



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS - CB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA

ANIELLY NAYANE DE MELO SILVA

APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS ÁCIDOS ESTÍTICO E BARBÁTICO ISOLADO E
PURIFICADO DA *Cladia aggregata* SOBRE *Leishmania*.

Recife

2018

ANIELLY NAYANE DE MELO SILVA

**APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS ÁCIDOS ESTÍTICO E BARBÁTICO ISOLADO E
PURIFICADO DA *Cladia aggregata* SOBRE *Leishmania*.**

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

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Profº Drº Nicácio Henrique da Silva

Co-orientadora: Profª Drª Mônica Cristina Barroso Martins

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Anielly Nayane de Melo

Aplicação biológica dos ácidos estítico e barbático isolado e purificado da *Cladia aggregata* sobre *Leishmania* / Anielly Nayane de Melo Silva - 2018.

67 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Nicácio Henrique da Silva

Coorientadora: Mônica Cristina Barroso Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Leishmaniose 2. Líquens 3. Produtos naturais

I. Silvas, Nicácio Henrique da (orient.) II. Martins, Mônica Cristina Barroso (coorient.) III. Título

579.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-093

ANIELLY NAYANE DE MELO SILVA

Aprovada em 22/02/2018

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

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Nicácio Henrique da Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Mônica Cristina Barroso Martins (Co-orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Ana Paula Sant'anna da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª. Vera Lúcia de Menezes Lima (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

À Pandhy, obrigado pelos 16 melhores anos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por tudo, pela minha vida, pelos meus pais (Dona Ana Maria e Seu Cícero Marques), pelo meus irmãos e principalmente pelo meu irmão mais novo que fora meu melhor amigo (Gatinho). A Mainha e Painho, mãe pelo seu amor incondicional, pronta a me apoiar e me amar independentemente de minhas escolhas, ao seu auxílio em momentos de lágrimas, a pessoa que fora minha fortaleza durante toda minha vida, meu pai pelo seu amor que muito não fora compreendido, mas que hoje não vejo outro caminho além de sua rígida, porém necessária criação.

Ao Professor Nicácio Henrique que além de meu orientador, foi um grande mestre, ensinando-me a veredar pela sua paixão por produtos naturais e pelos líquens, uma pessoa única, que acreditou em mim, assumindo um novo projeto, apesar de todos os intepéries decorridos nesses dois anos de mestrado.

A Professora Mônica Martins, minha co-orientadora, uma pessoa ímpar, espiritualizada e que com ela aprendi a galgar minha carreira e dar os primeiros passos em um novo laboratório, que com o passar do tempo tornou-se meu lar, além de sua compreensão extrema e quase divina.

Tenho agradecimentos à equipe LPN-UFPE que há muito tornou-se parte de minha vida e que sempre foram muito gentís e solícitos.

Aos alunos do Departamento de Geografia Juliana e Deivson, este último contribuiu tanto para a compreensão da extração e purificação, assim como na compreensão da importância de nosso trabalho.

A Seu João Virgínio, técnico do laboratório que mesmo aposentado me ensinou “as manhas” do rotaevaporador, assim como qual seria a melhor forma de fazer um determinado experimento, além de ser um grande amigo que torcia em todos por mim em os momentos.

Aos professores que fizeram parte de minha formação no Programa, desde aqueles que ministraram as aulas de disciplinas que cursei, aqueles que mesmo não fazendo parte do programa como a Prof^a Dayane.

Aos professores que fizeram parte da minha formação na UFRPE, assim como aqueles da Pós-graduação, em especial à Prof^a Maria Raquel Querino, sem seus ensinamentos os quais foram de grande valia guardo em meu coração até hoje. A Prof^a Raquel era entusiasta da causa animal, veterinária em sua formação acadêmica, tornou-se uma ativista que despertou em mim o grande respeito que tenho hoje por todo e qualquer animal existente. À ela, também

agradeço pela forma que penso hoje sobre a utilização de animais na pesquisa e acredito veementemente que um dia eles não mais serão mais utilizados para este fim.

Aos animais que foram utilizados por mim e por outros estudantes, a vida de cada um é importante.

Por fim, agradeço a quem foram por muito tempo as razões dos meus bons sonhos, a você Pandhy que me fez uma pessoa melhor. Xandinha, Marisa, Mufasa, Angie, meu muito obrigado.

O destino do homem é o mesmo do animal; o mesmo destino os aguarda. Assim como morre um, também morre o outro. Todos têm o mesmo fôlego de vida; o homem não tem vantagem alguma sobre o animal. Nada faz sentido! Todos vão para o mesmo lugar, vieram todos do pó, e ao pó todos retornarão. Quem pode dizer se o fôlego do homem sobe às alturas e se o fôlego do animal desce para terra? (BIBLIA, A.T. Eclesiastes 3:19-21)

RESUMO

A atividade leishmanicida de dois metabólitos secundários purificados provenientes da *Cladia aggregata*: os ácidos estítico e barbático foram testada contra cepas de *Leishmania amazonensis*, espécie responsável por doenças como a leishmaniose cutânea (tegumentar) e, em alguns casos já relatados, pela leishmaniose visceral. O ácido estítico foi obtido a partir de 12 g de talo líquênico *in natura*, que foram submetidos à sucessivas extrações do talo líquênico seguindo a série eluotrópica éter, clorofórmio e acetona. Através de várias lavagens em funil G4 com acetona, obteve-se o ácido estítico com 94,86% de pureza de acordo com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O ácido barbático foi cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais da UFPE. A atividade leishmanicida capaz de interferir no ciclo de vida do parasito foi verificada através do método de microdiluição com (MTT) nas concentrações de entre 12,5 a 200 µg/mL dos ácidos estítico e barbático diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% em placas de 96 poços contendo as células parasitárias. As leituras foram realizadas no equipamento Thermo Scientific Varioskan® Flash com comprimento de onda de 595 nm. Os resultados expressaram que ambos os ácidos apresentaram, em todas as concentrações utilizadas, atividade leishmanicida, de acordo com o teste estatístico utilizado. Sendo a concentração capaz de matar as células parasitárias em mais de 50% (CC50) de 26,20 µg/mL para o ácido estítico, enquanto que para o ácido barbático foi de 15,49 µg/mL. Em ensaios de citotoxicidade com células Vero, o ácido barbático demonstrou ter um potencial citotóxico elevado comparado ao ácido estítico, obtendo uma CC50 de 20,2 µg/mL enquanto que o outro ácido obteve uma CC50 de 196,85 µg/mL. Conclui-se que ambos os ácidos possuem atividade leishmanicida pronunciada, sendo esta diretamente proporcional ao aumento da concentração. Apesar de ser mais evidenciado nas células parasitárias que nas células Vero, o ácido barbático mostrou-se possuir potencial citotóxico para ambas, enquanto que o ácido estítico demonstrou um forte potencial como tratamento ou medida para inibição do ciclo de vida do parasito.

Palavras-chave: Leishmaniose. Líquens. Produtos Naturais.

ABSTRACT

The biological activity of two purified secondary metabolites of *Cladia aggregata*: stictic and barbatic acids was evaluated against strains of *Leishmania amazonensis*. This species is responsible for serious diseases such as cutaneous leishmaniasis (tegumentary) and, in some reported cases, visceral leishmaniasis. The botanical material, 12g of dry lichen thallus *in natura*, was subjected to successive extractions following the eluotropic series of polarity, using ether, chloroform and acetone. The acetone extract showed higher yield, 5,40% (0.6478 g) of extract, and less number of bands in thin layer chromatography (TLC). The stictic acid was obtained after several washes using acetone in the G4 funnel. Its purity, 94.86%, was determined in high performance liquid chromatography (HPLC). The barbatic acid was supplied by Laboratory of Natural Products of UFPE. The leishmanicidal activity was determined by the microdilution method with MTT. Isolated lichen metabolites, diluted in a solution of Dimethylsulfoxide (DMSO) at 10%, were tested at concentrations of 12,5 to 200 µg/ mL, distributed in 96-well plates containing the parasite cells. The readings were performed on the Thermo Scientific Varioskan® Flash calibrated at 595 nm. s the concentration was able to kill the parasite cells by more than 50% (CC50) of 26.20 µg/mL for aesthetic acid, whereas for barbático it was 15.49 µg / mL. Cytotoxic emulsions with citric acid cells demonstrated a high cytotoxic potential to sterile acid, yielding a CC50 of 20.2 µg / mL while the other acid had a CC50 of 196.85 µg/mL. Conclusion that the serial numbers have the pronouncement of leishmanicide, being a proportion proportional to the increase in concentration. Although it is more evident in the parasite cells that occur in the Vero cells, the barbatic acid presents / displays cytotoxic potential for both, whereas the esthetic acid demonstrates a strong potential like treatment or measure of inhibition of the life cycle of the parasite.

Key-words: Leishmaniasis. Lichens. Natural Products.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 –	Casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) em Pernambuco nos anos de 1994 a 2003.....	18
Figura 2 –	Distribuição geográfica cumulativa dos casos de LV em Pernambuco/Brasil.....	18
Figura 3 –	Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i>	20
Figura 4 A –	Forma promastigota da <i>Leishmania</i>	20
Figura 4 B –	Forma amastigota da <i>leishmania</i>	20
Figura 5 –	Microscopia Eletrônica de Transmissão das formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i> sp.....	21
Figura 6 –	Tipos de talos liquênicos. a) crostoso, b) folioso e c) fruticoso...	25
Figura 7 –	Via do metabolismo secundário.....	27
Figura 8 –	<i>Cladia aggregata</i> (Sw.) Nyl. (Cladoniaceae, Lecanorales).....	29
Figura 9 –	Representação da estrutura do ácido estítico.....	30
Figura 10 –	Representação da estrutura do ácido barbático.....	31

Artigo

Figura 1 –	Cromatografia em camada delgada nas várias extrações com acetona.....	48
Figura 2 –	CLAE por extensão demonstrando picos concernentes ao ácido estítico.....	49
Figura 3 –	Ressonância magnética nuclear de prótons confirmando a estrutura do ácido estítico.....	50
Figura 4 –	Ressonância magnética nuclear de carbono 13 confirmando a estrutura do ácido estítico.....	51
Figura 5 –	Estrutura do ácido estítico.....	52
Figura 6 –	Atividade Leishmanicida do ácido barbático.....	53
Figura 7 –	Atividade Leishmanicida do ácido estítico.....	54
Figura 8 –	Potencial citotóxico contra Células Vero do ácido barbático.....	55
Figura 9 –	Potencial citotóxico contra Células Vero do ácido estítico.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CC 50	Concentração que mata 50% da população
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL 50	Dose Letal para 50% da população
DMSO	Dimetilsulfóxido
LC	Leishmaniose Cutânea
LIT	Liver Infusion Triptose
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Brometo [3 – (4,5- dimetilhidrozol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio]
PBS	Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE	13
1.1.1	Leishmaniose cutânea.....	14
1.1.2	Leishmaniose mucocutânea	15
1.1.3	Leishmaniose visceral.....	15
1.1.4	Epidemiologia.....	16
1.1.5	Ciclo de vida do parasita.....	19
1.2	SUBSTÂNCIAS NATURAIS COMO FONTE ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	23
1.3	OS FUNGOS LIQUENIZADOS.....	24
1.3.1	Metabolismo primário e secundário de líquens	26
1.4	LÍQUENS E SEU POTENCIAL BIOLÓGICA.....	28
1.5	<i>Cladia aggregata</i>	28
1.6	ÁCIDO ESTÍTICO.....	30
1.7	ÁCIDO BARBÁTICO.....	31
2	ARTIGO: APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS ÁCIDOS ESTÍTICO E BARBÁTICO ISOLADO E PURIFICADO DA <i>Cladia aggregata</i> SOBRE <i>Leishmania</i>	34
3	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, doença órfã ou ainda doença tropical, juntamente com outras doenças parasitárias encontradas em vários países em desenvolvimento. Essas doenças negligenciadas consistem em um grupo de patologias que o mercado de pesquisas e produção de medicamentos não dá ênfase (BASTOS et al., 2012). A leishmaniose é vista como um problema para o desenvolvimento social e econômico de alguns países, sendo esses situados, geralmente, abaixo da linha do Equador (KETTER; MARJONOVIC, 2004). Esta doença, na maioria dos casos, pode ainda ser considerada uma doença ocupacional por estar envolvida com aspectos psicológicos, refletindo nos âmbitos sociais e econômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Países tropicais em ascensão por causa de fatores econômico-sociais possuem uma elevada ocorrência de doenças e infecções endêmicas (HERRLIND, 2007; MACHADO et al., 2009; WHO 2011).

Sendo uma doença infecciosa (ALVARENGA et al., 2010), a leishmaniose não é contagiosa e atua na pele e mucosas, mas pode vir a acometer os mais diversos sistemas no organismo, sendo causada por seres pertencentes ao reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* (LEVINE et al, 1980), cujas espécies mais difundidas no Brasil são *L. amazonensis* e *L. chagasi*. O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), onde este ciclo ocorre em alternância entre vertebrados (hospedeiros) e insetos (vetores). Estes últimos são os responsáveis pela transmissão dos parasitas para os hospedeiros (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Esses protozoários se alojam no aparelho digestório do inseto e ao picar o hospedeiro, o inseto, transmite a doença para o animal ou para o homem. No caso do homem, a incubação é variável, tendo uma média de 2 meses, mas pode manifestar outros períodos, sendo esses mais curtos (duas semanas) ou mais longos (dois anos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A transmissão da leishmaniose tanto para o homem como para outros vertebrados dá-se através da picada do mosquito fêmea infectado hematófago, do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo: Eurásia e África) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo: As Américas) (SANTOS et al., 2008), os flebotomíneos pertencem a ordem Diptera; Família Psychodidae; Sub-Família Phlebotominae, com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (BORASCHI; NUNES, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (1990), essa é uma das seis maiores endemias do mundo, estando atrás apenas da malária e da esquistossomose.

A doença ocorre clinicamente através de três formas: cutânea (LC) ou tegumentar, mucocutânea (LMC) e visceral (LV), alocadas em dois grupos: O primeiro grupo consiste nas leishmanioses tegumentares, também conhecidas como leishmanioses dermatrópicas ou mucotrópicas, dentro deste grupo estão as leishmanioses cutânea e mucocutânea, no segundo grupo encontramos a leishmaniose visceral (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). A forma cutânea é caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas, como nos braços ou pernas; a mucocutânea causa lesões que podem destruir totalmente ou parcialmente a mucosa oral e nasal. A leishmaniose visceral é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), assim como anemia no paciente, apresentando aproximadamente 100% de mortalidade em indivíduos não tratados (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Essa doença pode, ocasionalmente, caracterizar-se como zoonoses (doenças que podem ser transmitidas de animais vertebrados para o ser humano), se dando através do mosquito que pica o animal infectado e, posteriormente, ao picar o ser humano transmite a doença para este último (GONTIJO; CARVALHO, 2003), uma vez que, esta doença acomete, sobretudo, mamíferos (RYAN; LAINSON; SHAW 1987). Quando, ao invés do animal, é o homem que, por meio do mosquito, transmite a doença para outro ser humano, o que se caracteriza como uma antroponose (ASHFORD, 2000; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Alguns aspectos devem ser levados em consideração em relação à doença, a ocorrência de problemas relacionados ao encontro do parasita *in vitro* e a possível variação na resposta humoral individual é relevante, já que nem sempre esta doença encontra-se associada à presença da lesão ativa (MADEIRA et al., 2003).

1.1.1 Leishmaniose Cutânea

No Brasil, a Leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC) é conhecida como Leishmaniose cutânea, causada, entre tantas espécies, pela *L. amazonensis*, e segundo GENARO (2001), esta espécie é de extrema importância para a determinação e caracterização do quadro clínico de leishmaniose difusa. A LC é uma endemia frequente no Brasil (KAWA et al., 2010), pode-se afirmar que é uma das afecções dermatológicas mais importantes no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), à esta leishmaniose atribui-se os principais acometimentos da estrutura da pele.

Como principais vetores no país da LC, temos algumas espécies de insetos (mosquitos) que transmitem a doença: *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. migonei*, *L. flaviscutellata*, este último em especial, tem hábito noturno e transmite a

doença apenas para animais, não afetando o ser humano, uma vez que essa espécie é considerada zoófila (SILVEIRA; LAINSON; SHAW, 1991). Na forma cutânea da leishmaniose, as lesões na pele são, em geral, localizadas (única ou múltipla) com uma lesão ulcerada única, mas podem ser também disseminadas (lesões muito numerosas em várias áreas do corpo) e a forma difusa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Ainda segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010), as formas: cutânea localizada e múltiplas possuem uma lesão característica, denominada lesão ulcerada franca, sendo frequente, possuindo úlceras com bordas elevadas. Em geral, as úlceras são indolores; apenas a *L. amazonensis* está envolvida com a forma difusa da referida doença. Pernambuco notificou 620 casos de leishmaniose tegumentar no ano de 2003 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

1.1.2 Leishmaniose Mucocutânea

Pode-se entender da LMC é que, em geral, é proveniente da LC, sendo esta uma consequência da disseminação sanguínea ou linfática, logo, se não tratada, a LC, em um período de aproximadamente cinco anos, evoluirá para a LMC, sendo sua relação com a LC de 3 a 5% (MARSDEN, 1986). Esta doença é bem característica e clinicamente nota-se o comprometimento da mucosa das vias aéreas superiores com úlceras que, por vezes, podem ser necróticas, sendo assim a LMC pode atingir desde cornetos nasais, palato mole, palato duro, úvula à faringe e laringe (ALTAMIRANO-ENCISO et al, 2003) nesta situação, há o aumento do volume, hiperemia, rugosidades e úlceras superficiais nestes locais (VERONESI E FOCACCIA; 1997), a doença ainda é caracterizada por nódulos peculiares, encontrados frequentemente nos membros inferiores, com posterior ulceração (GOMES et al.; 2004). Provocando problemas de deglutição, na fala e até na respiração, LLANOS-CUENTAS; DAVIES (1992); MARSDEN (1986), afirmam que a junção e o agravamento desses sintomas poderá levar o indivíduo à morte. A LMC é uma variação clínica, mais prevalente na América do Sul (GOMES et al.; 2004).

1.1.3 Leishmaniose Visceral

A LV, também denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical, é considerada uma doença crônica, podendo vir a ser fatal para o ser humano (LAINSON; SHAW, 1987), de acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009) quando não tratada, a leishmaniose leva o paciente ao óbito em mais de 90% dos casos. De carácter eminentemente rural, a LV tomou proporções urbanas e dependendo da região a doença pode

ser denominada como calazar, barriga d'água, entre outros. A LV, também, possui três estágios ou fases: período inicial, período de estado e período final, cada um desses contendo suas particulares e sintomas (PASTORINO et al.; 2002) que vão desde a febre à caquexia e ao óbito (ACCIOLY, 2009).

O período inicial conhecido como fase aguda, tem como principais sintomas febre, palidez, tosse, diarreia, em geral, o indivíduo com LV nesta fase possui um estado de saúde geral preservado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Nas áreas endêmicas, alguns pacientes, em sua maioria, crianças, podem apresentar um quadro clínico discreto que dura aproximadamente 15 dias e que é acompanhado de uma cura espontânea, denominado forma oligossintomática, por ter vários sintomas que correspondem à outras enfermidades, este estágio ou período, geralmente, é confundido com outros processos infecciosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O período de estado é caracterizado por febre irregular, esta febre, em geral, está em associação com o emagrecimento progressivo, palidez e hepatoesplenomegalia. Seu quadro clínico apresenta uma evolução que dura em torno de dois meses, comprometendo o estado de saúde geral do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Ainda segundo MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006), os títulos de anticorpos específicos anti-*Leishmania* são elevados e a intradermorreação de Montenegro é negativa, as formas amastigotas de *Leishmania* são facilmente vistas através de esfregaço de medula óssea, baço, fígado e linfonodos.

Não havendo tratamento em tempo hábil, a doença evolui para seu período final, caracterizado por febre contínua, além disso pode-se perceber em tais pacientes unhas e cabelos quebradiços, pele extremamente seca, havendo relatos de hemorragias, icterícia e astite, podendo levar o indivíduo a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Novo Mundo (compreendendo as Américas), a *Leishmania*, *L. chagasi* é o principal agente etiológico da LV (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Os mamíferos associados a LV geralmente são silvestres, provenientes de locais como florestas e matas, como por exemplo, bichos-preguiça, tamanduás, raposas e roedores, sendo que os sintomas como as lesões causadas pela LV nestes animais não são aparentes na maioria das vezes (FUNASA, 2000), já na área urbana o cão doméstico vem sendo apontado como o principal reservatório (MOLANO et al., 2003).

1.1.4 Epidemiologia

Dados epidemiológicos indicam que existem 1,5 a 2 milhões de novos casos e 70.000 mortes por ano em todo o mundo (WHO, 2009). A doença tem ampla distribuição ocorrendo

na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (AMIM; MANISALE, 2000; ANTONOVICH et al. 2004). Essa doença fora relatada em meados do século I d.C. (LAINSON, 1997; CAMARGO; BARCINSKI, 2003). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, sendo as regiões Norte e Nordeste as mais afetadas, onde obtiveram seus registros iniciais (GRIMALDI JR; TESH; MCMAHIN-PRATT, 1989).

Um dos tipos de leishmaniose muito presente no subcontinente Indiano e na África Oriental é a leishmaniose visceral, que teve uma ocorrência entre 50.000 a 90.000 casos confirmados mundialmente. Recentemente, em 2015, aproximadamente 90% dos casos confirmados ocorreram em sete países, dentre eles o Brasil (WHO, 2017). Apenas 5% dos casos de leishmaniose cutânea não ocorrem em locais como as Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central e cerca de 75% de novos casos dessa leishmaniose ocorrem em seis países, em que novamente se observa a inserção do Brasil (WHO 2017).

Mesmo com um percentual de casos confirmados de infecção ainda muito alto, aproximadamente 350 milhões pessoas no mundo ainda estão ameaçadas pela leishmaniose (DESJEUX, 2001).

Em meados dos anos 80, houve a primeira epidemia de leishmaniose no estado brasileiro do Piauí, localizado na região Nordeste, destacando a epidemia ocorrida logo após o surgimento do estado de Tocantins, havendo, inclusive, casos na capital, Palmas (NETO; WERNECK; COSTA, 2009). Em Pernambuco, no período de 2001 a 2011, foram registrados 1.224 casos confirmados. Esta doença acomete indivíduos de todas as faixas etárias, entretanto, crianças, adolescentes e adultos jovens apresentam as maiores taxas de infecção (SES, 2012). Em Pernambuco no ano de 2003 foram registrados 84 casos de Leishmaniose Visceral (LV), com incidência de um caso por 100 mil habitantes e letalidade de 5% (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). SESA (2009) mostra que a partir do ano de 2007 o percentual de casos ocorridos no Nordeste caiu cerca de 35% na região em relação a década de 90.

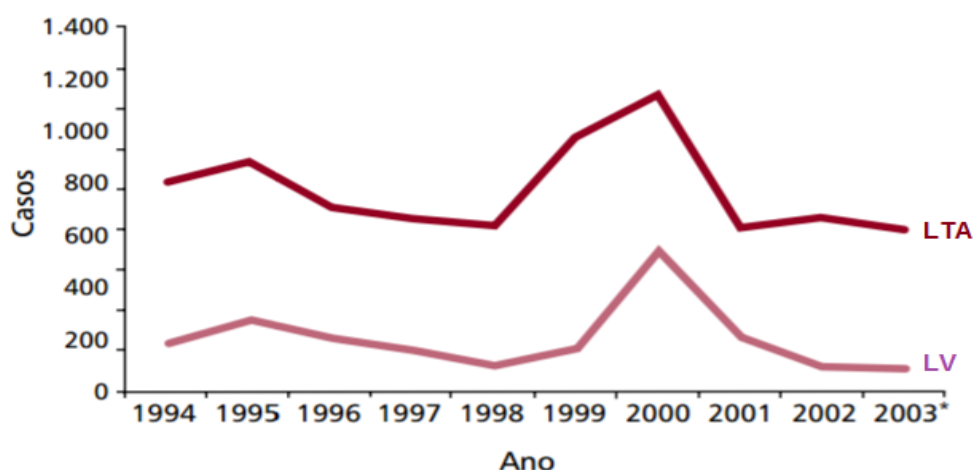


Figura 1. Casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) em Pernambuco nos anos de 1994 a 2003.

Fonte: SVS/MS, 2013.

Em um levantamento geográfico realizado entre os anos 1990 a 2001 (Figura 2), DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO (2006) perceberam uma distribuição cumulativa dos casos de LV e uma maior concentração de casos confirmados em regiões como Agreste e Sertão do Estado, porém ainda ressaltam que cidades da Região Metropolitana do Recife, como Itamaracá se destacou em número de casos fora do Agreste e Sertão.

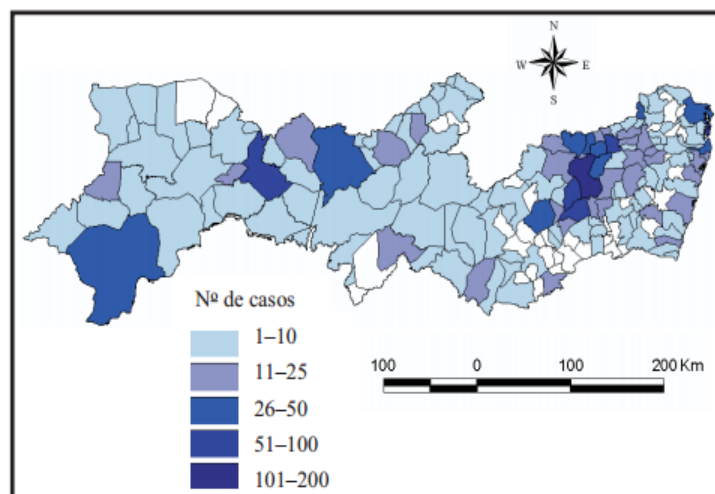


Figura 2. Distribuição geográfica cumulativa dos casos de LV em Pernambuco – Brasil. Dantas-Torres e Brandão-Filho 2006.

De acordo com MADEIRA et al., (2003), só no ano 2000 foram notificados na região sudeste, 3.059 casos de leishmaniose em seres humanos. No Brasil, a maior incidência de LV em humanos ocorreram no Nordeste, porém nos últimos anos um aumento significativo de casos localizados nas regiões Sudeste e Norte vêm sendo debatidos.

1.1.5 Ciclo de vida e Biologia do parasito

O ciclo de vida do parasita (Figura 3) no interior do hospedeiro se inicia quando formas amastigotas (formas desprovidas de flagelos) ingeridas pelo mosquito ao sugar o sangue de um animal mamífero infectado, estas formas se encontram livremente na circulação e no interior de macrófagos do mosquito. É no intestino médio do mosquito que as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas (protozoário com flagelos) e permanecem no intestino por aproximadamente 5 dias quando há a evolução da forma promastigota procíclica para a forma promastigota metacíclica que se desprende do aparelho bucal do inseto (LODGE; DESCOTEAUX, 2005), devendo ser inoculadas no hospedeiro para dar continuidade ao ciclo. À esta última recai a capacidade de infecção para o hospedeiro (CHANG; CHAUDHURI, 1990; GRIMALDI; TESH, 1989; BATES, 2006; NEUBER, 2008). A fêmea do mosquito ao praticar hematofagismo transfere a forma chamada promastigota (Figura 4 A) para o indivíduo picado. Posteriormente, estas formas são fagocitadas pelos macrófagos, transformando-se em formas amastigotas (Figura 4 B) que, para HENRIQUES et al. (2003), são consideradas as formas de resistência, possuindo estruturas arredondadas ou oval sem flagelos, que parasitam o hospedeiro, alojando-se nos monócitos, histiócitos e macrófagos e os protozoários se multiplicarão por divisão assexuada (LAINSON; SHAW, 1992), onde vão se multiplicar e conseqüentemente ocorrerá a lise das células do hospedeiro e a liberação de grande quantidade de parasitas na corrente sanguínea.

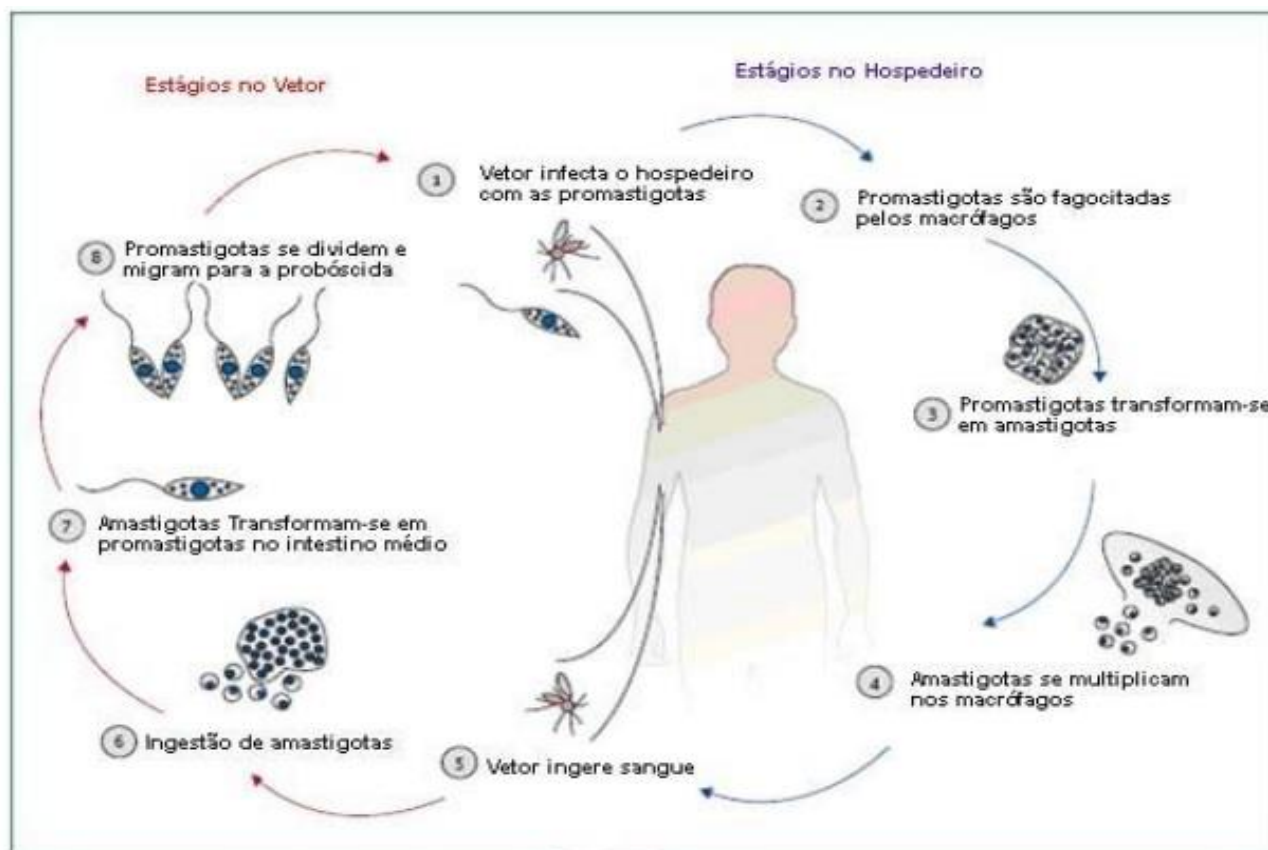


Figura 3. Ciclo de vida do parasita da *Leishmania*.

Fonte: Reinthinger et al. (2007) em Hager; Howard; Prior (2008) (modificada).

Ao picar um indivíduo infectado, o inseto ingere células parasitadas e ocorre a conversão das formas amastigotas para promastigotas, que sofrerão divisão binária no intestino do vetor e migrarão para probóscide do inseto. Este, ao picar outro indivíduo, inicia um novo ciclo de vida (LIMA JÚNIOR, 2009).

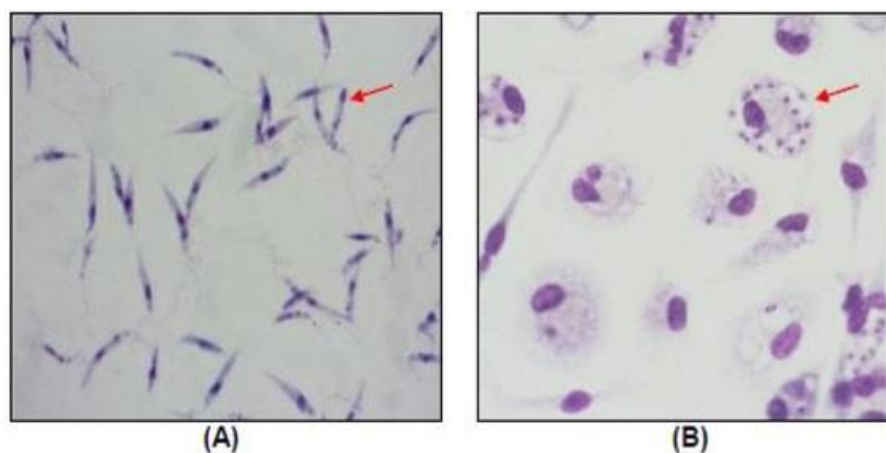


Figura 4 A. Forma promastigota da *Leishmania*

Figura 4 B. Forma amastigota da *Leishmania*.

Fonte: Antenarelli (2013).

As formas amastigotas são células esféricas, acidófilas, que são capazes de resistirem à determinadas ações microbidas, como hidrólises ácidas, por exemplo (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994); este mecanismo não está bem elucidado, mas reações que envolvem intermediários de nitrogênio e oxigênio parecem estar ligados à sobrevivência do parasito (EREL et al., 1999). Já as formas promastigotas são alongadas, o formato celular de ambas as formas é determinado por um arranjo de microtúbulos, localizados abaixo da membrana plasmática, de forma longitudinal ao corpo do parasita. Já o flagelo se localiza no saco flagelar, possuindo 18 microtúbulos na periferia que envolvem apenas um par de microtúbulos centralizados (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002), como pode ser observado na figura 5.

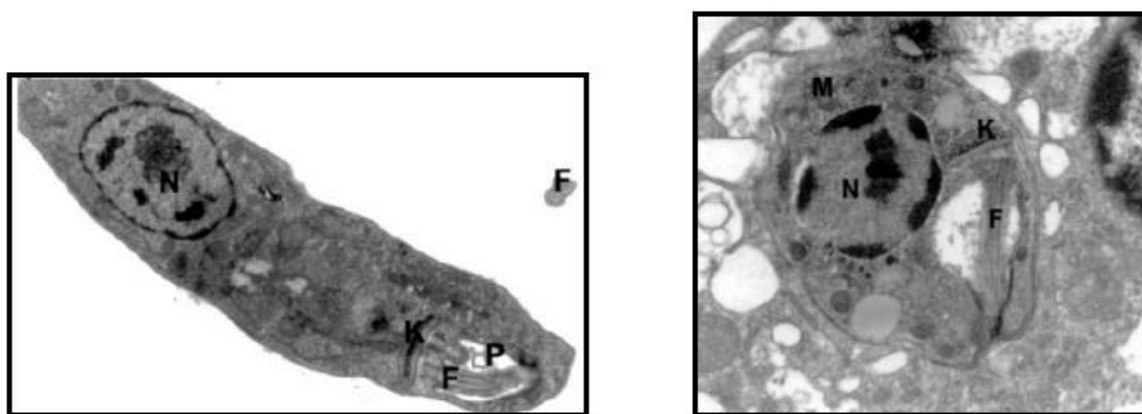


Figura 5. – Microscopia Eletrônica de Transmissão das formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita) de *Leishmania* sp. Podemos observar organelas como (N) – núcleo, (K) – cinetoplasto, (P) – saco flagelar, (F) – flagelo e (M) – megassomos (em amastigotas).

Fonte: Vannier-Santos; Martiny; De Souza 2002.

No ciclo natural a forma promastigota é encontrada apenas no hospedeiro invertebrado, por este motivo não é viável seu tratamento no caso da doença. Há várias diferenças morfológicas e bioquímicas entre as duas formas de *Leishmania*.

No saco flagelar acontece o transporte de vesículas em ambas as formas do parasita (WEBSTER; RUSSEL, 1993). As vesículas secretoras, geralmente não se distinguem tão facilmente das vesículas endocíticas, tais vesículas estão envolvidas na obtenção de moléculas importantes para o parasito, como por exemplo o LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade: Low Density Lipoprotein) (DE SOUZA, 2006).

Os megassomos são organelas essencialmente grandes, daí o nome; seu principal conteúdo são proteinases de cisteínas, tendo como função a acumulação e degradação de macromoléculas endocitadas (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002).

Segundo UEDA-NAKAMURA et al., (2002), esta organela está ligada à associação parasita-hospedeiro. Há os acidocalcissomos que são organelas com capacidade de armazenagem de íons cálcio, também contém enzimas pirofosfatase e polifosfatase (DO CAMPO; MORENO, 2001). Os glicossomos teriam a mesma função de peroxissomos (MICHELS et al., 2006). Todas essas organelas culminam para a sobrevivência do parasito. Por ser constituído com essas estruturas, as leishmanias tornam-se resistentes e desenvolvem um quadro patológico no hospedeiro mamífero (humano e não humano), por isso houve a necessidade de implantação de medidas de controle, profilaxia e tratamento para esta doença.

No Brasil, a principal medida de controle para leishmaniose canina ainda é a eutanásia de cães, pois no país é proibido o tratamento dos animais soropositivos, segundo a portaria interministerial 1426/2008 (BRASIL, 2008), mas já é sabido que esta alternativa não tem sido suficiente e BANETH; SHAW (2002), alertam para a necessidade de outros métodos e alternativas para o controle deste tipo de leishmaniose.

O tratamento das leishmanioses envolve o uso de diversas drogas sintéticas, como a anfotericina B, pentamidina e miltefosine, entretanto, a anfotericina B apresenta o uso restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que causa. Por causa desta limitação, novas formas farmacêuticas foram desenvolvidas, como anfotericina lipossômica que é menos tóxica e pouco absorvida pelos rins, que é o órgão alvo para toxicidade da droga. Porém, seu alto custo de produção em escala industrial torna seu uso quase inviável para países em desenvolvimento onde a prevalência da doença é maior (DESJEUX, 1996).

De forma geral, as alternativas terapêuticas podem ser introduzidas no tratamento de determinada doença pelos seguintes processos: triagem empírica, modificação molecular de compostos já existentes, síntese, associação de fármacos e extração de princípios ativos de outros organismos (TEMPORE; OLIVEIRA. BERLINK, 2011). Há estudos com substâncias ativas de plantas e seus extratos contra as espécies de *Leishmania*, RANGEL (2011), utilizou 120 extratos oriundos de 26 espécies pertencentes a 16 famílias de plantas do bioma Cerrado *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania spp.* Alguns princípios ativos que atuam diretamente contra o parasito são chalconas, como exemplo tem-se a licochalcona que destrói mitocôndrias dos protozoários sem danificar os macrófagos do hospedeiro (CHRISTENSEN et al., 1994) e alcaloides como coronaridina que também age na mitocôndria do parasito (DELORENZI et al., 2001, 2002). Segundo LUQUE-ORTEGA et al. (2004), a fitoalexina produzida por um fungo que infecta bananeiras, consegue bloquear a cadeia respiratória da *L. donovani* por inibição de duas enzimas: fumarato redutase e succinato desidrogenase; a conoduramina, conodurina e gabunina encontradas em algumas Apocynaceae são ativas

contra amastigotas da *L. amazonensis*. (MUNOZ et al.,1994). Terapias alternativas que possam erradicar o parasito, atuando no seu ciclo de vida e apresentando melhores índices terapêuticos, menor toxicidade e menor custo devem ser os principais objetos de estudos científicos.

1.2 SUBSTÂNCIA NATURAIS COMO FONTE ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.

Com o avanço científico, o interesse por alternativas naturais para o tratamento de algumas doenças se fez pertinente, a leishmaniose é alvo de diversos estudos que visam uma erradicação através do uso de substâncias naturais e que possam, no âmbito geral, atender a população. Para o surgimento de uma droga há três vertentes, a primeira visa a síntese de novos fármacos (sintéticos), a segunda tenta obter de fármacos já existentes uma resposta favorável e a terceira utiliza-se de produtos naturais para uma ação anti-protozoário (LINDOSO; COSTA; GOTO, 2012).

Sabe-se que esses produtos naturais hoje são caracterizados como uma importante procedência de novas moléculas bioativas com viés farmacêutico. Essas moléculas advindas dos produtos naturais fizeram com que eventos complexos relacionados à biologia celular e molecular fossem compreendidos, desta forma a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos mais seletivos e eficazes contra várias patologias foram lançados na farmacologia. Vantagens como diversidade de estruturas químicas, economia de recursos fazem com que este segmento de pesquisa seja considerado imperativo (SHU, 1998; CALIXTO, 2003; MINDELL, 2009). Por isso, há diversos estudos e pesquisas que compreendem o propósito da utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças negligenciadas (BROGES et al., 2012). O uso de várias espécies promoveram diversas atividade contra alguns protozoários, inclusive com os que envolvem as leishmanioses (RODRIGUES et al., 2012; CARNEIRO et al., 2012).

A OMS tem considerado prioridade o estudo farmacológico de produtos naturais para populações menos favorecidas, onde a busca por produtos naturais que aliviam os sintomas são utilizadas como tratamento populares e viáveis, pois, muitas vezes, não há acesso à drogas sintéticas (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Segundo CALIXTO (2001), aproximadamente 40% dos fármacos desenvolvidos contra a leishmaniose são obtidos de produtos naturais, terpenos, flavonoides e alcaloides já têm um papel importante na atividade leishmanicida, este último é enquadrado como possuindo o maior potencial contra o protozoário *Leishmania* conhecido (CALDERON et al.,

2009). Alguns metabólitos extraídos de líquens foram eficazes no tratamento da leishmaniose pela inibição do ciclo de vida do parasito, como no caso do ácido úsnico, proveniente da *Cladonia substellata* (DA LUZ et al., 2015). Pesquisas têm demonstrado que substâncias como taninos, esteroides, chalconas e naftoquinonas também possuem atividades biológica contra a doença (KLEIN et al., 2009), são utilizados extratos de folhas, raízes de plantas e outros produtos naturais como fonte desta atividade pelos mais diversos mecanismos de ação (OLIVEIRA; GILBERT; VILLAS-BÔAS, 2014).

Ainda não há, de fato, medicamentos que sejam considerados 100% eficazes para o tratamento das leishmanioses que possuam uma maior eficiência e uma menor toxicidade, por este motivo, diferentes produtos naturais vêm sendo estudados (SILVA; FIGUEIREDO; CARVALHO, 2016). Portanto, nota-se a grande importância de produtos naturais e seu uso contra doenças como a leishmaniose.

1.3 OS FUNGOS LIQUENIZADOS OU LÍQUENS

Os líquens são considerados de acordo com AHMADJIAN (1993) e (IAL, 1981), uma associação mutualística entre um ser micobionte (fungo) e um ser fotobionte (algas ou cianobactérias) e desta associação resulta um talo liquênico. Por não possuírem clorofila, os fungos, não realizam a fotossíntese e portanto na natureza os fungos têm várias estratégias de obtenção de alimento que vão desde a decomposição de material orgânico à interações com seres fotossintetizantes (HAWKSWORTH; HILL, 1984), desta maneira, estes fungos conseguem captar carbono e manter suas taxas energéticas necessárias à vida. Assim como as cianobactérias e musgos, os líquens têm uma grande importância como pioneiros na colonização dos substratos (SPIELMANN, 2006).

Segundo Lutzoni; Pagel; Reeb (2001) 20% das espécies de fungos encontradas estão associadas a algas ou a cianobactérias, como dominante nesta associação encontramos, em geral, o organismo micobionte (KRZEWICKA et al., 2017). Os líquens são encontrados na natureza e, em sua maioria, estes organismos pertencem ao Filo Ascomycota, o que compreende entre 20 a 25% das espécies de fungos conhecidas, sendo imperativa para várias ordens dentro do Reino Fungi, como aproximadamente 50% das espécies de Ascomycetos (BENATTI; MARCELLI, 2007). Além dos Ascomycetos, tem-se como fungos formadores de líquens os Basidiomicetos, Deuteromicetos e Mastigomicetos, totalizando quatro filos.

Apesar de encontrarmos a relação ecológica de mutualismo nos líquens, HONNEGER (1991) diz que os líquens são simbióticos de fungos especializados que captam nutrientes a partir de um hospedeiro que pratica fotossíntese, esta simbiose é ecologicamente obrigatório

com uma alga e/ou cianobactéria. Sendo heterotrófico, o fungo, adquire da alga sua fonte de carbono para respiração e nutrição, promovendo seu crescimento (HAWKSWORTH; HILL, 1984). Os líquens podem ser classificados de acordo com a morfologia de seu talo em crostosos, foliosos e fruticosos (Figura 6).



Figura 6. Tipos de talos líquênicos. a) crostoso, b) folioso e c) fruticoso.
Fonte: Cunha, 2011.

Quando em associação, os líquens produzem várias substâncias, algumas como ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas, vitaminas e lipídeos são provenientes do metabolismo primário sendo estes indispensáveis à vida e frutos de inúmeras reações químicas que ocorrem no organismo, transformando os nutrientes nestes compostos químicos (WATSON, 1965) e outras substâncias como os dibenzofuranos, depsídeos, depsídonas, ácidos graxos, quinonas que são originadas do metabolismo secundário. As substâncias formadas através do metabolismo secundário são chamadas de ácidos líquênicos ou substâncias líquênicas (PODTEROB, 2008). Essas substâncias têm como características gerais a pouca solubilidade em água, peso molecular relativamente baixo e podem se acumular no córtex ou na camada medular e são produzidas de acordo com a necessidade do organismo e seguem as condições ambientais onde o mesmo se encontra. Encontra-se substância depositada na parte extracelular, podendo formar cristais sobre a superfície das hifas. Esses metabólitos secundários são geralmente táxon-específicos, por isso, de acordo com Molnár; Farkas (2010), são utilizados para caracterização taxonômica, isolamento e sistemática dos fungos liquenizados.

Segundo Alexopoulos; Mims; Blackwell (1996) e Fleig et al. (2008), a relação existente entre os organismos mico e fotobionte se caracteriza como o primeiro produzindo muitos ácidos líquênicos, além da produção de outras substâncias e o organismo fotobionte

conseguir, através da fotossíntese, a produção de dióxido de carbono e várias substâncias para o fungo, mantendo a relação em equilíbrio (SPIELMANN 2006).

Sabe-se que os metabólitos secundários advindos de líquens têm funções alelopáticas, inibindo a divisão celular dos organismos fotobiontes, como por exemplo o ácido úsnico (BAČKOR et al., 2010). Em algumas espécies a alta concentração das substâncias liquênicas são atreladas com a defesa dessas estruturas. Esses metabólitos ainda podem garantir aos líquens a resistência a vários fatores como altas concentrações de dióxido de enxofre (SO₂) (HAUCK; JÜNGENS, 2008), altas temperaturas e umidade.

O papel ecológico das substâncias liquênicas é indiscutível, sendo estas das mais diversas como absorção de luz ultravioleta, bioindicativa, troca de gases, entre outras (PÖYKKÖ et al., 2010). As características acima também são pesquisadas para atividades biológicas como antimicrobianas, herbicidas, inseticidas, moluscicida, antitumorais, antioxidantes, fotoprotetores, alergênicos além de seu uso nas indústrias de cosméticos e alimentícia bem como antivirais, analgésicos e antipiréticos (YOUSUF; IQBAL M; ATTA-UR- RAHMAN, 2014).

1.3.1 Metabolismo primário e secundário de líquens

O metabolismo pode ser visto como um conjunto de transformações, reações que ocorrem no organismo a nível celular, estas reações são de suma importância e fundamentais para a funcionalidade e a sobrevivência da célula, tais como biossíntese, equilíbrio ácido-base, manutenção, aquisição de energia e respiração (CHAVES, 2012). Para garantir esta funcionalidade há as rotas metabólicas que, visando a homeostase, sintetizam, degradam ou ainda transformam substâncias químicas, que são chamados de metabólitos (SIMÕES et al., 2010).

Considera-se a luz solar, um dos muitos fatores que está ligado ao desenvolvimento de organismos fotobiontes o que, de fato, pode influenciar, segundo ARAÚJO (2014) na síntese de metabólitos secundários. De acordo com FÁVERO; PAVAN (1997) há várias substâncias diferentes, fruto do metabolismo secundário de plantas, porém todos os reinos conseguem fornecer metabólitos originados do metabolismo secundário, dentre estes podemos destacar o reino vegetal; os fotobiontes, de forma geral, conseguem tais metabólitos através de mecanismos de defesa contra vários fatores, inclusive de predadores, e são de natureza química (CROTEAU; KUTCHAN.; LEWIS 2000; PINTO et al., 2002).

De acordo com VIZZOTO; KROLOW; WEBER, (2010), a importância ecológica de metabólitos secundários tem alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres

humanos, além disso algumas de suas características podem ser úteis para outros animais. Estes metabólitos são quimicamente divididos em três grandes grupos, são eles: Terpenos, compostos fenólicos e compostos constituídos de nitrogênio (SHAHIDI, 1997; CROTEAU; KUTCHAN.; LEWIS, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006). São assim divididos, pois além de sua conformação, suas rotas são distintas, pois no caso dos terpenos utilizam a via do ácido mevalônico ou do metileritritol fosfato (MEP), enquanto que os compostos fenólicos lançam mão de duas rotas principais, sendo estas as dos ácidos chiquímico e malônico e os compostos nitrogenados são sintetizados por meio dos aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2006) (Figura 7).

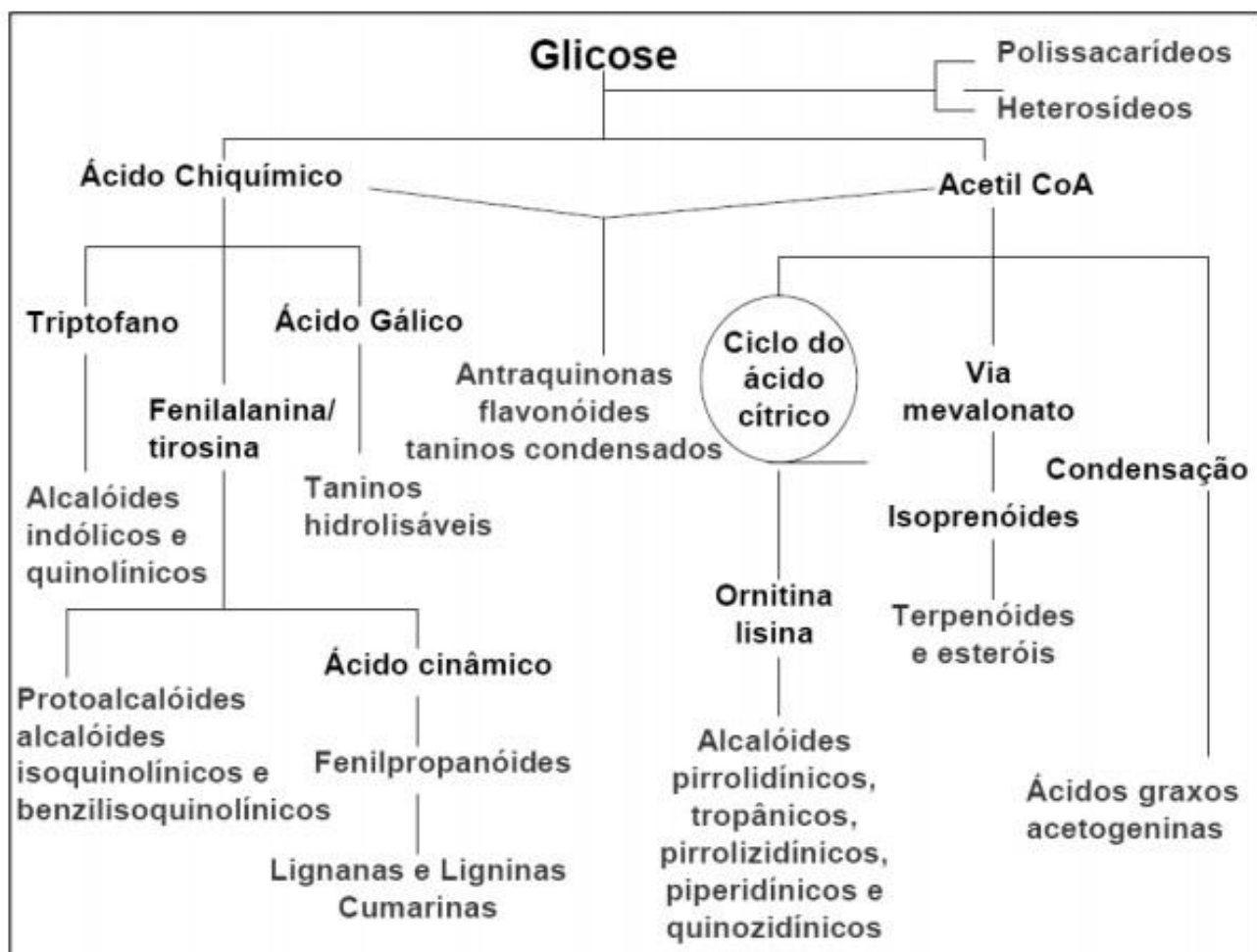


Figura 7. Via do metabolismo secundário. Simões et al., 2003.

Como o maior grupo dentre os metabólitos secundários, destacamos os terpenos ou terpenoides, derivados do isopropeno, estes compostos são classificados em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos, sendo assim distribuídos pela quantidade de carbonos em sua composição. São designados como “alcenos naturais”, uma vez que, têm como uma de suas peculiaridades uma dupla ligação entre carbonos, desta

maneira é definido como um hidrocarboneto insaturado (MCMURRY, 2011). Aos compostos fenólicos, atribuímos características como sabor, odor e até mesmo coloração, sendo bioativos, formados por um ou mais anéis aromáticos, possuindo uma atividade oxidante no fotobionte. Segundo Horst (2008) atuam na absorção e na neutralização de radicais livres, logo agem ativamente em processos de oxiredução. Como são amplamente distribuídos e diversificados para denominá-los é necessário o conhecimento da cadeia carbônica que o constitui (LEMOS, 2008). O último grupo é constituído por compostos nitrogenados que abrange os aminoácidos, alcaloides, aminas e glicosídeos cianogênicos (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ; DUCOING; SOSA, 2004). Estes compostos podem atuar no controle de pragas (JÚNIOR, 2003), assim como serem capazes de manifestar atividade antimicrobiana (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2004).

Sabe-se que o metabolismo secundário está envolvido com esquemas de proteção conferidas ao organismo fotobionte como também ao micobionte e há várias associações desta proteção com benefício ao ser humano que vai desde ação antimicrobiana à modulações neuropatológicas como anti-depressivos (KAUFMAN et al., 1999).

1.4 LÍQUENS E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO

Além de sua importância ecológica, os líquens vêm sendo utilizados nos mais diversos estudos, ficando claro o seu grande potencial biológico, não obstante seu potencial econômico. Espécies como *Cladonia substellata*, *C. verticillaris* e *Cladia aggregata* veem sendo amplamente estudadas para avaliação de seu potencial biológico.

Ácido barbático, úsnico, divaricático e lectinas demonstraram atividades biológicas pronunciadas como atividade antimicrobiana, antitumoral, leishmanicida, moluscicida e cercaricida (MARTINS et al., 2010; RAMOS, 2011; DA LUZ et al., 2015; SILVA, 2016). No estudo de HONDA; VILLEGAS (1998), os autores avaliaram atividades fungitóxica, antitumoral e citotóxica de várias substâncias provenientes de várias espécies de líquens, entre elas: Ácido úsnico, salazínico, hipostítico e lecanórico atranorina e orselinato de etila. Como visto, a importância da bioprospecção de líquens e a extração de seus metabólitos são extremamente importante para o aperfeiçoamento de estudos que promovam o conhecimento sobre suas ações em outros organismos, consequentemente seu potencial biológico.

1.5 *Cladia aggregata*

A espécie de líquen escolhida para pesquisa fora a *Cladia aggregata* (Figura 8), pertencente à família Cladoniaceae (BATTS; CALDER; BATTS, 2004) que possui 16 gêneros

incluindo o gênero *Cladia* (LUMBSCH; HUHNDORF, 2007). Dentro desta família encontra-se líquens bem característicos com talo dimórfico, possuindo o talo primário crustoso ou folhoso e um talo secundário fruticoso.

A *C. aggregata* é vista como uma das espécies fenotipicamente mais variáveis (PARNMEN; LÜCKING; LUMBSCH, 2012), sendo considerada um grupo de fungos liquenizados, possuindo notável diversidade morfológica e química (PARNMEN et al., 2013), sendo esta plasticidade fenotípica sua principal característica de adaptação (FILSON, 1981).

A espécie *C. aggregata* possui como metabólitos secundários os ácidos bárbatco, estítico, norstítico e fumarprotocetrárico e esses compostos podem ou não estarem presentes no líquen de acordo com a área onde este se encontra na natureza, mostrando portanto, a importância do ambiente no qual o líquen está localizado. Suas extremidades são densamente ramificadas com ápices rígidos e encurvados e apotécios agregados. Os metabólitos, advindos da *C. aggregata*, já são conhecidos por suas atividades biológicas antimicrobiana, células tumorais, funções anti-oxidantes, entre outras (PEREIRA et al., 1994; PEREIRA et al., 1997, AMO DE PAZ, et al., 2010).



Figura 8. *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl. (Cladoniaceae, Lecanorales).
Fonte: Pictures of Tropical Lichens.

A *C. aggregata* é encontrada amplamente na Austrália, sendo muito difundida nos países do hemisfério Sul como o Brasil, podendo ocorrer como um líquen do tipo fruticoso, presentes em crostas criptogâmicas (BATTS; CALDER; BATTS, 2004). No Brasil, há

ocorrência dessa espécie no Nordeste, na região da Bacia de Mamanguape-PB, devido ao seu clima propício.

1.6 ÁCIDO ESTÍTICO

O ácido estítico, 1,3-dihidro-1,4-dihidroxi-10-methoxi-5,8-dimethyl-3,7-dioxo-7H-isobenzofuro(4,5-b)(1,4)benzodioxepin-11-carboxaldeído é uma substância do metabolismo secundário, encontrado *Cladia aggregata*. Sendo uma substância orgânica, este componente é uma depsidonas, assim como os ácidos norstítico e lobárico (ISMED, et al., 2016), possuindo a fórmula química $C_{19}H_{14}O_9$ e com massa molecular de 386,30/u.m.a. (Figura 9).

Considerado uma depsidona, o ácido estítico tem propriedades pró-apoptóticas, citotóxicas, antioxidantes, porém esta última se encontra em menor proporção em relação aos outros ácidos testados (PERRY, et al., 1999; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, et al., 2007; AMO DE PAZ, et al., 2010). Apresenta um importante papel na inibição da proteína transportadora de beta-hidroxiacil-acilo desidratase (MCGILLICK, et al., 2016) que participa na síntese de ácidos graxos removendo água da beta-hidroxiacil-ACP, criando uma dupla-ligação e na atividade antitumoral, como no caso do adenocarcinoma do colón humano, observado no estudo de PEJIN, et al, 2017. Segundo HALE (1974) o ácido estítico pode ser alergênico e provocar fotossensibilidade na pele humana (THUNE; SOLBERG, 1980).

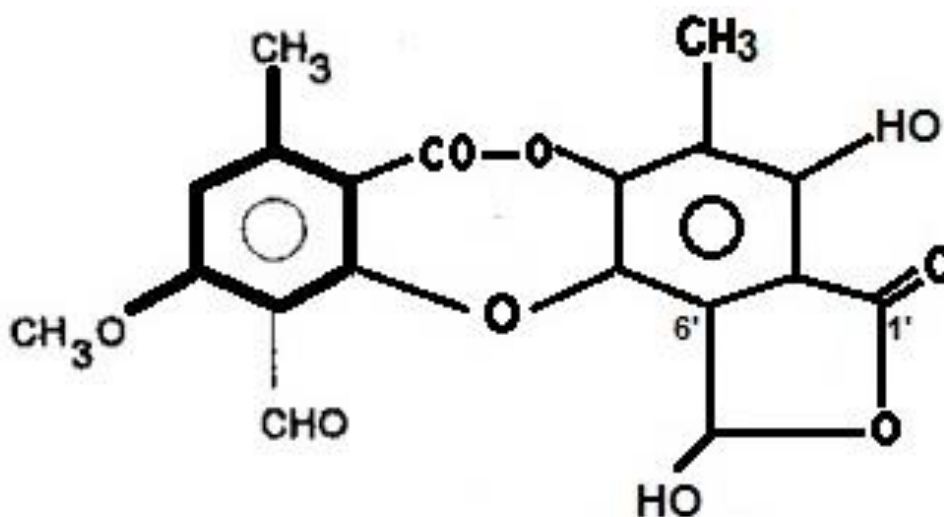


Figura 9. Representação da estrutura do ácido estítico.
Fonte: Autores (2018).

O ácido estítico pode ser considerado mais complexo do que depsidonas derivadas do orcinol, se origina a partir do β -orcinol, possuindo, entre outros substituintes, um anel heterocíclico com oxigênio nos radicais derivados dos carbonos, nas posições 1' e 6', se estes

forem grupamentos carboxila ou aldeído, respectivamente (HONDA; VILEGAS, 1998) e sendo uma substância liquênica com duplas ligações conjugadas consegue absorver bem a luz Ultra-Violeta (THUNE; SOLBERG, 1980). Essa substância é encontrada também no gênero *Clandestinotrema*, conforme relato de RIVAS PLATA; LUMBSCH (2011).

1.7 ÁCIDO BARBÁTICO

O ácido barbático, 2-hidroxi-4-[(2-hidroxi-4-metoxi-3,6-dimetilbenzoil) oxi]-3,6-dimetilbenzóico, possui fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_7$ (Figura 10) é uma substância orgânica, assim como o ácido estítico, proveniente do metabolismo secundário da *C. aggregata*, podendo ser encontrado em várias outras espécies de *Cladonia*, ocorrendo também em *Rhizocarpon geographicum* (ASAHINA; SHIBATA, 1954). Sendo um depsídeo derivado do β -orcinol, formado por dois anéis aromáticos, o ácido barbático, apresenta também grupamentos carboxílicos e hidroxílicos em ambos anéis aromáticos e que estes grupos favorecem a reação de esterificação, levando a formação de uma ligação éster entre os anéis.

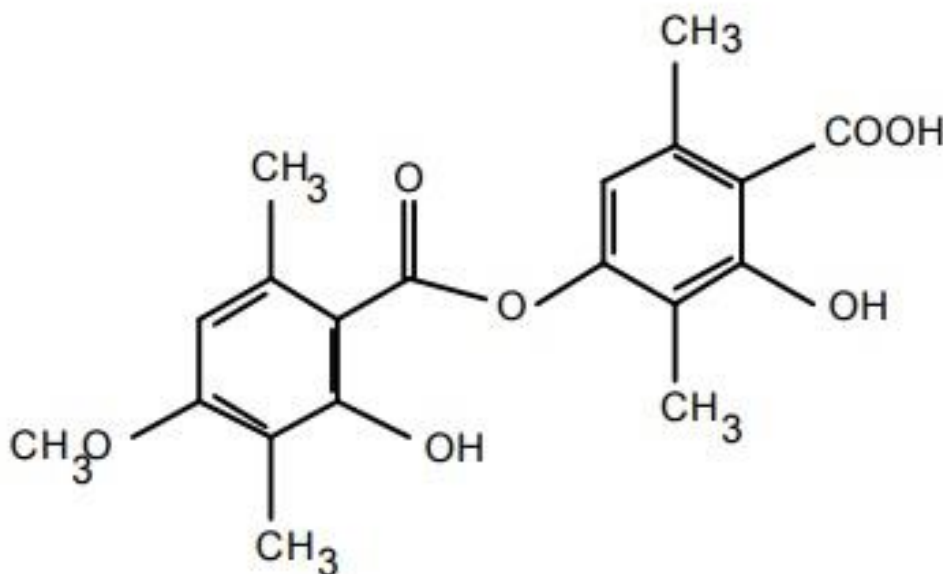


Figura 10. Representação da estrutura do ácido babático.
Fonte: Honda; Vilegas, 1998.

De acordo com STOCKER-WÖRGÖTTER (2001), a síntese deste ácido se dá de maneira mais proeminente quando há fatores de estresse como temperaturas mais baixas. HAGER; HOWARD; PRIOR (2008) demonstraram experimentalmente que este ácido consegue diminuir a divisão celular nas algas, que é considerada uma medida protetiva em relação ao fotobionte, há ainda a produção do ácido barbático quando este é submetido à

radiação ultravioleta. De acordo com Asahina; Shibata (1954), assim como Huneck; Yoshimura (1996), o ácido barbático possui seus cristais de cor amarelo-pálido, podendo ser extraído utilizando solventes como éter, clorofórmio e acetona. Apresenta reação positiva de homofluorescina com hidróxido de sódio e clorofórmio (ASAHINA; SHIBATA, 1954). TAKAHAGI et al. (2006) afirmaram que este metabólito é uma substância com grande potencial biológico, sendo eficiente na cadeia transportadora de elétrons, impedindo a transferência dos elétrons em células de tabaco, além de apresentarem funções alelopáticas.

Vários estudos já demonstraram diversas atividades biológicas do ácido barbático, como os realizados por Martins et al (2010) que trabalharam com extratos orgânicos e com a substância purificada, extraídas da *C. aggregata* Nyl, em quatro linhagens de *Staphylococcus aureus*, demonstrando que ambos, extrato e substância purificada, inibem o crescimento microbiano. Apesar do termo ácido barbático ser mais comumente utilizado, CULBERSON (1969) aponta outras denominações como ácido alectórico, rizóico, coccelico, coenomicina, entre outras. A descrição anterior, a respeito das atividades biológicas das substâncias liquênicas demonstra o potencial farmacêutico e econômico destas substâncias, podendo servir de protótipos para moléculas sintéticas e/ou quimicamente modificadas que poderão ser utilizadas em diferentes setores industriais. A flora liquênica do Nordeste é bastante diversificada e muito pouco explorada, o que torna ainda mais relevante as pesquisas destas substâncias.

OBJETIVOS

GERAL

Verificar o potencial biológico dos ácidos estítico e barbático extraídos e isolados da *Cladia aggregata* (líquen) sobre protozoários do gênero *Leishmania*.

ESPECÍFICOS:

- Coletar amostras dos líquens em Mamanguape – PB.
- Extrair, isolar e purificar o ácido estítico da *C. aggregata*.
- Caracterizar quimicamente o ácido estítico através de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13 (RMN ^1H e C^{13}).
- Verificar *in vitro* o potencial biológico dos ácidos estítico e barbático sobre a *Leishmania amazonensis*.
- Verificar citotoxicidade das substâncias em células Vero.

2 ARTIGO: APLICAÇÃO BIOLÓGICA DOS ÁCIDOS ESTÍTICO E BARBÁTICO ISOLADO E PURIFICADO DA *Cladia aggregata* SOBRE *Leishmania*.

Anielly N.M. Silva¹⁻², Mônica C.B. Martins², Phillipe L. Silva³, Fábio Brayner⁴, Ana Paula S. Feitosa⁴, Luiz C. Alves⁴, Eliete C. da Silva³, Eugênia C. Pereira, Eliane Carvalho³, Vanderlan N. Holanda⁵, Regina C B. Q. Figueiredo⁵, Nicácio H. da Silva².

¹Mestrado em Bioquímica e Fisiologia-UFPE; ²Departamento de Bioquímica-UFPE; ³Departamento de Histologia-UFPE; ⁴Lika (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)-UFPE. ⁵Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

*Correponding Author

Profº. Drº. Nicácio Henrique da Silva

Laboratorio de Produtos Naturais-UFPE

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, Recife/PE.

Phone:+55 81 21268541, fax:+55 81 21268540

e-mail:nicacio_hsilva@hotmail.com

Aplicação Biológica Dos Ácidos Estítico e Barbático Isolado e Purificado Da *Cladia aggregata* Sobre *Leishmania*.

Anielly N.M. Silva¹⁻², Mônica C.B. Martins², Phillipe L. da Silva³, Fábio Brayner⁴, Ana Paula S. Feitosa⁴, Luiz C. Alves⁴, Eliete C. da Silva³, Eugênia C. Pereira, Eliane Carvalho³, Vanderlan N. Holanda⁵, Regina C B. Q. Figueiredo⁵, Nicácio H. da Silva².

¹Mestrado em Bioquímica e Fisiologia; ²Departamento de Bioquímica; ³Departamento de Histologia; ⁴Lika (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami)-UFPE., ⁵Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

RESUMO: Os ácidos barbático e estítico são metabólitos secundários advindos de líquens que possuem uma gama de propriedades biológicas. A utilização destas substâncias contra a leishmaniose se fez pertinente. O ácido barbático foi cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais – UFPE, sendo purificado de acordo com Martins et al (2010), o ácido estítico foi purificado a partir de 12 g do líquen *C. aggregata*. Obteve-se mediante extração com acetona um rendimento 5,4%. Visando avaliar o potencial contra *Leishmanias amazonensis in vitro* dos ácidos estítico e barbático purificados, ensaios foram realizados nas concentrações de 12,5 a 200 µg/mL destes ácidos e citotoxicidade, assim como em células Vero. O potencial leishmanicida de ambos os ácidos fora evidente em todas as concentrações utilizadas, demonstrando que o aumento da concentração é inversamente proporcional à viabilidade celular, sendo a CC50 de 15,49 µg/mL para o ácido barbático e 26,20 µg/mL. O ácido barbático demonstrou um maior poder citotóxico contra células Vero comparado ao ácido estítico. Os presentes dados são atribuídos a ambos os ácidos pesquisados extraídos da *C. aggregata*, mostrando a relevância da pesquisa com metabólitos secundários no tratamento ou na inibição de doenças como a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose, líquens, ácido barbático, ácido estítico.

ABSTRACT: Barbatic and stictic acids are secondary metabolites from lichens that have a range of biological properties. The use of these substances against leishmaniasis, has become relevant. The barbatic acid was supplied by the Laboratory of Natural Products - UFPE, being purified according to Martins et al (2010), the stictic acid was purified from 12 g of lichen *C. aggregata*. Obtained with acetone extract in 5.4% yield. Aiming to evaluate the potential against *Leishmanias amazonensis in vitro* of the purified stitic and barbatic acids, the results tests were performed at concentrations of 12,5 to 200 µg / mL of these acids and cytotoxicity with Vero cells. The leishmanicidal potential of both acids was evident in all concentrations, demonstrating that the increase in concentration is inversely proportional to cell viability, with CC50 of 15.49 µg / mL for barbatic acid and 26.20 µg / mL. The bacillus acid demonstrated a greater cytotoxic power against Vero cells compared to the esthetic acid. The present data are attributed to both of the investigated acids extracted from *C. aggregata*, showing the relevance of the research with secondary metabolites in the treatment or inhibition of diseases such as leishmaniasis.

Key-words: Leishmaniasis, lichens, barbatic acid, stictic acid.

Introdução

A Leishmanioses é uma doença muito presentes em países em desenvolvimento, sendo denominadas como doenças negligenciadas ^[1]. Essa enfermidade é subdividida clinicamente em três tipos: Leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC), Leishmaniose mucocutânea (LMC) e Leishmaniose visceral (LV) ^[2] e são causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* ^[3]. A *L. amazonensis* é a causadora da Leishmaniose cutânea difusa (LCDf) que também pode ocasionar a Leishmaniose cutânea disseminada (LCDi) ^[4], assim como a Leishmaniose mucocutânea (LMC), quando o paciente apresenta erosões cutâneas e posteriormente nas mucosas com disseminação rápida ^[5-9].

A leishmaniose cutânea é considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes, chegando a atingir 88 países em todo o mundo e vista pela Organização Mundial de Saúde como prioridade em relação às doenças tropicais ^[10]. Nos anos de 1994 e 1995, o Brasil chegou a relatar 22,83 e 22,94 números de casos entre para cada 100.000 habitantes, respectivamente. No Nordeste entre os anos de 1980 a 2005 foram registrados 219.910 casos de LC, sendo que destes casos 12.239 ocorreram no Estado de Pernambuco ^[11]. A transmissão dessa doença ocorre através da picada do mosquito que inocula o parasita ainda na formas não infecciosas da doença, uma vez no organismo do animal ou do ser humano, os protozoários evoluem para a forma infecciosa.

Os líquens são uma associação entre um micobionte (fungo) e um fotobionte como algas que desde os primórdios da civilização humana são utilizados na medicina popular, produzindo óleos essenciais, corantes e que possuem diversas atividades biológicas como atividade antimicrobiana, ação contra células cancerígenas, tumores e atividades leishmanicida ^[12-16]. Estes organismos são amplamente difundidos no globo terrestre, produzindo diversos metabólitos secundários, essas substâncias desempenham diversos papéis que vão desde a preservação estrutural do líquen à proteção deste ^[17-18], além de serem bioindicadores. Diversos estudos apontam diferentes potenciais biológicos associados aos líquens e suas substâncias secundárias, dentre elas há os depsídeos e depsidonas, substâncias derivadas do β -orcinol, como os ácidos estítico e barbático, ambos encontrados especialmente em espécies do gênero *Cladia*.

O presente estudo objetivou extrair, purificar o ácido estítico substância fenólica proveniente de *Cladia aggregata* (SW.) Nyl. E avaliar o desempenho de duas substâncias liquênicas secundários, os ácidos estítico e barbático, contra cepas de *L. amazonensis*.

Materiais e Métodos

Coleta, identificação do líquen e dos principais constituintes químicos da espécie.

A *C. aggregata* (Sw.) Nyl. foi coletada no município de Mamanguape localizado no estado da Paraíba-Brasil, Mamanguape possui as coordenadas 06° 50' 19" S de latitude e 35° 07' 34" W de longitude. A coleta da espécie de líquen se deu devido as condições climáticas favoráveis, onde o clima é tropical chuvoso com estação seca no verão e chuvas de inverno antecipadas no outono^[19], sendo do tipo As' segundo a classificação de Köppen, quente e úmido^[20].

Foram coletadas aproximadamente 120 g de tufo da espécie citada, sendo conservados em sacos de papel, a temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) em local seco até a realização dos testes. A confirmação da espécie foi realizada pela Dra M.L.L. Buril através das características morfológicas e químicas do talo de acordo com chaves de identificação. Para determinação dos fenóis, pequenos cortes foram feitos na superfície do talo de cada espécie a fim de expor uma parte do córtex e/ou a medula. Sobre estas camadas expostas foram gotejadas hidróxido de potássio saturado e/ou hipoclorito de sódio saturado ou a combinação das duas soluções. A reação de coloração foi observada sob microscópio estereoscópico e que indica a presença da substância majoritária da espécie^[21]. A presença das substâncias majoritárias foi determinada através de cromatografia em camada delgada (CCD), após a obtenção dos extratos orgânicos^[22]. Uma amostra da espécie com aproximadamente 10 g foi preservada e depositada no herbário Geraldo Mariz-UFP da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, sob número de tombamento 82.195 no referido herbário.

Também foi realizada reação de coloração com soluções de cloreto férrico 10% e hidróxido de potássio a 10%, na amostra purificada e obtida a partir do extrato acetônico, com objetivo de confirmar a presença do ácido estético na amostra^[23].

Obtenção do extrato acetônico do talo *in natura* através de extração por esgotamento a frio, isolamento e purificação da substância líquênica

A *C. aggregata* triturada (12 g) foi submetida à extração sucessiva por esgotamento a frio com solventes orgânicos seguindo a série eluotrópica que se inicia com solvente menos polares para os mais polares, neste caso utilizou-se a sequência: éter, clorofórmio e acetona, repetidos três vezes com cada solvente, onde apenas os extratos acetônicos foram utilizados para o desenvolvimento da pesquisa. Os extratos acetônicos foram alocados em agitador mecânico durante 60 minutos a temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$). Cada extrato acetônico

obtido fora filtrado e evaporado em rotaevaporador acoplado em banho-maria a temperatura de aproximadamente 40° até seca e mantido em dessecador^[24].

Após a obtenção da parte sólida dos extratos acetônicos purificados, determinou-se o grau de pureza das amostras através de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e comparou-se com padrão do ácido estítico, onde este ácido fora isolado e purificado por meio de sucessivas lavagens com acetona em funil G4 de fundo poroso^[25]. O ácido barbático foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco –UFPE, sendo isolado e purificado através da metodologia de Martins et al., (2010)^[26].

Cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras purificadas de ácido estítico em funil G4, 0,1 mg de cada amostra purificada, assim como 0,1 mg do ácido estítico padrão foram dissolvidas em acetona e aplicadas em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄₊ 366 Merk de 20 x 20 cm, e desenvolvidas, de forma ascendente, no sistema de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 90:25:4 v/v/v). Após a eluição e evaporação dos solventes, as bandas foram visualizadas sob luz UV curta (254 nm) e longa (366 nm), os cromatogramas foram revelados em câmara de iodo e borrifados com ácido sulfúrico a 10% e aquecidos a 60 °C por 20 minutos, para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração^[27]. Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de R_fs e comparados ao padrão do ácido estítico.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras purificadas e o ácido estítico padrão (0,1mg/mL) foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido HITACHI acoplado em detector UV a 254 nm. As amostras purificadas e o ácido estítico padrão dissolvidas em éter foram injetadas em coluna C₁₈ de fase reversa, sendo a fase móvel constituídas de metanol/água/ácido acético (80:19,5:0,5 v/v/v), em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os resultados foram analisados pelo tempo de retenção (RT) da substância na coluna e comparados com o padrão do ácido estítico^[28].

Caracterização da estrutura molecular do ácido estítico

A confirmação da estrutura molecular do ácido estítico purificado foi realizada por meio da análise dos dados espectrais de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono 13 (RMN ^1H e C^{13}), respectivamente.

Atividade leishmanicida em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

A atividade leishmanicida será realizada de acordo com a metodologia descrita por Aranda-Souza, de Lorena. Serão utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/LTB0016). Culturas de promastigotas contendo 2×10^6 parasitas/mL serão incubadas a 26°C , na ausência e presença dos ácidos X e Y, iniciando na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ e em concentrações decrescentes até 6,12 $\mu\text{g/mL}$. Neste experimento, a Anfotericina B (10 $\mu\text{g/mL}$) será utilizada como controle positivo.

O crescimento celular será avaliado durante 72h, por contagem direta em câmara de Neubauer. O parâmetro para estimar a inibição do crescimento será a CC 50 (concentração dos ácidos capaz de matar 50% a proliferação dos parasitas após 48h de tratamento). Serão realizados três ensaios independentes em triplicata^[29].

Ensaio de Citotoxicidade em Células Vero

As análises de citotoxicidade serão realizadas segundo o protocolo estabelecido por Mosmann (2), através da técnica de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. Para tal, serão utilizadas células Vero, obtidas de uma cultura pré-existente. As células serão cultivadas (1×10^5 células/poço) e tratadas com diferentes concentrações dos ácidos X e Y (200 a 6,12 $\mu\text{g/mL}$) por 24h. Após o tratamento, células tratadas e não-tratadas serão lavadas com tampão HBSS e posteriormente incubadas em meio de cultura contendo 10% de MTT por até 4h. Em seguida, o pellet será solubilizado com uma solução de isopropanol e HCl 1% e transferido para microplacas. O precipitado derivado da redução do MTT será determinado por espectrofotometria a 570 nm^[30].

Análises Estatísticas

As análises estatísticas e o desvio padrão (DP) foram realizadas através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0 para o Windows (GraphPad Software San Diego, CA USA). Os dados foram expressos como replicatas e $\pm$ DP. As diferenças estatísticas foram

estabelecidas através da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey's, em que $p < 0,05$ foi considerado significativo para ambas as análises, assim como para concentração inibitória de crescimento em 50% da população parasitária (CC_{50}).

Resultados e Discussão

A confirmação da espécie *C. aggregata* e o teste de coloração foi positivo para o ácido estítico presente no extrato acetônico. Reagentes como hidróxido de potássio são utilizados para a classificação taxonômica de líquens^[31] sendo empregado juntamente com o cloreto férrico e apresentando coloração púrpura e amarela, respectivamente, características do ácido estítico. Obteve-se a partir de talos *in natura* do líquen *C. aggregata*, 0,87g de extrato e 0,6478g de ácido estítico purificado com um rendimento de 5,4%; ácidos provenientes de líquens tem um rendimento que varia entre 0,1% a 10% do peso seco do talo liquênico^[32]. A estação de coleta da planta é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a composição dos constituintes ativos não são constantes durante o ano. Há alguns fatores são primordiais para caracterizar o metabólito secundário proveniente nos organismos tais quais, temperatura, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, poluição, disponibilidade de água, altitude, entre outros^[33].

A análise em cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de apenas uma banda relacionada ao ácido estítico purificado com valor de R_f 32, no sistema de eluição A, igual ao R_f do ácido estítico padrão e que estão de acordo com os dados da literatura^[34] (Fig. 01). O extrato acetônico revelou a presença de duas bandas, sendo que apenas uma apresentou o mesmo número de R_f de 32 do ácido estítico purificado, havendo no extrato acetônico uma outra banda, a qual não foi analisada. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) confirma através do seu cromatograma a presença de uma única substância^[22] com tempo de retenção (TR) de 3 minutos que corresponde ao ácido estítico purificado e uma concentração de pureza de 94,86% (Fig. 02).

As análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protons (RMN^1H) e carbono¹³ ($RMN^{13}C$) (Fig. 03 e 04), confirmaram a estrutura química do ácido estítico purificado (Fig. 05), resultando nos seguintes dados e que estão de acordo com a literatura^[35]: RMN^1H (299 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H : 2.14 (3H, s, Me-8'); 2.25 (3H, s, Me-9); 3.93 (3H, s, MeO-4); 6.71 (1H, s, H-9'); 7.05 (1H, s, H-5); 10.32 (1H, s, CHO-8); 12.32 (1H, s, HO-2'). $RMN^{13}C$ (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C : C-1: 111.2; C-2: 171.4; C-3: 108.6; C-4: 163.6; C-5: 107.1; C-6: 160.0; C-

7:165.9; C-8:193.9; C-9: 21.4; C-4''-OMe: 56.2; C-1':105.6; C-2':160.7; C-3': 128.9; C-4':156.3; C-5':144.4; C-6':142.9; C-7':169.8; C-8':15.4; C-9': 104.7.

A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão para os ensaios. Com relação ao potencial leishmanicida, o ácido barbático mostrou ter atividade em todas as concentrações utilizadas. O referido ácido demonstrou um potencial leishmanicida evidenciado contra a *Leishmania amazonensis*, apresentando diferença estatística, onde $p < 0.05$; percebe-se também que nas duas maiores concentrações a inviabilidade celular cresce drasticamente, possuindo uma CC50 de 15,49 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 06). O ácido estítico, por sua vez, também apresenta atividade contra as células parasitárias, onde o aumento da concentração é inversamente à absorbância, proporcionado um índice significativo de mortalidade celular, onde $p < 0.05$, com CC50 de 26,20 $\mu\text{g/mL}$. As análises indicaram que a medida que a concentração do ácido aumenta, o número de células viáveis diminui, quando comparados ao controle, estando bem evidenciado no gráfico da Figura 07, apresentando diferença estatística significativa, assim como o ácido barbático. Para testar o poder leishmanicida do extrato de lipofílico de *Hypericum* spp, utilizou diferentes concentrações que variaram entre 15,60 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ ^[36], encontrando uma resposta dose-dependente, assim como visualizado no presente estudo.

Para a comprovação de que os ácidos estudados conseguiriam atingir os protozoários sem causar danos às células foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro*, onde pôde-se observar que os ácidos estítico e barbático apresentaram um poder citotóxico diferenciado para as células Vero. Nakamura e colaboradores em 1962, firmaram que as células Vero seriam uma boa linhagem de células para serem utilizadas nos mais diferentes estudos e este tipo de células é um dos poucos aprovados para produção de vacinas nos dias atuais^[37]. O ácido barbático mostrou um potencial citotóxico maior do que o ácido estítico, tendo obtido uma CC50 de 20,20 $\mu\text{g/mL}$, sendo pouco maior a viabilidade das células Vero em relação às células parasitárias de *L. amazonensis* (Figura 08). Já o ácido estítico demonstrou ser uma importante alternativa contra as *Leishmanias*, uma vez que, possui CC50 de 196,85 $\mu\text{g/mL}$ para linhagem de células Vero (Fig. 08), apresentando diferença estatística onde $p < 0.05$ (Figura 09), esta substância mostrou também ação citotóxica contra alguns tipos de células cancerígenas em fibroblastos normais de pulmão fetal humano MRC-5 e para células do adenocarcinoma mamário MCF-7^[38].

Há estudos que mostram que o ácido barbático é citotóxico para linhagens de células cancerígenas tais como adenocarcinoma de laringe e carcinoma epidermóides de pulmão. Encontrou-se uma DL50 de 75,69 mg/Kg para o ácido barbático contra células tumorais^[26] e

CC50 no valor de 29,29 $\mu\text{g/mL}$ do ácido estítico contra células HT-29 do adenocarcinoma humano^[39]. Como ainda não há testes com os ácidos estítico e barbático na atividade leishmanicida, porém fora utilizado o ácido úsnico um dibenzofurano do metabolismo secundário proveniente de *Cladonia substellata*, contra *Leishmania chagasi* onde obteve-se CC50 no valor de 18,30 $\mu\text{g/mL}$, esta substância obteve atividade em suas três maiores concentrações, respectivamente 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ ^[40], entretanto, podemos ressaltar outras substâncias que já foram utilizadas contra outras espécies de *Leishmania* com CC50 relativamente alto, em um estudo, encontrou-se uma CC50 de 3.919 $\mu\text{g/mL}$ para N-metil glucamina contra protozoários da espécie *L. guyanensis*^[41].

Utilizou-se o extrato hidroalcolico de *Starchytapheta cayennensis*, onde para *L. brasiliensis* obteve CC50 de 73,7 $\mu\text{g/mL}$ e *L. amazonensis* de 382,5 $\mu\text{g/mL}$ ^[42]. Afirma-se que extratos de *P. edulis*, *C. ambrosioides* e *S. jambolanum* que possuem CI50 maiores que 100 $\mu\text{g/mL}$ tem potencial leishmanicida moderado contra formas promastigotas de *Leishmania*^[43]. Fora utilizada a raiz de *Physalis angulata* (planta) e detectou uma série de alterações nas células parasitárias como encurtamento ou duplicidade de flagelo e perda da morfologia natural, além do processo de divisão atípica^[44]. A anfotericina B é um antibiótico efetivo contra Leishmaniose cutânea e mucocutânea, porém possui diversos efeitos colaterais, sendo incorporada pelos macrófagos, porém sem reagir com moléculas de colesterol do hospedeiro^[45], no presente estudo percebe-se que na concentração de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a anfotericina B é capaz de reduzir cerca de 50% da população parasitária, pela sua eficácia e seus efeitos ela é utilizada em pequenas doses.

Desta forma, percebe-se que o ácido barbático mostrou-se eficaz contra cepas de *L. amazonensis* e baixo poder citotóxico, o ácido estítico, por sua vez, apresentou uma maior citotoxicidade contra células Vero, porém não apresentou atividade com diferença estatística, apesar do gráfico demonstrar uma tendência à esta atividade, acredita-se que com outras análises como a microscopia poderá nos fornecer dados que, apesar dos índices de mortalidade de ambos os ácidos, mostrem que há deformidades nas células parasitárias que possam interferir em seus ciclo de vida.

6 Referências Bibliográficas

1. Academia Brasileira de Ciências. **Doenças negligenciadas** / Wanderley de Souza, coordenador. Acesso em: <https://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>, set de 2017. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.
2. Altamirano-Enciso A J; Marzochi M C A; Moreira J S; Schubach A O; Marzochi K Bf. **Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas.** vol. 10(2):853-82, set-dez. História, Ciências, Saúde Manguinhos, Rio de Janeiro, 2003.
3. Accioly M. P. Atividade Leishmanicida *in vitro* de frações de *Spondias Mombin* e *Musa Paradisiaca* sobre *Leishmania Chagasi*. Dissertação. UEC- CE. Fortaleza, 73p.; il.
4. Barral A.; Pedral-Sampaio D.; Grimaldi J.G.; Momen H.; McMahon-Pratt .; Ribeiro de Jesus A.; Almeida R.; Badaro R.; Barral-Netto M.; Carvalho E.M. Leishmaniasis in
5. Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol** 30: 1269-1281.
2009.
6. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 27: 305-318. 2004.
7. Oliveira C.I. et al. Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis. **Drug Discov Today: Disease Models** 1(1): 81-86. 2004.

8. Silveira FT, Lainson R, Corbett C. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the 93 Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99(3): 239- 251. 2004.

9. Berman JD. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Curr Infect Dis Rep** 7:33-38. 2005.

10. Remme, J.H.F., et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.:421-426, Oct., 2012.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico Clínico e Diferencial. Brasília -DF 2006.

12. Vartia K.O. Antibiotics in lichens I. **Annals Medicine Experimental Biologic Fennici**. V 27. 46-54 p. 1949.

13. Ingólfssdóttir K.; Chung, G.A.C.; Skúlason V.G.; Gissurarson S.R.; Vilhelmsdóttir. Antimicrobial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Science**. V6. 142-144 p. 1998.

14. Lima R.M.C.; Nascimento S.C.; Pereira E.C. Campos-Takaki G.M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot**. 340-348 p. 1990.

15. Martins, M.C.B.; Lima , M.J.G.; Neto, M.P.C.; Pereira, E.C. ; Santos, N.P.S. ; et al. In vitro and in vivo antineoplastic activity of barbatic acid. **International Archives of Medicine**. Vol. 9 No. 63. doi: 10.3823/1934. 2016.

16. Da Luz, J. S. B; Oliveira, E.B.; Martins, M.C.B.; Silva, N. H.; Alves, L.C.; Santos, F.A.B.; Silva, L.L.S.; Silva, E.C.; Medeiros, P. L. Ultrastructural Analysis of Leishmania infantum chagasi Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. Hindawi Publishing Corporation. **The Scientific World Journal**. 2015.

17. Taylor, T.N, Hass, H; Remy, W.; Kerp, H. The oldest fossil lichen. *Nature*. 378 (1995) 244. doi:10.1038/378244a0

18. Oettl, S.K., Hubert, J.; Nuzillard, J.M.; Stuppner, H.; Renault, J.H.; Rollinger, J.M. Dereplication of depsides from the lichen *Pseudevernia furfuracea* by centrifugal partition chromatography combined to ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition. *Anal. Chim. Acta*. 846 (2014) 60-67. doi: 10.1016/j.aca.2014.07.009

19. Medonça, F.; Oliveira, I. M. D. *Climatologia: Noções Básicas e Climas do Brasil*. **Ed. Oficina de Texto**. São Paulo. 2007.

20. Paraíba, Governo do Estado. **Atlas Geográfico da Paraíba**. Secretaria de Educação, UFPB. João Pessoa, 100 p. 1985.

21. Hale Jr., M.E. *The Biology of lichens*. 3 ed. **London Edward Arnold Pub**. 1983.

22. Culberson, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer chromatographic method. **Journal of Chromatography Amsterdam**, v. 72, p. 113-125. 1972.

23. Asahina, Y; Shibata, S. **Chemistry of lichen substances**, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, 240p. 1954.

24. Legaz, M. E; Vicente, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. **Plant physiology Lancaster**, v. 71, p. 300-301. 1983.

25. Huneck S.; Yoshimura Y. Identification of lichens substances. **Springer**, Berlin Heidelberg Nova York, p. 492. 1996.

26. Martins, M.C.B. Lima, M.J.G.; Silva, F.P.; Azevedo-Ximenes E.; Silva N.H.; Pereira E.C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. **Braz. arch. biol. technol.** v.53, n.1, p.115-122, 2010.
27. Pillai, S.K.; Moellering, R.C. Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2005, p. 365-400.
28. Lanças, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente Compatíveis?. **Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos– São Carlos** (SP) Brasil. 2009.
29. Aranda-Souza M.A., de Lorena V.M.B., dos Santos Correia M.T., de Figueiredo R.C.B.Q. In vitro effect of Bothrops leucurus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. International journal of biological macromolecules. 2018;120:431-9
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 1983;65(1):55-63
31. Honda N.K.; Vilegas W. A Química dos líquens. **Química Nova**, 21(6). 1998.
32. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim Nova 30: 374-381, 2007.
33. Kortepeter, S.A. Lichen speciation in the section *Cocciterae*: *Cladonia incrassata* and *Cladonia cristella*. **Journal Undergrad. Science** 3: 71-73. 1996.
34. Chust, Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC). **Boletim SPQ**, 39, 1990.
35. Huneck S.; Yoshimura Y. Identification of lichens substances. Springer, Berlin Heidelberg Nova York, p. 492. 1996.

36. Ahti, T., S. Stenroos; L. Xavier-Filho. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brazil. **Tropical Biology**. 7, 55-70. 1993.

37. Shu, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, n. 61, p. 1053-1071, 1998.

38. Dagnino, A.P.; Barros, F.M.C.; Ccana-Ccapatinta, G.V.; Prophiro, J.S.; Poser, G.L.; Romão, P.R.T. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*. v. 22. P. 71-76. 2015.

39. Pejin B., Iodice C., Bogdanović G., Kojić V., Tešević V. Stictic acid inhibits cell growth of human colon adenocarcinoma HT-29 cells. **Arabian Journal of Chemistry**. 2017.

40. Bretas, R.M. Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais, 2011. 170p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, 2011.

41. Campos, J.F.F. Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. **Universidade de Brasília**. Brasília-DF. 2008.

42. Moreira, R.C.R; Costa, G.C.; Lopes, T.C.; Bezerra, J.L.; Guerra, R.N.M.; Rebelo, J.M.M; Ribeiro, N.M.S.; Nascimento, F.R.F.; Costa, J.M.L. Efeito Leishmanicida In Vitro De *Starchytapheta cayennensis* (Rich) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 17. 2007.

43. Bezerra, J.L.; Costa G.C.; Lopes, T.C.; Carvalho, I.C.D.S Patrício, F.J.; Sousa, S.M.; Amaral, F.M.; Rebelo, J.M.M.; Guerra, R.N.M.; Riberio, N.M.S.; Nascimento, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 16. 2006.

44. Silva, R.R.P. Atividade leishmanicida do extrato de raiz de *Physallis angulata* e sua ação na célula hospedeira. Universidade Federal do Pará, Belém-PA. Dissertação. 2013.
45. Roberts W.L. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexam and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol Biochem Parasitol.** 2003;126:129-42.

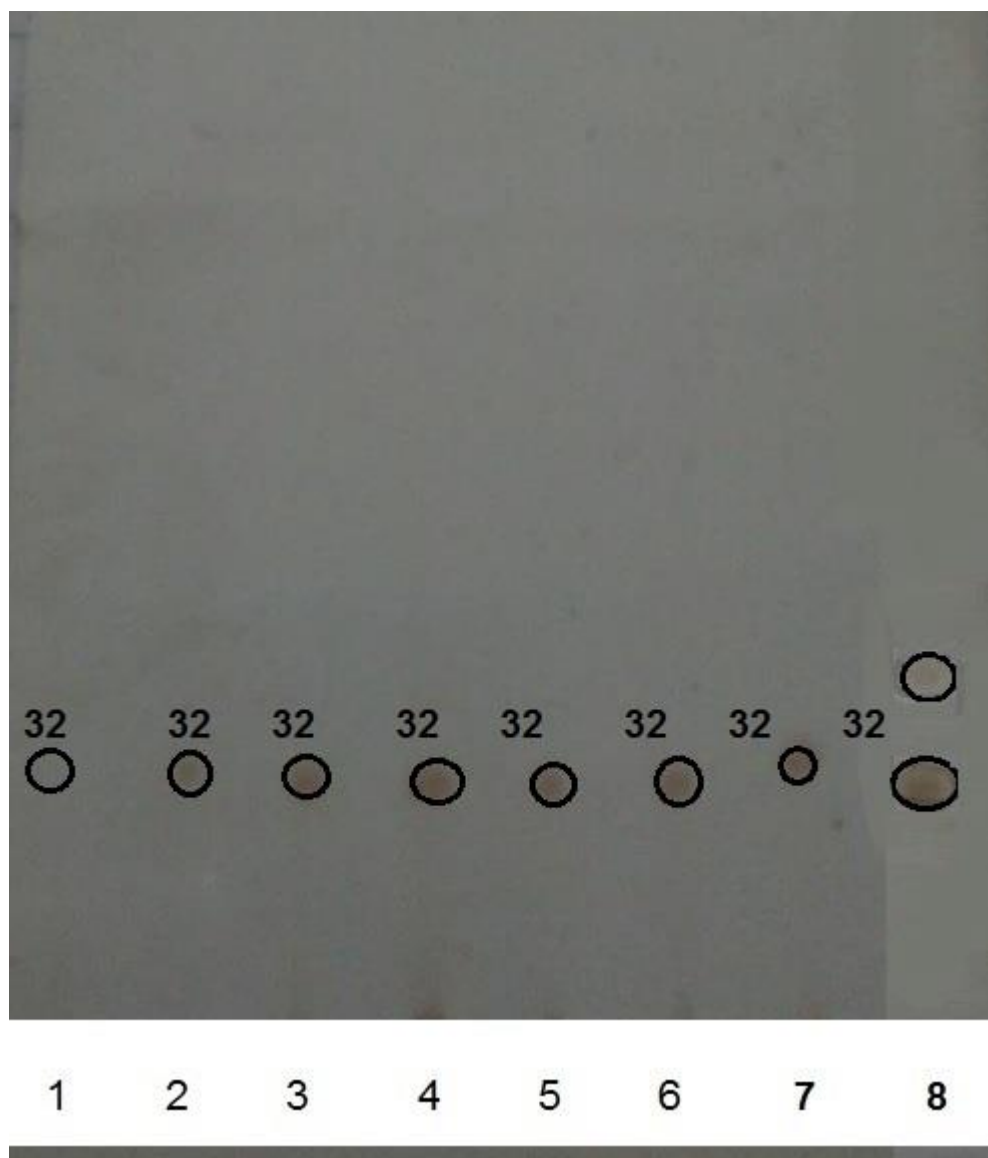


Figura 1. Cromatografia em camada delgada das várias amostras de ácido estítico purificado e extrato acetônico.
1-Padrão do ácido estítico, 2-7 ácido estítico purificado, 8- extrato acetônico.

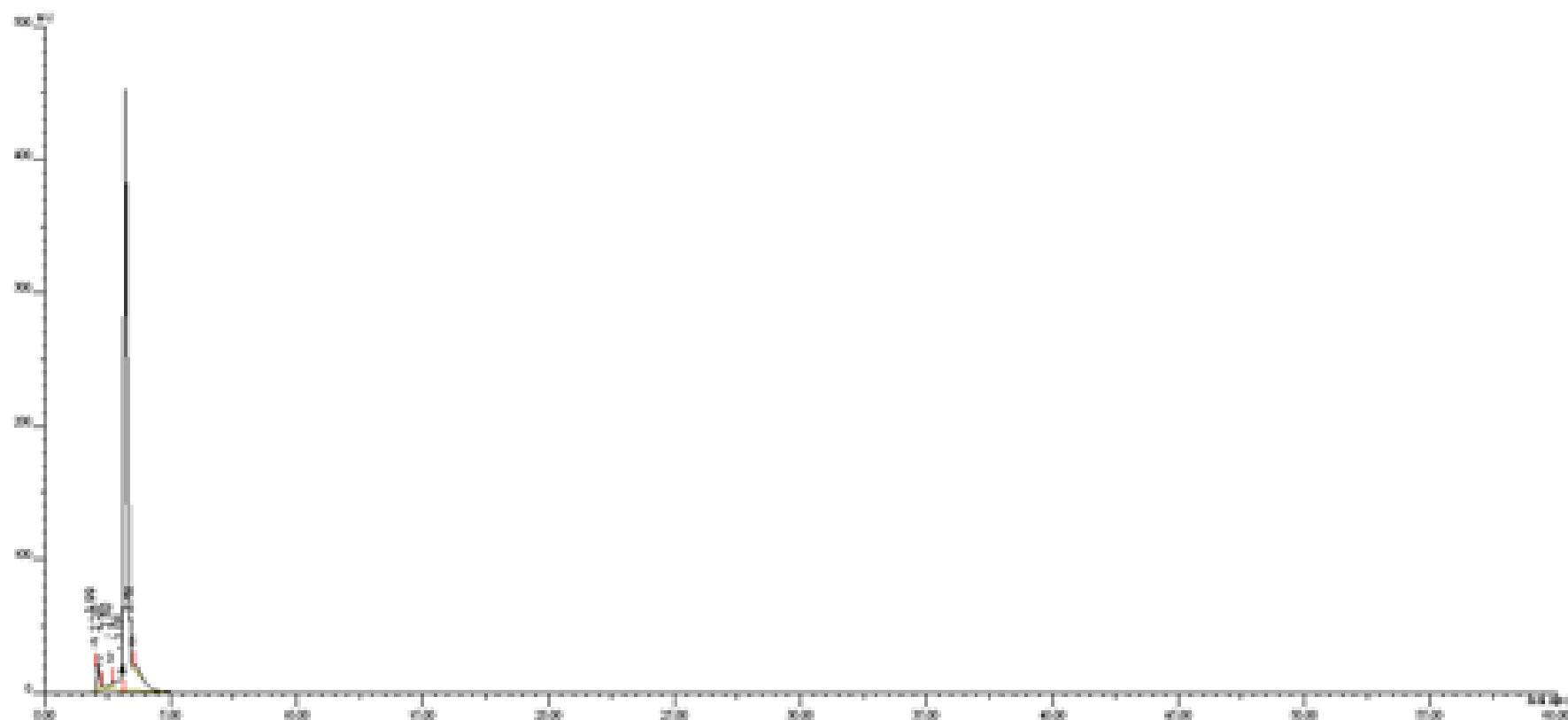


Figura 2. CLAE apresentou um único pico referente ao ácido estítico purificado com retenção de 3 minutos.

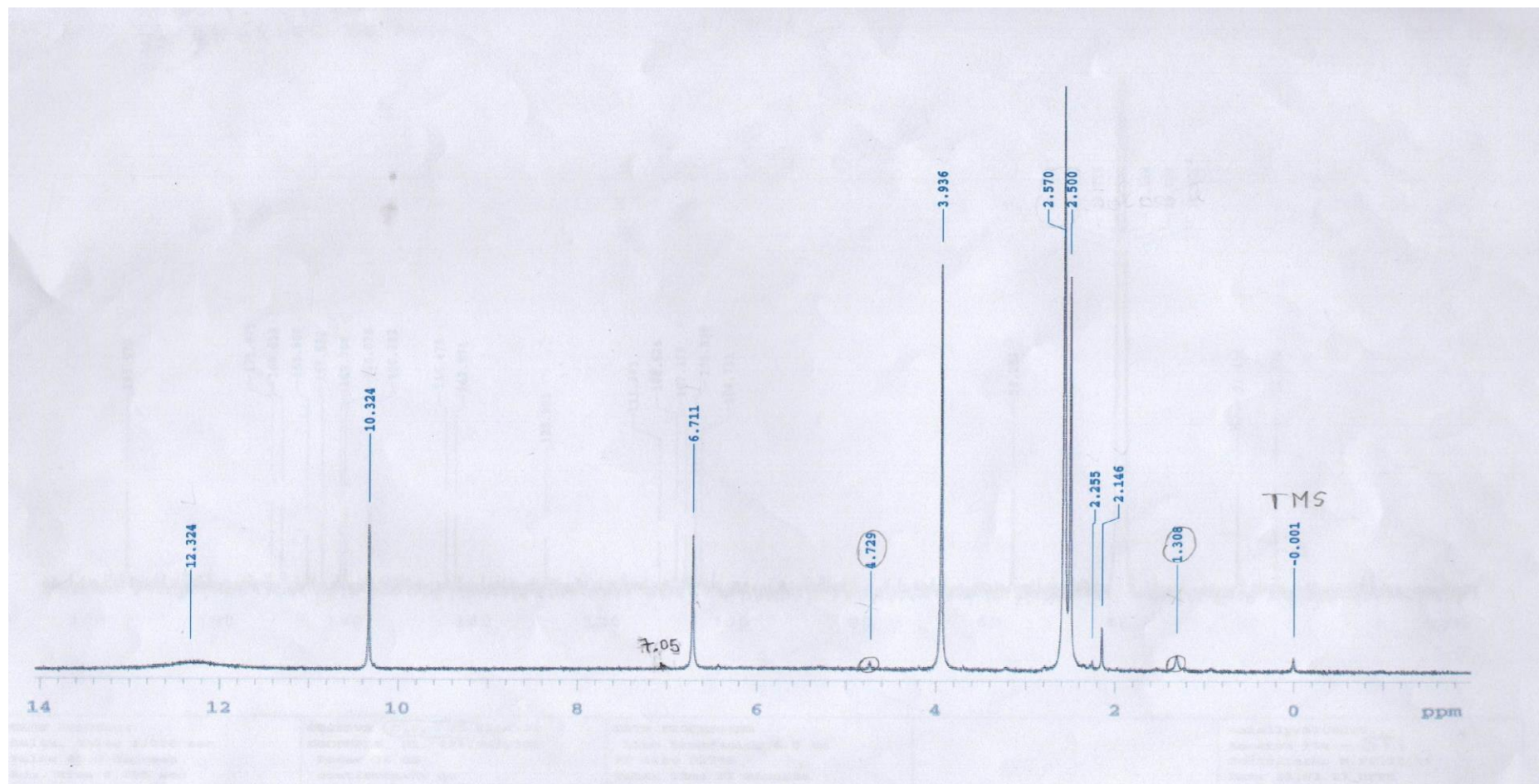


Figura 3. Ressonância magnética nuclear de prótons confirmando a estrutura do ácido estítico purificado.

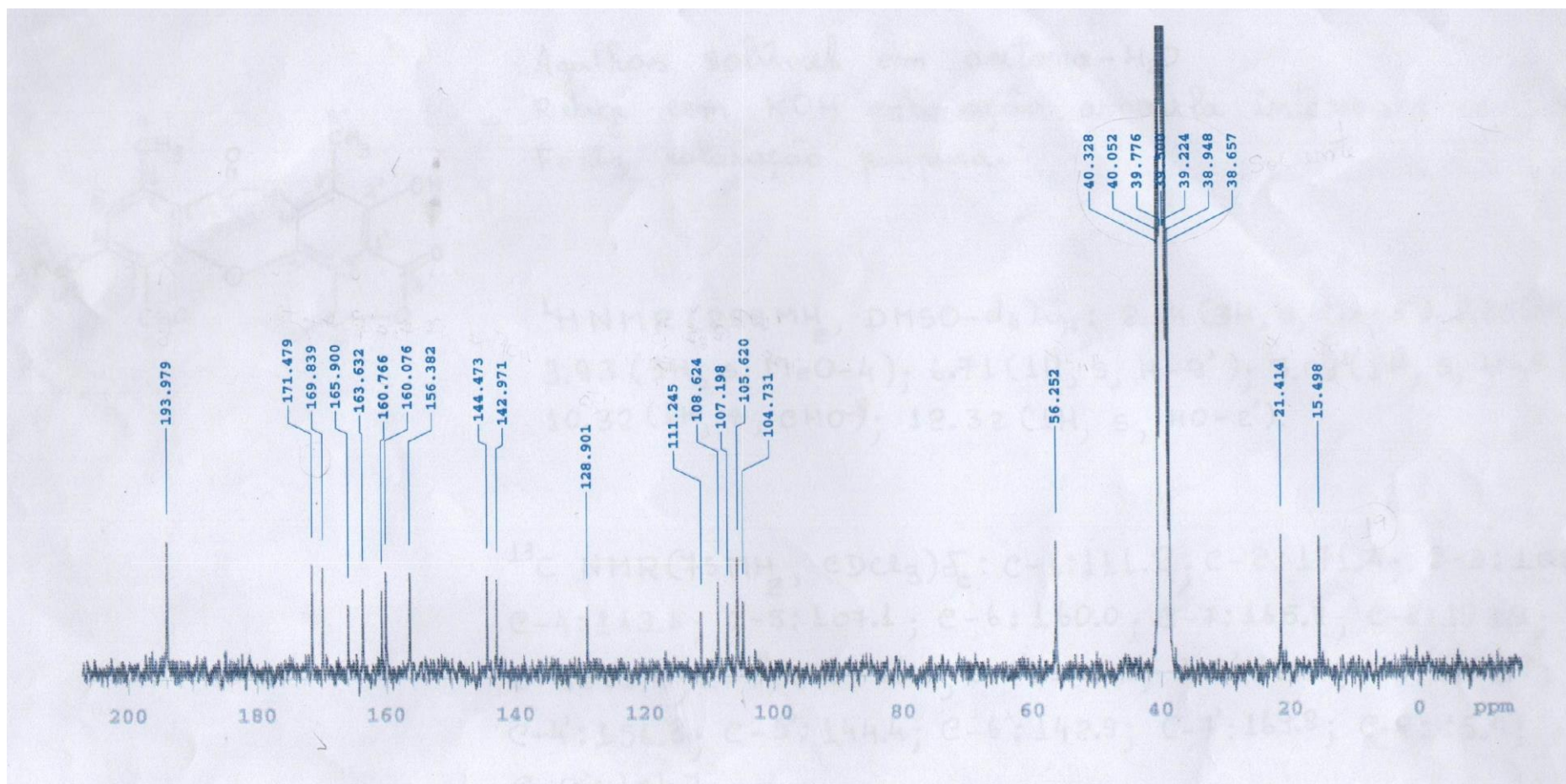


Figura 4. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C confirmando a estrutura do ácido estítico purificado.

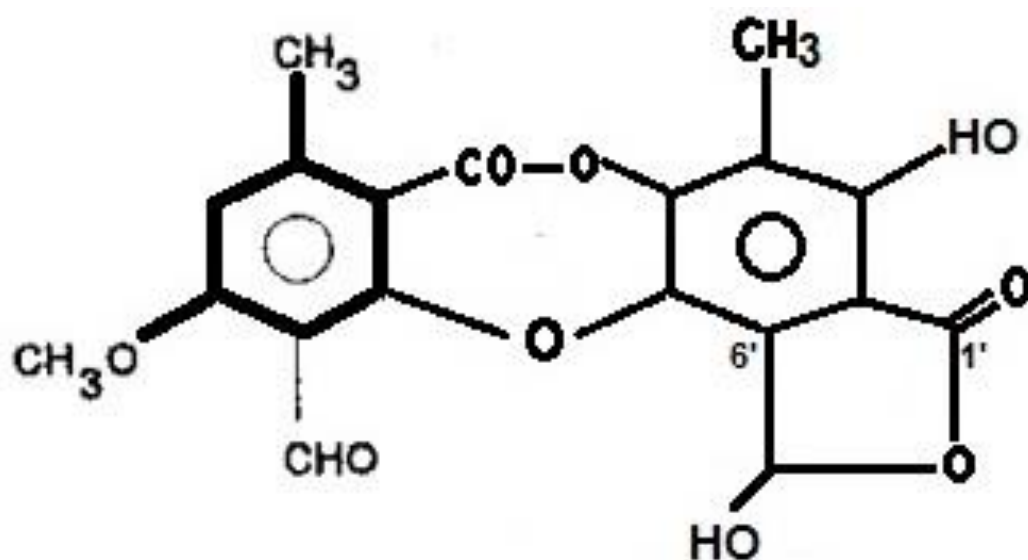


Figura 5. Representação da estrutura do ácido estítico.

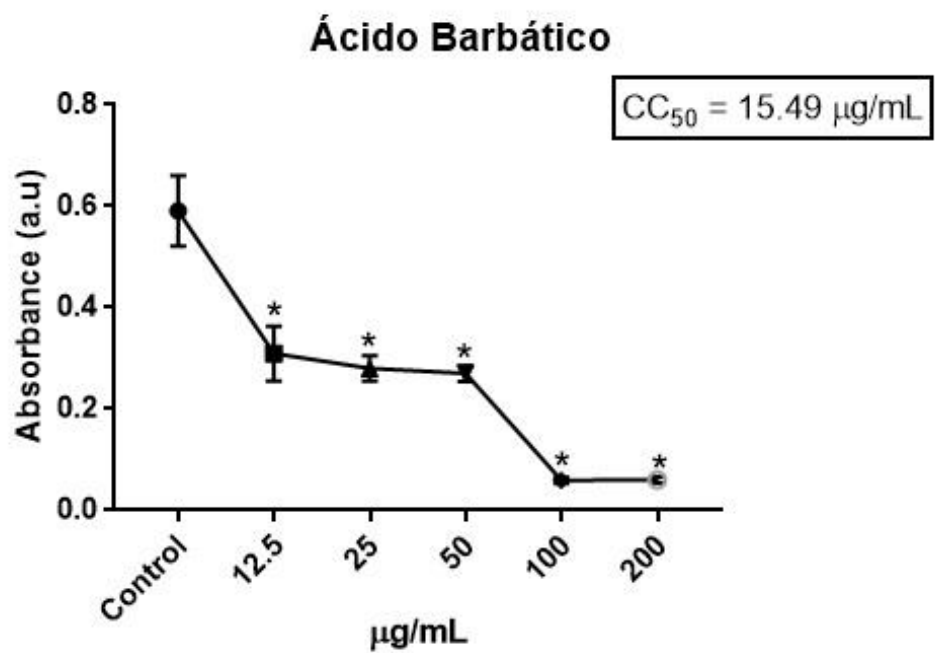


Figura 6. Atividade Leishmanicida do ácido barbático. O asterisco sugere o valor de $p < 0,05$, Bonferroni test.

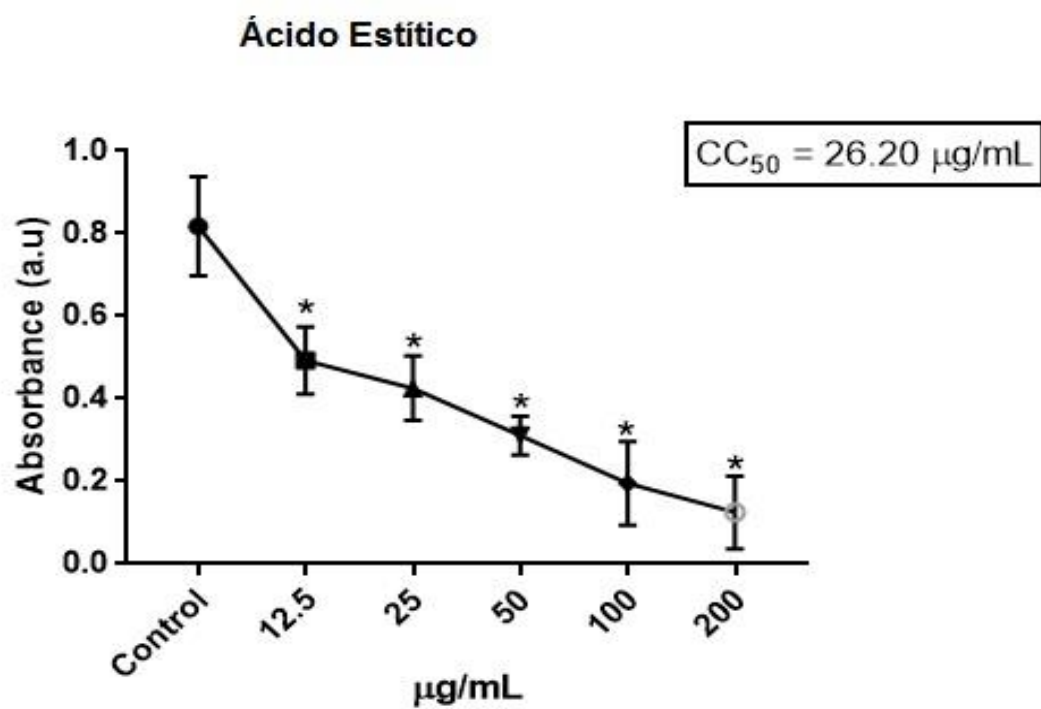


Figura 7. Atividade Leishmanicida do ácido estítico, onde o asterisco sugere o valor de $p < 0,05$, Bonferroni test.

CITOTOXIDADE ÁCIDO BARBÁTICO

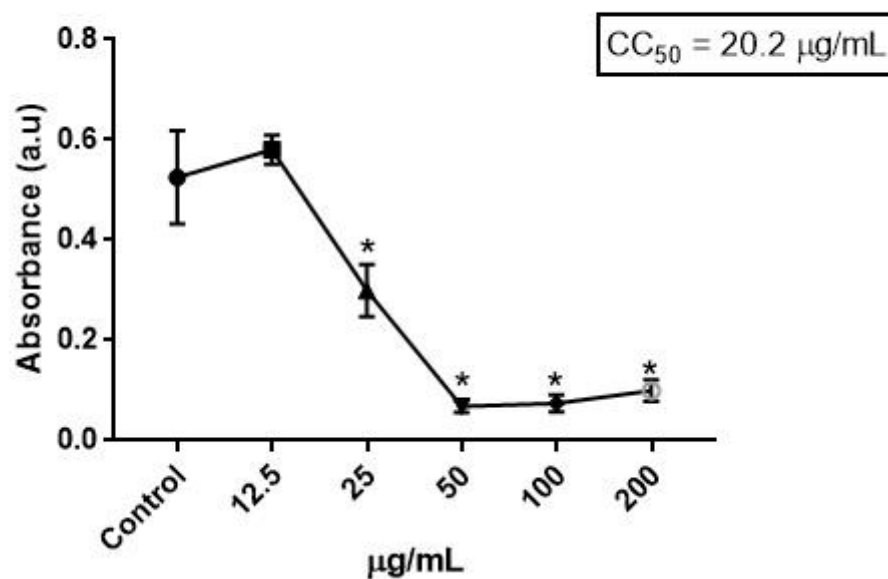


Figura 8. Potencial citotóxico contra Células Vero do ácido barbático, onde o asterico indica que $p < 0,05$, bonferroni test .

CITOTOXIDADE ÁCIDO ESTÍTICO

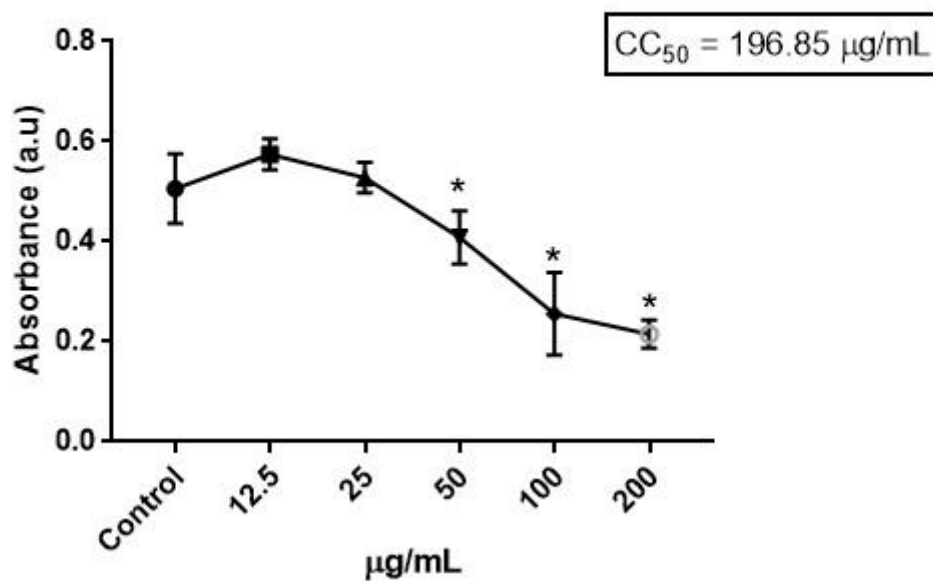


Figura 9. Potencial citotóxico contra Células Vero do ácido estético. O asterico indica que $p < 0,05$, Bonferroni test

3 CONCLUSÕES

Através da metodologia utilizada, o ácido estítico foi purificado de forma eficaz;

Os ácidos estítico e barbático purificados demonstraram potencial leishmanicida, tendo um pronunciado percentual de inibição de crescimento celular;

Análises estatísticas mostram que o ácido barbático purificado tem um maior potencial citotóxico contra linhagens de células Vero, enquanto fica evidenciado que o ácido estítico purificado possui uma CC50 maior, sendo uma boa alternativa para posteriores estudos com atividade leishmanicida e aplicação biológica, de maneira geral.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY M P. Atividade Leishmanicida *in vitro* de frações de *Spondias Mombin* e *Musa Paradisiaca* sobre *Leishmania Chagasi*. Dissertação. UEC- Ceará. Fortaleza, 2009. 73p.; il.
- AHMADJIAN, V. 1993. The Lichen Symbiosis. John Wiley & Sons, New York. 250 p.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. Introductory Mycology. New York, John Wiley. 1996.
- ALTAMIRANO-ENCISO A J; MARZOCHI M C A; MOREIRA J S; SCHUBACH A O; MARZOCHI K BF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. vol. 10(2):853-82, set-dez. História, Ciências, Saúde. Manguinhos, Rio de Janeiro, 2003.
- ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; e MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados a letalidade. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 43 (2): 194-197p., 2010.
- AMIM, M. Cutaneous leishmaniasis affecting the face: Report of a case. J Oral Maxillofac Surg. 58: 1066-1069. 2000.
- AMO DE PAZ G.; RAGGIO J.; GÓMES-SERRANILLOS M.P.; POLOMINO O.M.. GONZÁLES-BURGOS E.; CARRETERO M.E.; CRESPO A. HPLC isolation of antioxidante constituents from *Xanthoparmelia* spp. J. Pham. Biome. Anal. v. 53. P. 165-171. 2010.
- ANTINARELLI, L. M. R. Atividade leishmanicida de derivados de quinolinas: 4aminoquinolinas complexadas a esteroide e amodiaquina. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- ANTONOVICH D.D. et al., Cutaneous Leishmaniase: A diagnostic challenge. J Am Acad Dermatol. P 103, march 2004.
- ARAÚJO L.L.N. Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *Tetradenia riparia* (hochst) codd- lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento. Dissertação. Universidade Federal De Goiás. Goiania, 2014.
- ASAHINA, Y; SHIBATA, S. Chemistry of lichen substances, Japan Society for the Promotion of Science, Tokio, 240p. 1954.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. 2000 International Journal for Parasitology , n 30, pp. 1262-81.
- BAČKOR, M.; PEKSA, O.; ŠKALOUD, P.; BAČKOROVÁ, M. Photobiont diversity in lichens from metal-rich substrata based on its rdna sequences. Ecotoxicological Environmental Safety, v. 73, n. 4, p. 603-612. 2010.
- a

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 315-324, 2002.

BARBOSA, F A R. Medidas de Proteção e Controle de Inundações Urbanas na Bacia do Rio Mamanguape/PB. Universidade Federal da Paraíba. Dissertação. Paraíba. 2006.

BASTOS, M.M; BOECHAT, N.; GOMES, A.T.P.C; NEVES, M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Revista Virtual de Química*. v. 4., 2012.

BATES, P. A. Housekeeping by *Leishmania*. *Trends Parasitol*, 22: 447–448. 2006.

BATTS J. E., CALDER L. J., BATTS B.D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. *Chemical Geology*. Volume 204, Issues 3–4, p. 345–368 15 April 2004.

BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica*, v. 21, n. 4, p. 863-878. 2007.

Biological Activities. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 43, Pages 223-259. 2014.

BORASCHI C.S.S.; NUNES C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Clinica Veterinária*, v.71, p.44-48, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Guia de Bolso: Doenças Infecciosas e Parasitárias, Brasília-DF, 2010. 454 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. 1 ed. 2014

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Manual De Controle Da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília – DF 5 ed. 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF 6 ed. www.saude.gov.br (acesso em 15.04.2017).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF 2 ed. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, Relatório de Situação/ Pernambuco. Série C Projetos, programas e Relatórios. Brasília – DF. 2005.

BRASIL. Portaria Interministerial nº. 1.426 de 11 de Julho de 2008: Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde, Diário Oficial, 133, p. 37, 2008.

BRASIL. SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. Capacitação em Leishmaniose. Em:<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/ses-realiza-capacitacao-em-leishmaniose>. Acesso em: 24 dez 2016. 2012

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J.P.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, H.P.; STÁBELI, R.G. Amazonian Biodiversity: A view of drug Development for leishmaniasis and Malaria. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1011-1023, 2009.

CALIXTO JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult*;55(3):37-9. 2003.

CALIXTO, J.B. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2:261- 279. 2001.

CAMARGO, L.M.A., BARCINSKI M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. 2003, 1:34-7.

CARNEIRO SM, CARVALHO FA, SANTANA LC, SOUSA AP, NETO JM, CHAVES MH. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biol Res*.45(2):111-6. 2012.

CHAN-BACAB MJ, PENA-RODRÍGUEZ LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Roy Soc Chem*. 2001.

CHANG, K. & CHAUDHURI, G. Molecular determinants of *Leishmania* virulence, *Annu Rev Microbiol*, 44: 499-529. 1990.

CHAVES, T.P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. Universidade Estadual da Paraíba. Dissertação. Campina Grande – PB 2012.

CHRISTENSEN, S.B.; MING, C.; ANDERSEN, L.; HJORNE, U.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Medica*, v.60, n.2, p.121-123, 1994.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CULBERSON C F. Chemical and Botanical guide to lichen products. The University of North Carolina. 348 p. 1969.

CUNHA,E.Oslíquens, disponível em: <http://esthercientista.blogspot.com.br/2011/06/os-liquens.html> (acesso em julho de 2017). 2011.

DA LUZ, J. S. B; OLIVEIRA, E.B.; MARTINS, M.C.B.; SILVA, N. H.; ALVES, L.C.; SANTOS, F.A.B.; SILVA, L.L.S.; SILVA, E.C.; MEDEIROS, P. L. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum* chagasi Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal. 2015.

DANTAS-TORRES F; BRANDÃO-FILHO S.P. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. Rev. Saúde Pública 40: 537-541. 2006.

DE SOUZA, W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2006; 78(2): 271-291.

DELORENZI, J.C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTASS, C.R.; DE ANDRADE, M.; COSTA, D.; HE, L.; KUEHNE, M.E.; SARAIVA, E.M.. In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.46, n.7, p.2111-2115, 2002.

DELORENZI; J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A. C.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB; D.C.; SARAIVA, E.M.. Antileishmanial activity of na indole alkaloid from *Peschiera australis*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.45, n.5, p.1349-1354, 2001.

DESJEUX, P. Leshmaniasis: public health aspects and control. Clinics in Dermatology, v. 14, p. 417, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis world-wide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 95, p. 239-243, May. Jun., 2001.

DO CAMPO, R.; MORENO, S.N. The acidocalcisome. Mol Biochem Parasitol. 114, p. 151-159, 2001.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ª Ed. Brasília. 2006.

EREL, O; KOCIGYTA A; BULUT V.; GUREL M.S. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 172-183. 1999.

FÁVERO, O. A.; PAVAN, S. Botânica Econômica. 1ª ed. São Paulo. Catálise Editora. 1997.

FILSON, R. B. A revision of the lichens genus *Cladia* Nyl. Journal Hattori Botany Laboratory. 49, 1-75. 1981.

FLEIG, M., GRÜNINGER, W., MAYER, W.E., HAMPP, R. Líquens da Floresta com Araucária no Rio Grande do Sul. EdUPUCRS, pp. 219. 2008.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. p.62, 2000.

GENARO O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves D P. Parasitologia Humana, são Paulo, p. 36 – 53. 2001.

GOMES A C A, SILVA E D O, PITA-NETO I C, BEZERRA T P. Leishmaniose Muco-Cutânea: Relato De Caso Clínico. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial* v.4, n.4, p. 223 - 228, out/dez – 2004.

GONTIJO B; CARVALHO M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

GRAMICCIA M.; GRADONI L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology*, v. 35, p. 1169- 1180, 2005.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B.; MCMAHIN-PRATT, D.; A. Review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the world. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41: p. 687, 1989.

HAGER, T.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.56, n.3, p.689-695, 2008.

HALE, JR. M. E.; *The Biology of Lichens*; Edward Arnold, London, 1974.

HAUCK, M.; JURGENS, S. R. Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens, *Environmental and Experimental Botany*, v. 156, p. 115-122. 2008.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J.; *The lichen-forming fungi*; Blackie & Sons. Ltd. Glasgow, 1984.

HENRIQUES, C.; ATELLA, G. C.; BONILHA, V. L. & DE SOUZA, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*, 89: 123-133. 2003.

HERRLIND, P. Patent sense. *Nature*, 449: 174-175, 2007.

HONDA N.K.; VILEGAS W. A Química dos líquens. *Química Nova*, 21(6). 1998.

HONNEGGER, R. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 42, p. 553-578. 1991.

HORST, K. *Westcott's plant disease handbook*. 7. ed. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008.

HUNECK S.; YOSHIMURA Y. *Identification of lichens substances*. Springer, Berlin Heidelberg Nova York, p. 492. 1996.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Base de informações por setor sensível – João Pessoa, Estado da Paraíba. Censo Demográfico 2000. Rio de Janeiro. Disponível em CD-ROM. 2002.

INTERNATIONAL ASSOCIATION LIQUENOLOGY (IAL), v. 14, n. 9 p. 1981.

ISMED F; DÉVÉHAT F L; ROUAUD I; FERRON S; BAKHTIAR A; BOUSTIE J. NMR reassignment of stictic acid isolated from a Sumatran lichen *Stereocaulon montagneanum* (Stereocaulaceae) with superoxide anion scavenging activities. *Naturforsch.* 2016.

JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. *Natural products from plants*. Boca Raton: CRC Press, FL, 1999.

KAWA, H.; SABROZA, P.C.; OLIVEIRA, R.M.; BARCELLOS, C. A produção do lugar de transmissão da leishmaniose tegumentar: o caso da localidade Pau da Fome na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.26(8): Rio de Janeiro, 2010.

KETTER, H.; MARJANOVIC, S. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 171-176, 2004.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.30 (3): 241-248. 2009. Available from: https://www.researchgate.net/publication/267651921_Potential_for_innovation_in_the_treatment_of_leishmaniasis_using_plants_and_natural_products_as_sources_of_new_drugs. accessed Jan 2018.

KRZEWICKA, A.B; SMYKLA J.; GALAS J, SLIWA L. Freshwater lichens and habitat zonation of mountain streams. *Limnologica* 63 1–10. 2017.

LAINSON R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina*; 11(1): 29-40. 2. 1997.

LAINSON R; SHAW JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 44: 94-106, 1992.

LAINSON R; SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. London: Academic Press. p. 1-120. 1987.

LEMOS A.R. Caracterização Físico-Química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L). 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos) -UESB – Itapetinga. 2008.

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, RONIGBERG BM, LIEEDALE GF, LEOEBLICH AR, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VÁVRA J, WALLACE FG. A newly revised classification of the PROTOZOA. *Journal of Protozoology* 27: 37-58, 1980.

LIMA JUNIOR, C. G. Síntese de dezesseis adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: bioavaliação contra *Leishmania chagasi* e análise da relação estrutura-atividade biológica. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba. 122p. 2009.

LINDOSO, J.A.L.; COSTA, J.M.L., GOTO, I.T.Q.H. Review of the current treatments for leishmaniasis. Res Rep Trop Med. 2012.

LLANOS-CUENTAS, A, DAVIES C. Epidemiological studies on Andean Cutaneous Leishmaniasis and their significance for designing a control strategy. Em T. GOODMAN E C. ESPINAL. International Development Research Center. Mérida, Nov. 25-29th of 1992. Ed. by P. Wijeyaratne, pp. 286-303. 1992.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. Clin Immunol 114, 256-265. 2005.

LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT F, TOMASI S, ELIX J.A, BERNARD A, ROUAUD I, URIAC P, OUSTIE J. Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. J. Nat. Prod. 70:1218-1220, 2007.

LUMBSCH HT, HUHNDORF SH. Outline of Ascomycota . Myconet 13: 1–58. 2007.

LUQUE-ORTEGA, J.R.; MARTINEZ, S.; SAUGAR, J.M.; IZQUIERDO, L.R.; ABAD, T.; LUIS, J.G.; PINERO, J.; VALLADARES, B.; RIVAS, L. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.48, n.5, p.1534-1540, 2004.

LUTZONI, F.; PAGEL, M.; REEB, V. Major fungal lineages derived from lichen symbiotic ancestors. Nature, v. 411, p. 937-940. 2001.

MACHADO, C. M.; MARTINS, T. C.; COLTURATO, I.; LEITE, M. S.; SIMIONE, A. J.; SOUZA, M. P.; MAUAD, M. A.; COLTURATO, V. R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 51: 309-324, 2009.

MADEIRA M F, UCHÔA C M A, LEAL C A, SILVA R M M, DUARTE R, MAGALHÃES C M, SERRA C M B. *Leishmania* (Vianna) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36(5): 551-555, set-out, 2003.

MARSDEN, P D. Mucosal leishmaniasis (espundia, Escamel, 1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, nº 80, pp. 859-76, 1986.

MARTINS, M.C.B. LIMA, M.J.G.; SILVA, F.P.; AZEVEDO-XIMENES E.; SILVA N.H.; PEREIRA E.C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. Braz. arch. biol. technol. v.53, n.1, p.115-122, 2010.

MARZOCHI, M. C. A; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - Emerging antropozoonosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública, 10:359-375. 1994.

MCGILLICK B.E., KUMARAN D., VIENI C., SWAMINATHAN S. β -Hydroxyacyl-acyl Carrier Protein Dehydratase (FabZ) from *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*: Structure Determination, Enzymatic Characterization, and Cross-Inhibition Studies. *Biochemistry*. 2016 Feb 23;55(7):10919. doi:10.1021/acs.biochem.5b00832. Epub 2016.

MCMURRY, J. 7^o Ed. Química Orgânica - Combo. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

MICHELS P.A., BRINGAUD F., HERMAN M., HANNAERT V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. Dec;1763(12):1463-77.2006.

MINDELL D.P. Evolution in the everyday world. *Scientific American*. 300:82-9. 2009.

MOLANO, I.; ALONSO MG, MIRÓN C, REDONDO E, REQUENA JM, SOTO M, NIETO CG, ALONSO C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 92, p. 1-13. 2003.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 65, p. 157 – 173, 2010.

MUNOZ, V.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PORZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta Medica*, v.60, n.5, p.455-459, 1994.

NETO, J.C.; WERNECK, G.L.; COSTA, C.H.N. Factors associate with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.25 (7): Rio de Janeiro, 2009.

NEUBER, H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 6: 754-65. 2008.

OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B.; VILLAS BÔAS, G.K. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, V. 8. 2014.

ORGANISATION MONDIAL DE LA SANTÉ. Lutte contre les leishmanioses. Serie de rapports techniques. Geneve: OMS, 1990, 176p.

PARNMEN S.; LEAVITT S.D.; RANGSIRUJI A.; LUMBSCH H.T. Identification of species in the *Cladia aggregata* group using DNA barcoding (Ascomycota: Lecanorales). *Phytotaxa* 115 (1): 1–14. 2013.

PASTORINO A C, JACOB C M A, OSELKA G W, CARNEIRO-SAMPAIO M M S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Jornal de Pediatria - Vol. 78, Nº2*, 2002 120 0021-7557/02/78-02/120. 2002.

PEJIN B., IODICE C., BOGDANOVIĆ G., KOJIĆ V., TEŠEVIĆ V. Stictic acid inhibits cell growth of human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017.

PEREIRA, E. C., SILVA N.H., CAMPOS-TAKAKI G. M, L. XAVIER-FILHO M.E.; LEGAZ M. E; VICENTE C. Antimicrobial activity of biologically-active compounds from lichen *Cladonia crispatula*. Boletim. Ecotrópica - Ecosistemas Tropicales. 31, 09-19. 1997.

PEREIRA. E. C., S. C. NASCIMENTO, R. M. C. LIMA, N. H. SILVA, A. F. M. OLIVEIRA, E. BANDEIRA, M. BOITARD, H. BERIEL, C. VICENTE AND M. E. LEGAZ. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine. 19, 47-52. 1994.

PERRY, N.B.; BENN, M.H.; BRENNAN, N.J.; BRUGESS, E.J.; ELLIS, G. GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S.D; TANGNEY RS. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. Lichenologist. 1999; 31:627–636.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. Química Nova, São Paulo, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

PODTEROB, A. P. Chemical composition of lichens and their medical applications. Pharmaceutical Chemistry Journal, v. 42, n. 10, p. 32-38, 2008.

PÖYKKÖ, H., BAČKOR, M.; BENCÚROVÁ, E.; MOLCANOVÁ, V.; BAČKOROVÁ, M.; HYVÄRINEN, M. Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. Oecologia, v. 164, n. 2, p. 423-430. 2010.

RAMOS, D.B.M. Atividade antimicrobiana da Lectina do Líquen *Cladonia verticillaris* (Clavell) sobre bactérias e fungos de importância médica. Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação. Recife-PE. 2011.

RANGEL, E.T. Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 131 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases, New York, v. 7, p. 581-596, 2007.

RIVAS PLATA, E.; LUMBSCH H.T. Parallel evolution and phenotypic divergence in lichenized fungi: A case study in the lichen-forming fungal family Graphidaceae (Ascomycota: Lecanoromycetes: Ostropales). Molecular Phylogenetics and Evolution. v 61 , p. 45-63. 2011.

RODRIGUES KA, AMORIM LV, DIAS CN, MORAES DF, CARNEIRO SM, CARVALHO FA. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. J Ethnopharmacol. 160:32-40. 2012.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of Leishmania in Pará State, Brazil. Medical and Veterinary Entomology. Vol 1 (4): Oxford, 383-395p.,1987.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. Parasitology Research, v. 103, p. 1 – 10, 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. A. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2004.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. S.; DUCOING, H. P.; SOSA, M. R. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, México, v. 21, n. 3, 2004.

SESA. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Fortaleza em números. Prefeitura Municipal de Fortaleza. 2009.

SHAHIDI, F. Antinutrients and phitochemicals in food. Washington, DC.: American Chemical Society, 1997. 344 p. (ACS Symposium Series, 662). 1997.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, n. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, J.F.; FIGUEIREDO, K.A.; CARVALHO, M.G.F.M. Natural products for leishmaniasis treatment: exploratory technology. *Rev Cubana de Farmacia*. 50(2), 2016.

SILVA, R.R.P. Atividade leishmanicida do extrato de raiz de *Physallis angulata* e sua ação na célula hospedeira. Universidade Federal do Pará. Belém-PA. Dissertação. 2013.

SILVEIRA, F T; LAINSON R; SHAW J J. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil and the significance of a negative Montenegro Skin-test in human infections. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85:735-738, 1991.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL E.P.; MELLO J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK P.R. *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 5 Ed.; Ed UFRGS 1104 p. 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1102, 2010.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 139, 2004.

n

SPIELMANN, A. A. Fungos Liquezados (líquens). Instituto de Botânica – IBt Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Programa de capacitação de monitores e educadores. São Paulo, outubro de 2006.

STOCKER-WÖRGÖTTER E. Experimental Lichenology and Microbiology of Lichens: Culture Experiments, Secondary Chemistry of Cultured Mycobionts, Resynthesis, and Thallus Morphogenesis. *The Bryologist*. v. 104, No. 4, pp. 576-581. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TAKAHAGI, T.; IKEZAWA, N.; ENDO, T.; IFUKU, K.; YAMAMOTO, Y.; KIMOSHITA, Y.; TAKESHITA, S.; SATO, F. Inhibition of PSII in Atrazine-Tolerant tobacco cells by Barbatic Acid, a lichen derived depside. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 266-268, 2006.

TEMPORE, A. G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural produtos. *Planta medica*, v. 77, p. 572-585, 2011.

THUNE P O; SOLBERG Y J. Photosensitivity and allergy to aromatic lichen acids, compositae oleoresins and other plant substances. *Contact Dermatitis*. 6: 64-71. 1980.

UEDA-NAKAMURA, T., D'ACONCEIÇÃO ROCHA SAMPAIO, M., CUNHA-E-SILVA, N.L., TRAUB-CSEKO, Y.M. & DE SOUZA, W. Expression and processing of megasome cysteine proteinases during *Leishmania amazonensis* differentiation. *Parasitol Res.* Apr;88(4):332-337. 2002.

VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*; 8, 297-318. 2002.

VERONESI R., FOCACCIA R. *Tratado de Infectologia*. v.2 Atheneu, São Paulo, 1997.
VIZZOTO M.; KROLOW A. C.; WEBER G.E.B. *Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância*. Embrapa Clima Temperado Pelotas, RS 2010.

WATSON, J. D. *Molecular biology of the gene*. New York: W. A. Benjamin, 1965.

WEBSTER, P & RUSSEL, DG. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today*. 1993; Jun;9(6):201-6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009. The disease and its epidemiology. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html. Acesso em junho de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em set 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Schistosomiasis* 86, 73-80. 2011.

YOUSUF S, IQBAL M; ATTA-UR- RAHMAN. Chapter 7 - Lichens: Chemistry and Biological Activities. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 43, 2014, p. 223-259.

ZILBERSTEIN, D., SHAPIRA, M., The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, vol. 48, p. 449-470, 1994.