques por períodos longos e que sofreram vários repiques (GRIMALDI, 1984; LOUASSINI, 1998; PAULA, 2004).

O antimoniato de meglucamina (Gluncatime®), droga de 1^o escolha no tratamento da LTA, não foi utilizado como controle nos testes *in vitro* do presente trabalho, pois um estudo realizado por JARAMILLO et al., em 2000, mostrou que a concentração mínima necessária para a atividade *in vitro* deste fármaco é de 4,1 mg/mL. A concentração mais observada na literatura para avaliação *in vitro* da atividade anti-*leishmania* foi de 100 µg/mL (RIOS, 1988, WEINGER et al., 2001).

Na revisão bibliográfica realizada até outubro de 2006, poucas referências de atividade anti-*Leishmania* para as substâncias isoladas de líquens foram encontradas. Um estudo similar realizado por FOURNET *et al.* (1997) demonstrou que a substância líquênica ácido úsnico, testadas *in vitro* em *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, obteve uma ação leishmanicida total do ácido úsnico em uma concentração de até 25 µg/mL. Sobre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* a lise foi de 80-90% na concentração de 10 µg/mL de ácido úsnico, e

frente a *L. donovani* a atividade anti-*Leishmania* foi total. Já as depsidonas panarina e 1'-cloropinarina foram ativas somente em concentrações iguais ou maiores de 50 µg/mL.

Foi relatado na literatura por JOTA et al.(1997) a atividade de substâncias líquênicas sobre *L. chagasi* , avaliaram os depsídeos atranorina e ácido difractéico nas concentrações de 10 a 40 µg/mL, e obtiveram 50% de lise (IC₅₀) dos parasitos nas concentrações de 30 e 40 µg/mL respectivamente.

O interesse pelos fungos liquenizados que se apresentam como fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas aumenta gradativamente. Muitos líquens apresentam um número grande de compostos secundários, dos quais muitos são exclusivos e não são encontrados em nenhum outro organismo (VICENTE, 1991; MATEOS *et al.* , 1993; PORTER e FOX, 1993).

Atividades biológicas reportadas para as substâncias isoladas de líquens utilizadas neste trabalho são antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatórias, antitumoral, antiviral e imunomoduladora (SANTOS *et al.* 2004), mas não há dados na literatura, com exceção do ácido úsnico e atranorina, da atividade dessas substâncias frente a *Leishmania ssp.*

Os testes biológicos foram realizados com a concentração de 100 µg/mL e decrescemos até, aproximadamente, 1,56 µg/mL, em diluições seriadas (WENIGER *et al.* , 2001). Somente as substâncias capazes de causar lise de pelo menos 70-80% dos parasitos foram testadas pela 2^ª vez, e submetidos ao método colorimétrico MTT.

No presente trabalho o orselianto de *n*-pentila é considerado a substância líquênica mais ativa, a atividade leishmanicida observada ocorreu em uma concentração em torno de 12,5 µg/mL em formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* e 25 µg/mL em formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

Resultado compatíveis com os descritos na literatura para outras substâncias líquênicas, já que no orselianto de *n*-pentila este teste é inédito.

As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram as mais suscetíveis frente aos orselinato de *sec*-butila, orselinato de *n*-pentila e orselianto de *n*-hexila, apresentando ação inibitória entre 25 e 12,5 µg/mL. Este é um resultado importante, pois a *L. braziliensis* é a espécie mais prevalente no homem. É encontrada em todas as áreas endêmicas do país, e geralmente está associada à presença de infecção em animais domésticos. É considerada a mais resistente das *Leishmanias* aos diversos tratamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; NAME, 2005).

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

Um estudo de triagem de 19 substâncias líquênicas com ação sobre *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* permitiram selecionar: orselinato de *sec*-butila, orselinato de *n*-hexila e oselinato de *n*-pentila.

As substâncias orselinato de *sec*-butila e oselinato de *n*-pentila apresentaram ótima atividade nos testes *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com lise total dos parasitos até a concentração de 50 µg/mL : muito ativas (+++).

Os orselinatos de *sec*-butila, *n*-hexila e *n*-pentila apresentaram excelente atividade nos testes *in vitro* sobre fomas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* com lise total dos parasitos até a concentração de 50 µg/mL : muito ativo (+++) para os orselinatos de *sec*-butila e *n*-hexila .

Para o orselinato de *n*-pentila a concentração de lise total dos parasitos foi de 25 µg/mL : muito ativo (+++)

Os teste *in vitro* do orselinato de *sec*-butila, orselinato de *n*-hexila e orselinato de *n*-pentila não têm dados reportados para atividade anti-*leishmania*.

O orselinato de *n*-pentila é promissor para novos estudos a fim de obter novas alternativas tratamento da LTA.

PERSPECTIVAS

7- PERSPECTIVAS

- Avaliar a ação *in vitro* das substâncias líquênicas (orselinato β -metil orselinato de metila, orselinato de *n*-butila, orselinato de *n*-propila, orselinato *n*-butila, orselinato de *sec*-butila, orselinato de *terc*-butila e orselinato de *n*-pentila) sobre formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.
- Testar a citotoxicidade das substâncias líquênicas ativas sobre células de mamíferos.
- Avaliar a influência das mesmas substâncias líquênicas ativas sobre a produção de óxido nítrico.
- Avaliar a atividade das substâncias líquênicas (orselinato β -metil orselinato de metila, orselinato de *n*-butila, orselinato de *n*-propila, orselinato *n*-butila, orselinato de *sec*-butila, orselinato de *terc*-butila e orselinato de *n*-pentila) *in vivo*.

REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS

ACESTOR,N; MASINA, S; WALKER, J; SAVIA, NG; FASEL, N; QUADRONI, M. **Establishing two-dimensional gels for the analysis of the leishmaniasis proteomes.** *Protemics*, v.2, p. 877-879, 2003.

ALEXANDER, B; MAROLI, M. **Control of phlebotomine danflies.** *Med. Vet. Entomol.*, V. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

ALRAJHI, AA; IBRAHIM, EAJ; DE VOL, EB; KHAIRAT, M; FARIS, RM; MAGUIRE, JH. **Fluconazol for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*.** *New England Journal of Medicine*, v. 346, p. 891-895, 2002.

ALZATE JF, ALVAREZ-BARRIENTOS A, GONZALEZ VM, JIMENEZ-RUIZ A. 2006. **Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-XL expression.** *Apoptosis* 11:161–171.

AHMADJIAN, V. **The Lichen symbiosis**, New York, John Wiley and Sons, 2^a ed. 1993.

BARRAL,A; SAMPAIO,DP; GRIMALDI JR,G; MOMEM,H; PRATT,DMM; JESUS,AR; ALMEIDA,R; BADARÓ,R; NETTO,MB; CARVALHO,EM; JONHSON JR,WD. **Leishmaniasis in Bahia, Brazil. Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases.** *Amer. J .Trop. Med. Hyg.*, 44: 536-546, 1991.

BELLIARD, AM; LEROY, C; BANIDE, H; FARINOTTI, R, LACOUR, B. **Decrease of intestinal *P*-glycoprotein activity by 2n-propylquinoline, a new oral treatment for visceral leishmaniasis.** *Exp Parasitol* 103: 51–56,2003.

BRYCESON, A.D.M. **Therapy in man.** *In:* Peters,W.; Killick-Kendrick,R.(eds) The Leishmaniasis in biology and medicine, vol. 2, Academic Press, London, p. 847-907, 1987.

BRENDLE, JJ; OUTLAW A; KUMAR, A; BOYKIN, DW; PATRICK, DA; TIDWELL, RR; WERBOVETZ, KA. **Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications.** *Antimicrob Agents Chemother* 46: 797-807,2002.

CANAANI, O.; RONEN, R.; GARTY, J.; CAHEN, D.; MALKIN, S.; GALUN, M. Photocustic study of the green alga *Trebouxia* in the lichen *Ramalina duriae* in vivo.**Photosynth. Res.**, Dordrecht, v. 5, 1984. p. 297-306.

CALIXTO JB. 2000. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).***Braz J Med Biol Res.* 33 (2): 179-189.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; FREITAS BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. **Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*.** *J. Submicroscopy Cytol. and Pathol.*, v. 29, p. 503-509, 1997.

CARVALHO, PB; FERREIRA, EI. **Leishmaniasis phytotherapy. Nature`s leadership agaist an anciesnt disease- review.** *Fitoter.*, v. 72, p. 599-618, 2001.

CHAGAS, A; BELÉM,H; MENEZES,C; SOUZA,R; BERG, EVD; MULLER, A; GARCEZ, L. **Potencial Anti-*Leishmania* e imunomodulador de um vegetal (ordem: Rosales) utilizado por Quilombolas do Rio Trombetas-Pará;** *Rev Soc Bras Med Trop* 37, suplemento I, p.244, 2004.

CHIN, YW; BALUNAS, MJ; CHAI, HB; KINGHORN, AD. **Drug Discovery from Natural Sources.** The AAPS Journal 8 (2): 239-253, 2006.

COHEN,PA; HUDSON,JB; TOWERS,GHN. **Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens.** *Experientia* 52: 180-183,1996.

CROFT, SL; COOMBS, GH. **Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.** Trends in Parasitology, v. 19, n. 18, p. 502-508, 2003.

CRUZ, FJSM; MIRANDA, WRH; MISTURA, SLL; CHAVES, MH; ALMEIDA, FR DE C; CARVALHO, FA DE A. **Avaliação do efeito inibitório dos extratos de *Azadirachta indica*, *Combretum leprosum* e *Terminalia brasiliensis* sobre *Leishmania (L.) amazonensis*.** Rev Soc Bras Med Trop 37, suplemento I, P. 214, 2004.

DAVIS, AJ; MURRAY, HW; HANDMAN, E. **Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships.** Trends parasitol., v. 20, n.2, p. 73-76, 2004.

DAVIDSON, RN; CROFT, SL; SCOTT, A; MAINI,M; MOODY, AH; BRYCESON, ADM. **Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis.** The Lancet 337:1061-1062, 1991.

DEDET,JP. ***Leishmania* et leishmanioses du continent américain.** Ann L 'Inst Pasteur 4 (1): 3-25, 1993.

DESJEUX, P. **Global control and leishmania HIV co-infection.** Clinics in Dermatology, v.17, p. 317-325, 1999.

DIAZ, B; UGARTE, R; QUILHOT, W. **Actividad antibacteriana *in vitro* de la depsidona clorada 1'-cloropannarina.** Rev. Lat. Amer. Microbiol. 30: 79-861,1998.

DONKOR, IO; ASSEFA, H; RATTENDI, D; LANNE, S; VARGAS, M; GOLDBERG, B; BACCHI, C. **Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidina.** European Journal Med. Chem., v. 36, p. 531-538, 2001.

ELIX, J. A. **Biochemistry and secondary metabolites.** In: Nash III, T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, p. 1-7, 1996.

ERNST-RUSSELL, MA; CHAI, CLL; HURNE, AM; WARING, P; HOCKLESS, DCR; ELIX, JA. **Structure Revision and Cytotoxic Activity of the Scabrosin Esters, Edidithiopiperazinediones from the Lichen *Xanthoparmelia scabrosa*.** Aust. J. Chem. 52: 279-283,1999a.

ERNST-RUSSEL, MA; ELIX, JA; CHAI, CLL; WILLIS, AC; HAMADA, N; NASH III, TH. **Hybocarpone, novel cytotoxic naphthazarin derivatived dfrom mycobiont cultures of the lichen *Lecanora hypocarpa*.** *Tetrahedron Lett.* 40: 6321-6324, 1999b.

ESIMONE, C. O.; ADIKWU, M. U. **Antimicrobial activity and citotoxicity of *Ramalina farinaceae*.** Fitoterapia, v. 70, p. 428-431, 1999.

FAKHFAKH, MA; FOURNET, A; PRINA, E; MOUSCADET, JF; FRANCK, X; HOCQUEMILLER, R; FIGADERE, B. **Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections.** Bioorg Med Chem 11: 5013-23, 2003.

FOURNET, A; BARRIOS, AA; MUNOZ, V; HOCQUEMILLER, R; CAVE, A; BRUNETON, J. **2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs.** *Antimicrob Agents Chemother* 37: 859-863, 1993.

FOURNET, A; GANTIER, JC; GAUTHERET, A; LEYSALLES, L; MUNOS, MH; MAYRARGUE, J; MOSKOWITZ, H; CAVE, A; HOCQUEMILLER, R. **The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*.** *J Antimicrob Chemother* 33: 537-544, 1994.

FOURNET, A; FERREIRA ME; ROJAS DE ARIAS, A; TORRES DE ORTIZ, S; FUENTES, S; NAKAYAMA, H; SCHININI, A; HOCQUEMILLER, R. **In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2447-2451, 1996.

FOURNET, A; FERREIRA, ME; ARIAS, AR; ORTIZ, ST; INCHAUSTI, A; YALLYF, G; QUILHOT, W; FERNANDEZ, E; HIDALGO, ME. **Activity of Compounds Isolated from Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis.** *Comp. Biochem. Physiol.* 116C: 51-54, 1997.

FRANCK, X; FOURNET, A; PRINA, E; MAHIEUX, R; HOCQUEMILLER, R; FIGADERE, B. **Biological evaluation of substituted quinolines.** *Bioorg Med Chem Lett* 14: 3635-3638, 2004.

FRANCK, X ; FIGADERE, B ; HOCQUEMILLER, R ; FOURNET, A. **Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases.** *Antimicrob Agents Chemother* 49:4950-4956, 2005.

FRANKE, ED; WIGNALL, FS; CRUZ, ME; ROSALES, E; TOVAR, AA; LUCAS, CM; LLANOS-CUENTAS, A; BERMAN, JD. **Efficacy and Toxicity of sodium**

stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Annals of Internal Medicine* 113:934-940, 1990.

FRIEDEL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. In: NASH, T.H. **Lichen biology.** Cambridge: University press, p.8-23., 1996.

FURTADO, T. **Critérios para diagnóstico de LTA.** *An Bras Dermatol* 65: 51-86, 1980.

GOMES, AT; SMÂNIA JUNIOR, A; SEIDEL, C; SMÂNIA, EF; HONDA, NK; ROESE, FM; MUZZI, RM. **Antibacterial activity of orsellinates.** *Braz. J. Microbiol.*, July, vol.34, no. 3, p.194-196, 2003.

GONTIJO, B; CARVALHO, MLR. **Leishmaniose tegumentar americana-** Artigo de atualização. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(1):71-80, 2003.

GRIMALDI, GJ. **A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks.** *Trasactions of the Royal Society of Tropicak Medicine and Hygiene*, 78: 560, 1984.

GRIMALDI JR, G; TESH, RB. **Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research.** *Clin Microbiol Rev* 6 (3): 230-250, 1993.

GRISARD, EC; STEINDEL, M; SHAW, JJ; ISHKAWA, EAY; CARVALHO-PINTO, CJ; EGER-MANGRICH, I; TOMA, HK; LIMA, JH; ROMANHA, AJ; CAMPBELL, DA. **Characterization of *Leishmania sp* strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, Southern Brazil.** *Acta Tropica* 74 (1): 89-93, 2000.

GUERIN, PJ; OLLIARO, P; SUNDAR, S; BOELAERT, M; CROFT, SL; DESJEUX, P; WASUNNA, MK; BRYCESON, ADM. **Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda.** Lancet Infect.Dis., v.2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HALE, M. E. **How to know the lichens.** 2^a ed. Iowa: Brown, 246p., 1979.

HALE, M. E. **The biology of lichens.** Baltimore: Edwards Arnold, 1983.

HASHIM, FA; KHALIL, EAG; ISMAIL, A; EL HASSAN, AM. **Apparently successful treatment of two cases of kala-azar dermal leishmaniasis with amphotericin B.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 89:440, 1995.

HAWKSWORTH, DL; HILL, DJ. **The lichen-forming fungi.** Blackie & Sons. Ltd. Glasgow, 1984.

HERWALDT, B; BERMAN, JD. **Recommendations for treating Leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostan) and review of pertinent clinical studies.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 46:296-306, 1992.

HIEMENZ, W; WALSH, TJ. **Lipid Formulations of Amphotericin B: Recent Progress and Future Directions.** Clinical Infectious Diseases ,22(2): S133-144,1996.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. **Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts.** Planta Medica, v. 59, p. 253-255, 1993.

HIRABAYASHI, L.; IEHATA, S.; ITO, M.; SHIGETA, S.; NARUI, T.; SHIBATA, S. **Inhibition effect of a lichen polysaccharide sulphate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro***. Chem. Pharm. Bull., v. 37, p. 2410-2412, 1989.

HIRAYAMA, T; FUJIKAWA, F; KASAHARA, T; OTSUKA, M; NISHIDA, N; MIZUNO; D. **Anti-tumor Activities of Some Products and Their Degradation Products**. Yakugaku Zasshi 100(7): 755-759, 1980.

HONDA, NK; VILEGAS, W. **A química dos líquens**. Quím. Nova. São Paulo , v.22, n.1, 1998.

HUFFORD,CD; SHARMA, AS; OGUNTINEIN, BO. **J. Pharm. Sei.** 69. 1180, 1980.

INGÓLFSDÓTTIR, K; CHUNG, GAC; SKÚLASON, VG; GISSURARSON, SR; VILHELMSTÓTTIR, M. **Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro**. Eur. J. Pharm. Sci. 6: 141- 144, 1998.

JARAMILLO, C; ARANGO, G J; GONZALEZ, MC; ROBLEDO, S; VELEZ, I D. **Citotoxic and antiparasitic activity from fruit skin of *Annona muricata***. Journal of Fitoterapia, 71:183-186, 2000.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1975. p. 100-106.

JOTA, VCS; ANDRADE, PP; SILVA, NH; PEREIRA, EC; FIGUEIREDO, R; HONDA, NK. **Análise *in vitro* da influência de substâncias líquênicas sobre *Leishmania chagasi***. Livro de Resumos – II Encontro do Grupo Brasileiro de Líquenólogos – EGBL-2, Campo Grande-MS, 06 a 08 de outubro de 1998.

KATAKURA, K. **Structural and functional analysis of the La-MDR1 multidrug resistance gene in *L. amazonensis***. Biochem Biophys Res Commun 255: 289-294, 1999.

KOŁODZIEJ, H; KIDERLEN, AF. **Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells**. Phytochemistry in press, 2005.

KOUTINAS, AF; SARIDOMICHELAKIS, MN; MILONAKIS, ME; LEONTIDES, L; PALIZOPOULOU, Z; BELLINIS,L; ARGYRIADIS, D; DIAKOU, D; PAPADOPOULOS,OA. **Randomised, blinded, placebo-control clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis**. Veterinary parasitology, v. 98, p. 247-261, 2001.

LAINSON, R; SHAW, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W LAINSON, R; SHAW, JJ. KILLICK-KENDRICK, R LAINSON, R; SHAW, JJ. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Florida: Academic, v. 1, p. 1-20, 1987.

LAINSON, R; SHAW, JJ. **Leishmaniasis and leishmanias of the New World, with particular reference to Brazil**. Bull PanAm Heal Org 7 (4): 1-19, 1973.

LAINSON, R. **Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil**. Rev Soc Bras Med Trop 18 (1): 47-56, 1985.

LAUTERWEIN, M; OETHINGER, M; BELSNER, K; PETERES, T; MARRE, R. **In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, and (-) Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms**. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 2291-2296, 1995.

LEANDRO, C; CAMPINO, L. **Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance**. Int. J. Antimicrob. Agents, v. 22, p. 352-357, 2003.

LEON, CJ; GOMEZ, SM; MORANTES, SJ. **Sensitivity profile of a panel of cell lines designed for the evaluation of in vitro cytotoxicity**. Biomédica, vol.26, no.1, p.161-168, Mar. 2006.

LIMA, RMOC; NASCIMENTO, SC; PEREIRA, EC; HONDA, NK; DEVINCENZI, IAA; ALVES, RC. **Estudo preliminar da ação antineoplásica de substâncias liquênicas**. Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, pg. 131, 1996.

LOUASSINI M, ADROHER, FJ FOULQUIÉ, MR; BENITEZ,R;. **Investigations on the in vitro metacyclogenesis of a visceral and cutaneous human strain of Leishmania infantum**. Acta tropica 70:355-368, 1998.

MAES, L; BERGHE, VD; GERMONPREZ, N; QUIRIJNEN, L; COS, P; DE KIMPE, N; PUYVELDE, LV. **In Vitro and in vivo activities of triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant Maesa balansae against visceral Leishmania species**. Antimicrob. Agents Chemother., v. 48, n. 1, p. 130-136, 2004.

MAGALHÃES, HMTV; COSTA, JML; COSTA, RM; FRANÇA, F; VALE, KC; MARSDEN, P; MAGALHÃES, AV. **Mudança no comportamento cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do Sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar**. Rev Soc Bras Med Trop 23 (1): 49-52, 1990.

MATEOS, J. L.; PEDROSA, M.M; MOLINA, M. C.; PEREIRA, C. E.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. **Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the**

synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. Plant Physiol. and Biochem. v. 31, p. 667-674, 1993.

MARSDEN, PD; SAMPAIO, RNR.; CARVALHO, EM; VEIGA, JPR; COSTA, JLM; LLANOS-CUENTAS, EA. **High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34:710-713, 1985.

MARSDEN, PD. **Mucosal leishmaniasis ("Espundia", Escomel, 1911).** Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 80:859-876, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância Epidemiológica, Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. **Manual de Controle da Leishmaniose Visceral Americana**, Brasília, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Vigilância Epidemiológica, Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**, Brasília, 62p, 2000,.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ***Leishmaniose Tegumentar Americana – Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada, Brasil, 1980-2003.*** Disponível em <http://www.saúde.gov.br> Acessado em 18/11/2006.

MIRANDA, C; MASSA, L; MARQUES, CCA. **Análise da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana através de imagem obtida por sensoriamento remoto orbital em localidade urbana da região Sudeste do Brasil.** Rev de Saúde Pública 30: 433-437, 1996.

Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay.** J. Immunol. Methods; 65: 55–63, 1983.

MORAES, MAP; SILVEIRA, FT. **Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Rev Inst Med trop São Paulo 36 (5): 459-463, 1994.

MORAIS, NA; OLIVEIRA, AWS. **Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Goiás.** Rev Soc Bras Med Trop 33: 282-283, 2000.

MURRAY ,HW .**Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach.** Int. J.Infec. Dis., v.4, n.3, p.158-177, 2000.

NAME, RQ; BORGES, KT; NOGUEIRA, LSC; SAMPAIO, JHD; TAUIL, PL; SAMPAIO, RNR. **Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil.** An Bras Dermatol 80 (3): 249-54, 2005.

NAKAYAMA, H; LOISEAU, PM; BORIES, C; DE ORTIZ, ST; SCHININI, A; SERNA, E; DE ARIAS, AR; FAKHFAKH, MA; FRANCK, X; FIGADERE, B; HOCQUEMILLER, R; FOURNET, A. **Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases.** Antimicrob Agents Chemother 49:4950-4956, 2005.

NASH III, TH. **Lichen Biology - Introduction;** In *Lichen Biology*; Nash III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996 .

NEAMATI, N; HONG, H; WANG, S; NICKLAUS, MC; MAZUMDER, A; ZHAO, H; BURKE, TRJR; POMMIER, Y; MILNE, GWA. **Discovery of HIV-1 Integrase Inhibitors by Pharmacophore Searching.** J. Med. Chem. 40: 930-936, 1997a.

NEAMATI, N; HONG, H; MAZUMDER, A; WANG, S; SUNDER, S; NICKLAUS, MC; MILNE, GWA; PROKSA, B; POMMIER, Y. **Despides and Depsidones as Inhibitors of HIV-1 Integrase : Discoery of Novel Inhibitors throug 3D Database Searching.** J. Med. Chem. 40: 942-951, 1997b.

NEUMAN, DJ; CRAGG, GM; SNADER, KM. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.** J Nat Prod; 66 : 1022 – 1037, 2003.

ÖGMUNDSTÓTTIR, HM; ZOËGA, GM; GISSURARSON, SR; INGÓLFSDÓTTIR, K. **Anti-proliferative Effects on Lichen-derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Celli-lines and Mitogen-stimulated Lymphocytes.** J. Pharmacol. 50: 107-115, 1998.

OLAFSDOTTIR, E.S.; INGÓLFSTTIR, K. **Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity.** Planta Med., Stuttgart, v. 67, p. 199-208, 2001.

OLIVEIRA-NETO, MP; SCHUBACH, A; ARAÚJO, ML; PIRMEZ, C. **High and low doses of Antimony (SbV) in American Cutaneous Leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 91(1): 207-209, 1996.

OLIVEIRA-NETO, MP; MATTOS, MS. **An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical 39(4): 323-326, 2006 (a).

OLIVEIRA-NETO, MP; MATTOS, MS. **Successful Therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(4): 376-378 2006 (b).

OLLIARO, P; LAZDINS, J; GUHL, F. **Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis.** *Expert. Opin. Emerg. Drugs*, v.7, n. 1, p. 61-67, 2002.

PASA, S; TOZ, SO; VOYVODA, H; OZBEL, Y. **Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconato.** *Veterinary parasitology*, v. 128, p. 243-249, 2005.

PASSOS, VMA; FERNANDES, O; LACERDA, PAF; VOLPINI, AC; GONTIJO, CMF; DEGRAVE, W; ROMANHA, AJ. ***Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil.** *Acta Tropica* 72 (3): 251-258, 1999.

PAULA, CDR. **Avaliação de *Cavia porcellus* como modelo murino experimental de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Tese de doutorado- Faculdade de Ciências da Saúde- Universidade de Brasília- UnB. Brasília, 2004.

PEREZ-VICTORIA, FJ; CASTANYS, S; GAMARRO, F. ***Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug.** *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 47, p. 2397-2403, 2003.

PORTER, N., FOX, F. M. **Diversity of microbial products: Discovery and applications.** *Pesticide Science*, v. 39, p. 161-168, 1993.

PORTO, C. **Autoctonia da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal: Estudo em seres humanos e cães na cidade de São Sebastião.** Dissertação (Mestrado em Dermatologia) - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília -Brasília, DF, 86f, 2004.PURVIS, W. **Lichens.** Singapore: Craft Print, 2000.

REITHINGER R. **Protective saliva: sandfly spit delivers.** Trends Parasitol 17: 513, 2001.

RIOS, JL; RECIO, MC; VILLAR, A. **Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature.** Journal of ethnopharmacology, v.23, p 127-149, 1988.

RODERIC, C. **Lichens.** In: RODERIC, C. Symbiotic fungi. London: John Willey & Sons, 1977. p. 226-253.

RODRIGUES J.C.F., ATTIAS M., RODRIGUEZ C., URBINA J.A., SOUZA W. **Ultrastructural and Biochemical alterations induced by 22,26-Azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ – sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v.46, n.2, p. 487-499, 2002.

RODRIGUES, AM; HUEB, M; RODRIGUES-DOS-SANTOS, TAR; FONTES, CJF. **Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(2):139-145, 2006.

SAENZ, RE; RODRÍGUEZ, CG; JONSON, CM; BERMAN, JD. **Efficacy and toxicity of Pentostan against Panamanian mucosal leishmaniasis.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 44:394-398, 1991.

SAMPAIO, RN. **Tratamento Hospitalar da Leishmaniose Cutâneo-Mucosa.** Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1984.

SAMPAIO, RNR; SAMPAIO, JHD; MARSDEN, PD. **Pentavalent Antimonial treatment in mucosal leishmaniasis.** The Lancet 1:1097, 1985.

SAMPAIO, RNR; SOARES, SKP; ROSA, AC; NETTO, EM; MAGALHÃES, EV; MARSDEN, PD. **Tratamento com pentamidina de seis casos de forma mucosa de leishmaniose tegumentar.** Anais Brasileiros de Dermatologia 63:439-442, 1988.

SAMPAIO, RNR; MÉRCHAN, EM; VEXENAT, A; TRISTÃO, RJ; MARSDEN, PD. **Combined antimonial allopurinol therapy in mucosal leishmaniasis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 85:373-374, 1990.

SAMPAIO, RNR; PAULA, CDR. **Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal.** Rev Soc Bras Med Trop 32 (5): 523-528,1999.

SAMPAIO, RNR; LUCAS, IC; TAKAMI, HL. **Estudo da associação da Miltefosina tópica com N-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos.** Rev Soc Bras Med Trop 37 (1): 223,2003.

SAMPAIO, RNR; PORTO, C; MOTTA, J. **Estudo comparativo entre o tratamento com anfotericina B lipossomal e N-metil-glucaminana forma cutânea de Leishmaniose.** Rev Soc Bras Med Trop 37 (1): 223,2003.

SAMPAIO, SAP; CASTRO, RM; DILLON, NL; MARTINS, JEC. **Treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B. A report of 70 cases.** International Journal of Dermatology 10:179-181,1991.

SANTOS, LC; HONDA, NK; CARLOS, IZ; VILEGAS, W. **Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens.** Fitoterapia 75: 473-479, 2004.

SAUVAIN, M; DEDET, JP; KUNESCH, N. **In vitro and in vivo leishmanicidae activity of natural and synthetic quinoids.** *Phytother. Res.*7, 167-171, 1993.

SEIFERT, K; CROFT, SL. **In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50 (1): 73–79, 2006.

SILVEIRA, TGV; TEODORO, U; ARRAES, SMAA; LONARDONI, MVC; DIAS, MLGG; SHAW, JJ; ISHIKAWA, EA; LAINSON, R. **An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Lainson & Shaw, 1972 from the North of Paraná State, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 85 (4): 475-476, 1990.

SINGH, S; SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis.** J. Infect. Chemother., v. 10, p. 310-315, 2004.

SMITH, DC; DOUGLAS, AE. **The Biology of Symbiosis;** Edward Arnold, London, 1987.

SMITH, D. C. **The symbiotic condition.** Symbiosis, v. 14, p. 3-15, 1992.

SOTO, J; TOLEDO, J; VEGA, J; BERMAN, J. **Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis.** Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 72, n. 4, p. 421-422, 2005.

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

SUNDAR, S. **Drug resistance in indian visceral leishmaniasis.** Trop. Md. Int. Health, v.6, p.849-854, 2001.

TORRES-CISNEROS, J; VILLANUEVA, JL; KINDELAN, JM; JURADO, R; SANCHEZ-GUIJO, P. **Successful treatment of antimony - resistant**

leishmaniasis with liposomal amphotericin B in patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases* 17:625-627, 1993.

TROTTER, ER; PETERS, W; ROBISON, BL. **The Experimental chemotherapy of leishmaniasis. VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*.** *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 74,299-319, 1980.

UEDA-NAKAMURA, T; FILHO, RRM; MORGADO-DÍAZ, JÁ; MAZA, PK; FILHO, BPD; CORTEZ, DAG; ALVIARO, DS; ROSA, MSS; LOPES, AHCS; ALVIANO, CS; NAKAMURA, CV. **Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*.** *Parasitology International* 55 (2006) 99 – 105, 2006.

VICENTE, C. **Biochemical and environmental influence on the synthesis and accumulation of lichen phenolics.** *Symbiosis*, v. 11, p. 279-297, 1991.

VIJAYAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; KANNAPPA REDDY, M.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. ***Fitoterapia***, v. 71, p. 564-566, 2000.

WALL, ME; WANI, MC. **Camptothecin and taxol: from Discovery to clinic.** *J. Ethnopharm.*, v 51, p 239-254, 1996.

WERBOVETZ, KA. **Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications.** *Antimicrob Agents Chemother* 46: 797-807, 2002.

YAMAMOTO, Y; MIURA, Y; KINOSHITA, Y; HIGUCHI, M; YAMADA, Y; MURAKAMI, A; OHIGASHI, H; KOSHIMIZU, K. **Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of**

tumor promoter induced Epstein-Barr virus activation. Chem. Pharm. Bull. 43(8): 1388-1390, 1995.

XAVIER-FILHO, L.; LEITE, J. B. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana de líquens antárticos. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 63, p. 93-98, 1990.

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

ZHAI, L; CHEN, M; BLOM, J; THEANDER, TG; CHRISTENSEN, SB; KHARAZMI, A. **The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 43: 793-803,1999.

Referências citadas conforme normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT).

Anexos

ANEXO I

1. Obtenção dos Líquens

Os líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale e *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale foram coletados na região de Piraputanga, em Mato Grosso do Sul. O líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi Fr.) foi coletado em Alhandra, Paraíba. *Cladonia confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti, *Ramalina peranceps* Nyl. e *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler foram adquiridos em lojas de produtos para decoração em Campo Grande-MS.

A homogeneidade das amostras para análise química foi garantida mediante observação dos talos dos líquens em lupa. Esse procedimento permite separar os talos não danificados e livres de incrustações de musgos e resíduos sólidos para a análise química. Após remoção de substratos e outros resíduos que acompanham os talos dos líquens, estes foram secos ao ar à temperatura ambiente. A seguir foram fragmentados com auxílio de tesoura e os fragmentos foram triturados em almofariz com auxílio de pistilo.

As condições para extração das substâncias fenólicas presentes nos líquens em estudo foram estabelecidas mediante a avaliação preliminar de extração de uma pequena porção (100 mg) do pó de cada líquen, com diversos solventes e em diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 45-50°C e 60-70°C) e a análise cromatográfica em camada delgada de sílica gel (CCD) dos extratos obtidos.

O critério para estabelecer o número de extrações com cada solvente baseou-se na ausência de resíduo sólido ou de matéria de natureza lipídica no balão, após a evaporação do solvente de cada extração em evaporador rotativo.

Os fracionamentos cromatográficos em coluna foram realizados com sílica gel (70-230 mesh) e foram realizados em coluna aberta à pressão atmosférica.

Cladina confusa - O pó do líquen (70 gramas) foi tratado preliminarmente com hexano à temperatura ambiente, com a finalidade de extração de matéria de natureza lipídica presente nos talos do líquen. Foram realizadas 03 extrações sucessivas por um período de 24 a 36 horas cada extração. Após a remoção de matéria de natureza lipídica pela ação de hexano, o pó do líquen foi seco em capela e a seguir foi tratado com clorofórmio com a finalidade de extrair as substâncias de natureza fenólica. A extração foi conduzida à temperatura ambiente por um período de 24 horas cada extração. Foram realizadas 04 extrações.

Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo. O extrato clorofórmico concentrado foi cromatografado em camada delgada de sílica gel no eluente hexano: acetona (5:2 v/v). A revelação sob luz UV 254 nm e com metanol: ácido sulfúrico (9:1v/v) seguido de aquecimento em chapa elétrica indicou a presença de duas substâncias majoritárias. Para a separação e purificação dessas substâncias 1,0 g do resíduo seco obtido da extração com clorofórmio foi fracionado em uma coluna contendo 50,0 gramas de sílica gel. A eluição foi conduzida iniciando com hexano seguido de gradiente crescente de polaridade da mistura hexano: acetato de etila (1 a 80%) e acetato de etila. Foram recolhidas 80 frações de 50 mL cada. A eluição foi monitorada por CCD e as frações com a mesma composição foram reunidas. Foram isoladas duas substâncias puras: Ácido perlatólico (**Figura 15**) e ácido úsnico (**Figura 16**).

Ramalina peranceps Nyl. – O pó do líquen (70 gramas) foi extraído inicialmente com clorofórmio à temperatura de 45-50°C em banho-Maria. Foram realizadas 03 extrações, cada um por um período de 6 horas. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo. O extrato concentrado e seco (0,300g) foi fracionado em coluna de sílica gel (15,0g). A eluição foi iniciada com hexano seguido de gradiente de hexano com clorofórmio (1 a 80%) e clorofórmio. Foram recolhidas 30 frações de 20 mL. A eluição foi monitorada por CCD de sílica gel. As frações com a mesma composição foram reunidas. Das frações eluídas com

hexano: clorofórmio (60%) foi isolado o ácido úsnico. Após a extração com clorofórmio o pó do líquen foi seco em capela e extraído 03 vezes com acetona, durante 6 horas cada uma, em banho-Maria à temperatura média de 45-50°C. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Devido à intensa adsorção da substância principal contida no extrato concentrado sobre sílica gel, não foi possível o uso de cromatografia em coluna de sílica para a purificação desse extrato. O método alternativo baseou-se na adição de pequenos volumes (aproximadamente 10 mL) de acetona resfriada em banho de gelo ao extrato acetônico concentrado (semi-sólido) e a mistura foi centrifugada. O tratamento dos extratos concentrados com solventes em temperaturas abaixo da temperatura ambiente, visa a remoção de pigmentos presentes nesses extratos sem causar acentuada dissolução das substâncias fenólicas. O pó branco sedimentado foi identificado como ácido norstítico (**Figura 17**).

Parmotrema lichexanthonicum. - O pó do líquen (50 gramas) foi extraído 03 vezes com clorofórmio à temperatura de 45-50°C em banho-Maria. Após a extração com clorofórmio. O extrato clorofórmico, após a evaporação do solvente, foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel (1,0 grama de extrato: 50 gramas de sílica). A eluição foi realizada com hexano e gradiente de polaridade hexano: clorofórmio (1 a 50%) e clorofórmio e a eluição foi monitorada por CCD. Foram coletadas 50 frações de 50 mL. Obteve-se o componente majoritário desse extrato que foi identificado como liquexantona (**Figura 18**).

Após a extração com clorofórmio, o pó do líquen foi extraído com acetona (05 vezes) à temperatura de 45-50° C em banho-Maria, por um período de 05 horas. Após a evaporação do solvente o extrato concentrado (semi-sólido) foi tratado com acetona resfriada em banho de gelo (10 mL) e a mistura foi centrifugada. O processo foi repetido 04 vezes e o pó branco sedimentado foi identificado como ácido salazínico (**Figura 19**).

Parmotrema tinctorum - O pó obtido (50 gramas) foi extraído com clorofórmio em banho-Maria à temperatura de 45-50°C. Após 03 extrações o pó do líquen foi seco e extraído com acetona nas mesmas condições. Os extratos obtidos foram evaporados sob baixa pressão em evaporador rotativo.

Devido à presença de pigmentos de cor verde o extrato clorofórmico concentrado (semi-sólido) foi tratado com etanol resfriado em banho de gelo. Após centrifugação da mistura, o resíduo menos pigmentado (0,25g) foi cromatografado em coluna de sílica gel. A coluna foi preparada com 12,5g de sílica e a eluição foi conduzida com hexano seguido de gradiente crescente de polaridade de hexano: clorofórmio (1 a 70%) e clorofórmio. Foram recolhidas 30 frações de 25 mL. A eluição foi monitorada por CCD. As frações eluídas com hexano: clorofórmio (60%) apresentaram uma única substância que foi identificada como atranorina (**Figura 20**). O extrato acetônico concentrado foi dissolvido em éter etílico e a solução foi tratada com bicarbonato de sódio a 5% em funil de separação. A fase aquosa foi separada e tratada com solução de ácido sulfúrico 0,5 M até precipitação completa do ácido lecanórico (Ahmann e Mathey 1967). O precipitado branco-amorfo obtido foi dissolvido em éter etílico e a solução tratada com sulfato de sódio anidro para remoção de umidade. Após a evaporação do éter obteve-se o ácido lecanórico (**Figura 21**).

Parmotrema dilatatum - 50 gramas do pó do líquen foram extraídos com clorofórmio à temperatura ambiente. Após 03 extrações o pó do líquen foi extraído com a e acetona nas mesmas condições. Os extratos foram evaporados em evaporador rotativo e os resíduos foram fracionados. O resíduo obtido do extrato de clorofórmio foi fracionado em coluna de sílica gel. A eluição foi conduzida com hexano, hexano: clorofórmio e clorofórmio. Foram recolhidas 30 frações de 50mL e foram isoladas duas substâncias: atranorina e ácido úsnico.

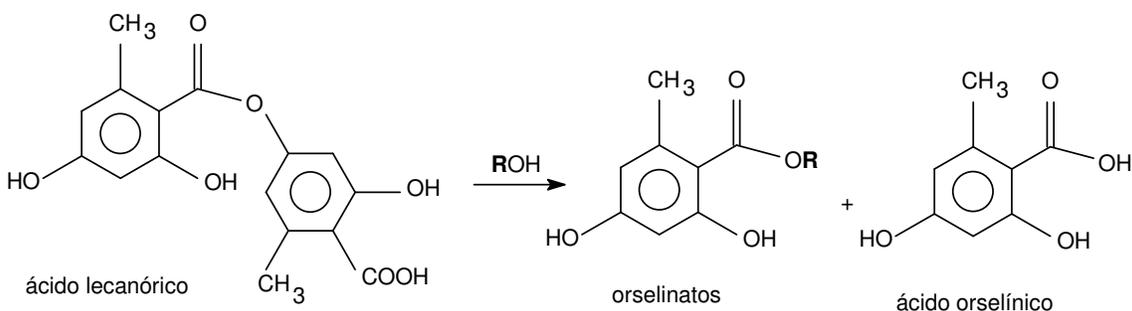
O extrato acetônico concentrado foi tratado com acetona resfriada em banho de gelo e a mistura centrifugada. O processo foi repetido até obtenção de um pó branco que foi identificado como ácido protocetrário (**Figura 22**).

Cladonia verticillaris - O pó do líquen (50 gramas) foi extraído com clorofórmio (04 vezes) seguido de acetona (06 vezes) em banho-Maria à temperatura de 45-50°C. O extrato acetônico foi evaporado e o resíduo obtido foi tratado com pequenas porções de acetona gelada e centrifugado. O processo foi repetido até obtenção de pó branco e este foi caracterizado como ácido fumarprotocetrário (**Figura 23**).

A elucidação estrutural ou a confirmação das estruturas de todas as substâncias foi feita mediante a análise dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135 (Huneck & Yoshimura 1996, Sudholm & Huneck, 1981). O grau de pureza de todas as substâncias (> 95%) foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN).

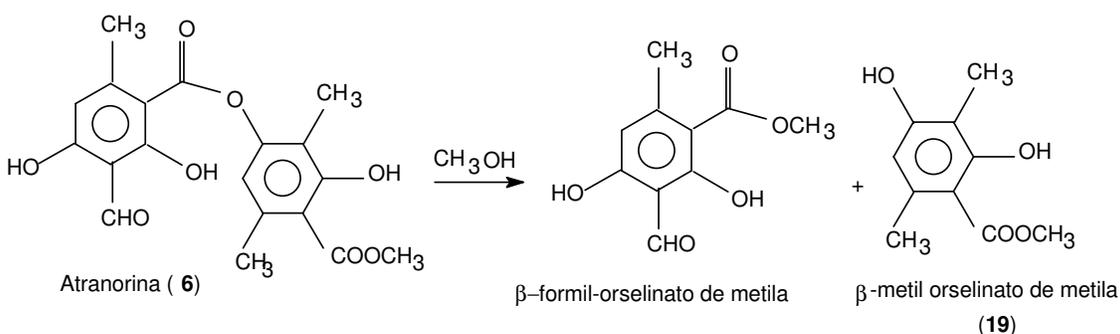
1.2 Reações de modificações estruturais do ácido lecanórico e da atranorina – Reações de alcoólise

Ácido lecanórico: 200 mg (0,3 mmol) com 50 mL de álcool (metanol, etanol, *n*-propanol, *iso*-propanol, *n*-butanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol e pentanol) foram aquecidos à temperatura de 60°C. e a reação foi monitorada por CCD. Depois da reação completa, a mistura reacional foi fracionada em coluna de sílica gel com gradiente de polaridade entre hexano e acetona. Os orselinatos foram eluídos com hexano: acetona 10% e o ácido orselínico e ácido lecanórico foram eluídos com hexano: acetona 50%.



Esquema 1 - Reações de alcoólise do ácido lecanórico (7) produzindo orselinatos de metila (**Figura 24**), de etila (**Figura 25**), de *n*-propila (**Figura 26**) de *iso*-propila (**Figura 27**) de *n*-butila (**Figura 28**), de *sec*-butila (**Figura 29**), de *terc*-butila (**Figura 30**), *n*-pentila (**Figura 31**) e *n*-hexila (**Figura 32**) (R = -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₃, -CH₂(CH₂)₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -C(CH₃)₃, -CH₂(CH₂)₃CH₃, -CH₂(CH₂)₄CH₃),

Atranorina – 150 mg (0,4 mmol) com 50 mL de metanol, foram aquecidos à temperatura de 60°C. Após reação completa, a mistura foi concentrada em rotavapor e fracionada em coluna de sílica gel com clorofórmio: tolueno 1:1 v/v. Foram obtidos os compostos: β-metil-orselinato de metila (**Figura 33**) β-formil-orselinato de metila.



Esquema 2 - Reação de alcoólise do depsídeo atranorina produzindo β-metil orselinato de metila.

Estruturas químicas das substâncias liquênicas:

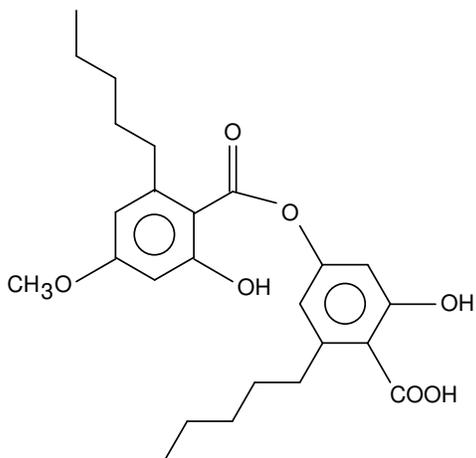


Figura 15. Ácido perlatólico

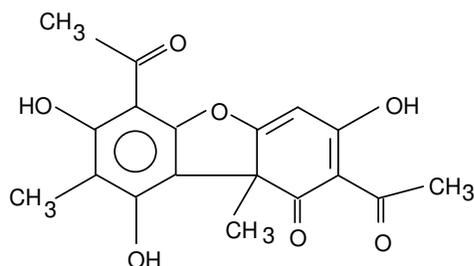


Figura 16. Ácido úsnico

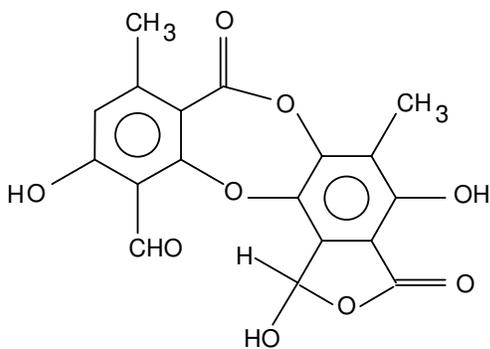


Figura 17. Ácido norstítico

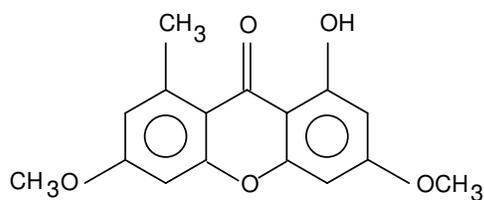


Figura 18. Liquexantona

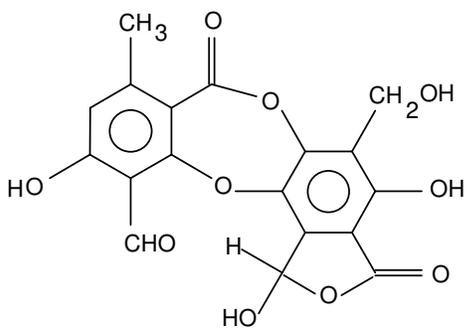


Figura 19. Ácido salazínico

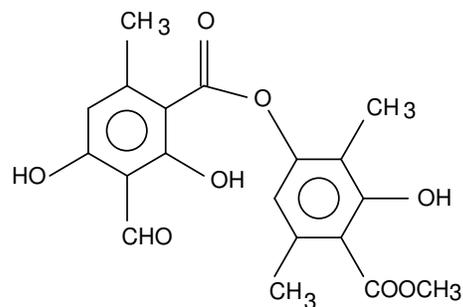


Figura 20. Atranorina

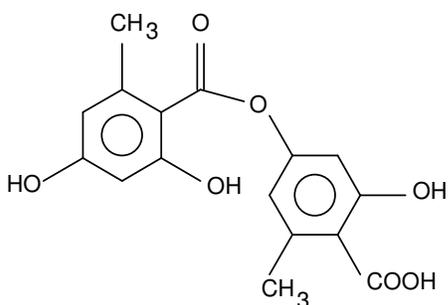


Figura 21. Ácido lecanórico

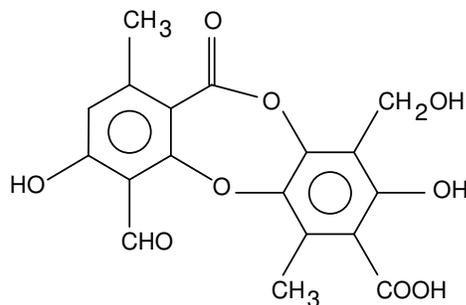


Figura 22. Ácido protocetrário

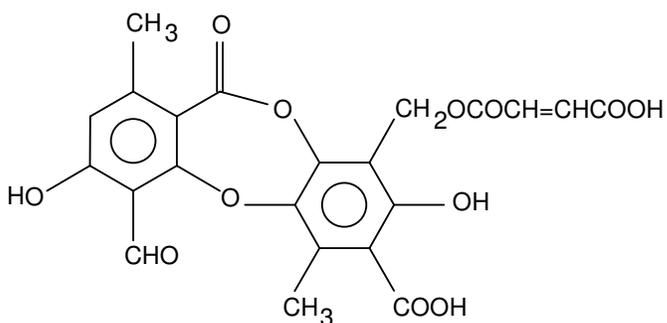


Figura 23. Ácido fumarprotocetrário

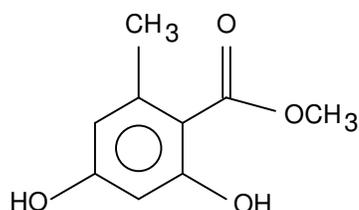


Figura 24. Orselinato de metila

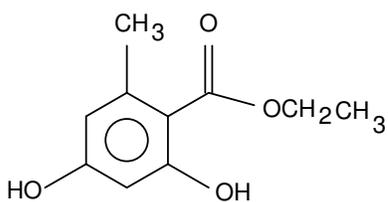


Figura 25. Orselinato de etila

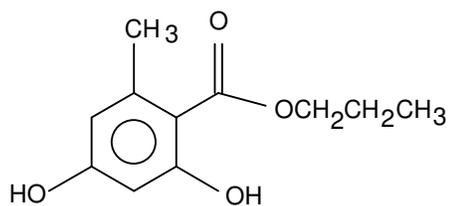


Figura 26. Orselinato de *n*-propila

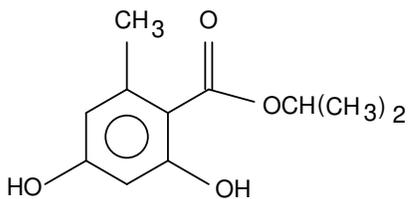


Figura 27. Orselinato de *iso*-propila

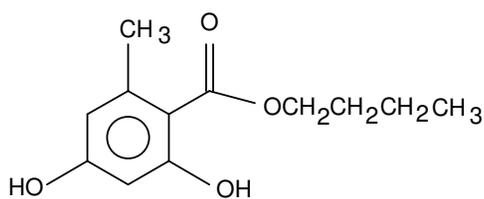


Figura 28. Orselinato de *n*-butila

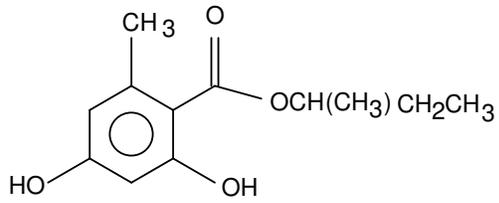


Figura 29. Orselinato de *sec*-butila

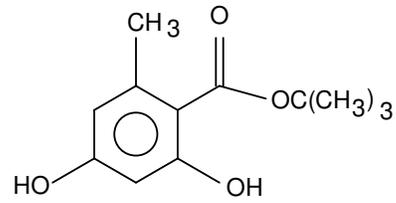


Figura 30. Orselinato de *terc*-butila

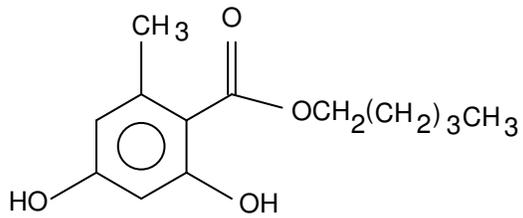


Figura 31. Orselinato de *n*-pentila

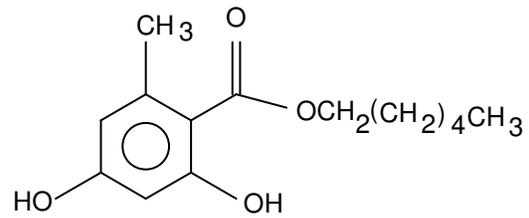


Figura 32. Orselinato de *n*-hexila

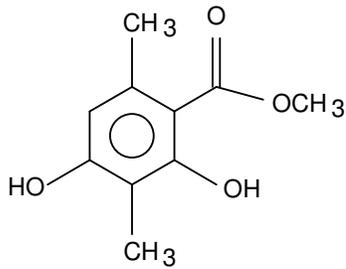


Figura 33. β -*metil*-orselinato de metila

Anexos II

Valores das absorvâncias do β - metil orselinato de metila (19) , orseliato de *n*-propila(12), orselinato de iso-propila (13) e ácido salazínico (5) sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidos através do leitor de ELISA 570 nm

Substâncias ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
Absorvância do β -metil orselinato de metila (19)	0.805	1.077	1.044	1.291	0.973	1.062	1.074
	0.819	1.049	1.069	1.327	0.939	1.111	1.090
	0.796	0.998	0.958	1.157	0.868	0.967	1.030
Absorvância do orseliato de <i>n</i> -propila (12)	0.783	1.754	1.325	1.018	1.221	1.203	1.215
	0.794	1.136	1.059	1.120	1.074	1.101	1.135
	0.765	1.106	0.668	0.990	1.139	1.079	1.176
Absorvância do orselinato de <i>n</i> -butila (14)	0.895	1.067	1.015	1.275	0.931	0.991	0.981
	1.087	1.084	1.068	1.462	1.021	1.101	1.146
	0.944	1.130	0.707	1.254	1.088	0.997	1.067
Absorvância do ácido salazínico (5)	1.629	1.199	1.009	1.220	0.885	1.013	1.059
	1.741	1.152	0.944	1.136	0.840	0.937	0.976
	1.465	1.151	0.993	1.194	0.857	0.980	1.016