



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

PAULA ROBERTA DA SILVA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS INDÓLICOS-  
TIOSEMICARBAZÔNICOS FRENTE OS PROTOZOÁRIOS  
TRIPANOSOMATÍDEOS DO GÊNERO LEISHMANIA E TRIPANOSSOMA**

Recife

2021

PAULA ROBERTA DA SILVA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS INDÓLICOS-  
TIOSEMICARBAZÔNICOS FRENTE OS PROTOZOÁRIOS  
TRIPANOSOMATÍDEOS DO GÊNERO *LEISHMANIA* E *TRIPANOSSOMA***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica

Orientador(a): Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Recife

2021

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Paula Roberta da

Atividade biológica de derivados indólicos-tiossemicarbazônicos frente aos protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* e *Tripanossoma* / Paula Roberta da Silva. – 2021.

1 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos .

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Doenças negligenciadas. 2. Leishmaniose. 3. Chagas, Doença de. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora). II. Santos, Fábio André Brayner (coorientador). III. Título.

616.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-249

PAULA ROBERTA DA SILVA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS INDÓLICOS-  
TIOSEMICARBAZÔNICOS FRENTE OS PROTOZOÁRIOS  
TRIPANOSOMATÍDEOS DO GÊNERO LEISHMANIA E TRIPANOSSOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 10/12/2021

**COMISSÃO EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Anekécia Lauro da Silva  
Universidade Federal do Vale do São Francisco-Campus Paulo Afonso/Bahia

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

\_\_\_\_\_  
Profa. Dr. Ricardo Olímpio de Moura  
Universidade Estadual da Paraíba

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa  
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE)

Aos meus pais, Deise Maria da Silva e Paulo Roberto da Silva, por toda dedicação e amor.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha mãe científica e orientadora, professora Maria do Carmo Alves de Lima, por toda sua dedicação, trabalho e amizade.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Luiz Alves e Prof. Dr. Fabio Brayner do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, por me receber de braços abertos na sua família científica e também por todo apoio e orientação na realização dos testes biológicos.

Agradeço também aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial a Amanda Aliança, Camila Queiroz, Ana Paula, Amanda Vasconcelos e Rubens Rocha por toda paciência e ensinamentos nos testes biológicos.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da UFPE, em especial a Iris Trindade, Amélia Ribeiro, Keriolaine Santos, Pedro Bomfim, Cleberson Soares, Thammyres Pires por toda colaboração, apoio e companheirismo ao longo dessa jornada, e por me escutarem nos momentos difíceis, “Quem tem amigos, não sofre”. Também a Iranildo José, que chegou ao final dessa caminhada com seu apoio e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu companheiro Diogo Aires por compartilhar comigo os momentos mais difíceis e por toda ajuda.

As amigas Iris Trindade, Keriolaine Santos e Mirelly Miranda, por suportarem ao meu lado os momentos difíceis, pelos cafés, pelo carinho e por todas as palavras amigas.

Aos meus pais: Deise Maria da Silva e Paulo Roberto da Silva, por todo amor e educação, que serviu como suporte para alcançar meus sonhos.

À toda minha família e amigos que estiveram sempre intercedendo a Deus por mim em todos os momentos de minha vida, em especial a Tarciane Pires e Maria de Lourdes.

A FACEPE pelo suporte financeiro.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre”

Paulo Freire

## RESUMO

A leishmaniose e a Doença de Chagas enquadram-se na categoria de doenças extremamente negligenciada, são causadas por protozoários da classe cinetoplastídeos. A terapia utilizada para tratamento dessas doenças apresenta diversos problemas como: tratamento de longo prazo, medicamentos utilizados durante décadas, efeitos colaterais, via de administração parenteral, falta de formulações pediátricas, alto custo e aparecimento de cepas resistentes. Diante do exposto, é necessário a busca novos compostos que tenham como características baixa toxicidade, seletividade para o parasito, bom custo benefício, tratamento de curto prazo e uma via de administração mais adequada. Nesse contexto as tiossemicarbazonas e o núcleo indól apresentam-se como moléculas com ampla atividade biológica, boas propriedades químicas, de fácil síntese e possuem fármacos utilizados comercialmente. A *Morinda citrifolia* (Noni) é uma planta conhecida na medicina popular, as ligninas extraídas do Noni tem diversas aplicações na indústria farmacêutica sendo um composto natural promissor no estudo antiparasitário. Portanto, o objetivo do trabalho é analisar a atividade biológica de compostos indólicos-tiossemicarbazônicos e liguinina, avaliando: a citotoxicidade em macrófagos e células Vero, a viabilidade celular e ultraestrutural frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, , análise do perfil de morte celular por citometria de fluxo. A atividade leishmanicida e tripanocida dos compostos sintéticos mostrou-se promissora, onde todos foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*. Os derivados LQIT/PR-01, LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 apresentaram melhor atividade leishmanicida, eles foram capazes de causar modificações ultraestruturais nos parasitos, além disso os compostos LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 apresentaram atividade frente a formas amastigotas de *Leishmania*, diminuindo a carga parasitária dos macrófagos. Na atividade tripanocida os compostos LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 foram capazes de inibir formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, ocasionando a morte celular por necrose, assim como o fármaco padrão Bezonidazol. A liguinina extraída do Noni também mostrou resultados promissores quando testadas frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, causando alterações ultraestruturais no corpo do parasito. Dessa maneira, os compostos indólicos-tiossemicarbazônicos e a liguinina extraída do Noni apresentam atividades leishmanicida e devem formar a base para futuros estudos experimentais.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; Doença de chagas; Tiossemicarbazona; Indol; *Leishmania Infantum*; *Leishmania amazonensis*; *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease fall into the category of extremely neglected diseases, they are caused by protozoa of the *kinetoplastid* class. The therapy used to treat these diseases has several problems, such as: long-term treatment, drugs used for decades, side effects, parenteral route of administration, lack of pediatric formulations, high cost and the emergence of resistant strains. Given the above, it is necessary to search for new compounds that have low toxicity, selectivity for the parasite, cost-effectiveness, short-term treatment and a more appropriate route of administration. In this context, thiosemicarbazones and the indole nucleus are molecules with broad biological activity, good chemical properties, easy synthesis and have commercially used drugs. *Morinda citrifolia* (Noni) is a plant known in folk medicine, the lignins extracted from Noni have several applications in the pharmaceutical industry, being a promising natural compound in the antiparasitic study. Therefore, the present study aimed to analyze the biological activity of indole-thiosemicarbazoin compounds and liguinin, evaluating: cytotoxicity in macrophages and Vero cells, cellular and ultrastructural viability against promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, analysis of cell death profile by flow cytometry. The leishmanicidal and trypanocidal activity of the thiosemicarbazonic indole compounds showed promise, where all compounds were able to inhibit the growth of promastigotes of *L. infantum*, *L. amazonensis* and *T. cruzi*. Derivatives LQIT/PR-01, LQIT/PR-02 and LQIT/PR-09 showed better leishmanicidal activity, they were able to cause ultrastructural changes in the parasites, in addition the compounds LQIT/PR-02 and LQIT/PR-09 showed activity against amastigotes forms of *Leishmania*, reducing the parasitic burden of macrophages. In the trypanocidal activity, the compounds LQIT/PR-06 and LQIT/PR-09 were able to inhibit trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*, causing cell death by necrosis, as well as the standard drug Bezonidazole. Liguinin extracted from Noni also showed promising results when tested against promastigotes of *L. amazonensis*, causing ultrastructural alterations in the body of the parasite. Thus, the indole-thiosemicarbazoin compounds and the liguinin extracted from Noni present leishmanicidal activities and should form the basis for future experimental studies.

**Keywords:** Leishmaniasis; Chagas disease; Thiosemicarbazone; Indol; *Leishmania Infantum*; *Leishmania amazonensis*; *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de doenças negligenciadas, quimioterapia atual e perspectivas de novos compostos com ação leishmanicida e tripanocida.....	16
Figura 2 - Status de endemicidade de leishmaniose visceral no mundo, 2019.....	20
Figura 3 - Status de endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, 2019.....	21
Figura 4 - Status de endemicidade de tripanossomíase.....	22
Figura 5 - Representação esquemática das principais formas morfológicas presentes nos tripanossomatídeos.....	23
Figura 6 - Formas promastigotas (A) amastigotas (B) e de <i>Leishmania</i> .....	26
Figura 7 - Flebotomíneo.....	27
Figura 8 - Manifestações da leishmaniose em caninos.....	27
Figura 9 - Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i> .....	29
Figura 10 - Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar.....	31
Figura 11 - Manifestações clínicas da leishmaniose visceral e dérmica pós calazar.....	32
Figura 12 - Fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.....	34
Figura 13 - Fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.....	36
Figura 14 - Espécies triatomíneos responsáveis pela transmissão de <i>T. cruzi</i> .....	36
Figura 15 - Ciclo biológico da <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
Figura 16 - Sinal de Romaña e sinal de chagoma.....	39
Figura 17 - Fármacos utilizados para o tratamento da doença de chagas .....	40
Figura 18 - Aplicação do FBDD na obtenção dos derivados indol- tiossemicarbazonas.....	42
Figura 19 - Estrutura da tiossemicarbazona.....	43
Figura 20 - Estrutura geral do indol.....	44
Figura 21 - Folhas e frutos do noni ( <i>Morinda citrifolia</i> ).....	46
Figura 22 - Estruturas moleculares dos álcoois <i>p</i> -cumarílico (1), coniferílico (2) e	

sinapílico (3).....	48
Figura 23 - Fluxograma das etapas realizadas para a obtenção da lignina de <i>Morinda citrifolia</i> .....	52
Figura 24 - Equação de cálculo da porcentagem de redução da descoloração de DPPH.....	53
Figura 25 - Equação para o cálculo do percentual de parasitos viáveis.....	57
Figura 26- Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	63
Figura 27 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	66
Figura 28 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	68
Figura 29 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	70
Figura 30 - Índice de sobrevivência de amastigotas de <i>L. infantum</i> em macrófagos após tratamento com compostos e fármaco padrão. ....	72
Figura 31 - Análise do perfil de morte celular de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com compostos indólicos-tiossemicarbazônicos e controles. ....	76
Figura 32 - Atividade antioxidante promovida pela lignina das folhas de <i>Morinda citrifolia</i> em função da concentração para diferentes ensaios <i>in vitro</i> .....	77
Figura 33 - Gráficos da viabilidade celular e produção de óxido nítrico.....	79
Figura 34 - Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento de células promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com lignina.....	80
Figura 35 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratada com diferentes concentrações de lignina.....	82
Figura 36 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tratadas com diferentes concentrações de lignina.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> que causam a patologia em humanos.....	25
Tabela 2 - Atividade antioxidante promovida por diferentes ligninas em diferentes ensaios.....	49
Tabela 3 - Tempo e rendimento das reações dos compostos Indólicos-tiossemicarbazônicos.....	51
Tabela 4 -Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> sobre promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona.....	60
Tabela 5 -Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> sobre amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona.....	72
Tabela 6 -Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida <i>in vitro</i> sobre promastigotas de Tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona.....	73
Tabela 7 - Atividade antioxidante da lignina das folhas de <i>Morinda citrifolia</i> comparada a outras ligninas encontradas e a antioxidantes comerciais na concentração de 0.5 mg/mL.....	78

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Mecanismo de ação para obtenção de tiossemicarbazidas.....	45
Esquema 2 -Mecanismo de ação para obtenção de indol-tiossemicarbazonas.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
3.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS .....	19
3.2 DOENÇAS PROMOVIDAS PELA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE .....	22
3.3 LEISHMANIOSE .....	25
<b>3.3.1 <i>Leishmania</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2 Ciclo Biológico de <i>Leishmania sp.</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.3 Manifestações clínicas da leishmaniose.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.4 Tratamento .....</b>	<b>32</b>
3.4 DOENÇA DE CHAGAS .....	35
<b>3.4.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.2 Ciclo Biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.3 Manifestações clínicas da doença de chagas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.4 Tratamento .....</b>	<b>40</b>
3.5 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS.....	42
<b>3.5.1 Derivados Indólico-Tiossemicarbazonas .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2 Lignina isolada da <i>Morinda citrifolia</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>51</b>
4.1 QUÍMICA .....	51
<b>4.1.1 Derivados Indólicos-tiossemicarbazônicos .....</b>	<b>51</b>

<b>4.1.2 Lignina isolada das folhas da <i>Morinda citrifolia</i></b> .....	<b>51</b>
4.1.2.1 Análise composicional de folhas de <i>Morinda citrifolia</i> .....	52
4.1.2.2 Determinação do teor de grupos fenólicos presentes na lignina de <i>Morinda citrifolia</i> .....	53
<b>4.2 BIOLÓGICA</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.1 Atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazinla)...</b>	<b>53</b>
<b>4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.3 Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, J774 e células Vero e determinação de óxido nítrico</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.4 Produção de óxido nítrico</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2.5 Atividade Leishmanicida</b> .....	<b>55</b>
4.2.5.1 Atividade leishmanicida frente as formas promastigotas <i>Leishmania</i> .....	55
4.2.5.2 Atividade leishmanicida frente a formas amastigota de <i>L. infantum</i> .....	55
4.2.5.3 Análise ultraestrutural das formas promastigotas <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	56
<b>4.2.6 Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	<b>56</b>
<b>4.2.7 Avaliação da morte celular</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2.8 Analise estatística</b> .....	<b>58</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
5.1 DERIVADOS INDÓLICOS-TIOSSEMECARBAZÔNICOS .....	59
5.2 LIGNINA DAS FOLHAS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i> .....	77
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitos, que incapacitam ou matam milhões de pessoas, representando uma emergência médica importante (FENWICK, 2012). Endêmicas de forma geral em países com baixo poder socioeconômico, essas patologias não atraem os investimentos e pesquisas da indústria farmacêutica, devido à baixa capacidade de pagamento dos sistemas de saúde e dos potenciais consumidores (GARG, 2011; AERTS et al., 2017) A leishmaniose e Doença de chagas são enquadradas como doenças extremamente negligenciadas causando altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo e no Brasil (OLIVEIRA, 2018).

As leishmanioses são doenças causadas por um conjunto de espécies de *Leishmania sp.*, transmitidas através do vetor do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, a depender da espécie e do sistema imunológico do paciente essa doença de maneira geral pode manifestar-se de duas formas a tegumentar e a visceral (HARHAY et al., 2011), Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 1 milhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e estão sob risco de infecção (OMS, 2018).

A quimioterapia para o tratamento das leishmanioses de pedem principalmente de medicamentos utilizados durante décadas, os compostos antimoniato pentavalentes (antimoniato de Meglumina e estibogluconato de sódio), são fármacos de primeira escolha, outros medicamentos também são utilizados como pentamidina, paromicina e miltefosina (AERTS et al., 2017; RATH et al., 2003). No entanto essas terapias apresentam efeitos adversos, administração via parenteral diária, alto custo, os medicamentos não estão incluídos nas listas de medicamentos essenciais dos países e também o fornecimento descontínuo inviabiliza um tratamento adequado (DIMITRI, 2012; AMATO et al., 2008). Além de todos os importunos citados acima, existem alguns relatos indicando o surgimento de cepas resistentes (SANSOM, 2018).

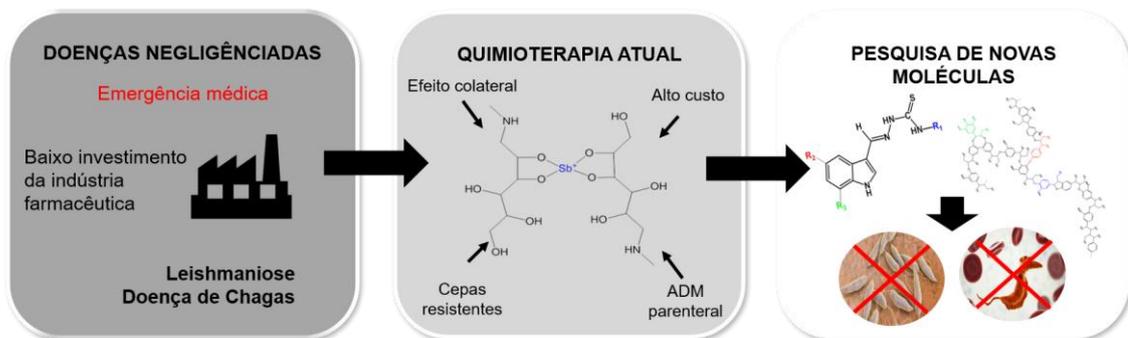
A doença de chagas ou tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal causada por um protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*. transmitida através das fezes do inseto vetor conhecido como barbeiro (JANSEN, XAVIER, ROQUE, 2015). Os sintomas da doença são variados e dependem das fases da doença que são: assintomática, fase aguda e fase crônica (CORREIA et al., 2021). A OMS estima que de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo

estão contraminadas com a doença de chagas, sendo a América Latina a região mais endêmica da doença (WHO, 2021).

No tratamento da doença de chagas atualmente temos dois medicamentos disponíveis o nitroheterociclo benznidazol e nifurtimox, são eficientes na fase aguda com cerca de 80% de eficácia, porem na fase crônica essa eficácia é reduzida (PAUCAR, MORENO-VIGURI, PÉREZ-SILANES, 2016). Esses medicamentos são utilizados a mais de 40 anos, apresentam diversos efeitos colaterais e adversos que dificultam e forçam a interrupção do tratamento por parte dos pacientes e cepas resistentes ao tratamento (BERN, 2015).

Nesse contexto existe a necessidade de buscar novos fármacos leishmanicidas mais eficazes e seguros, menos tóxicos, com vias de administração mais adequadas e com um melhor custo-benefício, dessa maneira surgem diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* utilizando compostos sintéticos e naturais com ação leishmanicida (Figura 1) (KAPIL, SINGH, SILAKARI, 2018).

Figura 1 - Esquema de doenças negligenciadas, quimioterapia atual e perspectivas de novos compostos com ação leishmanicida e tripanocida.



Fonte: Próprio autor.

Uma classe de moléculas que vem sendo amplamente estudada devido as suas propriedades químicas e farmacológicas são as tiossemicarbazonas, dentre as quais como atividade biológica destacamos a leishmanicida, derivados de tiossemicarbazona vem apresentando eficácia contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* com possíveis mecanismos de ação elucidados (HOLLOWAY et al., 2009; BRITTA et al., 2012). Outra molécula com grande potencial é o núcleo indol, composto amplamente presente na natureza, que serviram de inspiração para a criação de derivados sintéticos, esse núcleo também apresenta atividade leishmanicida contra as duas formas evolutivas da leishmaniose (RODRIGUES et al., 2015; GIRAUD et al., 2009; KAUSHIK et al., 2013).

As ligninas, presentes, são macromoléculas polifenólicas formadas a partir do acoplamento radical de três hidroxipropanoídeos: os álcoois cumarílico, sinapílico e coniferílico, apresentando grande distribuição vegetal e consistindo em um recurso renovável (CHRISTIERNIN, 2006). Diversas ações referentes às ligninas e seus derivados são descritas na literatura, tais como: eliminação de radicais livres (LU et al, 2012), atuação contra bactérias Gram-positivas e negativas (WANG et al, 2018), efeito neuroprotetor com promissora utilização na prevenção de doenças neurodegenerativas (AKAO et al, 2004) entre outras.

Diante da problemática encontrada no tratamento da leishmaniose e doença de chagas a equipe de pesquisa do Laboratório de Química Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (LQIT/UFPE), propõem o estudo *in vitro* de moléculas sintéticas e naturais para avaliar a sua atuação em diferentes formas evolutivas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *T. cruzi*, verificando se as moléculas serão potenciais fármacos para o tratamento das doenças.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito *in vitro* dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos e lignina extraída da *Morinda citrifolia*, frente os protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e *Tripanossoma* formas evolutivas de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, e *Tripanossoma cruzi* e sobre as células de mamíferos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotoxicidade *in vitro* dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos frente a linhagens J774 de macrófagos e células VERO;
- Avaliar a atividade da lignina frente a macrófagos J774 e a produção de óxido nítrico;
- Avaliar através do IC<sub>50</sub> a atividade frente formas tripomastigotas *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a atividade frente a formas amastigotas de *L. infantum* dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos, estimando o IC<sub>50</sub> e o índice de sobrevivência;
- Avaliar o efeito dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos sobre o crescimento de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, através da determinação da IC<sub>50</sub>;
- Estimar o Índice de Seletividade dos compostos;
- Realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura e de transmissão dos melhores compostos indólicos-tiossemicarbazônicos e da lignina;
- Avaliar o perfil de morte celular de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com os compostos indólicos-tiossemicarbazônicos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

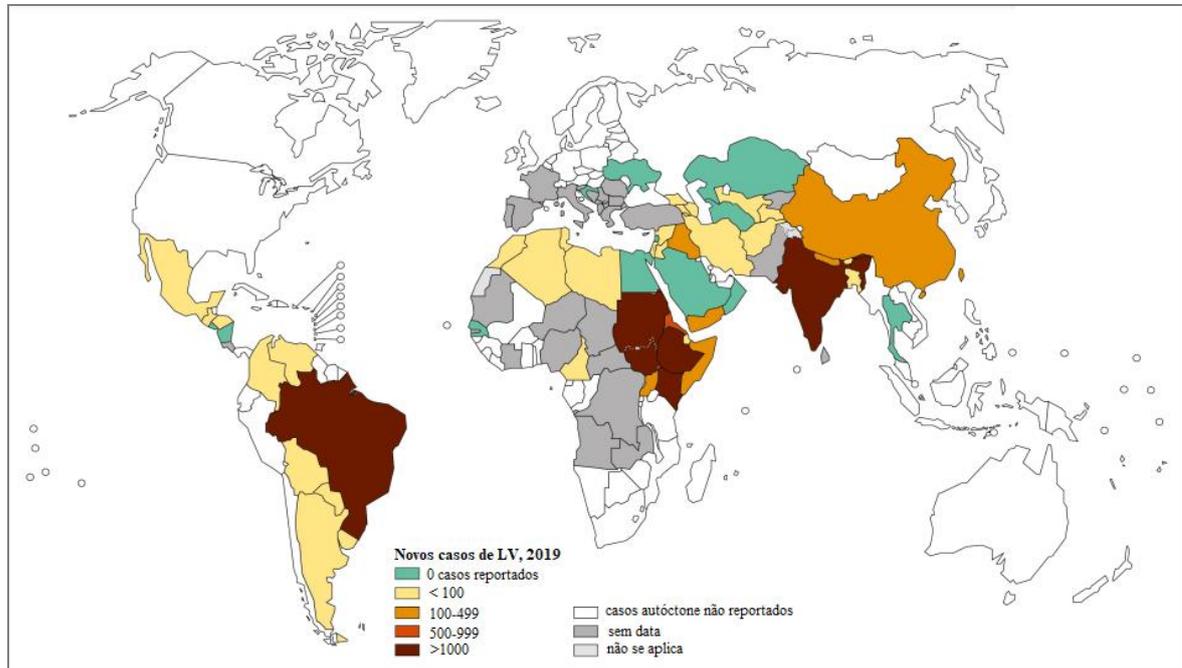
As doenças negligenciadas são um grupo de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários, que são endêmicas e se disseminam em regiões com precária estrutura sanitária, condições de moradia, alimentação e dificuldade de acesso ao sistema de saúde (VASCONCELOS, KOVALESKI, JUNIOR, 2015). Segundo a OMS, 17 doenças fazem parte desse grupo, afetando cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo, sendo 70% dos territórios atingidos são de economia de baixa e média renda (WHO, 2012). Sendo um grave problema de saúde pública as doenças negligenciadas não atraem os investimentos e pesquisas da indústria farmacêutica para terapia e prevenção, por acometerem uma população sem recursos financeiros, resultando assim em um baixo retorno financeiro (OLIVEIRA, 2018). Um estudo sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas mostrou que apenas 5% do financiamento foram investidos no grupo de doenças extremamente negligenciadas leishmaniose, doença de chagas e doença do sono, mesmo tendo aproximadamente 500 milhões de pessoas estejam ameaçadas por essas três 3 parasitoses (G-FINDER, 2019).

Sendo a doença de Chagas e a leishmaniose classificadas como parasitoses extremamente negligenciadas, as mesmas possuem outros aspectos em comum, são causadas por protozoários da classe cinetoplastídeos, são consideradas doenças com alta morbidade ocasionando comprometimento da dinâmica social do indivíduo e a terapia disponível vem sendo utilizado durante décadas, apresentam efeitos colaterais e o surgimento de cepas resistentes tornando assim o tratamento inadequado (OLIVEIRA, 2018). A ocorrência da leishmaniose e doença de chagas está diretamente ligada à pobreza, desnutrição, imunossupressão, mobilidade populacional, mudanças ambientais e climáticas (ORYAN, AKBARI, 2016; DESJEUX, 2004).

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de vetor denominado de flebotomíneos (BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018), sendo as manifestações clínicas dessa patologia de dois tipos: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (NYLÉN, KUMAR, 2012; OZBILGIN et al, 2018). Sendo um grave problema de saúde pública, estima-se que anualmente há ocorrência de 1 milhão de casos com aproximadamente 30.000 mortes (OMS, 2018). No ano de 2018 houve relato de casos de LT em 92 países com a estimativa

que 600.000 de casos ocorram anualmente, para o mesmo período 83 países relataram casos de LV com o surgimento de anual de 50.000 novos casos (Figura 2) (WHO, 2021a).

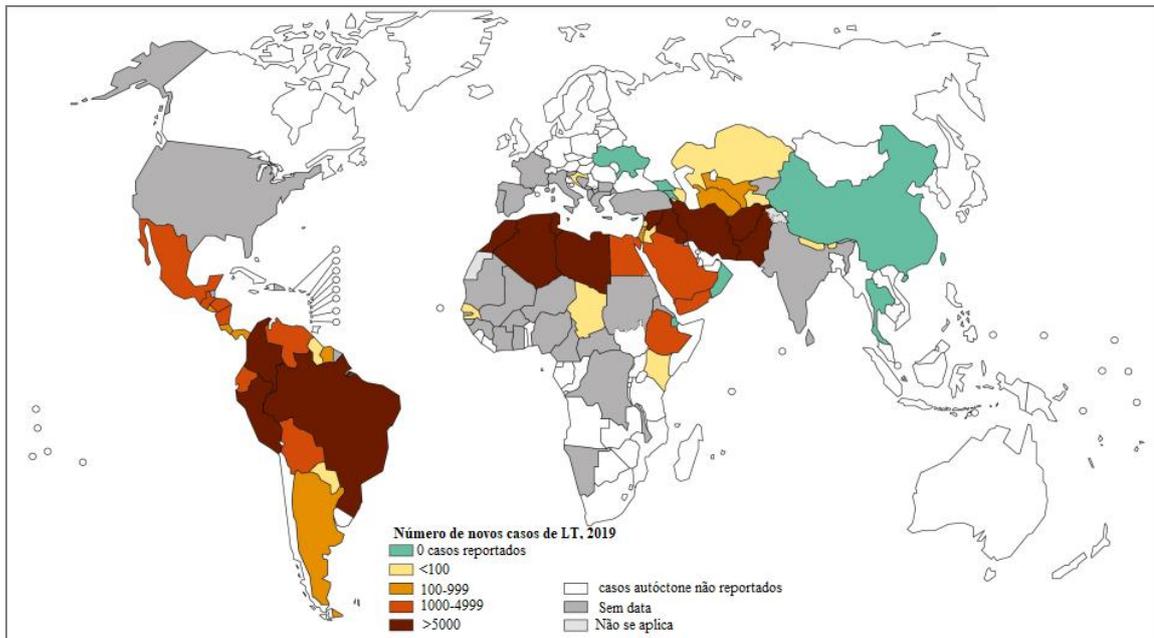
Figura 2 - Status de endemicidade de leishmaniose visceral no mundo, 2019.



Fonte: adaptado de WHO, 2021b.

Nas Américas no período de 2001-2019 foram notificados 1.028.054 casos de Leishmaniose tegumentar, dados de 2019 mostram que o Brasil, Colômbia, Nicarágua e Bolívia juntos foram responsáveis por 77% dos casos na América (Figura 3). A LV no período de 2001 -2019, apresentou uma média anual de 3.470 casos, sendo o Brasil no ano de 2019 responsável por 97% deles (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020). Dados de 2019 registrados pelo Ministério da Saúde mostram que a LT apresentou 15.484 novos casos, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes, sendo a região Norte responsável por 42,8 % dos casos. No mesmo período a LV apresentou 2.529 novos casos, uma taxa de incidência de 1,2 casos a cada 100 mil habitantes, destacando a região nordeste responsável pelo maior registro do país com 49,1% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

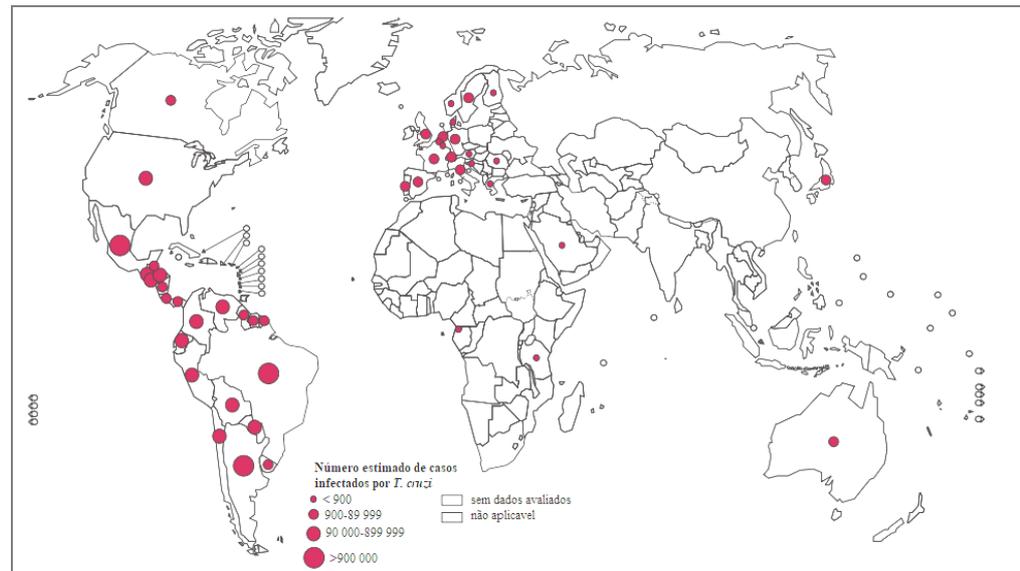
Figura 3 - Status de endemicidade de leishmaniose tegumentar no mundo, 2019.



Fonte: Adaptado de WHO, 2021c.

A tripanossomíase popularmente conhecida como doença de Chagas, é uma doença causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, tendo como principal vetor triatomíneo hematófagos (ALENCAR et al., 2021). As manifestações clínicas da doença de Chagas apresentam duas fases: fase aguda e fase crônica. É estimado que entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com *T. cruzi*, endêmica em 21 países da América Latina, esta doença por um período estava confinada ao continente Americano (WHO, 2020), mas devido a urbanização, mobilidade populacional e emigração, nas últimas décadas foram registrados casos em outras regiões e países como por exemplo na Europa e África (DIAS et al., 2016).

Figura 4 - Status de endemicidade de tripanossomíase



Fonte: adaptado de WHO, 2018.

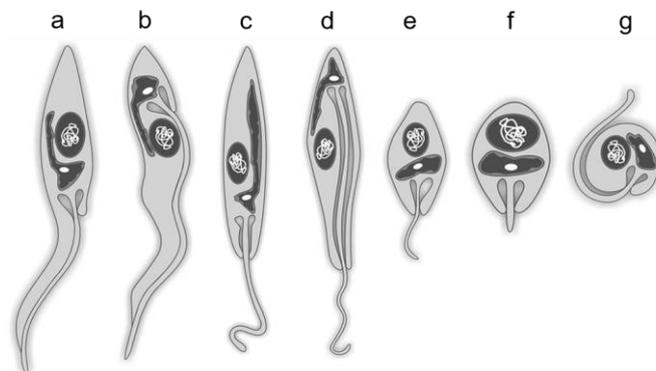
Nas Américas aproximadamente 70 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e correm risco de adquirir a doença, com cerca de 10 mil pessoas morrendo anualmente devido a complicações das doenças (Organização Pan-Americana, 2020). No Brasil a infecção por *T. cruzi* está entre as quatro maiores causas de mortes por doenças infecto-parasitárias, nos anos de 2003 a 2018 foram registrados 4.556 casos de doença de Chagas aguda com as maiores ocorrência e incidências concentradas na região norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Com frequência de casos em indivíduos em idades produtiva no Brasil (15 aos 59 anos), a doença de Chagas aguda é considerada a doença negligenciada mais importante das Américas, pois causa impacto na produtividade na força de trabalho devido a deficiência prematura e a morte (SANTOS et al., 2020).

### 3.2 DOENÇAS PROMOVIDAS PELA FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A família trypanosomatidae pertence ao filo Euglenozoa (Eukaryota: Excavata), a classe kinetoplastea, tendo como apomorfia a presença do cinetoplasto, a ordem Trypanosomatida, sendo a única família pertencente a essa ordem, que os seus representantes apresentam um único flagelo (STEVENS, 2008). Englobando espécies de parasitos responsáveis por perdas econômicas na agricultura e pecuária e por graves doenças no homem. A família dos trypanosomatidae agrupa diversos protistas unicelulares e

uniflagelados com ciclos de vida monoxênicos e heteroxinênicos (D'AVILA-LEVY et al., 2015). Os trypanosomatidae heteroxinênicos são amplamente estudados na literatura, a eles pertencem os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, causadores das enfermidades leishmaniose e doença de Chagas respectivamente em humanos e outros mamíferos, sendo responsável anualmente por milhões de óbitos no mundo (MOREIRA, LO' PEZ-GARCÍA, VICKERMAN, 2004). Os membros pertencentes a família trypanosomatidae podem apresentar diferentes morfologias ao longo de seus ciclos evolutivos, essas formas foram definidas e classificadas de acordo com a forma, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e no ponto de emergência do flagelo (KAUFER et al., 2017). Os morfotipos principais foram separados em dois grupos: 1 - Alongados e de flagelos longos (promastigotas, opistomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas); 2 - Esféricos e de flagelo curto (amastigotas, coanomastigotas e esferomastigotas) (Figura 5) (WHEELER, GLUENZ, GULL, 2013).

Figura 5 - Representação esquemática das principais formas morfológicas presentes nos tripanosomatídeos.



Fonte: Adaptado de D'AVILA-LEVY et al., 2015.

Legenda: A- forma epimastigota; B- forma tripomastigota; C- forma promastigota; D- opistomastigotas; E- coanomastigotas; F- amastigota e G- esferomastigotas.

Apesar dos trypanosomatidae apresentarem variações entre os estágios de ciclo de vida e entre as espécies, a similaridade ultraestrutural é universalmente conservada (D'AVILA-LEVY et al., 2015). Os tripanosomatídeos possuem organelas similares a outras células eucarióticas, entretanto algumas delas possuem peculiaridades, servindo de alvos potenciais para agentes quimioterápicos (MONZOTE; GILLE, 2011).

Os representantes da família trypanosomatidae apresentam uma única mitocôndria ramificada, portanto a correta função dessa organela é fundamental para a sobrevivência do protozoário (SCHNEIDER, 2001). A mitocôndria de modo geral está localizada abaixo da

membrana plasmática distribuída por todo o corpo do parasito abaixo dos microtúbulos subpeliculares, podendo preencher até 12% do volume total da célula (DESOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009). Essa organela em protozoários possui uma característica peculiar, ela possui uma região denominada cinetoplasto, nessa região está concentrada o K-DNA que corresponde a 30% do DNA total da célula. O K-DNA é formado por duas classes de moléculas circulares o maxicírculos e o minicírculos, o primeiro são responsáveis por codificar RNAs ribossomais e subunidades do complexo respiratório, e o segundo tem como função codificar pequenos RNAs guia que na edição do RNA mensageiro codificado pelo maxicírculo (CAVALCANTI et al., 2009).

Outras organelas importantes presentes nos trypanossomatidae são os acidocalcissomos, essa organela em geral possui formato esférico e distribuição por todo o corpo do parasito, seu conteúdo é ácido e com elevada elétrons-densidade, sendo uma organela ausente nas células de mamíferos (MORENO, DOCAMPO, 2009). Tem como principal função reserva de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro, compostos fosfatados, especialmente pirofosfato inorgânico e polifosfato, além de estabelecer a homeostase de cálcio, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (DOCAMPO, ULRICH, MORENO, 2010).

Os glicossomos são estruturas delimitada por membrana relacionada ao metabolismo de carboidratos, por via glicolítica, e aminoácidos (ALLMANN, BRINGAUD, 2017). Os glicossomos também dispõem de enzimas da síntese de aminoácidos,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, síntese de éter-lipídios, metabolismo de peróxido, esteróis, pirimidinas e enzimas da via de recuperação de purinas (SZÖÖR et al., 2014). Como essa organela não possui núcleo, as proteínas presentes são codificadas por genes nucleares, transcritas em ribossomos para entrar na organela (HAANSTRA et al., 2016). A quantidade dos glicossomos pode variar de acordo com a espécie e estágio evolutivos dos parasitos, assim como a presença de enzimas também é variável e depende do estágio evolutivo do parasito, mostrando que a dinâmica energética e metabólica distinta entre as formas (MICHELS et al., 2006).

Os triatomíneos possuem organelas com semelhanças aos compartimentos lisossomais presentes em outras células eucarióticas, os megassomos e reservossomos, presentes em espécies do gênero *Leishmania* e gênero *Trypanosoma* respectivamente (CONCEIÇÃO-SILVA, ALVES, 2014). Essas organelas possuem semelhança na estrutura e funcionamento, são estruturas eletrondensas delimitadas por uma membrana, tem como principal característica pH ácido e a presença de cisteínas proteases, além de a captura de moléculas por

essas organelas estarem vinculadas ao processo endocítico (SANT'ANNA, SOUZA, CUNHA-E-SILVA, 2004; CONCEIÇÃO-SILVA, ALVES, 2014; UEDA-NAKAMURA, ATTÍAS, DE CULL, 2007).

### 3.3 LEISHMANIOSES

#### 3.3.1 *Leishmania*

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, esse parasito pertence a ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, sendo esse dividido em dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (STEVERDING, 2017). Aproximadamente 20 espécies de leishmania causam patologia no homem, dentre elas apenas duas espécies são responsáveis pela manifestação visceral da doença *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) donovani* (STEVERDING, 2017; BANULS, HIDE, PRUGNOLLE 2007). Abaixo a tabela 1 apresenta a relação das espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.

Tabela 1- Espécies de *Leishmania* que causam a patologia em humanos.

Subgêneros	Espécies	Manifestação Clínica
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	LCL, LCD
	<i>L. amazonensis</i> *	LCL,LCD,LMC
	<i>L. donovani</i>	LV,LPC
	<i>L. infantum</i> *	LV,LC
<i>Viannia</i>	<i>L. major</i>	LC
	<i>L. mexicana</i>	LCL, LCD
	<i>L. tropica</i>	LCL
	<i>L. venezuelensis</i>	LCL
	<i>L. waltoni</i>	LCD
	<i>L. braziliensis</i> *	LCL,LMC
	<i>L. guyanensis</i> *	LCL,LMC
	<i>L. lainsoni</i> *	LCL
	<i>L. lindenbergi</i> *	LCL
	<i>L. naiffi</i> *	LCL
	<i>L. panamensis</i> *	LCL,LCM
	<i>L. peruviana</i>	LCL,LMC
<i>L. shawi</i> *	LCL	

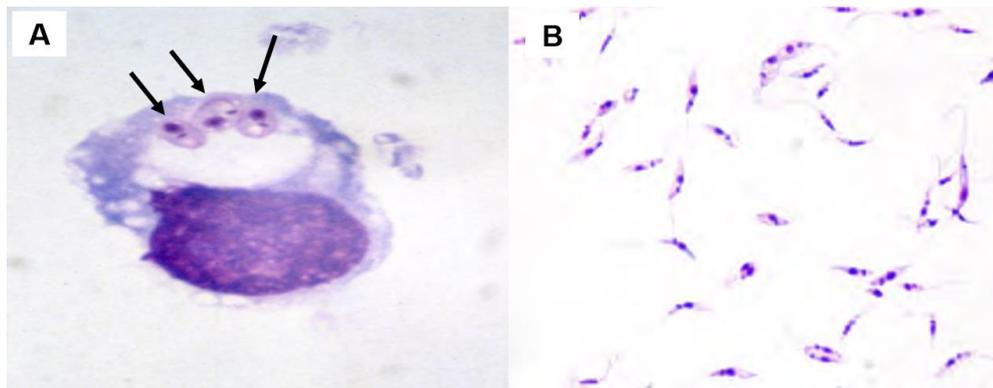
Fonte: Adaptado de Steverding (2017).

Legenda: LCL-Leishmaniose cutânea localizada; LCD- Leishmaniose cutânea difusa; LMC- Leishmaniose mucocutânea; LV- Leishmaniose Visceral; LPC- Leishmaniose pós-calazar e \*-Espécies presentes no Brasil.

Os protozoários da leishmaniose são parasitos intracelulares obrigatórios, assumindo duas formas evolutivas promastigota e amastigota (Figura 6) (BANULS, HIDE, PRUGNOLLE, 2007). A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor,

possuindo aproximadamente 10-15  $\mu\text{m}$  de comprimento, exibe forma alongada e flagelo único, longo e móvel, possui núcleo central ao corpo em formato oval e o cinetoplasto presente na região anterior ao núcleo. Medindo cerca de 2-5  $\mu\text{m}$ . As formas amastigotas são arredondadas, sem flagelo exteriorizado e não móvel, são presentes em células do sistema fagocítico mononuclear, o núcleo é grande e central (GOTO, LINDOSO, 2010; JAIN, JAIN, 2013).

Figura 6 - Formas promastigotas (A) amastigotas (B) e de *Leishmania*.



Fonte: adaptado de ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021.

Legenda: A- Macrófago infectado com três formas (setas) amastigotas de *Leishmania spp.*; B- Formas promastigotas de *Leishmania spp.*

Os vetores responsáveis pela transmissão da leishmaniose são insetos flebotomíneos, pertencentes a ordem Díptera, Família *Psychodidae*, e gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (AKHOUNDI et al., 2016). Popularmente conhecido como mosquitos palha (Figura 7), esses insetos possuem cor amarelada e são de pequeno porte, com comprimento de 0,5 cm, possuindo atividade crepuscular ou noturna. Apenas as fêmeas são responsáveis pela transmissão da doença, pois necessitam alimentar-se de sangue para amadurecer seus ovos (MUNSTERMANN., 2019). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão de LT são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. Na transmissão de LV temos como principal vetor a espécie *L. longipalpis* (BRASIL, 2013).

Figura 7 - Flebotomíneo.



Fonte: adaptado de ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021.

Legenda: Fêmeas de adulta de *Lutzomyia spp.* Ingerindo sangue sobre a pele humana.

As leishmanioses possuem como hospedeiro os mamíferos, tendo como principais reservatórios dessa doença em áreas endêmicas animais silvestres como raposas, tatus, preguiças, marsupiais; animais sinantrópicos em geral pequenos roedores e animais domésticos como cães e gatos (ROQUE, JANSEN, 2014). Os cães tem importância na transmissão da doença para os humanos, pois possuem alta prevalência de infecção dependendo da região, eles têm o hábito de deslocarem de um lugar a outro, possuem lesões ricamente parasitadas, além de um número grande de animais assintomáticos (MARCONDES, ROSSI, 2013; COSTA et al., 2018).

Os sinais clínicos em cães incluem: anemia, hepatoesplenomegalia, perda progressiva de peso, febre, linfadenomegalia, lesões descamativa (localizada ou mucocutâneo generalizado), ulcerativa, papular, nodular ou pustular e lesões nasais semelhantes a lúpus ou pênfigo, alopecia multifocal, hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia (Figura 8) (PALTRINIERI et al., 2010; SANTOS, YOSHIOKA, MIYAGUI, 2008; SILVA, 2007).

Figura 8 - Manifestações da leishmaniose em caninos.



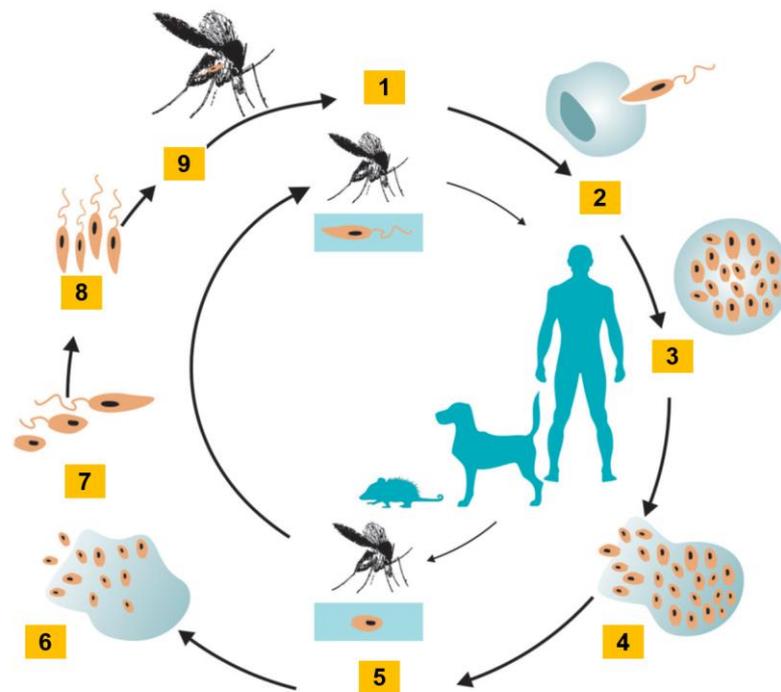
Fonte: Adaptado de Arruda (2010); Vilas et al. (2014).

A leishmaniose acometia apenas animais silvestres, porém com a urbanização desorganizada, fazendo com que a população fosse residir nas periferias próximo a regiões de mata, além do fluxo migratório do interior para a cidade, essa patologia começou acometer animais sinantrópicos e domésticos, acometendo conseqüentemente o ser humano (DANTAS-TORRES, BRANDÃO-FILHO, 2006; REIS et al., 2017). Associado a esses fatores a adaptação do flebotomíneo aos mais diversos ambientes e temperatura e a ocupação de maneira desordenada de cidades fez com que a leishmaniose se proliferasse em diversas regiões e ambientes (RISUENO et al., 2018; READY et al., 2014).

### **3.3.2 Ciclo biológico de *Leishmania* sp.**

O ciclo biológico da *Leishmania* inicia quando a fêmea do inseto vetor para amadurecer seus ovos alimenta-se de sangue de um mamífero infectado, ao fazer o repasto sanguíneo ela ingere formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 9). No sistema gastrointestinal do inseto as formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas pró-cíclicas, com alta capacidade de realizar divisão celular, porém sua forma ainda é de corpo redondo e o flagelo mais curto do que o corpo celular (SCHLEIN, 1993; REITHINGER et al., 2007). Após aproximadamente 3 dias as promastigotas pró-cíclicas, sofrem alteração em seu corpo ficando alongadas e com flagelo grande e móvel, são denominadas de promastigotas nectomas, essas formas ficam fixas no epitélio do intestino médio do vetor pelo flagelo (ROGERS, CHANCE, BATES, 2001; SUNTER, GULL, 2017).

As nectomas por sua vez se diferenciam em promastigotas leptomonas, que migram para a região do intestino médio torácico, as leptomonas possuem flagelo maior que o corpo celular e ampla divisão celular (GOSSAGE et al., 2003; SUNTER, GULL, 2017). As leptomonas que cessam a divisão celular diferenciam-se em formas de corpo delgado e flagelo longo e livre, as promastigotas metacíclicas, que migram para a região da válvula estomodeal e são as formas infectantes para o hospedeiro (KAYE, SCOTT, 2011).

Figura 9 - Ciclo biológico de *Leishmania sp.*

Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 2019.

Legenda: 1- vetor infectado inocula *Leishmania sp.* promastigotas metacíclicas em animais vertebrados durante a refeição de sangue; 2- Promastigotas metacíclicas penetram macrófagos; 3- Promastigotas se desenvolvem em amastigotas e se multiplicam por divisão binária; 4- Macrófagos lisam e liberam amastigotas para o extracelular; 5- O vetor ingere sangue infectado com amastigotas durante refeições de sangue; 6- As células parasitadas ingeridas lisam e liberam os amastigotas; 7- Amastigotas tornam-se promastigotas no intestino do vetor; 8- Promastigotas dividem por divisão binária; 9- Promastigotas migram para a probóscide do vetor.

Quando o flebotomíneo já infectado alimenta-se novamente de sangue, as promastigotas metacíclicas, através do repasto sanguíneo são introduzidas no hospedeiro. Essa entrada no hospedeiro é facilitada por componentes presentes na saliva do inseto que bloqueiam a hemóstase do hospedeiro, a saliva possui moléculas com ação anticoagulantes, o maxadilan um potente vasodilatador e prostaglandina, aspirase e prostaciclina com ação antiagregante plaquetário (KAYE, SCOTT, 2011; BATES, 2007).

Além das substâncias salivares presentes no vetor que modificam a ação das células hospedeiras, outras moléculas presentes no parasito também facilitam a sua entrada. Os proteofosfolípidos são responsáveis pela produção do gel secretor de promastigota (PSG), esse gel faz com que ocorra um bloqueio da ingestão de sangue pelo vetor, fazendo com que o mesmo para alimentar-se regurgite as formas promastigotas metacíclicas, o PSG auxilia na captação de macrófagos para o local da picada, aumentam a produção da arginase I, fazendo

com que os macrófagos sintetizem moléculas que auxiliam no crescimento do parasito (MERIDA-DE-BARROS et al., 2018). Lipofosfoglicano (LPG) e glicosilfosfatidilinositol (GPI) são moléculas que atuam como fator de virulência, essas moléculas são reconhecidas pelos receptores das células fagocíticas, regulando negativamente a ação dos macrófagos como por exemplo atuam retardando a fusão do fagossomo com lisossomos e inibindo a ação da enzima óxido nítrico sintase e do sistema oxidativo (MERIDA-DE-BARROS et al., 2018, AEBISCHER, 2016).

Uma vez dentro do mamífero as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e, dentro deles, diferenciam-se em amastigotas e começam a se multiplicar. Com a grande quantidade dessas formas o macrófago rompe liberando-as para o sistema sanguíneo, sendo fagocitadas por outras células ou ingeridas por flebotomíneos reiniciando o ciclo biológico (LISBOA et al., 2016).

### **3.3.3 Manifestações clínicas da leishmaniose**

A leishmaniose apresenta diversas manifestações clínicas dependentes da resposta imune do hospedeiro, espécie infectante e outros fatores como: idade, estado nutricional do paciente e carga parasitária. Existem duas formas principais dessa patologia: a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LT manifesta-se de quatro maneiras: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose disseminada (Figura 9) (PACE, 2014).

A leishmaniose cutânea localizada, quando sintomática, inicia-se com uma placa ou nódulo que progride ao longo do tempo para lesões ulcerosas, a lesão ulcerada é arredondada, com fundo granular e bordas elevadas (POLLACK, FLOWERS, ZLOTOFF, 2019; TIRONI et al., 2021). A leishmaniose tegumentar mucocutânea manifesta-se como uma úlcera crônica, sendo o resultado da propagação de certas espécies de parasitas de *Leishmania* para as mucosas nasal e oral. As lesões da cavidade oral podem se espalhar para orofaringe e laringe comprometendo a cartilagem e as cordas vocais (ABADÍAS-GRANADO et al., 2021). Essa manifestação clínica forma lesões faciais desfigurantes e mutiladoras causando estigma nos pacientes (SHOWLER, BOGGILD, 2017; CROVETTO-MARTÍNEZ et al., 2015).

A Leishmaniose cutânea difusa são mais raras e em geral está relacionada a uma infecção descontrolada devido a uma resposta humoral inadequada. Caracteriza-se pela presença de grande quantidade de lesões ao longo do corpo, são múltiplas pápulas e/ ou nódulos não ulcerados (MACHADO et al., 2011). A leishmaniose cutânea difusa inicia-se com

apenas uma lesão em geral nas extremidades e depois a dispersão pela pele, resultado de uma resposta não satisfatória do tratamento (ESPINOZA-MORALES et al., 2017; ABADÍAS-GRANADO et al., 2021). Leishmaniose cutânea disseminada apresenta o aparecimento de múltiplas lesões papulares com aspectos acneiformes presentes em vários segmentos corporais, podendo está associado a sintomas como febre, astenia e mialgia. Essa manifestação clínica pode estar associada a coinfeção por HIV (HOTT et al., 2021).

Figura 10 - Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar.



Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 2019.

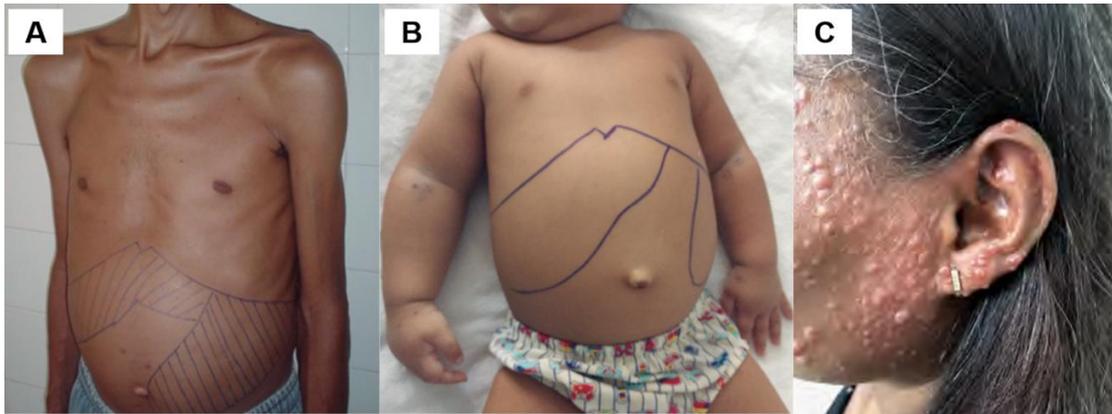
Legenda: A- leishmaniose cutânea localizada; B- Leishmaniose mucocutânea; C- Leishmaniose cutânea disseminada; D- Leishmaniose cutânea difusa.

Considerada a forma mais severa da doença a leishmaniose visceral, se não tratada é fatal em mais de 95% casos (WHO, 2021a). Os fatores de risco para o desenvolvimento da LV incluem desnutrição, faixa etária (principalmente crianças por não apresentarem o sistema imunológico amadurecido), uso de fármacos imunossupressores e a coinfeção com HIV (OLIVEIRA et al., 2018; PACHECO et al., 2021). A LV é uma doença sistêmica grave que atinge órgão como fígado e medula óssea (MANSUETO et al., 2014).

Na manifestação assintomática da LV, o indivíduo não apresenta sintomas, em alguns casos pode ocorrer a cura espontânea do paciente ou sintomas inespecíficos como febre, diarreia e fraqueza (BRASÍLIA, 2014). A forma aguda caracteriza-se por apresentar como sintomas febre alta, palidez, diarreia, perda de peso, fraqueza além visceromegalia (Figura 11) (GÓES, JERALDO, OLIVEIRA, 2013, AGUIAR, RODRIGUES, 2017). A fase crônica caracteriza-se por apresentar como febre contínua, desnutrição, perda progressiva de peso, edema, desnutrição grave, hemorragias e aumento da hepatoesplenomegalia (BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018), a doença pode evoluir e no seu período final O período final da doença caracteriza-se por hemorragias, delírio e complicações infecciosas que condicionam para o óbito (TEIXEIRA et al., 2019).

A leishmaniose visceral dérmica pós calazar é uma manifestação atípica de LV, onde pacientes aparentemente curados após tratamento da LV, apresentam lesões maculares, papulares ou nodulares na pele (ANSARI et al., 2008) (Figura 10). Apesar de não apresentar riscos de vida ao paciente e uma cicatrização de aproximadamente 12 meses das lesões, é uma doença estigmatizante que carrega uma carga socioeconômica significativa (MUKHOPADHYAY et al., 2014).

Figura 11 - Manifestações clínicas da leishmaniose visceral e dérmica pós calazar.



Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 2019; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021.

Legenda: A- paciente com peso perda e presença de hepatoesplenomegalia; B- presença de hepatomegalia e esplenomegalia; C- leishmaniose dérmica pós-calazar em paciente com múltiplas lesões nodulares na face e na orelha.

### 3.3.4 Tratamento

Antimoniato pentavalente são fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, apresentando-se duas formulações antimoniato de Meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) (Figura 11) (BASTOS et al., 2016). Esses medicamentos vêm sendo utilizados ao longo de décadas, apesar dos seus efeitos adversos tais como artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástricas, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, febre, fraqueza, cefaleia, palpitação, insônia e problemas renais, cardíacos e pancreáticos (MAGILL, 2013). Essa medicação apresenta uma via de administração endovenosa ou intramuscular que faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento, associado a esse abandono de tratamento o uso prolongado durante décadas, vem desenvolvendo-se resistência a essa droga (SUNDAR, 2015).

Os antimônios atuam interferindo na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, causando a

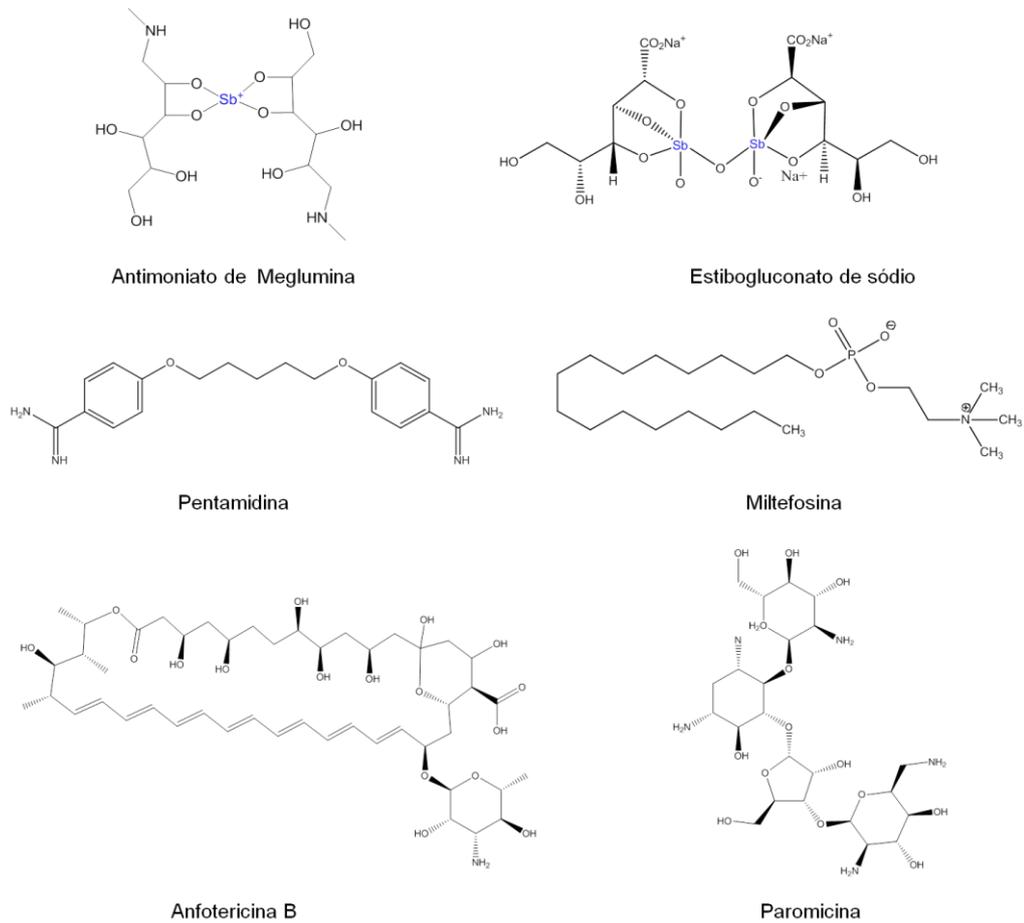
redução na produção de ATP e GTP (NO, 2016). Utilizado de maneira adequada esses fármacos são eficientes para o tratamento de todas as manifestações clínicas da leishmaniose. No Brasil apenas o antimoniato de Meglumina é utilizado e a organização mundial de saúde recomenda que a dose deste fármaco seja calculada em mg  $20\text{mg}/\text{Sb}+5/\text{kg}/\text{dia}$  no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias (BRASIL, 2016).

O desoxicolato sódico de anfotericina B, é um antibiótico, utilizado para o tratamento das leishmanioses como fármaco de segunda linha (Figura 12), porém como fatores limitantes de seu uso temos a administração intravenosa, sendo administrado por  $1\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$  por infusão venosa, durante 14 a 20 dias (BRASIL, 2016). Os efeitos adversos como febre alta, nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite (SUNDAR, 2015). A anfotericina B liga-se preferencialmente ao ergosterol, desencadeando a formação de poros na membrana (CHATTOPADHYAY, JAFURULLA, 2011). O ergosterol é uma molécula importante para o crescimento, diferenciação e sobrevivência da *Leishmania*, pois controla a homeostase das membranas biológicas, portanto, qualquer alteração bioquímica pode afetar o funcionamento de diferentes organelas presente na membrana plasmática do parasito (YAMAMOTO et al., 2020).

Com a finalidade de diminuir os efeitos adversos, foi desenvolvida formulações lipossomais da anfotericina B. Uma das vantagens dessa formulação é a capacidade de ter eficácia com menor quantidade de dias para o tratamento, sendo  $3\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ , durante 7 dias, ou  $4\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ , durante 5 dias em infusão venosa, em uma dose diária (BRASIL, 2016). Contudo, seu alto custo inviabiliza o uso limitado. No Brasil a formulação lipossomal é utilizada apenas para o tratamento da leishmaniose visceral (FARHI, 2008; SINHA, BHATTACHARYA, 2014).

A pentamidina (Figura 12), tratamento de segunda escolha, é um medicamento também causa efeitos colaterais como náusea, dor de cabeça, sensação de queimações, hipotensão, além de erupções cutâneas, disfunções hepática e renal (IQBAL et al., 2016). Seus efeitos adversos, altos índices de falha e administração parenteral geraram uma diminuição gradual de seu uso. A ação desse fármaco ainda não está totalmente elucidada, sabe-se que os resultados experimentais propõem que o sistema de transporte ativo e as mitocôndrias são os locais de inibição por este fármaco (NO, 2016).

Figura 12 - Fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses.



Fonte: Próprio autor

A paromomicina também é um fármaco indicado, utilizado para tratamento de LT e LV (Figura 12), também de administração intravenosa, seus efeitos colaterais incluem disfunção hepática, erupções cutâneas e prurido (IQBAL et al., 2016). O mecanismo de ação da paromomicina alteração na síntese de proteínas, na interferência da atividade mitocondrial e na capacidade de captação de precursores de macromoléculas, dificultando, assim, o crescimento do parasito. (CHAWLA et al., 2011).

A Miltefosina, fármaco antineoplásico, foi utilizado para tratamento de leishmaniose primeiramente na Índia, por ser um fármaco de administração oral, seu tratamento é de fácil aceitação pelos pacientes, porém seus efeitos secundários incluem complicações gastrointestinais, toxicidade renal e efeito teratogênico em mulheres com idade fértil (SUNDAR et al., 2012). Utilizado para o tratamento de LT e TV, seu mecanismo de ação ainda não foi estabelecido, porém sua atuação pode estar relacionada com morte celular por apoptose, alteração das vias de sinalização celular mediada por lipídeos, inibição da síntese de

lipofosfoglicano e glicoproteína 63 do parasito, essa glicoproteína atua na fixação, internalização e escape do parasito às células de defesa da resposta imune do hospedeiro, sendo um importante alvo biológico (BASTOS et al., 2016).

Desta forma, os tratamentos das leishmanioses sempre estão associados a um alto custo, diversos efeitos colaterais, aplicações injetáveis, um dificultoso acesso ao tratamento da população com menor nível socioeconômico, além da resistência da *Leishmania* aos medicamentos. Todos esses fatores contribuem para o abandono de tratamento dos pacientes (IQBAL et al., 2016; SUNDAR et al., 2012).

### 3.4 DOENÇA DE CHAGAS

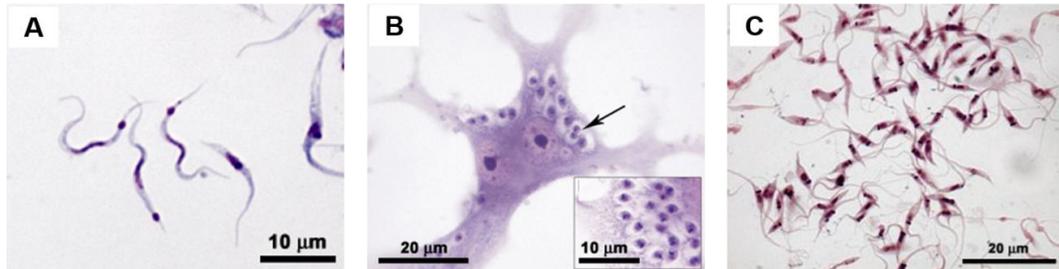
#### 3.4.1 *Trypanosoma cruzi*

A doença de chagas é causada pelo protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi*, a qual pertence a ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, o *T. cruzi* apesar de ser uma única espécie, apresenta uma diversidade genética e características bioquímicas entre suas cepas (MILES et al., 2009). Estudos foram realizados para padronizar a nomenclatura das diferentes cepas do *T. cruzi*, sendo importante essa padronização para facilitar o entendimento de questões de biologia básica do parasito, de características epidemiológicas e de sua ecologia e diferença na patogenicidade dos grupos (ZINGALES et al., 2012; BRENIÈRE, WALECKX, BARNABÉ, 2016). A classificação utilizada atualmente é baseada em DTU (Unidades de Tipagem Discreta), que identifica isolados geneticamente semelhantes, através de marcadores moleculares e imunológicos incomuns (ZINGALES et al., 2009). A nomenclatura consensual reconhece seis unidades de tipagem discreta (DTUs) denominadas TcI a TcVI e Tcbat (ZINGALES, 2018).

O *T. cruzi* possui três formas evolutivas principais ao longo do seu ciclo de vida: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas (Figura 13). As formas epimastigotas, não infectantes, são encontradas no intestino do vetor, é uma forma altamente replicável possuindo corpo alongado e flagelo livre fixado ao cinetoplasto (DESOUZA, 2009). A forma tripomastigota, não possui a capacidade de multiplicação, são as formas infectantes para o hospedeiro (tripomastigotas sanguíneas) e são encontradas também no vetor na porção final do intestino (tripomastigotas metacíclicas), possuem corpo delgado e flagelo emergindo da bolsa flagelar (DESOUZA, 2009; ZUMA, DOS SANTOS BARRIAS, DE SOUZA, 2021). As formas amastigotas são exclusivamente encontradas no interior de células de mamíferos, onde

se multiplicam, apresenta morfologia arredondada e flagelo curto restrito ao interior da bolsa flagelar (ZUMA, DOS SANTOS BARRIAS, DE SOUZA, 2021).

Figura 13 - Principais formas evolutivas de *Typanosoma cruzi*

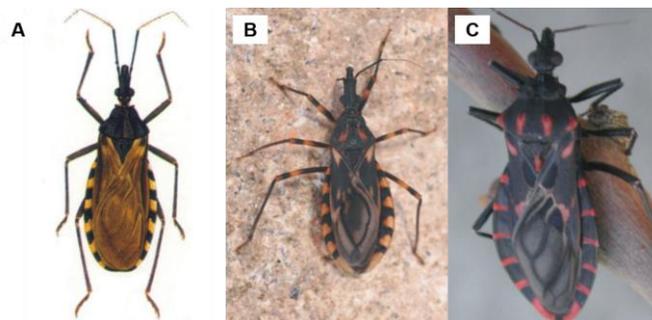


Fonte: Adaptado de Carvalho, 2017.

Legenda: (A) Forma tripomastigota metacíclica *T. cruzi*; (B) Célula infectada com formas amastigotas (seta) de *T. cruzi*; (C) Formas epimastigota de *T. cruzi*.

A doença de Chagas é transmitida para mamíferos através de insetos triatomíneos contaminados esses insetos pertencem a ordem: Hemiptera, família: Reduviidae, e subfamília: Triatominae (JURBERG et al., 2014). Dos insetos pertencentes a essa subfamília, apenas 20 espécies dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são relevantes para a transmissão do *T. cruzi* ao homem (MONTEIRO et al., 2018). As espécies: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* são considerados os vetores primários mais importantes para a transmissão (Figura 14), esses insetos são popularmente conhecidos como vinchuca, barbeiro, percevejo do mato e percevejo do sertão (GALVÃO, 2014).

Figura 14 - Espécies triatomíneos responsáveis pela transmissão de *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de JURBERG et al., 2014

Legenda: (A)- *Triatoma infestans*; (B)- *Triatoma brasiliensis*; (C)- *Panstrongylus megistus*

Caracterizados por serem insetos hematófagos, com aparelho bucal tipo picador-sugador, os dois sexos alimentam-se de sangue, assim como as fases imatura dos triatomíneos (GOURBIÈRE et al., 2012). No processo de alimentação esses insetos podem defecar durante ou logo após a alimentação, e esse comportamento faz com que eles sejam transmissores da doença de Chagas, uma vez que um triatomíneo infectado expelir nas fezes tripomastigotas de *T. cruzi* (GALVÃO, 2014). O parasita infecta diferentes populações de hospedeiros vertebrados como humanos, animais silvestres (tatus, roedores, macacos, raposas, marsupiais), além de animais domésticos (cães e gatos) (GÜRTLER, CARDINAL, 2015).

A forma vetorial de transmissão de *T. cruzi* é a mais habitual, porém outras formas são relatadas na literatura: por transplante de órgãos, transfusões sanguíneas, transmissão congênita, exposição ocupacional e por via oral (DIAS, AMATO NETO, LUNA, 2011). A transmissão por via oral tem como fator importante a contaminação de alimentos, como cana-de-açúcar e açaí, por fezes de vetores silvestres ou consumo de carne de vertebrados infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (MAGALHÃES-SANTOS, 2014).

#### **3.4.2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

O ciclo biológico da *Trypanosoma cruzi*, inicia-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas pelo inseto vetor na sua alimentação (Figura 15). Essas formas no intestino anterior, local inóspito para o *T. cruzi*, faz com que ocorra uma diminuição drástica no número de parasitos, além da diferenciação dessas formas em esferomastigotas (DE FUENTES-VICENTE et al., 2019). As esferomastigotas ao migrarem para o intestino médio posterior todas diferenciadas em epimastigotas começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binárias e aderem-se as membranas perimicrovilar. Essa adesão a membrana é facilitada por glicoproteínas do parasita como a gp63 e a cruzipaina (REBELLO et al., 2019).

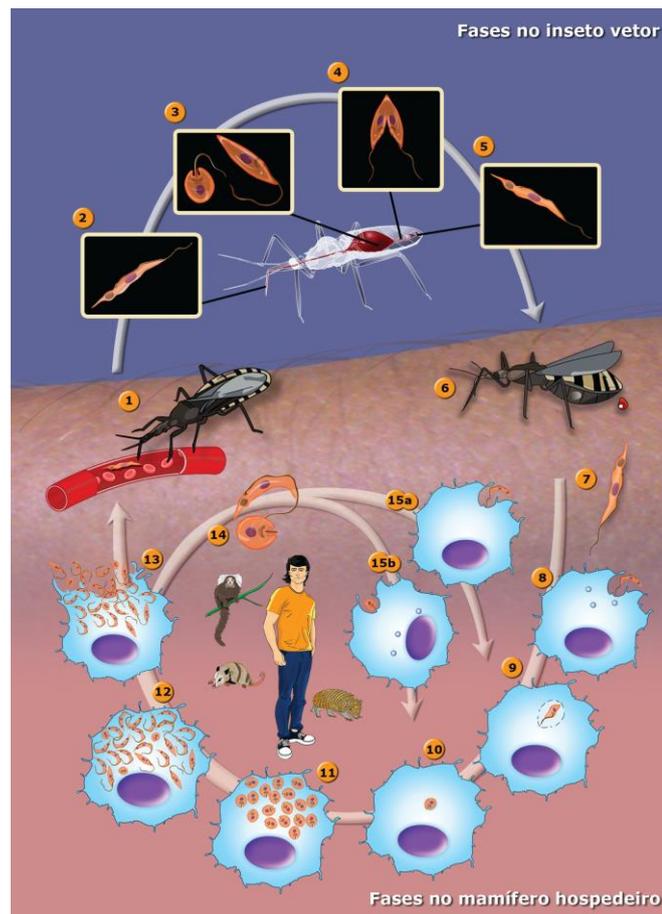
Na parte posterior do intestino as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, em um processo denominado metaciclogênese, esse processo inicia-se quando as formas epimastigotas do intestino grosso, pobre em nutrientes, se fixam na cutícula cerosa do reto do vetor triatomíneo, iniciando uma mudança morfológica para diferenciar-se nas formas infectantes (MELO, GUARNERI, SILBER, 2020).

Uma vez as formas tripomastigotas metacíclicas formadas, ao inseto vetor alimentar-se, elas serão excretadas nas fezes e entraram em contato com o hospedeiro através da pele lesada pelo inseto. Uma vez dentro do hospedeiro essas formas são fagocitadas por

macrófagos, nesse processo ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, dentre desse vacúolo as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas (TEIXEIRA et al., 2011).

Com a lise do vacúolo parasitóforo as formas amastigotas agora no citoplasma do macrófago começam a multiplicar-se através de divisões binárias. Antes do macrófago romper, ocorre a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas sanguíneas. Com o rompimento as formas tripomastigotas e algumas amastigotas remanescentes, em menor quantidade, podem infectar novas células. O ciclo se fecha quando um novo triatomíneo for se alimentar de sangue e ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas (MELO, GUARNERI, SILBER, 2020).

Figura 15 - Ciclo biológico da *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: adaptado de TEIXEIRA et al., 2011.

Legenda: (1) triatomíneo pica um hospedeiro mamífero e ingere os tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero; (2) tripomastigotas metacíclicos internalizado (3) tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em esferomastigotas; (4) epimastigotas se multiplicam por fissão binária; (5) epimastigotas transformando-se em tripomastigotas metacíclicos; (6) tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes próximo ao local da picada ; (7) os parasitas metacíclicos infectam macrófagos (8) promastigotas no interior da célula, (9) promastigotas diferenciam-se em amastigotas; (10) liberação do vacúolo parasitóforo; (11) amastigota se multiplica no citoplasma; (12) amastigotas se transformam em

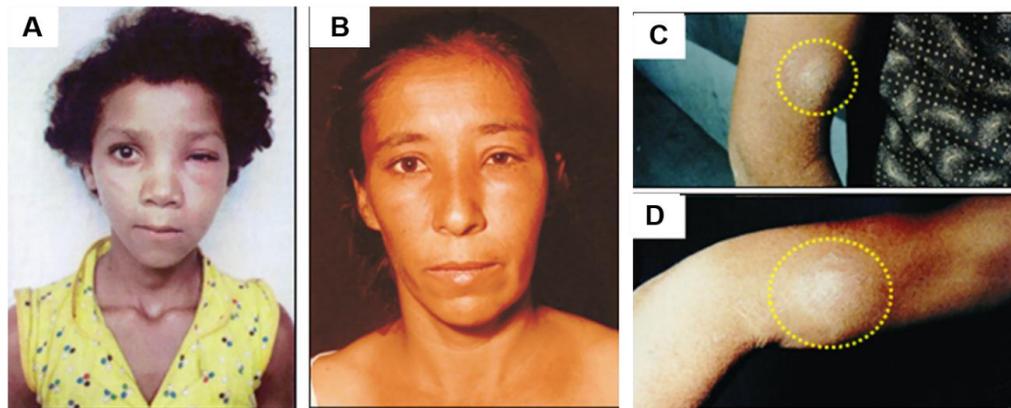
tripomastigotas; (13) macrófago rompendo; (14) forma amastigotas e tripomastigotas; (15) Tripomastigotas (a) e (b) amastigotas infectam macrófagos.

### 3.4.3 Manifestações clínicas da doença de chagas

As manifestações clínicas da doença de Chagas é dividida em duas fases: fase aguda, com alta parasitemia, inicial e de duração rápida, e a fase crônica, com baixa parasitemia, tardia e de evolução lenta (RASSI, RESENDE, 2012).

A manifestação aguda da doença quanto transmitida por via vetorial tem um período de incubação de 7 a 15 dias. Um dos primeiros sintomas da infecção por doença de Chagas aguda são sinais de porta de entrada, o sinal denominado de chagoma é caracterizado por lesão maculonodular eritematosa, consistente, indolor, circundada por edema e aumento do volume dos linfonodos satélites (Figura 15) (RASSI et al., 2017; ECHEVERRIA, MORILLO, 2019). O sinal de Romaña é o sinal mais típico de portal de entrada do parasita, caracterizada por um inchaço indolor da pálpebra de um olho, ocorrendo com frequência ocorrem congestão conjuntival e hipertrofia dos linfonodos satélites (Figura 15) (GUARNER, 2019).

Figura 16 - Sinal de Romaña e sinal de chagoma.



Fonte: Adaptado de RASSI et al., 2017.

Legenda: A e B- Sinal de Romaña; C e D- Chagoma no braço

Os sintomas sistêmicos da doença de chagas incluem: febre, geralmente constante, não superior a 39 °C; mal estar; cefaleia; astenia e hiporexia; edema da face e dos membros inferiores não associados aos sinais de entrada; aumento discreto e moderado dos linfonodos; hepatomegalia e/ou esplenomegalia pequena a moderada; miopericardite e hemorragia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A fase crônica sintomática da doença aparece anos, ou as vezes décadas após a transmissão, as formas mais frequentes dessa manifestação é o envolvimento cardíaco, que

pode ser visto em até 20-30% de todos os casos, seguido pelo sistema gastrointestinal em 5-20% e uma forma mista, cardíaca e digestiva, em 5-10% dos casos (ECHAVARRÍA et al., 2021). As manifestações gastrointestinais caracterizam-se por apresentar aumento do esôfago, cólon ou ambos que resultam em degeneração dos neurônios intestinais, a apresentação da doença esofágica pode variar de acalasia assintomática leve a megaesôfago grave com regurgitação, aspiração, tosse, disfagia, odinofagia e perda de peso (GUARNER, 2019).

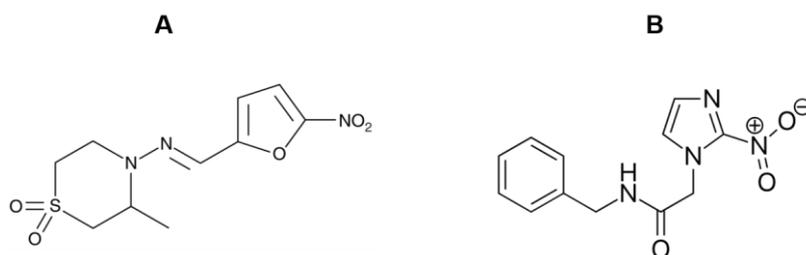
A cardiopatia chagásica pode apresentar uma ampla gama de alterações dependendo o sítio cardíaco afetado, essas manifestações incluem cardiomiopatia dilatada, fenômenos tromboembólicos e arritmias que podem causar morte súbita (SIMÕES et al., 2018). As alterações iniciais da doença podem apresentar contrações ventriculares prematuras multiformes, bloqueio de ramo direito ou bloqueio fascicular anterior esquerdo; alterações persistentes no sistema de condução, como bradicardia grave devido à disfunção do nó sinusal, atrial fibrilação, bloqueio atrioventricular, contrações ventriculares prematuras e taquicardia ventricular (SANTOS, FALCÃO, 2020).

A doença de Chagas crônica também possui uma forma indeterminada, onde os pacientes apresentam evidência sorológica de infecção por *T. cruzi*, mas não apresentam sintomas, nem sinais físicos. Pacientes acometidos com essa forma da doença apresentam excelente prognóstico, sendo suas taxas de sobrevivência são semelhantes às de indivíduos saudáveis (VIEIRA et al., 2019).

### 3.4.4 Tratamento

O tratamento da tripanossomíase é realizado por medicamentos que são utilizados desde a época de 1960, o nifurtimox e o benznidazol (Figura 17). O tratamento desses medicamentos aos pacientes é benznidazol a 5 mg / kg / dia por 60 dias ou nifurtimox a 8–10 mg / kg / dia por 60–90 dias, sendo o benznidazol o fármaco de primeira escolha (GARCÍA-HUERTAS, CARDONA-CASTRO, 2021).

Figura 17 - Fármacos utilizados para o tratamento da doença de chagas



Fonte: Próprio autor

Legenda: A- nifurtimox; B- benznidazol

O mecanismo de ação do benznidazol e nifurtimox é semelhante, eles são ativados enzimaticamente, gerando vários intermediários de radicais livres e metabólitos eletrofilos. A redução do benznidazol resulta na geração do metabólito citotóxico glioxal, que se ligam a guanosina e evita a formação de novas cadeias de DNA, (GARCÍA-HUERTAS, CARDONA-CASTRO, 2021). Outro mecanismo proposto é que o benznidazol se ligue covalentemente a múltiplos metabólitos reativos a tióis de baixo peso molecular, sendo importante nas vias da glutathione e da tripanotona (KRATZ, et al., 2018). Por sua vez, a redução do Nifurtimox leva à produção de uma nitrila insaturada de cadeia aberta que pode reagir com muitos componentes celulares, e são tóxicas para o parasita, como por exemplo inibir a síntese de ácido pirúvico e interrompe o metabolismo de carboidratos do *T. cruzi* (BERN, 2015; KRATZ, et al., 2018).

Muitas pesquisas foram realizadas a respeito da eficácia do tratamento do nifurtimox e benznidazol para as duas manifestações da doença (TANOWITZ et al., 2015). Hoje a utilização desses medicamentos é indicada para o tratamento etiológico nas seguintes condições: na fase aguda com taxas de cura de aproximadamente 80%, nessa fase ainda pode-se incluir neonatos ou lactantes com transmissão congênita; na fase crônica em pacientes até 18 anos e na reativação da doença devido a supressão imunológica (KRATZ, et al., 2018; SALOMON, 2011; TANOWITZ et al., 2015).

Os dois medicamentos utilizados apresentam vários efeitos adversos, o benznidazol causa efeitos colaterais mais acentuados como astenia, dor muscular, tonturas, náuseas, estados subfebris, parestesias, polineuropatias periféricas, erupções cutâneas do tipo eritema polimorfo não-bolhoso e distúrbios de hematopoiese (ALDASORO et al., 2018). O nifurtimox apresenta reações principais como perda de peso, anorexia, insônia, distúrbios psíquicos, hiperorexia, vômitos, epigastralgia, irritabilidade e neurite periférica sensitiva (ALEXANDRE, TESTON, ZANUSOJÚNIOR, 2015).

O nifurtimox e o benznidazol, apesar de serem utilizados por muito tempo enfrentam restrições devido aos seus efeitos colaterais, disponibilidade limitada devido a problemas na produção e entrega em áreas endêmicas, sua utilização limitada para manifestação crônica da doença e a presença de cepas resistentes ao tratamento continuam sendo desafios para a expansão desse tratamento (JACKSON, WYSSA, CHAPPUIS, 2020; OLIVEIRA et al., 2015).

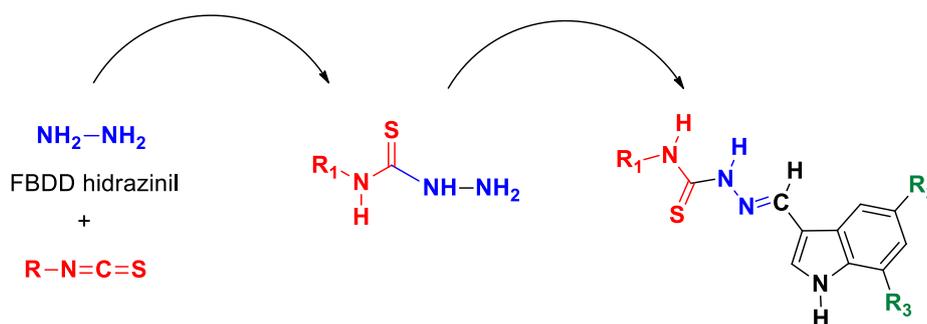
### 3.5 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS

A busca por novas alternativas terapêuticas vem ganhando destaque ao longo dos séculos em todo o mundo, justificada pelo surgimento de novas enfermidades e, muitas vezes, pelo fracasso terapêutico dos medicamentos disponíveis. Desta forma todos os recursos naturais e sintéticos são importantes.

A Química Medicinal trata tanto de produtos de origens naturais como origem sintéticas, sendo a força motriz na proposição de diversos quimioterápicos, através do planejamento de novas substâncias e da síntese orgânica, ou ainda do isolamento, caracterização físico-química e espectroscópica de macromoléculas naturais. Neste trabalho, foram utilizados compostos oriundos do planejamento e síntese orgânica, e através do isolamento de macromolécula, a lignina, das folhas de *Morinda citrifolia*.

Os recursos da química medicinal como a simplificação molecular a partir do anel acridínico, formando o núcleo indólico, e o desenho baseado em fragmentos (FBDD - *Fragment-based Drug Design*) nos conduziu aos derivados indólicos- tiossemicarbazônicos (Figura 18).

Figura 18 - Aplicação do FBDD na obtenção dos derivados indólicos- tiossemicarbazônicos.



Fonte: Próprio autor

O método baseado em fragmentos, FBDD, que surgiu como uma abordagem para identificar pequenas moléculas que se ligam a uma ampla gama de alvos terapêuticos. A maioria dos alvos de FBDD são proteínas, embora haja um número crescente de exemplos em que a FBDD foi utilizada para alvos não proteicos tais como RNA. Um dos princípios básicos que sustenta o FBDD é que a triagem de uma coleção de moléculas pequenas e simples aumenta a probabilidade da relação às triagens de moléculas maiores e mais complexas (DE SOUZA et al., 2020).

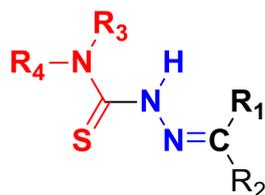
### 3.5.1 Derivados Indólico-Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são uma importante classe de compostos amplamente estudada na química medicinal por sua diversidade de aplicação biológicas, tais como: atividade anti-inflamatório (SUBHASHREE et al., 2017), antibacteriana (KHAN et al., 2017), antifúngica (DE ARAÚJO NETO et al., 2017), antiviral (PACCA et al., 2017) e antiparasitária (VIEITES et al., 2009).

Atividade anti-tripanosomastídeo tem sido relatada em estudos que mostram a eficácia dessas moléculas contra *Leishmania* e *T. cruzi* (DA SILVA SANTOS et al., 2017; LINCIANO et al., 2018). Possíveis alvos biológicos e mecanismos de ação também são alvos desses estudos. Derivados de tiossemicarbazonas demonstram a capacidade de inibir as cisteínas proteases da *Leishmania*, enzimas diretamente relacionadas a nutrição, ao processo de invasão do parasito, evasão dos mecanismos da resposta imune e replicação, além de ter um papel fundamental na diferenciação de promastigotas para amastigotas (SCHRÖDER et al., 2013.). Outros trabalhos mostram que alguns derivados de tiossemicarbazona induzem a morte das leishmanias por apoptose (DA SILVA et al., 2017), derivados tiossemicarbazonas derivadas do limoneno relataram a ação desse composto na mitocôndria do parasito, atuando na despolarização da membrana dessa organela (BRITTA et al., 2012). Estudo realizado com *T. cruzi* evidenciam a ação de tiossemicarbazonas através da produção de radicais livres tóxicos e a interação com DNA (VIEITES et al., 2009).

A estrutura química das tiossemicarbazonas e a respectiva numeração dos átomos da cadeia principal estão representados na figura 19 (PANICO, POWELL & RICHER, 1993).

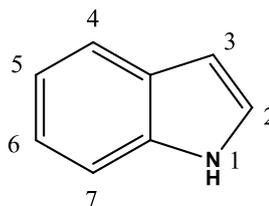
Figura 19 - Estrutura da tiossemicarbazona



Fonte: Adaptada de Tenório et al. (2005).

O núcleo indólico presentes em produtos naturais e sintéticos se caracteriza por ser uma estrutura heterocíclica aromática, sendo uma fusão dos núcleos benzênico e pirrólico (COLLIN, HÖKE, 2000) (Figura 20).

Figura 20 - Estrutura geral do indol.



Fonte: Adaptado de Collin, Höke (2000).

O núcleo indólico é amplamente encontrado na natureza sendo constituinte de diversas moléculas de plantas, bactérias e animais, tais como alcaloides, hormônio (serotonina e melatonina), presente na estrutura aminoácido o triptofano, entre outros (YU et al., 2018). Na química medicinal o mesmo é vastamente utilizado com *scaffold* para o planejamento de novas moléculas. O indol vem se destacando por sua semelhança química em diversas aplicações biológicas tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória e antitumoral (PANDOLFI et al., 2018; ZHANG, CHEN, YANG, 2014; CHEN et al., 2018; ASLAM et al., 2018; DE OLIVEIRA MORAES et al., 2018).

Atualmente medicamentos contendo o anel indólico estão disponíveis na clínica médica são eles: o Repersine, um alcaloide indólico utilizado para tratamento de hipertensão; a vimblastina e a vinorelbina para tratamento tumoral (CHEN, HUANG, 2005; CHADHA, SILAKARI, 2017).

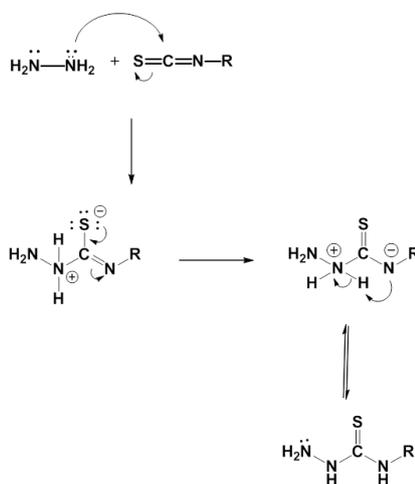
Já na atividade antiparasitária o grupo indol apresenta diversas possibilidades com novas moléculas ativas frente protozoários (MEZENCEV et al., 2009; FARAHAT et al., 2017; SHARMA et al., 2014). Compostos contendo indol demonstram excelente potencial leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, revelando ainda que os derivados induzam a morte dos parasitos por apoptose (PANDEY et al., 2016). No nosso grupo de pesquisa em inovação terapêutica-GPIT/UFPE, destacamos derivados híbridos indol-tiofeno e indol-tiazolidina-4-tiona que apresentaram atividade anti-leishmania frente formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* frente formas promastigotas e amastigotas, respectivamente (FÉLIX et al., 2016; GOUVEIA, 2019).

Sendo assim as tiossemicarbazonas e o núcleo indólico com diferentes substituintes se apresentam como uma estratégia adequada para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários.

De acordo com a metodologia adaptada de Tenório et al. (2005), a variabilidade na forma de obtenção, o baixo custo de síntese, a aplicação como intermediário de núcleos

importantes, rapidez de síntese, altos rendimentos e a sua comercialização fazem com que as tiossemicarbazonas se tornem quimicamente atraentes para realização de estudos (DU et al, 2002; HANG, BERTOZZI, 2001). Para a obtenção dessa classe de compostos duas estratégias podem ser usadas a obtenção direta através de condensação de tiossemicarbazona com um aldeído ou cetona, ou através da forma indireta, com a preparação previa de uma tiossemicarbazida utilizando hidrazina ( $\text{NH}_2\text{-NH}_2$  – ligante hidrazinil) e distintos reagentes (Esquema 1), seguida de uma condensação com um derivado carbonilado específico (CASAS, SORDO, 2000) O mecanismo de ação da forma indireta de obtenção a parti de isotiocianatos é descrito na literatura inicia-se com a formação de um composto intermediário a tiossemicarbazida, na reação a um ataque simultâneo do hidrogênio presente na hidrazina ao carbono da tiocarbonila, ocorrendo a deslocalização dos elétrons para o hidrogênio vizinho, formando assim a tiossemicarbazona.

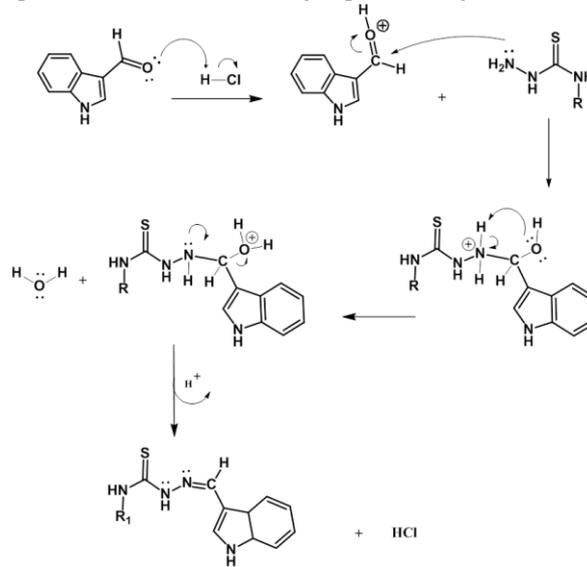
Esquema 1 - Mecanismo de ação para obtenção de tiossemicarbazidas.



Fonte: Próprio autor.

Na etapa seguinte ocorre uma reação de condensação. Por meio de um ácido ocorre ativação da função aldeído do composto aromático de escolha, o par de elétrons livres presente na hidrazina ataca o carbono positivo. Ocorre uma deslocalização de elétrons com formação e eliminação de água (Esquema 2). O nitrogênio que está positivo atacou a água e finalmente forma-se a indol-tiossemicarbazona (MENDONÇA, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2015).

Esquema 2 - Mecanismo de ação para obtenção de indol-tiossemicarbazonas.



Fonte: Próprio autor.

### 3.5.2 Lignina isolada da *Morinda citrifolia*

*Morinda citrifolia* é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, esta é comercialmente conhecida por Noni. O nome científico da planta foi primeiramente descrito por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, o qual é derivado do gênero *Rubia* L., do latim rubium, devido à tinta vermelha, tal qual é produzida pelas raízes de plantas desse gênero. Rubiaceae é a quarta maior família botânica entre as angiospermas e possui uma distribuição cosmopolita, com 550 gêneros e 9000 espécies, dessas, 2000 podem ser encontradas no Brasil. A maior parte das rubiáceas é própria de regiões quentes, principalmente os trópicos. A família é conhecida devido a sua importância econômica e terapêutica, sendo largamente utilizada na medicina popular (Figura 21) (PEREIRA, 2007; MATOSO et al., 2013). Neste estudo utilizamos as folhas da *Morinda citrifolia*.

Figura 21 – Folhas e frutos do noni (*Morinda citrifolia*)

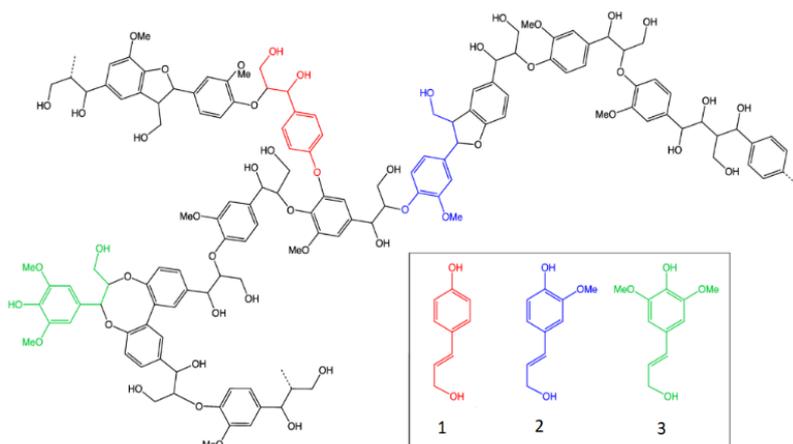
Fonte: NELSON (2006).

As plantas são incomparáveis na sua capacidade de produzir um vasto número de metabolitos secundários. Muitos destes metabolitos têm características medicinais. A propriedade medicinal das plantas é estudada há séculos pelo homem, e esta tradição mantém-se em uso crescente de medicinas alternativas e desenvolvimento de suplementos dietéticos na atualidade, documentadamente, todas as partes do noni, como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes são utilizadas como potenciais agentes terapêuticos, apresentando atividades com ações analgésica, anti-hipertensiva, antioxidante e anti-helmíntica (SILVA et al, 2012). Nas últimas décadas diversos produtos do noni atingiram uma grande popularização nas formas de sucos, pílulas, cápsulas e em pós, sendo intensamente comercializados como possuindo propriedades imunomodulatórias e no tratamento da síndrome da fadiga crônica e do câncer. Tendo em vista os benefícios atribuídos ao noni, a European Commission of Health and Consumer Protection (Comissão Europeia de Saúde e Proteção do Consumidor, tradução livre) o reconheceu como novo produto natural (LOHANI et al, 2019).

As ligninas são o segundo biopolímero mais abundante da Terra, atrás apenas da celulose, representando cerca de 30% da quantidade total de carbono da biosfera. As ligninas são responsáveis pela rigidez e força da parede das células vegetais, além de promoverem a condução de água, através de um sistema vascular, e promover a proteção das plantas contra patógenos (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). Embora produzida em milhões de toneladas todos os anos, as ligninas são tratadas como resíduo na indústria da produção de papel, a partir da celulose. Apenas uma pequena quantidade (1-2%) é empregada na produção de resinas fenólicas, freios automotivos, espumas de poliuretano, biodispersantes e surfactantes (MANSOURI; SALVADÓ, 2006).

Quimicamente, as ligninas consistem em complexos polímeros polifenólicos amorfos formados a partir da condensação radical de três álcoois aromáticos (monolignóis): *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A Figura 22 mostra a estrutura molecular dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

Figura 22 – Estruturas moleculares dos álcoois *p*-cumárflico (1), coniferflico (2) e sináplico (3).



Fonte: Adaptado de Clifford (2020)

Devido a abundância de o grupo hidroxila fenólico as ligninas apresentam a capacidade de desempenhar atividade antioxidante. Para a caracterização da ação antioxidante dos compostos fenólicos, podem ser utilizados diferentes métodos.

Dentre os métodos estão: Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), o método consiste na redução do radical de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Capacidade de sequestro do radical ABTS 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), o método baseia-se em uma reação por transferência de elétrons, no qual avalia-se a capacidade antioxidante de capturar o cátion radical ABTS. Esta captura produz um decréscimo na absorbância a 734 nm. Outro método bastante conhecido é o do fosfomolibdênio e baseia-se na redução do Mo(VI) em Mo(V) e subsequente formação do complexo fosfato de Mo(V). Essa determinação espectrofotométrica apresenta absorção máxima a 695 nm. Esse ensaio é conhecido também como atividade antioxidante total. Outros métodos também são utilizados, tais como: Captura de óxido nítrico (NO), de radicais OH (hidroxila), poder redutor de íons ferro dentre outros. A Tabela 1 mostra diferentes resultados para as ligninas obtidas por diferentes fontes.

Tabela 2 - Atividade antioxidante promovida por diferentes ligninas em diferentes ensaios.

Lignina	Ensaio	Referências
Madeira de <i>acácia</i>	DPPH (IC <sub>50</sub> ) que variaram de 79,89± 0.07 a 149,96 ± 4,4 µg/mL.  Para o ensaio de ABTS obtiveram 2,70 ± 0,1 a 3.95 ± 0,13 µg/mL e por fim para AAT obtiveram valores entre (54,44 ± 3,8 a 342 ± 12,9 mmol/100 mg de amostra).	AADIL et al., (2014)
Espiga de milho	IC <sub>50</sub> de 260 µg/mL e 28 µg/mL nos ensaios DPPH e ABTS <sup>+</sup>	MICHELIN et al., (2018)
<i>Opuntia ficus-indica</i> e <i>Opuntia cochenillifera</i>	DPPH (12.0 ± 0.3%; 21.1 ± 0.1%), ABTS (26.8 ± 0.1%; 61.5 ± 0.9%), NO (4.7 ± 0.7%; 5.8 ± 0.2%) AAT (4.0 ± 0.0% 8,5 ± 0.0%),	CRUZ- FILHO et al., (2019)
<i>Conocarpus erectus</i>	DPPH (IC <sub>50</sub> = 231.16 µg/mL), ABTS (IC <sub>50</sub> =356.03 µg/mL) e AAT (17.92 ± 0.41%).	NASCIMENTO et al. (2020)

Fonte: Próprio autor

Legenda: Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; Radical do ácido ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfônico; TAA - Atividade antioxidante total: ensaio de redução de fosfomolibdênio; Óxido nítrico IC<sub>50</sub> (50% de capacidade de sequestro).

As diferentes atividades promovidas por essas moléculas estão relacionadas ao teor de compostos fenólicos presentes na estrutura química e a outros grupos como por exemplo as hidroxilas alifáticas e os grupos metoxilas que estabilizam o radicam fenoxila formados durante a eliminação de radicais livres. Além destes fatores como peso molecular, presença de carboidratos na estrutura (pureza) pode influenciar o potencial das ligninas como antioxidante. Sendo a estrutura química um ponto determinante na atividade biológica.

Desta forma, as ligninas se destacam no meio científico em decorrência de sua perspectiva no uso farmacêutico e biomédico, devido à sua biocompatibilidade, versatilidade, por ser biodegradável e por causa de sua natureza polifuncional (DOMÍNGUEZ-ROBLES et al., 2020). As ligninas apresentam potencialidade imunestimulante (NASCIMENTO SANTOS et al., 2020), anticâncer e antiviral (ALQAHTANI et al., 2019), antimicrobiana (MELO et al., 2020) e antioxidante (ARRUDA et al., 2021). E com relação as aplicações farmacêuticas podemos citar a sua utilização como veículos para distribuição controlada de medicamentos (CULEBRAS et al., 2021) e genes (TEN et al., 2014), como aditivo para produção de membranas cicatrizantes (DAI et al., 2021) e de membranas utilizadas no tratamento da osteoartrite (LIANG et al., 2020), loções de proteção solar (ARRUDA et al.,

2021), encapsulamento de fármacos de liberação controlada (ALQAHTANI et al., 2019), biossensores e hidrogéis cicatrizantes (SUGIARTO et al., 2021).

## 4 METODOLOGIA

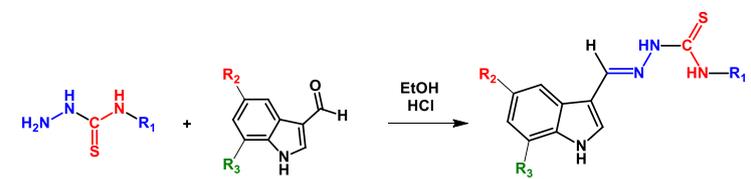
### 4.1 QUÍMICA

#### 4.1.1 Derivados Indólicos-tiossemicarbazônicos

Na primeira parte deste plano de trabalho estudaremos os derivados indólico-tiossemicarbazonas já previamente sintetizados e caracterizados por espectroscopia ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13, infravermelho e espectrometria de massas (Tabela 3).

Estes derivados foram obtidos em duas etapas. Na primeira etapa realizamos a síntese das tiossemicarbazidas a partir do ligante hidrazinil (hidrazina) com os isotiocianatos substituídos. Na segunda etapa as tiossemicarbazidas reagem com os indol-carboxaldeídos substituídos conduzindo as tiossecarbazona substituídas (LQIT/PRs).

Tabela 3 - Tempo e rendimento das reações dos compostos Indólicos-tiossemicarbazônicos.



Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Tempo (horas)	Rendimento (%)
LQIT/PR-01	Fenil	CH <sub>3</sub>	Br	4	94,64
LQIT/PR-02		Br	CH <sub>3</sub>		35,72
LQIT/PR-03	<i>p</i> -metóxi-fenil	CH <sub>3</sub>	Br	4	53,97
LQIT/PR-04		Br	CH <sub>3</sub>		71,31
LQIT/PR-05	<i>p</i> -metil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>	4	40,34
LQIT/PR-06		CH <sub>3</sub>	Br		32,09
LQIT/PR-07	Hidrogênio	Br	CH <sub>3</sub>	24	37,54
LQIT/PR-08		CH <sub>3</sub>	Br		39,08
LQIT/PR-09	<i>p</i> -etil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>	3	87,79
LQIT/PR-10		CH <sub>3</sub>	Br		59,17

Fonte: Próprio autor.

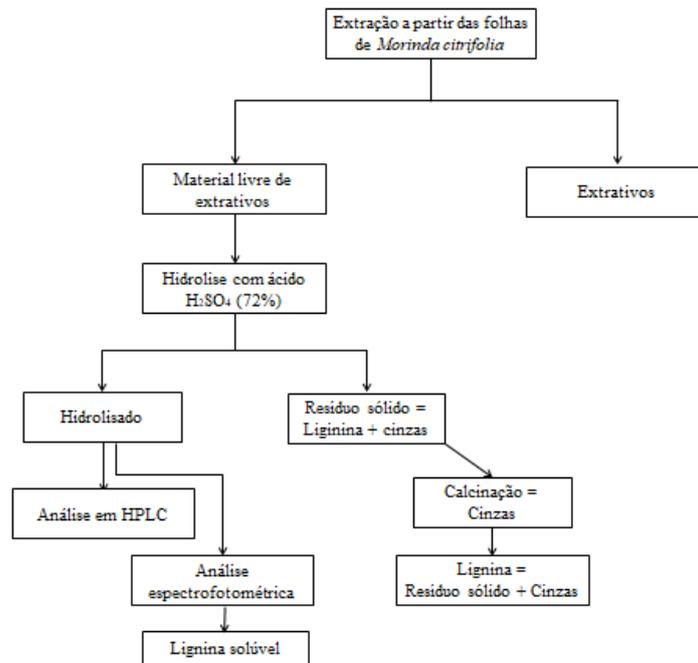
#### 4.1.2 Lignina isolada das folhas da *Morinda citrifolia*

As folhas de *Morinda citrifolia* foram coletadas no município de Cabo de Santo Agostinho - PE (8°29'86,07 "S e 35°06'45,29" W). A identificação foi realizada pela pesquisadora e curadora Dr<sup>a</sup> Marlene Barbosa e a exsicata depositada no Herbário Geraldo Mariz (UFPE), sob protocolo número 74.792.

#### 4.1.2.1 Análise composicional de folhas de *Morinda citrifolia*

A composição química (teores extrativos, cinzas, lignina, carboidrato não fibroso, celulose e hemicelulose) das folhas de *Morinda citrifolia* foi determinada pela metodologia descrita por Gouveia et al. (2009). O fluxograma descreve detalhadamente as etapas desde a extração das folhas com solvente orgânico até a obtenção da lignina de *Morinda citrifolia* (Figura 23).

Figura 23 - Fluxograma das etapas realizadas para a obtenção da lignina de *Morinda citrifolia*.



Fonte : próprio autor

As folhas de *Morinda citrifolia* (100 g) foram submetidas à metodologia de extração de acordo com Cruz-Filho et al. (2019). Inicialmente, foi realizada extração aquosa, nas proporções (g/L) 1:1, em um tanque agitado de 2 L, a 60°C e 1200 rpm, por 1 h. O sólido obtido na etapa de extração foi submetido a hidrólise ácida com 1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em autoclave a 121 °C por 1h, proporção 1:1 sólido: líquido (g / L). O hidrolisado ácido é separado por filtração e o sólido resultante do material foi então sujeito a deslignificação alcalina com NaOH a 1%, nas mesmas condições da hidrólise ácida. Após o final da reação, o licor preto contendo as ligninas foi separado do sólido resultante por filtração e logo após foi acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até pH 2 por 12hs para a precipitação das ligninas. Finalmente, as ligninas obtidas foram secas a 70°C por 48 h.

#### 4.1.2.2 Determinação do teor de grupos fenólicos presentes na lignina de *Morinda citrifolia*

Foi utilizado ácido gálico como padrão de referência. Este método envolve a redução do reagente pelos grupamentos fenólicos presentes nas amostras com formação de um complexo azul. Uma alíquota de 0.1 mL de lignina (dissolvida DMSO 10%) numa concentração de 500 µg/mL foi transferida para um tubo de ensaio de 10 mL e adicionado 3 mL de água destilada seguidos de 0.25 mL do reagente de Folin Ciocalteau. A reação ficou em repouso por 3 minutos para então ser acrescentado 2 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 7.5% (m/v). Um teste em branco foi conduzido nas mesmas condições, de modo que foi usado 0.1 mL de água destilada em substituição da amostra. A reação foi conduzida a 37 °C durante 30 minutos na ausência de luz. A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453) utilizando comprimento de onda de 765 nm. A quantificação de fenóis totais em triplicata foi expressa em mg EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de lignina.

## 4.2 BIOLÓGICA

### 4.2.1 Atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O radical DPPH é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Para o ensaio DPPH, 0.50 mL de lignina ou padrão (ácido ascórbico) com concentrações variáveis (0.0 a 1000 µg/mL) foram adicionados ao mesmo volume de solução metanólica de DPPH (60 µM). As amostras foram dissolvidas em DMSO 10% e o ácido ascórbico em água. Os sistemas foram agitados vigorosamente e incubados sem agitação durante 25 minutos com ausência de luz à temperatura ambiente. A absorvância foi determinada a 515 nm utilizando um espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453). A absorvância medida para a solução controle estava na faixa de 0.75 ± 0.01. O branco do equipamento foi o metanol. A porcentagem de redução da descoloração DPPH foi calculado usando a equação abaixo (Figura 24), onde através dos resultados obtidos foi possível determinar o IC<sub>50</sub> concentração onde se tem captura de 50% do radical DPPH.

Figura 24 – Equação de cálculo da porcentagem de redução da descoloração de DPPH.

$$DPPH(\%) = \left( \frac{A \text{ control} - M \text{ sample}}{A \text{ control}} \right) * 100\%$$

Fonte: Próprio autor

Legenda - A control - é a absorvância do controle; A amostra - é a absorvância da amostra.

#### **4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)**

O método de ABTS baseia-se em uma reação por transferência de elétrons, no qual avalia-se a capacidade antioxidante de capturar o cátion radical  $ABTS^+$ . A solução do radical  $ABTS^+$  foi produzida pela reação da solução aquosa ABTS (7 mM) com solução aquosa 2.45 mM de persulfato de potássio em quantidades iguais e permitiu que eles reagissem por 12 h em temperatura ambiente na ausência de temperatura. Em seguida, 1 mL da solução do radical foi misturada com 0.2 mL da amostra (dissolvida em DMSO 10%) ou padrão (ácido ascórbico) em diferentes concentrações (0.0 a 1000 $\mu$ g/mL). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por exatamente 10 min na ausência de luz. O controle foi preparado pela mistura de 1 mL de  $ABTS^+$  solução com 0.20 mL de água destilada e apresentou absorvância de  $0.7 \pm 0.01$ . Os resultados percentuais da atividade de eliminação foram calculados como% utilizando a Equação 1. Através dos resultados obtidos foi possível determinar o  $IC_{50}$  concentração onde se tem captura de 50% do radical  $ABTS^+$ .

#### **4.2.3 Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, J774 e células Vero**

Células de mamíferos ( $10^5$  células/ml) foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo em atmosfera de 5% de  $CO_2$  a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações, sendo novamente incubados durante 72h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 3h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorvância foi lida a 540nm. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade do fármaco de referência Anfotericina B. A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a  $CC_{50}$ .

#### **4.2.4 Produção de óxido nítrico**

A produção de óxido nítrico foi determinada através de um ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Griess (1% sulfanilamida/ 0.1% N-(1-naftil)-etilenediamina dihidroclorato/2.5%  $H_3PO_4$ ). O sobrenadante de macrófagos J774 não tratados e tratados com os compostos após 72 horas, foram submetidos ao reagente de Griess. A absorvância foi determinada a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A

concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. Cada teste foi feito em duplicata biológica e quadruplicata técnica. Macrófagos não tratados foram usados como controle.

#### 4.2.5 Atividade Leishmanicida

Os parasitos e linhagens celulares foram cedidos gentilmente pelo Prof. Luiz Carlos Alves do Departamento de Parasitologia do CPqAM/ FIOCRUZ.

##### 4.2.5.1 Atividade leishmanicida frente as formas promastigotas de *Leishmania*

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (Cepa MHOM/BR/70/BH46) e *L. amazonensis* (cepa WHOM/00LTB0016), foram mantidas em meio Schneider (Sigma) suplementado com 1% de estreptomicina e 20% de soro fetal bovino (SFB) respectivamente, cultivadas em estufa incubadora para BOD com temperatura de 26° C. As formas promastigotas foram utilizados em fase exponencial de crescimento em todas as fases do experimento.

Para o ensaio de atividade leishmanicida, formas promastigotas foram contadas e diluídas em meio Schneider's (Sigma/Merck) completo a  $2 \times 10^6$  células/mL. Os parasitos foram incubados a 26°C na presença de diferentes concentrações dos compostos por 72h. Parasitos incubados apenas com meio de cultura e com Anfotericina B foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Foi realizada também incubação com a mesma faixa de concentração de DMSO (0,01 a 1%) presente na diluição dos compostos. O crescimento celular foi avaliado e a  $IC_{50/72hs}$  foi determinada por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

##### 4.2.5.2 Atividade leishmanicida frente a formas amastigota de *L. infantum*

Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram coletados e semeados em placas de 24 poços, a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Após 3 horas cultivo, as culturas foram lavadas com meio RPMI-1640 e infectadas, por três horas com formas promastigotas infectivas, na concentração de  $2 \times 10^6$  promastigotas. Após a infecção, os macrófagos foram não tratados em diferentes concentrações. Após 24 horas de tratamento as placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem de 100 células em triplicata. A  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) foi determinada após 24 horas de

cultivo por análise de regressão linear. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por célula infectada. O índice de seletividade (SI) foi determinado como a razão entre  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$ .

#### 4.2.5.3 Análise ultraestrutural das formas promastigotas *L. infantum* e *L. amazonensis*

Formas promastigotas *L. infantum* e *L. amazonensis* controles e tratadas nas concentrações da  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$  dos compostos selecionados por 72 horas foram utilizadas na análise ultraestrutural.

Para microscopia eletrônica de varredura, promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina (Sigma®). Após 20 minutos as lamínulas foram lavadas no mesmo tampão para retirada das células não aderidas e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) em tampão cacodilato de sódio. Em seguida as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan), 42 cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tokyo, Japan) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan).

Para microscopia eletrônica de transmissão, os parasitos fixados foram lavados e pós-fixados por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM  $CaCl_2$  em tampão cacodilato de sódio. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em EPON (Sigma® Aldrich, St. Louis, USA). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de espessura, obtidos em ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica, Wetzlar, Germany), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI, Hillsboro, USA).

#### 4.2.6 Atividade anti- *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram coletados do sobrenadante de células Vero infectadas e distribuídos em uma placa de 96 poços para uma densidade final de  $4 \times 10^4$  células por poço em meio RPMI-1640. Cada composto foi adicionado aos poços em dez concentrações (0,19 a 100  $\mu g / mL$ ). Foram adicionados 20  $\mu L$  (5mg/mL) de MTT 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo tetrazol (Sigma-Aldrich) em todos os poços por 3 horas nas mesmas condições de cultivo conforme descrito por Mosmann (1983). O método

permite medir a atividade da desidrogenase mitocondrial, o potencial redox indicativo de atividade metabólica e, portanto, viabilidade, a qual gera cristais de formazam mensurados colorimetricamente. Após a reação, os parasitos serão centrifugados, a 1000 g, por 10 minutos e em seguida, o sobrenadante será descartado e o sedimento resuspenso em DMSO (Sigma-Merck) para completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial, resultando assim, em uma coloração. O ensaio foi feito duas vezes, em duplicata. O benzinidazol foi utilizado como fármaco de referência. A absorbância foi determinada em 570 nm em um leitor de ELISA (Molecular Devices), Sunnyvale, California (EUA). O percentual de parasitos viáveis (VB) será calculado através da seguinte fórmula equação representada abaixo (Figura 25).

Figura 25 – Equação para o cálculo do percentual de parasitos viáveis.

$$\% \text{ Viabilidade (VB)} = (\text{Absorbância do tratado} / \text{Absorbância do controle}) \times 100$$

Fonte: Próprio autor

#### 4.2.7 Avaliação da morte celular

Após a confirmação da atividade antiparasitária, a marcação com Anexina-FITC / Iodeto de Propídio foi usada para caracterizar as modalidades de morte celular induzidas pela incubação com compostos. Tripomastigotas de *T. cruzi* foram coletadas e, em seguida, semeadas a  $1 \times 10^5$  células / poço em meio de inseto de Schneider. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e adicionados aos poços nas concentrações  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ . Bezonidazol ( $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ ) e meio de cultura foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas nas mesmas condições utilizadas para a atividade anti-tripanosossoma ( $26^{\circ}C$ , 72h). Resumidamente, após o tratamento, os parasitas foram lavados com PBS e ressuspenso em tampão de ligação (Anexina V Binding Buffer- BD Pharmingen <sup>TM</sup>, EUA). Para marcação, foram adicionados 10  $\mu$ L de iodeto de propídio (50  $\mu$ g / mL) e 5  $\mu$ L de Anexina-FITC (BD Pharmingen <sup>TM</sup>, EUA) por 15 min, em temperatura ambiente, no escuro. A citometria de fluxo foi realizada em FACSCalibur (Becton & Dickinson, EUA). Para cada amostra adquirimos 20.000 eventos e os dados foram analisados usando o software Cell Quest (Becton & Dickinson, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicado. Para análise de significância foi utilizado ANOVA e teste de Dunnett, levando em consideração  $p < 0,05$ .

#### **4.2.8 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da  $CC_{50}$  e da  $IC_{50}$ . A análise para medir a variabilidade entre o grupo tratado foi o teste Wilcoxon e entre grupos tratado e controle foi o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% e todas as análises foram feitas no software GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos tiveram com metas a elucidação de um provável mecanismo de ação dos compostos estudados. Diferentes respostas foram obtidas para os derivados indólicos-tiossecarbazônicos como para lignina isolada das folhas da *Morinda citrifolia*.

### 5.1 DERIVADOS INDÓLICOS-TIOSSEMECARBAZÔNICOS

Os compostos indólicos-tiossemicarbazônicos em trabalho anterior, foram sintetizados, caracterizados e testados frente a formas promastigotas de *L. infantum*, esse último resultado é mostrados na tabela abaixo (SILVA, 2017) (Tabela 4). Os mesmos compostos no presente trabalho foram testados frente a formas promastigotas *L. amazonensis* e ensaios de citotoxicidade em macrófagos (Tabela 4). Baseado nos dados obtidos, foram selecionadas as melhores moléculas para a realização de estudos ultraestruturais e investigação um possível mecanismo de ação dos compostos indólicos-tiossemicarbazônicos (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida *in vitro* sobre promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona

Compostos	$\mu\text{M}$					R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
	IC <sub>50</sub> (a)	IC <sub>50</sub> (b)	CC <sub>50</sub>	IS (a)	IS (b)			
LQIT/PR-01	6.12	13.61	63.54	10.38	4.67	fenil	CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-02	5.60	46.63	100.65	17.97	2.16		Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-03	8.43	33.16	88.18	10.46	2.66	<i>p</i> -metóxi-fenil	CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-04	8.93	75.24	120.08	13.45	1.60		Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-05	23.35	134.38	118.31	5.07	0.88	<i>p</i> -metil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-06	11.46	19.58	135.25	11.80	6.91		CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-07	16.70	87.76	237.76	14.24	2.71	Hidrogênio	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-08	13.51	23.92	357.97	26.50	14.97		CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-09	4.36	12.31	53.23	12.21	4.32	<i>p</i> -etil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-10	11.97	>481.52	93.17	7.78	0.19		CH <sub>3</sub>	Br
Anfotericina B	0,05	37,60	29,26	585,2	0,78	----	----	----

Fonte: Próprio autor.

Legenda: IC<sub>50</sub> (a) – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*. IC<sub>50</sub> (b) – concentração que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*; CC<sub>50</sub> – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células de macrófagos; IS (Índice de seletividade) – CC<sub>50</sub> Macrófagos/IC<sub>50</sub> Promastigotas. IS (a) Índice de seletividade *L. infantum*. IS(b) Índice de seletividade *L. amazonensis*.

Na realização de estudos que busquem novos fármacos leishmanicidas é importante como critério de avaliação a baixa citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos e a eficácia ao parasito (BHARGAVA, SINGH, 2012). Em nosso estudo a análise de citotoxicidade utilizando macrófagos, foi possível observar uma variação citotóxica entre os compostos testados (53,23 a 357,97 $\mu\text{M}$ ). Os compostos LQIT/PR-07 e LQIT/PR-08 sem substituinte na posição N<sup>4</sup> da tiossemicarbazona foram menos citotóxicos, com valores de CC<sub>50</sub> de 237,76 $\mu\text{M}$  e 357,97 $\mu\text{M}$  respectivamente, esse valor de toxicidade baixo da molécula LQIT/PR-08 refletiu diretamente no índice de seletividade.

Na avaliação leishmanicida foi verificado a eficácia dos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Todos os compostos da série LQIT/PRs, testados foram capazes de inibir as formas promastigotas,

com valores de  $IC_{50}$  /72 horas que variam de 4,36 a 23,35  $\mu\text{M}$  quando testados frente a *L. infantum* e 12,31 a  $>481,52 \mu\text{M}$  quando testados para *L. amazonensis* (Tabela 4).

Analisando os dados obtidos as moléculas LIQT/PR02 e LIQT/PR09, obtiveram os melhores resultados de  $IC_{50}$  frente a formas promastigotas de *L. infantum*, apresentando valores 5.60  $\mu\text{M}$  e 4.36  $\mu\text{M}$  respectivamente, e na avaliação do índice de seletividades (IS) respectivamente 17,97 e 12,21. Entre todos os derivados testados frente a *L. amazonensis*, o LQIT/PR-01 e LQIT/PR-09, apresentaram maior atividade leishmanicida, com valores de  $IC_{50}$  de 13,61 $\mu\text{M}$  e 12,31  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 4). Na avaliação do índice de seletividade, estes compostos apresentaram-se mais seletivos ao parasito do que as células de mamíferos, com valores de IS de 4,67 e 4,32 respectivamente (Tabela 4). Os compostos em destaque possuem IS melhores do que o fármaco utilizado como padrão, pois a Anfotericina B apresentou IS de 0,78 no teste realizado frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os derivados indólicos-tiossemicarbazônicos apresentam em sua constituição o grupo indólico o qual tem atraído atenção entre a comunidade científica devido aos seus usos terapêuticos (KAUCHIK et al. 2013), alguns compostos naturais e sintéticos contendo o indol foram utilizados em testes e apresentaram ação antitumoral (OLIVEIRA et al., 2015), antiviral (ZHANG et al., 2015), antimicrobiano (AL-QAWASMEH et al, 2010), antileishmanicida (PANDEY et al., 2016). Dessa forma, atividade leishmanicida encontrada em todas as moléculas do presente estudo pode está associada a presença do grupo indólico, já que o derivado LQIT/PR-08 sem sibustituíntes apresentou o melhor resultado de IS da série quando testado frente as duas cepas de Leishmania.

As moléculas testadas tem em sua constituição duas diferenças principais, substituições na porção N4 da tiossemicarbazona, e um grupo indol dissubstituído com 5- $\text{CH}_3$ / 7-Br e 5-Br/7 $\text{CH}_3$ . O composto LQIT/PR-01 apresentou valor de  $IC_{50}$  significativo para as duas cepas de Leishmania testadas, o composto possui o Br na posição 7 do indol (7-Br). A literatura mostra que a presença de halogênios nas moléculas aumentam a permeabilidade da membrana plasmática e, portanto, possibilita a entrada do fármaco na célula, o que justifica a maior atividade de compostos com esses grupamentos (HERNANDES et al., 2010b). No entanto, neste estudo o posicionamento do bromo ligado ao indol, não repercutiram diretamente na atividade leishmanicida do presente trabalho visto que a molécula LQIT/PR-09, que também apresentou um dos melhores resultados de  $IC_{50}$  para as duas cepas de Leishmania testadas, tem posição do bromo no núcleo indólico de 5-Br. Portanto, a presença de porções aromáticas, substituíntes no grupo indol e a presença de halogênios nas moléculas

em geral mostram uma melhoria na atividade biológica das moléculas frente a tripanossomatídeos (MANZANO et al., 2016; YI WEI et al., DA SILVA et al, 2017; 2011; TEMRAZ et al., 2018; LINCIANO et al., 2018).

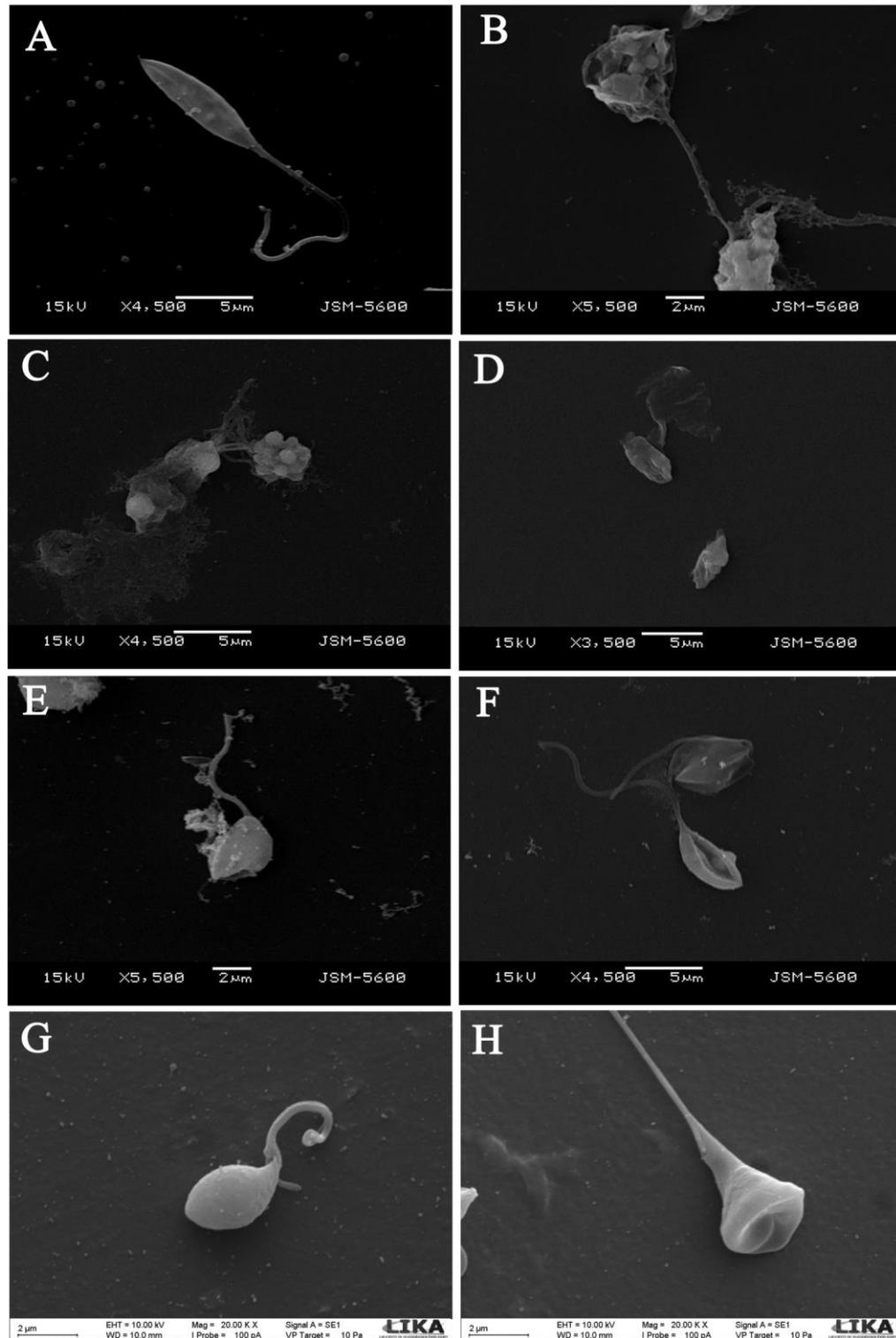
Substituintes na porção N4 da tiossemicarbazona é outra diferença presente nos derivados, são eles o grupamento fenil, metil-fenil, metóxi-fenil, etil-fenil e sem substituição. Dentre estes, os compostos LQIT/PR-01, LQIT/PR-02 com substituintes fenil e LQIT/PR-09, com substituintes etil-fenil, apresentaram a melhor atividade, podendo-se inferir que a ação também esteja relacionada a substituições nessa posição.

A substituição com o fenil na porção N4 de tiossemicarbazonas foi descrito na literatura e demonstrou resultados expressivos frente a formas tripomastigotas de *T. brucei* (GLINMA et al, 2014), com relação ao grupamento etil-fenil SAAD et al. (2016) observou atividade moderada de compostos que apresentam esse substituinte.

Apesar do composto sem substituição LQIT/PR-08 ter apresentado o melhor IS da série, sendo 26,50 para *L.infantum* 14,97 para *L. amazonensis*, estudos mostram que tiossemicarbazonas não substituídas na porção N<sup>4</sup> possuem resultados não satisfatórios de IC<sub>50</sub> elevando o IS (DE MELOS et al., 2015), fortalecendo assim a atuação do indol no desempenho do LQIT/PR-08. Estes resultados da literatura corroboram com os achados no presente estudo, onde os compostos testados também apresentaram atividade leishmanicida, podendo está relacionada a presença substituições na porção N<sup>4</sup> da molécula.

Baseado nas análises descritas acima, foram selecionados os compostos para análise ultraestrutural para elucidar possíveis mecanismos de ação. Nos compostos testados frente a formas promastigotas *L.infantum* foram selecionados LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09, frente as formas promastigotas *L. amazonensis* foram selecionados os compostos LQIT/PR-01 e LQIT/PR-09. O composto LQIT/PR-04 foi capaz de inibir as duas formas de *Leishmania*, porém não apresentou resultado significativo quando comparado com os melhores resultados, entretanto esse composto foi selecionado para análise ultraestrutural em ambas as espécies, afim de analisarmos possíveis mecanismos de ação.

Figura 26: - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de *L. infantum*.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Formas promastigotas de *L. infantum*. (A)-Promastigotas não tratadas. (B)- Promastigotas submetidas ao tratamento com 0,05 μM de Anfotericina B. (C) Promastigotas submetidas ao tratamento com 5,6 μM do composto LQIT/PR-02. (D) promastigotas submetidas a 11,2 μM do composto LQIT/PR-02. (E) Promastigotas

submetidas 4,36  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (F) Promastigotas submetidas 8,72  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (G) Promastigotas submetidas 8,93  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04. (H) Promastigotas submetidas 17,86  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04.

Na análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) observou-se que as promastigotas de *L. infantum* não tratadas exibiram uma morfologia fusiforme típica do parasito, além de uma superfície corporal topologicamente normal e um flagelo longo e livre (Figura 26 A). Já as promastigotas submetidas ao tratamento com anfotericina B, a 0,05  $\mu\text{M}$ , apresentaram alterações ultraestruturais, como encolhimento do corpo celular, aparecimento de ondulações na membrana e desintegração celular (Figura 26 B).

As promastigotas de *L. infantum* tratados com o composto indólicos-tiossemicarbazônicos LQIT/PR-02, nas concentrações testadas, 5,6  $\mu\text{M}$  e 11,2  $\mu\text{M}$ , alteraram a superfície do parasito. Pode-se observar algumas alterações morfológicas, tais como retração do corpo celular, o que modificou seu formato fusiforme para ovóide (Figura 26 D). Além disso, surgiram ondulações e desintegração na membrana do parasito (Figura 26 C), também foi observado retração e perda do flagelo (Figura 26 D). Estas alterações também foram observadas nas promastigotas submetidas ao tratamento com anfotericina B a 0,05  $\mu\text{M}$ .

O composto LQIT/PR-09 também foi capaz de causar alterações em promastigotas de *L. infantum* em ambas as concentrações testadas, 4,36  $\mu\text{M}$  e 8,72  $\mu\text{M}$  as alterações foram similares as descritas após tratamento com Anfotericina B e o LQIT/PR-02. Quando submetidos a 4,36  $\mu\text{M}$ , observou-se alterações na forma e tamanho da promastigotas, exibindo encolhimento pronunciado do corpo celular e retração do flagelar (Figura 26 E), presença de vários sulcos na superfície externa do protozoário também foi visualizado (Figura 26 F), os sulcos também foram observados na concentração de 8,72  $\mu\text{M}$ . (Figura 26 F), além de alteração na morfologia celular e divisão celular atípica.

O composto LQIT/PR-04 apesar de não ter um resultado significativo como as outras moléculas descritas acima, também foi capaz de promover alterações estruturais no corpo celular e flagelo. Promastigotas tratados na concentrações 8,93  $\mu\text{M}$  do composto apresentaram encurtamento do flagelo (Figura 26 G), em ambas concentrações 8,93  $\mu\text{M}$  e 17,86  $\mu\text{M}$  o composto foi capaz de modificar a forma o corpo celular para uma forma ovoide (Figura 26 G-H).

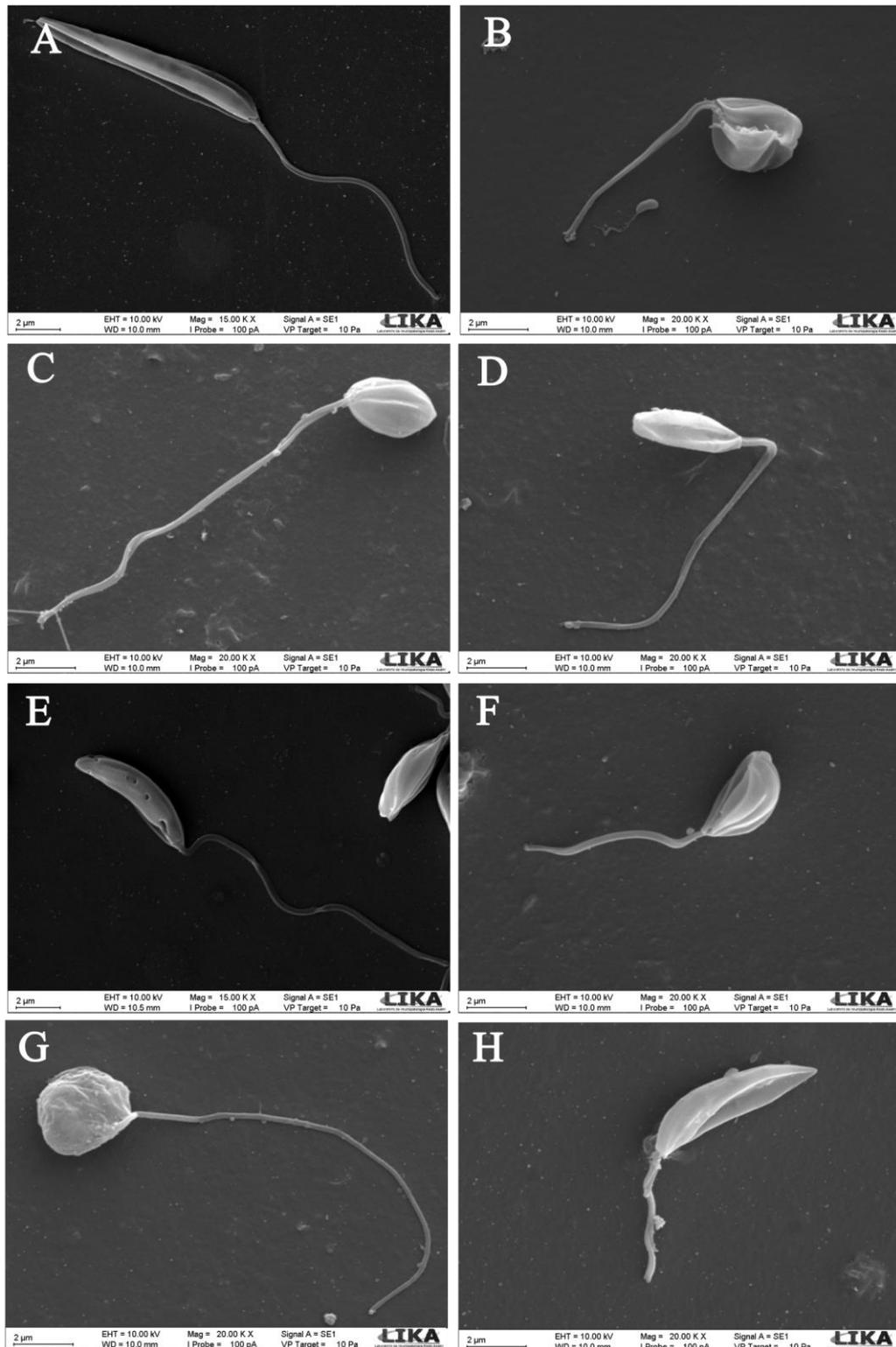
Analisando a microscopia eletrônica de varredura da *L. amazonensis* observamos promastigotas de não tratadas apresentaram estrutura celular típica, com flagelo longo e livre

e corpo celular fusiforme (Figura 27 A). Promastigotas tratados com 37,60  $\mu\text{M}$  do fármaco padrão apresentaram alterações na estrutura corporal (Figura 27 B), diminuição do flagelo, diminuição do corpo celular, assumindo uma forma arredondada.

O composto LQIT/ PR-01 promoveu alterações no corpo celular das formas promastigotas, apresentando forma ovoide em ambas concentrações 13,61  $\mu\text{M}$  e 27,22  $\mu\text{M}$  (Figura 27 C-D). O composto LQIT/PR-09 foi capaz de causar alterações no corpo celular do parasito, podemos observa na Figura 27-E, que a concentração de 12,31  $\mu\text{M}$  promoveu perfurações na membrana. Promastigotas tratados com 24,62  $\mu\text{M}$  do LQIT/PR-09 desenvolveram corpo celular no formato ovoide e encurtamento do flagelo (Figura 27 F).

O composto LQIT/PR-04 apresentou alterações estruturais semelhantes as dos compostos LQIT/PR01 e LQIT/PR-09 e também como a Anfotericina B, mesmo esse composto apresentando valor de  $\text{IC}_{50}$  acima dos compostos acima citados. Promastigotas tratados apresentaram forma celular ovoide, apresentou também enrugamento da membrana celular (Figura 27 G), na concentração de 150,48  $\mu\text{M}$  observou-se o encurtamento do flagelo e a formação de sulcos no corpo celular (Figura 27 H).

Figura 27 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Formas promastigotas de *L. amazonensis*. (A)-Promastigotas não tratadas. (B)- Promastigotas submetidas ao tratamento com 37,60 μM de Anfotericina B. (C) Promastigotas submetidas ao tratamento com 13,61 μM do composto LQIT/PR-01. (D) promastigotas submetidas a 27,22 μM do composto LQIT/PR-01. (E)

Promastigotas submetidas 12,31  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (F) Promastigotas submetidas 24,62  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (G) Promastigotas submetidas 75,24  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04. (H) Promastigotas submetidas 150,48  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04.

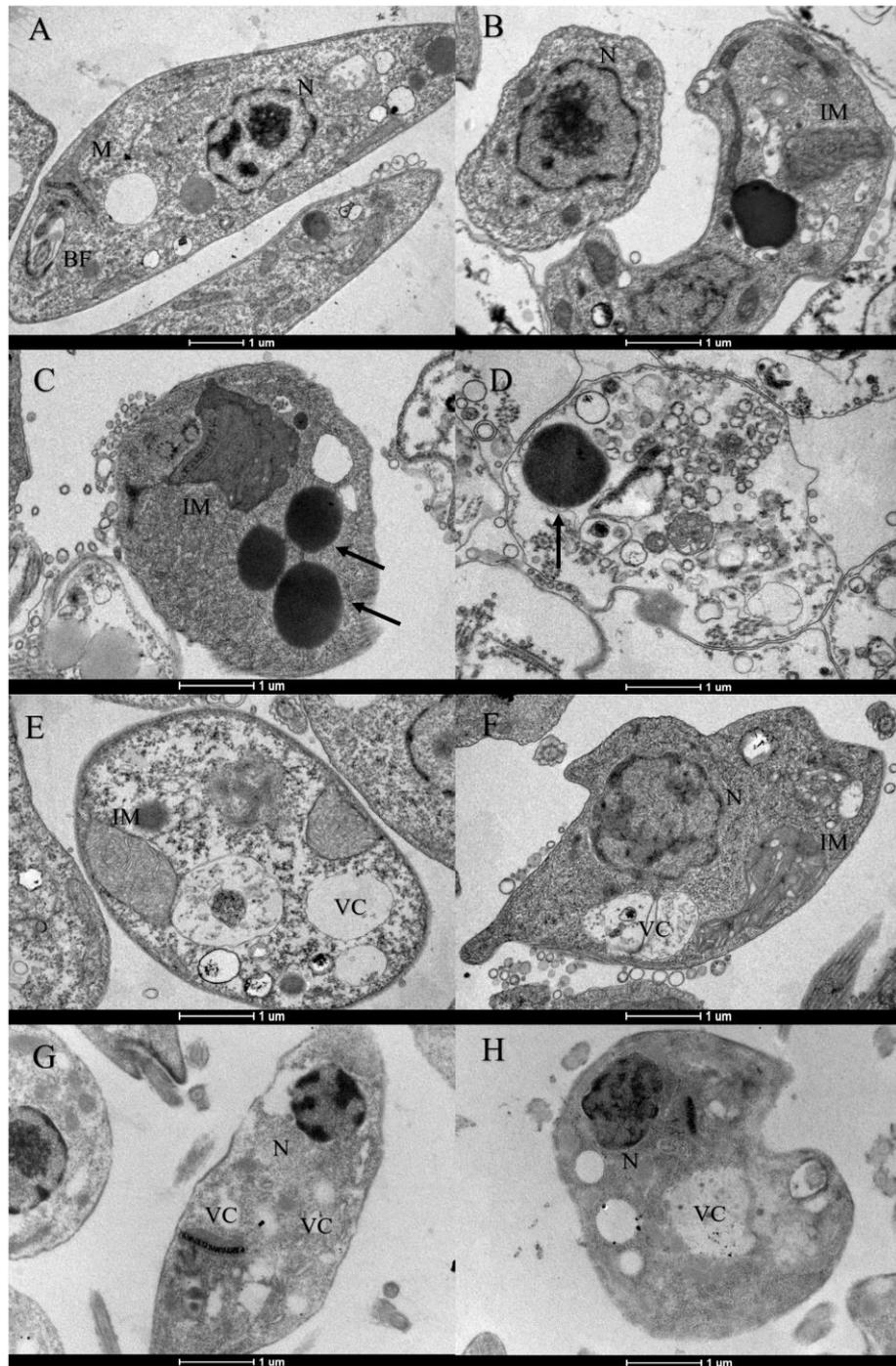
Nas análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) observou-se que, no grupo não tratado, as promastigotas de *L. infantum* apresentaram forma e a morfologia celular normais, com a mitocôndria, núcleo, bolsa flagelar e Flagelo bem preservados (Figura 28 A-C). Nas células tratadas com a Anfotericina B, a 0,05  $\mu\text{M}$ , houve a presença de inchaço mitocondrial, intensa vacuolização do citoplasma, presença de partículas eletrodensas e aumento da condensação da cromatina (Figura 28 D-F).

Quando submetidas ao tratamento com o composto LQIT/PR-02 na concentração de 5,6  $\mu\text{M}$  (Figura 28 C), as promastigotas de *L. infantum* apresentaram alterações semelhantes as causadas pela Anfotericina B a 0,05  $\mu\text{M}$ . Observou-se intensa vacuolização do citoplasma, presença de partículas eletrodensas, intenso inchaço mitocondrial e desorganização do cinetoplasto. Quando submetidas ao tratamento na concentração de 11,2  $\mu\text{M}$ , observou-se partículas eletrodensas, desorganização citoplasmática generalizada e a presença de restos celulares (Figura 28 D-F).

O composto LQIT/PR-09 em ambas as concentrações testadas, 4,36  $\mu\text{M}$  e 8,72  $\mu\text{M}$ , apresentaram alterações no citoplasma celular. Inchaço mitocondrial severo, com diminuição na eletrondensidade da matriz e aparência de estruturas membranares concêntricas dentro da organela. No citoplasma pode-se observar intensa vacuolização (Figura 28 E-F). Na menor concentração testada foi observado a presença de vacúolos autofágicos (Figura X E) e na maior concentração observou-se aumento na condensação da cromatina, observando-se uma marginalização.

No composto LQIT/PR-04 nas duas concentrações testadas, 8,93  $\mu\text{M}$  e 17,86  $\mu\text{M}$  foram capaz de promover intensa vacuolização no citoplasma do parasito (Figura 28 G-H), observamos também a marginalização da cromatina e um discreto inchaço mitocondrial na menor concentração testada.

Figura 28 – Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de *L. infantum*.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A)-Promastigotas não tratados, apresentando forma, morfologia e organelas celulares normais. (B)- Promastigotas tratados com Anfotericina B, 0,05 $\mu$ M, apresentando alterações celulares. (C) Promastigotas submetidas ao tratamento com 5,6  $\mu$ M do composto LQIT/PR-02. (D) promastigotas submetidas a 11,2  $\mu$ M do composto LQIT/PR-02. (E)- Promastigotas submetidas 4,36  $\mu$ M do composto LQIT/PR-09. (F) Promastigotas submetidas 8,72  $\mu$ M do composto LQIT/PR-09. (G) Promastigotas submetidas 8,93  $\mu$ M do composto LQIT/PR-

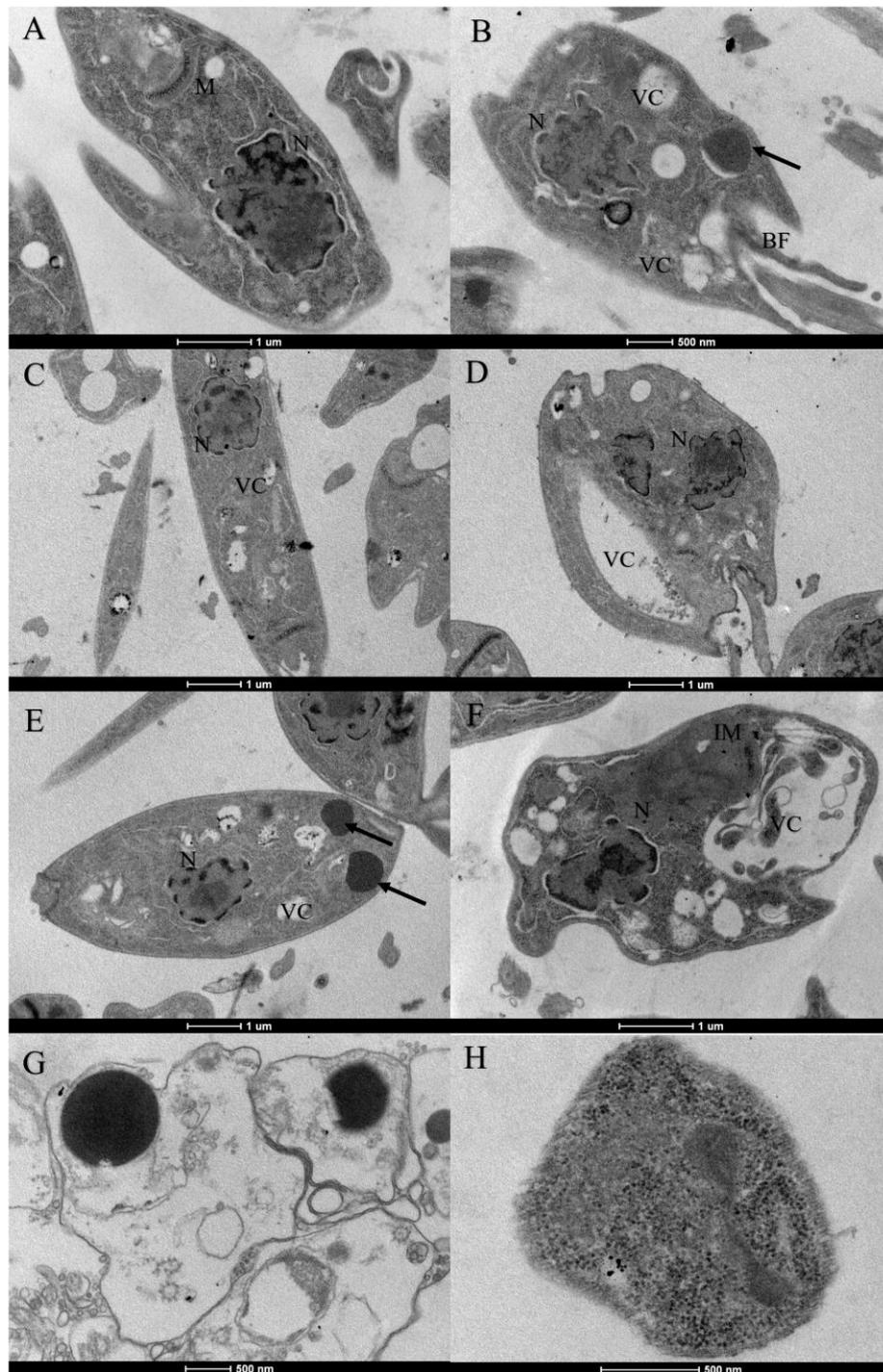
04. (H) Promastigotas submetidas 17,86  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04.VC- Vacuolização do citoplasma, IM- inchaço mitocondrial, seta preta - partículas eletrodensas. BF - bolsa flagelar, M - mitocôndria, N - núcleo e F- flagelo.

A análise de MET observamos promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas apresentaram morfologia normal com mitocôndria e núcleo bem preservados (Figura 29 A). Promastigotas tratados com 37,60  $\mu\text{M}$  de Anfotericina B, apresentaram alterações estruturais como intensa vacuolização, presença de partículas eletrodensas e desestruturação da bolsa flagelar (Figura 29 B). Promastigotas tratadas com o composto LQIT/PR-01 nas concentrações de 13,61  $\mu\text{M}$  e 27,22  $\mu\text{M}$  promoveram assim como a Anfotericina B intensa vacuolização.

O composto LQIT/PR-09 nas concentrações de 12,31  $\mu\text{M}$  e 24,62  $\mu\text{M}$  provocaram intensa vacuolização no citoplasma (Figura 29 E-F), na menor concentração testada o composto também provocou o aparecimento de partículas eletrodensas. Na concentração de 24,62  $\mu\text{M}$  observamos o inchaço mitocondrial (Figura 29 F). O composto LQIT/PR-04, apesar de não apresentar um resultado expressivo de  $\text{IC}_{50}$ , quando comparado com as melhores moléculas, analisando a MET observamos total desestruturação das células em ambas concentrações 75,24  $\mu\text{M}$  e 150,48  $\mu\text{M}$  (Figura 29 G-H).

Os derivados LQIT/PR-02, LQIT/PR-04 e LIQT/PR09 exerceram atividade leishmanicida afetando a mitocôndria do parasito, alterações que podem ser observadas através da MET. Os tripanossomatídeos são caracterizados por possuir mitocôndria única e ramificada ao longo do corpo, nela encontra-se uma região conhecida como cinetoplasto que possui 30% do material de DNA do protozoário conhecido como k-DNA (SOUZA, 2008; MEYER, MUSACCHIO, MENDONÇA, 1958), portanto o bom funcionamento dessa organela é importante para célula produzindo ATP, e a alteração da mesma pode levar a célula a morte, assim a mitocôndria é um importante alvo a ser explorado por drogas sintéticas (MESQUITA, et al., 2013; FERREIRA, et al., 2011).

Figura 29 – Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis*



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Formas promastigotas de *L. amazonensis*. (A)-Promastigotas não tratadas, apresentando morfologia normal. (B)- Promastigotas submetidas ao tratamento com 37,60  $\mu\text{M}$  de Anfotericina B. (C) Promastigotas submetidas ao tratamento com 13,61  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-01. (D) promastigotas submetidas a 27,22  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-01. (E) Promastigotas submetidas 12,31  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (F) Promastigotas submetidas 24,62  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-09. (G) Promastigotas submetidas 75,24  $\mu\text{M}$  do

composto LQIT/PR-04. (H) Promastigotas submetidas 150,48  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-04. VC- Vacuolização do citoplasma, IM- inchaço mitocondrial, seta preta - partículas eletrodensas. M - mitocôndria, N - núcleo e F- flagelo.

Savoia et al. (2006) relatou que a atividade de um peptídeo sintético causou em *L. infantum* e *L. amazonensis* intenso inchaço mitocondrial, como demonstrado pelas moléculas desse estudo. Ferreira et al. (2011) relataram que derivados de piperina e fenilamida induziu a morte de promastigotas de *L. amazonensis* afetando diretamente a fisiologia mitocondrial. Derivados de benzofenona apresentam atividade frente à promastigotas da *L. donovani*, causando alterações na morfologia da mitocôndria e uma diminuição do potencial eletroquímico mitocondrial (LUQUE- ORTEGA et al., 2010). Baseados no intenso inchaço mitocondrial que os derivados indólicos-tiossemicarbazônicos apresentaram e nos dados da literatura, podemos inferir assim que a mitocôndria do parasito pode ser um alvo potencial para os compostos sintetizados.

Os derivados LQIT/PR-01, LQIT/PR-02, LQIT/PR-04 LIQT/PR09 também induziram intensa vacualização e a presença de material eletrodense. Na literatura formas promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com derivados triazolopirimidina causaram alterações idênticas aos compostos LQIT/PRs (RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012). De Mello et al. (2015) analisaram derivados chalconas frente a *L. braziliensis* e esses compostos provocaram além de intensa vacuolização, completa desorganização do citoplasma, como ocorreu nesse estudo na concentração de 11,2  $\mu\text{M}$  do composto LQIT/PR-02 e LQIT/PR-04. Derivados de fenetilamina testados para *L. infantum* apresentaram também presença de partículas eletrodensas e vacuolização e sugeriu que a presença de tais alterações estão ligadas a morte celular (BRASIL et al., 2016). Corroborando estudo de Kaczanowski et al., 2011 com células eucarióticas descreve que alterações na morfologia celular como vacuolização do citoplasma é uma característica de morte celular.

As leishmania spp. Apresentam núcleo único envolto por uma membrana com cromatina condensada e dispersa pelo nucleoplasma. O composto LQIT/PR-09 foi capaz na concentração de 8,72  $\mu\text{M}$  de causar danos no núcleo aumentando a condensação da cromatina provocando uma marginalização da mesma. Essas alterações foram semelhantes a encontradas em *L. amazonensis* tratadas com alquilfosfocolina-dinitroanilina (GODINHO et al., 2013), estudos de Mesquita et al. (2013) e Marín et al. (2015), também mostraram condensação anormal da cromatina, sugerindo assim que os compostos da literatura e o composto

LQIT/PR-09 provocou alterações graves na morfologia, alterando seriamente a viabilidade do parasito.

Formas amastigotas são responsáveis pela forma clínica da leishmaniose, dessa forma no presente trabalho foram selecionados os compostos LQIT/PR-02, LQIT/PR-04 e LQIT/PR-09, para serem testados frente a formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Os resultados apresentados após 24 horas, mostram que os três compostos foram capazes de diminuir a carga parasitária (Tabela 5) dentro dos macrófagos, o composto LQIT/PR-09 destacou-se por apresentar IC<sub>50</sub> 14,34 µM, o menor valor entre as moléculas testadas. Os compostos foram capazes de diminuir o índice de sobrevivência das *L. infantum* em quase 90% das concentrações testadas, com resultado semelhante ao da Anfotericina B ( Figura 30).

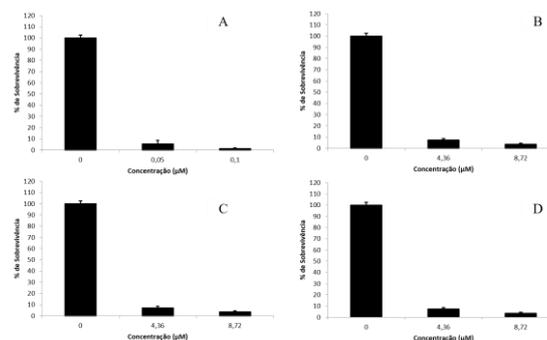
Tabela 5 - Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida *in vitro* sobre amastigotas intracelulares de *L. infantum* e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona.

Compostos	IC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	IS	Substituições		
LQIT/PR-02	14,34	100.65	7,02	fenil	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-04	25,10	120.08	4,78		Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-09	10,50	53.23	5,07	<i>p</i> -etil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>
Anfotericina B	0,44	29,26	66,5	----	----	----

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Legenda: IC<sub>50</sub> (a) – concentração que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*. CC50 – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células de macrófagos; IS (Índice de seletividade) – CC50 Macrófagos/IC50 Amastigotas intracelulares.

Figura 30 - Índice de sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos após tratamento com compostos e fármaco padrão.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A)- Índice de sobrevivência Anfotericina B; (B) Índice de sobrevivência LQIT/PR-02; (C) Índice de sobrevivência LQIT/PR-04 e (D) Índice de sobrevivência LQIT/PR-09.

Observamos que os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos testados em formas amastigotas intracelulares, foram mais elevados do que as encontradas para promastigotas, esse aumento pode ser explicado, pois os compostos necessitam entrar na célula hospedeira, para posteriormente chegar no seu alvo (DE MUYLDER et al., 2011). Observamos que os índices de sobrevivência do parasito são dependentes da concentração, assim como o do fármaco padrão, tais resultados são observados na literatura com derivado de tiossemicarbazona testado também frente a formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*, onde quanto maior a dose do composto testado, menor o índice de sobrevivência (QUEIROZ et al., 2020).

Em corroboração com os nossos resultados derivados tiazólicos testados foram capazes de reduzir a taxa de sobrevivência *L. infantum*, ressaltando que a presença de um grupo metil na molécula aumenta a atividade leishmanicida (OLIVERA et al., 2020). A presença do metil na molécula em geral melhora a lipossolubilidade do fármaco aumentando a atividade biológica do composto (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2014; ZELISKO et al., 2012).

Os compostos indólicos-tiossemicarbazônicos apresentando bons resultados frente a *L. infantum* e *L. amazonensis*, eles foram testados frente a formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (Tabela 6), pois esse protozoário pertence a mesma família e possuem estrutura semelhante ao gênero *Leishmania*. Primeiramente os derivados foram testados em trabalho anterior frente a células Vero (SILVA, 2017), obtendo variação de valores de CC<sub>50</sub> entre 59,9 a 17,06 µM.

Tabela 6 - Análise do potencial citotóxico, atividade leishmanicida *in vitro* sobre promastigotas de Tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e índice de seletividade de derivados indol-tiossemicarbazona.

Compostos	µM					R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
	CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (T)	IC <sub>50</sub> (A)	IS (T)	IS (A)			
LQIT/PR-01	18,84	5,98	16,40	3,15	1,15	fenil	CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-02	27,52	13,44	8,32	2,05	3,31		Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-03	27,86	19,60	15,39	1,42	1,81	<i>p</i> -metóxi-fenil	CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-04	21,44	3,93	12,45	5,46	1,72		Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-05	59,9	8,63	5,34	6,94	11,22	<i>p</i> -metil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>

LQIT/PR-06	26,04	1,24	9,64	21,06	2,70		CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-07	31,42	10,36	4,13	3,03	7,61	Hidrogênio	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-08	46,38	6,19	13,27	7,49	3,49		CH <sub>3</sub>	Br
LQIT/PR-09	17,33	2,14	6,72	8,10	2,58	<i>p</i> -etil-fenil	Br	CH <sub>3</sub>
LQIT/PR-10	17,06	9,48	9,57	1,80	1,78		CH <sub>3</sub>	Br
BZD	----	40,96	26,55	---	---	---	----	----

Fonte: Próprio autor.

Legenda: CC<sub>50</sub> – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% das células de Vero. IC<sub>50</sub> (T) – concentração que inibe 50% do crescimento das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. IC<sub>50</sub> (A) – concentração que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas de *T. cruzi*; IS (T) (Índice de seletividade) – CC<sub>50</sub> Vero/IC<sub>50</sub> Tripomastigota. IS (A) – CC<sub>50</sub> Vero/IC<sub>50</sub> Amastigota. BZD- benzonidazol.

Ao analisar a ação dos derivados frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, observamos que os menores valores de IC<sub>50</sub> foram 1,24 µM e 2,14 µM, referentes aos compostos LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09, respectivamente. Os demais compostos apresentaram resultados significativos de IC<sub>50</sub> com valores de 3,93 a 19,60 µM. O resultado de IC<sub>50</sub> das formas amastigotas de *T. cruzi* mostram que todas as moléculas foram capazes de inibir o crescimento, com 4,13 µM o LQIT/PR-07 obteve o menor valor de IC<sub>50</sub> e 16,40 µM o LQIT/PR-01 obteve o maior valor de IC<sub>50</sub>. As melhores moléculas LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 testadas frente a formas tripomastigotas, apresentaram resultado significativo quando testadas em amastigotas com resultados de IC<sub>50</sub> de respectivamente 9,64 e 6,72 µM. Ressaltamos também que a atuação de todos os compostos frente as duas formas *T. cruzi* testadas, tiveram melhores resultados do que o teste com o fármaco padrão que apresentou para tripomastigota valor de IC<sub>50</sub> de 40,96 µM e para amastigota valor de 26,55 µM.

Trabalhos na literatura mostram que tiossemicarbazonas tem atividade anti *T. cruzi* (SALSI et al., 2018; DA SILVA SANTOS et al., 2017), estudos de BLAU et al. (2013) testando derivados de tiossemicarbazonas frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, observaram que esses derivados causam estresse oxidativo nos parasitos ao se ligarem a enzima cruzaina. Derivados de tiossemicarbazona em trabalhos na literatura testados frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, substituídos na posição N4 com fenil substituído apresentam uma melhora na atividade (CAPUTTO et al., 2011), assim como os compostos que apresentaram os melhores IC<sub>50</sub> do presente trabalho LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09.

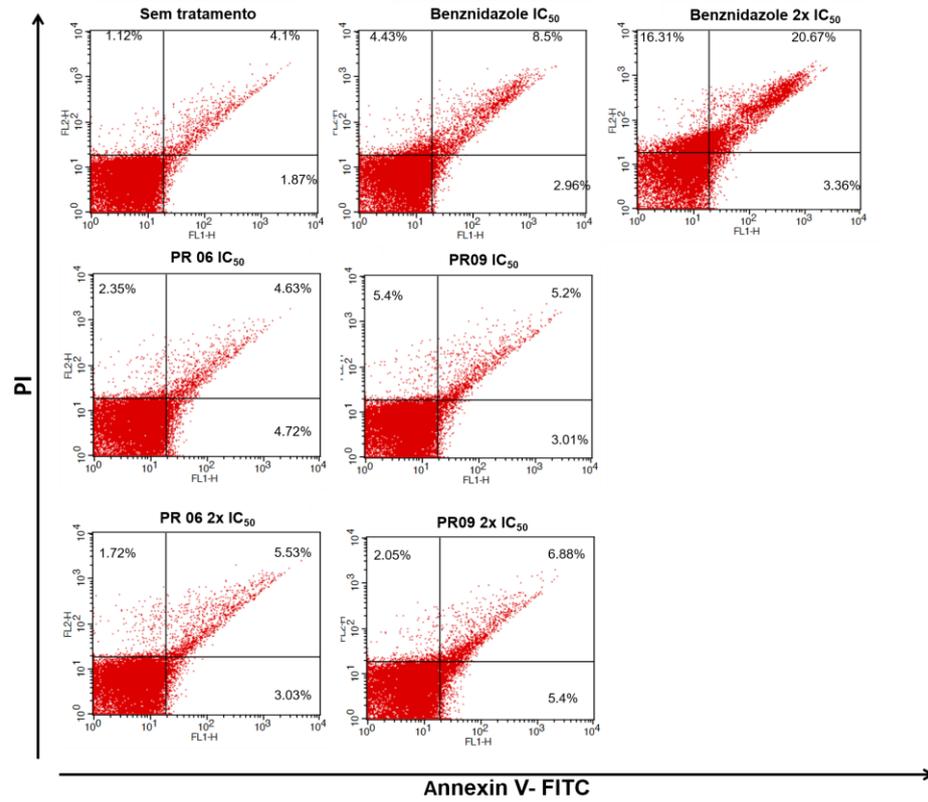
Moléculas que possuem uma porção indol em sua estrutura química também são potentes agentes tripanocidas (KOOVITS et al., 2020). Ressaltamos que no presente trabalho

as posições das substituições na porção indol, não influenciaram diretamente na ação do composto, porém sabemos que a presença de halogênios, como o Bromo na nossa molécula, atuando como substituintes são importantes para aumento da atividade, estudos de Hernandez et al. (2010a), com derivados de tiazolil-hidrazona frente a *T. cruzi*, revelou que a presença de halogênios como substituintes nas moléculas aumenta a interação entre o receptor e o fármaco. Outro substituinte presente na porção indol dos derivados estudados é o metil, que independentemente da posição 5-CH<sub>3</sub>/7-CH<sub>3</sub> proporciona aumento da atividade tripanocida como retratado na literatura (OLIVERA et al., 2020; DA SILVA et al., 2017).

Tiossemicarbazonas apresentaram ação frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi* em estudos de MORAES-GOMES et al. (2020), onde os compostos apresentaram IC<sub>50</sub> com valores de 3,60 a 94,41µM, sendo os resultados para a mesma forma nesse presente estudo com valores de IC<sub>50</sub> melhores, mostrando assim a influência do grupo indol na melhora da atividade da molécula. A análise ultraestrutural de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com tiossemicarbazonas, mostram que esse composto é capaz de causar danos na mitocôndria, vacuolização do citoplasma (CARVALHO, MELO; 2018). A ação de thiossemicarbazonas frente a formas amastigotas de *T. cruzi*, também é relatado na literatura, com redução no número de células hospedeiras humanas infectadas (SOARES et al., 2011).

Os compostos LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 apresentaram os melhores resultados de IC<sub>50</sub> quando testados frente a formas tripomastigotas, por esse motivo os mesmos foram selecionados para testes de análise de citometria de fluxo, afim de avaliar o perfil de morte dos parasitos, os compostos e fármacos padrões foram comparados ao controle não tratado e para análise de significância foi considerado p <0,05 (Figura 31).

Figura 31 – Análise do perfil de morte celular de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com compostos indólicos-tiossemicarbazonicos e controles.



Fonte: Próprio autor

O LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 foram capazes de induzir uma marcação compatível a morte por necrose, porém não foi tão significativa como o fármaco padrão o benzonidazol (Figura 31). Derivado de tiazóis, também foram capazes de causar morte por necrose como os derivados testados no presente trabalho e o fármaco padrão (FREITAS et al., 2021). Derivados de 1,3-tiazol também apresentaram resultados de morte celular por necrose (HAROON et al., 2021), inferimos assim que os compostos testados tem mais efeito na membrana do que no citoplasma e núcleo célula (DA SILVA et al., 2017).

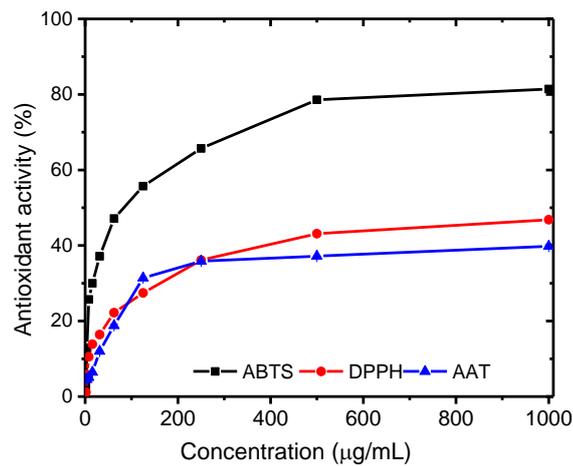
Baseado em todos os dados dos derivados thiossemicarbazonicos analisados e descritos e todo estudo realizado na literatura, os compostos do presente trabalho são potentes agentes tripanocidas e leishmanicidas, onde todos os derivados foram capazes de causar inibição de crescimento de *L. infantum*, *L. amazonenses* e *T. cruzi*. Onde os compostos LQIT/PR-01, LQIT/PR-02 E LQIT/PR-09 destacaram-se como os melhores compostos com ação leishmanicida e LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 como os melhores tripanocidas, destacamos a ação do composto LQIT/PR-09 que obteve ótimo resultado de IC<sub>50</sub> para *Leishmania*

tegumentar e visceral e também *Trypanossoma*, mostrando-se uma molécula promissora para atividade antiprotozoária.

## 5.2 LIGNINA DAS FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*

O teor de fenólicos totais presente na lignina das folhas de *Morinda citrifolia* foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (HE et al. 2020). O reagente Folin-Ciocalteu de coloração amarelada forma um complexo azul na presença de fenólicos (Cesari et al., 2019). O resultado para o ensaio foi expresso em miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama (g) de lignina (AADIL et al., 2014; CESARI et al., 2019; HE et al., 2020). O teor de fenólicos para a lignina deste estudo foi de  $193.3 \pm 2.7$  mgEAG/g. A literatura reporta as ligninas como potenciais agentes antioxidantes, apresentando resultados promissores em diferentes ensaios *in vitro* (AADIL et al., 2014; BARAPATRE et al., 2015). Esta versatilidade está relacionada a estrutura macromolecular complexa (UGARTONDO et al., 2008; VINARDELL et al., 2008). A Figura 32 apresenta os resultados de atividade antioxidante promovidos pela lignina em diferentes ensaios *in vitro*.

Figura 32 - Atividade antioxidante promovida pela lignina das folhas de *Morinda citrifolia* em função da concentração para diferentes ensaios *in vitro*.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 32 apresenta os resultados de atividade antioxidante em relação a concentração. Foi observado que a atividade antioxidante aumentou com o aumento da concentração para os ensaios de ABTS, DPPH e AAT. A lignina deste estudo promoveu maiores resultados de atividade antioxidante para o ensaio de ABTS seguidos de DPPH e AAT. A Tabela 7 apresenta os resultados de atividade antioxidante na concentração de 0.5

mg/mL para todos os ensaios de atividade antioxidante *in vitro* realizados, assim como os resultados obtidos para diferentes ligninas encontradas na literatura comparada a antioxidantes comerciais.

Tabela 7- Atividade antioxidante da lignina das folhas de *Morinda citrifolia* comparada a outras ligninas encontradas e a antioxidantes comerciais na concentração de 0.5 mg/mL.

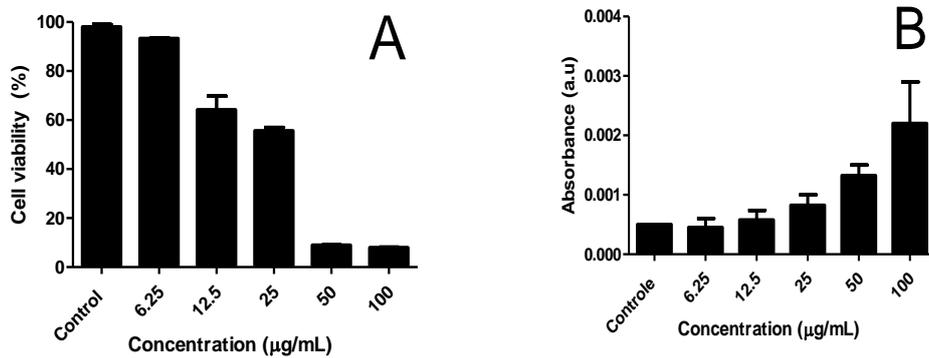
Amostras	ABTS (%)	DPPH (%)	TAA (%)	Referência
Lignina de <i>Morinda citrifolia</i>	74.35 ± 0.1	40.83 ± 0.1	34.91 ± 0.2	Este trabalho
Lignina de <i>Opuntia cochenillifera</i>	61.5 ± 0.9	21.1 ± 0.1	8.5 ± 0.0	Cruz-Filho et al. (2019)
Lignina de <i>Crataeva tapia</i>	58.0 ± 0.1	19.7 ± 0.2	18.9 ± 0.1	Arruda et al. (2021)
Lignina de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	51.1 ± 1.3	16.9 ± 0.2	40.0 ± 1.15	Melo et al. (2020)
Lignina de <i>Opuntia ficus-indica</i>	26.8 ± 0.1	12.0 ± 0.3	4.0 ± 0.0	Cruz-Filho et al. (2019)
Ácido ascórbico (antioxidante comercial)	92.1 ± 0.8	91.1 ± 0.6	99.9	Este trabalho
BHT (antioxidante comercial)	97.2 ± 0.10	94.7 ± 0.5	98.7 ± 0.3	Este trabalho

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; Radical do ácido ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína) - 6-sulfônico; TAA - Atividade antioxidante total: ensaio de redução de fosfomolibdênio; BHT - butylated hydroxytoluene.

Na avaliação da atividade citotóxica células de macrófago J774 e das formas promastigota de *Leishmania amazonensis*, o composto isolado foi avaliado *in vitro* quanto à sua citotoxicidade. Para avaliação do efeito citotóxico da lignina de *M. citrifolia* sobre macrófagos J774, foi realizado o ensaio do MTT em diferentes concentrações (6.25 a 100 µg/mL) por 72 horas como apresentados na Figura 33.

Figura 33 – Gráficos da viabilidade celular e produção de óxido nítrico.



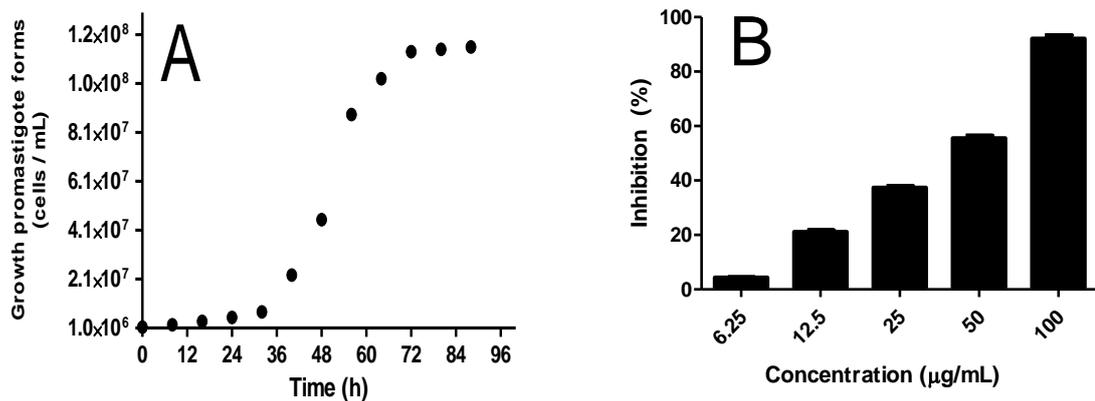
Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A)- Viabilidade celular avaliada pelo método de MTT, com diferentes concentrações da lignina. (B) Produção de óxido nítrico com diferentes concentrações da lignina.

O ensaio realizado em macrófagos J774 revelou que a lignina em estudo apresentou  $CC_{50}$  de  $31.0 \pm 1.10$  sendo menos citotóxica que o fármaco padrão para leishmanioses a anfotericina B, que teve como  $CC_{50}$  o valor de  $34.75 \pm 1.4$ . A análise da  $CC_{50}$  revela que esta macromolécula promove efeitos citotóxicos significativos apenas em concentrações muito elevadas como pode ser observado nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, onde a viabilidade celular ficou abaixo de 20% com significância de ( $p=0.0022$ ).

A Figura 34-A apresenta a curva de crescimento do parasito onde está evidenciada as fases de crescimento exponencial e estacionaria. A Figura 34-B apresenta os resultados de citotoxicidade das formas promastigota de *Leishmania amazonensis* no período de 72 horas em diferentes concentrações (6.25 a 100µg/mL) para a lignina obtida das folhas de *Morinda citrifolia*.

Figura 34 - Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento de células promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com lignina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A)- Curva de crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonensis* em meio de Schneider por um período de 96 horas. (B)- Inibição das formas promastigota em diferentes concentrações de lignina.

A curva de crescimento apresentada na Figura 35-A mostrou que em 72 horas as formas promastigotas se encontraram na fase estacionária de crescimento. Este perfil também foi observado por Soares et al. (2012), Paiva e Careta (2019) e Pereira et al. (2020) avaliando o crescimento das formas promastigotas em meio de cultura Schneider. Nesta fase de crescimento são encontradas as formas promastigotas metacíclicas as formas mais infectantes como mencionado anteriormente. A Figura 35-B apresenta os resultados de inibição da forma promastigota, os resultados mostram que a lignina apresenta  $IC_{50}$  de  $29,56 \pm 0,6$  com inibição máxima equivalente a 37%, enquanto a anfotericina B apresenta  $IC_{50}$  de  $0,14 \pm 0,0$ , já os índices de seletividade foram de 1.05 para a lignina e de 248.2 para a anfotericina B.

A Análise ultraestrutural das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de lignina, foi realizada através da microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET), são ferramentas importantes que auxiliam na elucidação do mecanismo de ação de novos candidatos a fármacos (VANNIER-SANTOS; CASTRO, 2009; SOUZA; ATTIAS, 2018). Estas permitem verificar alterações morfológicas tanto na superfície como nas organelas de diferentes parasitos (SOUZA et al., 2009; VANNIER-SANTOS; CASTRO, 2009; SOUZA; ATTIAS, 2018). Como estas técnicas são de caráter qualitativo mostraremos apenas as alterações provocadas apenas em alguns parasitos.

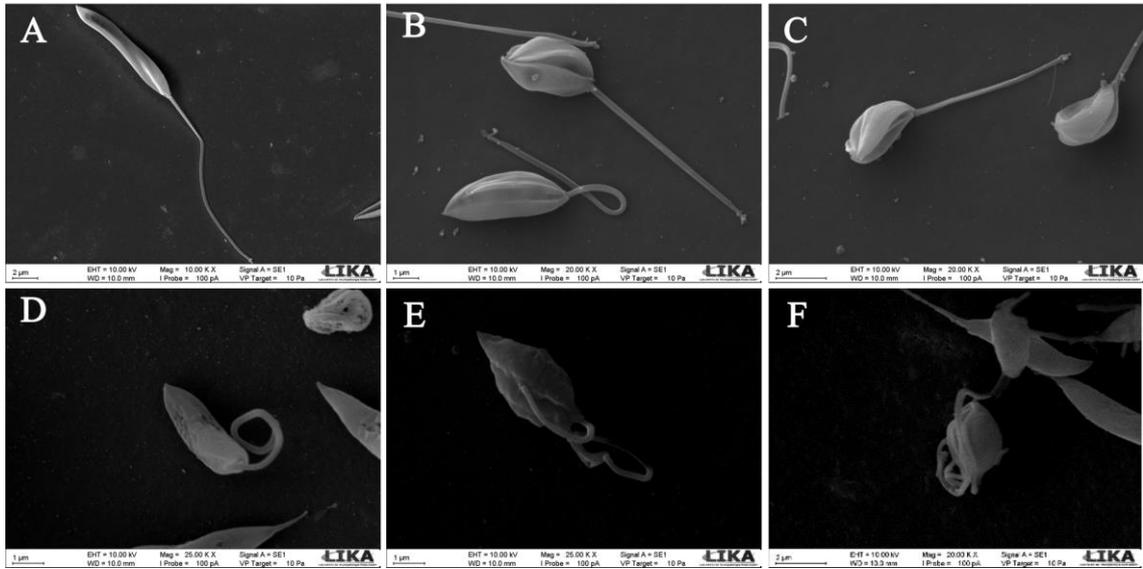
A análise ultraestrutural da lignina evidenciou a ação da mesma, onde ocasionou alterações na morfologia da célula e no citoplasma, nas menores concentrações testadas frente

a formas promastigotas. Na microscopia eletrônica de varredura observamos a promastigota sem tratamento possui corpo fusiforme e flagelo grande (Figura 35 A).

Observamos que promastigotas tratadas com a Anfotericina B (Figura 35 B-C) apresentaram mudança no formato da célula (formato redondo), bem como o encurtamento no flagelo. As três concentrações do composto natural testado 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram alterações semelhantes ao fármaco padrão (Figura 35 D-F), nas três concentrações observamos a mudança no corpo celular para um formato ovoide e encurtamento do flagelo, além desse último apresentar em alguns parasitos tratados o enrolamento.

Observando a microscopia eletrônica de transmissão (Figura 36) que promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas possuem estruturas intracelulares bem preservadas e com morfologia normal, nos parasitos tratados com o fármaco padrão observamos inchaço mitocondrial, vacuolização, aparecimento de regiões eletrodensas (Figura 36 B-C). Nos parasitos tratados com 6,25  $\mu\text{g/mL}$  da lignina encontramos vacuolização do citoplasma, na concentração 12,5  $\mu\text{g/mL}$  observamos desorganização do citoplasma e intensa vacuolização e lesão da membrana e nos parasitos tratados com 25  $\mu\text{g/mL}$  observamos além de vacuolização um inchaço mitocondrial.

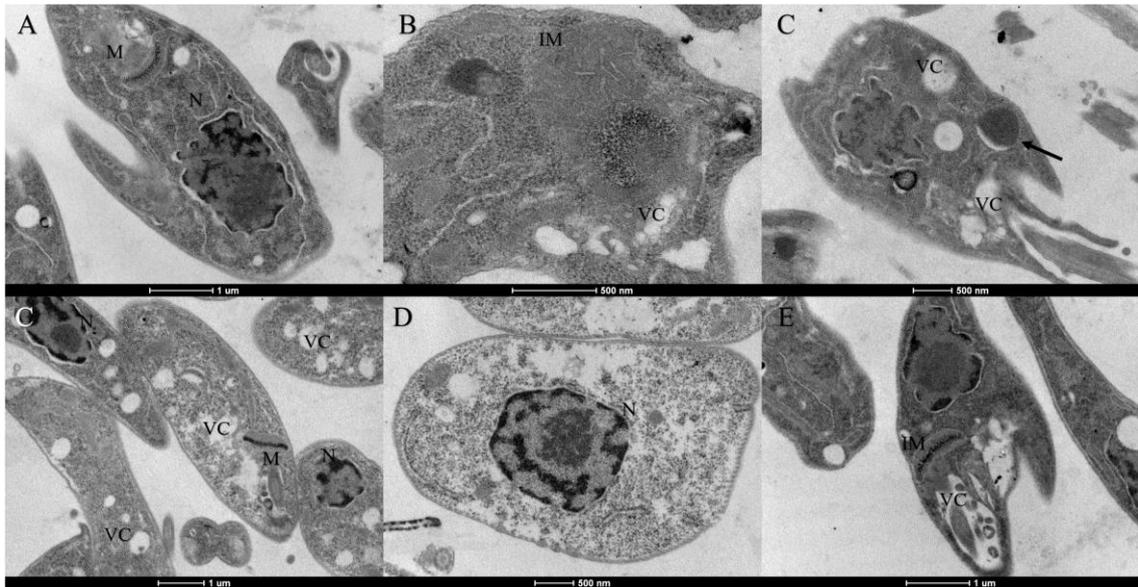
Figura 35 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura de promastigotas de *L. amazonensis* tratada com diferentes concentrações de lignina.



Fonte: Próprio autor

Legenda: Formas promastigotas de *L. amazonensis*. (A)- Sem tratamento. (B-C) Tratadas com Anfotericina. (D) – tratada com 6.25 µg/mL da lignina. (E)- tratadas com 12.5 µg/mL da lignina. (E)- 25 µg/mL.

Figura 36 - Eletromicrografia de Microscopia Eletrônica de Transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas com diferentes concentrações de lignina.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: (A)- Sem tratamento. (B-C) Tratadas com Anfotericina. (D) – tratada com 6.25 µg/mL da lignina. (E)- tratadas com 12.5 µg/mL da lignina. (E)- 25 µg/mL. Formas promastigotas de *L. amazonensis*. VC- Vacuolização do citoplasma, IM- inchaço mitocondrial, seta preta - partículas eletrodensas. M - mitocôndria, N – núcleo.

Resultados semelhantes as alterações ultraestruturais presentes nesse trabalho são encontradas na literatura, com diferentes compostos naturais testados. Estudos de Santos et al.

(2010), pesquisando sesquiterpeno elatol componente natural da alga vermelha sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, relatou alterações como arredondamento do corpo celular e encurtamento do flagelo, bem como a presença de vacúolos autofágicos. Nanoemulsões preparadas com óleos essenciais de copaíba e andiroba testadas em promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nas diferentes concentrações da lignina na MEV (MORAES et al., 2018). Alterações como inchaço mitocondrial, presença de vacúolos e desorganização do citoplasma foram efeitos apresentados por promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com composto natural ácido usólico (YAMAMOTO et al., 2015).

A lignina isolada das folhas de *Morinda citrifolia* apresenta-se como um promissor agente antiparasitário visto que possui menor citotoxicidade frente a macrófagos do que o fármaco padrão. Também foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas em todas as concentrações. Nas menores concentrações testadas observamos que o composto natural foi capaz de causar alterações na morfologia celular e nas organelas causando assim a inviabilidade celular. Assim, este estudo contribui com informações sobre o uso de ligninas como antiparasitário, visto que poucas informações são encontradas na literatura.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que os compostos indólicos-thiossemicarbazônicos foram promissores na atividade leishmanicida e tripanocida, onde todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* e formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanossoma*. Assim como a liguinina extraída *Morinda citrifolia* também foi promissora frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os compostos indólicos-thiossemicarbazônicos apresentaram a atividade leishmanicida, observando que os compostos LQIT/PR-02 e LQIT/PR-09 foram capazes de causar mudanças ultraestruturais nas células de *L. infantum*, acarretando a inviabilidade célula, assim como diminuíram a carga parasitária de *L. infantum* em macrófagos infectados. Derivados indólicos-thiossemicarbazônicos foram eficazes frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, onde o LQIT/PR-01 e LQIT/PR-09 apresentaram os melhores resultados de IC<sub>50</sub> da série e também causaram modificações ultraestruturais no parasito.

O LQIT/PR-06 e LQIT/PR-09 apresentaram ótimos resultados frente a formas tripomastigotas de *T. cruzi*, bem como apresentaram resultados significativos frente a formas amastigotas, tais compostos atuaram na membrana celular, causaram morte celular por necrose, assim como o composto padrão testado. Ressaltamos que o composto LQIT/PR-09 foi capaz de inibir com resultados expressivos promastigotas de a *L. infantum* e *L. amazonensis* e tripomastigotas e amastigota de *T. cruzi*, sugerindo que esse derivado possa ser utilizado em ambas manifestações clínicas da leishmaniose e na doença de chagas.

A liguinina obtida a parti das folhas de *Morinda citrifolia* apresentou menos citotóxica que o fármaco padrão utilizado, além de promover efeitos citotóxicos em concentrações mais elevadas. A mesma foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* nas menores concentrações testadas, assim como causou nessas concentrações desorganização ultraestrutural dos parasitos. Mostrando-se como um produto natural promissor para futuros estudos como antiprotozoário.

Portanto baseado nos resultados desse estudo os derivados indólicos-thiossemicarbazônicos e a liguinina apresentam-se como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas e tripanocida, corroborando para uma base sólida para mais estudos aprofundados das propriedades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanossoma* de compostos indólicos, thiossemicarbazônicos e liguininas.

## REFERÊNCIAS

- AADIL, K. R.; BARAPATRE, A.; SAHU, S.; JHA, H.; TIWARY, B. N. **Free radical Scavenging Activity and Reducing Power of Acacia Nilotica Wood Lignin**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 67, p. 220-227, 2014.
- AERTS, C. **As parcerias público-privadas são a solução para combater as doenças tropicais negligenciadas? Uma revisão sistemática da literatura**. Política de Saúde , v. 121, n. 7, pág. 745-754, 2017.
- ASLAM, J. **Catharanthus roseus (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production**. Pharmacie Globale (IJCP), v. 4, n. 12, p. 1-16, 2010.
- AKAO, Y. **Um derivado de lignofenol altamente bioativo da lignina de bambu exibe uma atividade potente para suprimir a apoptose induzida por estresse oxidativo em células do neuroblastoma humano SH-SY5Y**. Química bioorgânica e medicinal , v. 12, n. 18, pág. 4791-4801, 2004.
- AMATO, V. S. **Leishmaniose mucosa: cenário atual e perspectivas de tratamento**. Acta tropica , v. 105, n. 1, pág. 1-9, 2008.
- ARRUDA, M. D. M. **Caracterização de uma lignina das folhas de Crataeva tapia e potenciais aplicações em formulações medicinais e cosméticas**. International Journal of Biological Macromolecules , v. 180, p. 286-298, 2021.
- ALQAHTANI, M. S. **Novas nanopartículas de lignina para administração oral de drogas**. Journal of Materials Chemistry B , v. 7, n. 28, pág. 4461-4473, 2019.
- ALENCAR, M. M. F. **Epidemiologia da Doença de Chagas aguda no Brasil de 2007 a 2018**. Research, Society and Development, v. 9, n. 10, p. e8449109120-e8449109120, 2020.
- ALLMANN, S.; BRINGAUD, F. **Glycosomes: A comprehensive view of their metabolic roles in T. brucei**. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 85, p. 85-90, 2017.
- AEBISCHER, A.; MRVA, M. **Leishmania**. In: **Molecular Parasitology**. Springer, Vienna, 2016. p. 195-216.
- ABADIÁS-GRANADO, I. **Leishmaniose cutânea e mucocutânea**. Actas Dermo-Sifiliográficas. 2021.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. **Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão**. Unimontes Científica, v. 19, n. 1, p. 191-204, 2017.
- ALDASORO, E. **What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 73, n. 4, p. 1060-1067, 2018.
- AL-QAWASMEH, R. A. **Potente atividade antimicrobiana de derivados de 3- (4, 5-diaril-1H-imidazol-2-il) -1H-indol contra Staphylococcus aureus resistente à meticilina**. Cartas de química bioorgânica e medicinal , v. 20, n. 12, pág. 3518-3520, 2010.

ALEXANDRE, J. P. O.; TESTON, A. P. M.; JÚNIOR, G. Z. **Tratamento etiológico da doença de Chagas: um antigo problema de saúde pública.** REVISTA UNINGÁ REVIEW, v. 20, n. 2, 2014.

AKHOUNDI, M. **A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies.** PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ANSARI, N. A.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. **Immune response following miltefosine therapy in a patient with post-kala-azar dermal leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 11, p. 1160-1162, 2008.

ARRUDA, M. M. **Leishmanioses. Manual de Zoonoses.** Programa de Zoonoses região Sul, v. 1, p. 68-90, 2010.

BHARGAVA, P.; SINGH, R. **Desenvolvimentos em diagnóstico e drogas anti-leishmania.** Perspectivas interdisciplinares sobre doenças infecciosas , v. 2012, 2012.

BERN, C. **Doença de Chagas.** New England Journal of Medicine , v. 373, n. 5, pág. 456-466, 2015.

BLAU, L. **Desenho, síntese e avaliação biológica de novos ariltiosemicarbazona como candidatos antichagásicos.** European Journal of Medicinal Chemistry , v. 67, p. 142-151, 2013.

BRASIL, P. F. **Antiproliferative and ultrastructural effects of phenethylamine derivatives on promastigotes and amastigotes of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi.** Parasitology international, v. 66, n. 2, p. 47-55, 2016.

BRITTA, E. A.; BARBOSA SILVA, A. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, C. C.; SERNAGLIA, R. L.; NAKAMURA, C. V. **Benzaldeído tiossemicarbazona derivado de limoneno complexado com disfunção mitocondrial induzida por cobre em Leishmania amazonensis.** 2012

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.** Advances in parasitology, v. 64, p. 1-458, 2007.

BATES, P. A. **Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies.** International journal for parasitology, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BERN, Caryn. **Doença de Chagas.** New England Journal of Medicine , v. 373, n. 5, pág. 456-466, 2015.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. **Over six thousand Trypanosoma cruzi strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory.** PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 8, p. e0004792, 2016.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**, 1ª ed. 2016.

BRASIL. **Manual De Vigilância Leishmaniose tegumentar Americana** Brasília – DF. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2ª edição atualizada. . 2013.

BRASÍLIA – DF **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**.2014.

BASTOS, M. M. **Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura**. Revista Virtual de Química, v. 8, n. 6, 2016.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. **Lignin Biosynthesis**. Annual Review of Plant Biology., v. 54, p. 519-546, 2003.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. The lancet, Bélgica, v. 392, n. , 2018.

CASAS, J. S., GARCIA-TASENDE, M. S., SORDO, J. **Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones**. A structural review. Coordination Chemistry Reviews, v. 209, n. 1, p. 197-261, 2000.

CAVALCANTI, D. P. **Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of Trypanosoma cruzi**. BMC microbiology, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

CESARI, L.; MUTELET, F.; CANABADY-ROCHELLE, L. **Propriedades antioxidantes dos substitutos fenólicos da despolimerização da lignina**. Industrial Crops and Products , v. 129, p. 480-487, 2019.

CLIFFORD, C. B. JOHN A. **Lignina** . Dutton e-Education Institute.2020 Disponível em: <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/665>. Acesso em : 14 out. 2021.

CAPUTTO, M. E. **Tiosemicarbazonas derivadas de 1-indanonas como novos agentes anti-Trypanosoma cruzi**. Química bioorgânica e medicinal , v. 19, n. 22, pág. 6818-6826, 2011.

CHEN, F. E.; HUANG, J. **Reserpine: a challenge for total synthesis of natural products**. Chemical reviews, v. 105, n. 12, p. 4671-4706, 2005.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. **A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis**. Biochemical and biophysical research communications, v. 416, n. 1, p. 7-12, 2011.

CHADHA, N.; SILAKARI, O. **Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view**. European journal of medicinal chemistry, v. 134, p. 159-184, 2017.

CHRISTIERNIN, M. **Composição da lignina em tecidos cambiais de choupo**. Plant Physiology and Biochemistry , v. 44, n. 11-12, pág. 700-706, 2006.

CORREIA, J. R. **Doença de Chagas: aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos**. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 13, n. 3, p. e6502-e6502, 2021.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano.** Editora Fiocruz, 2014.

COLLIN, G.; HÖKE, H. **Indole.** Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 2000.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco.** Rev Soc Bras Med Trop, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

COSTA, D. N. C. C. **Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino.** Revista de Saúde Pública, v. 52, 2018.

Carvalho, T. U. **Organização Estrutural: Estudo microscopia óptica.** Portal da doença de chagas- Fiocruz. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/> Acesso em: Acesso em 22 jul. 2021.

CHAWLA, B. **Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible-resistant *Leishmania donovani*.** PloS one, v. 6, n. 10, p. e26660, 2011.

CROVETTO-MARTÍNEZ, R. **Mucocutaneous leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of midline destructive disease: two case reports.** Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology, v. 119, n. 1, p. e20-e26, 2015.

CRUZ FILHO, I. J.; DA SILVA BARROS, B. R.; DE SOUZA AGUIAR, L. M.; NAVARRO, C. D. C.; RUAS, J. S.; DE LORENA, V. M. B. & MAIOR, A. M. S. **Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production.** International journal of biological macromolecules, v. 123, p. 1331-1339, 2019.

CULEBRAS, M. **Adaptação fácil de estruturas para liberação controlada de paracetamol de plataformas sustentáveis derivadas de lignina.** Molecules. v. 26, n. 6, pág. 1593, 2021.

DAI, M. **Engenharia precisa de nanomateriais de dextrana / glicol incorporados com lignina para curativos de feridas para o tratamento da cirurgia anorretal.** Journal of Polymers and the Environment , p. 1-11, 2021.

DA SILVA, E. B. **Desing e síntese de potentes agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, novos derivados de tiazóis que induzem a morte apoptótica do parasita.** Jornal Europeu de Química Medicinal , v. 130, p. 39-50, 2017.

DA SILVA SANTOS, J. **Synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activity and quantitative structure relationships of some fluorinated thiosemicarbazones.** Journal of Fluorine Chemistry, v. 195, p. 31-36, 2017.

DA SILVA, A. C. **Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis***. *Experimental parasitology*, v. 177, p. 57-65, 2017.

DESJEUX, P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives**. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DA SILVA SANTOS, J. **Síntese, atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e relações quantitativas com a estrutura de algumas tiosemicarbazonas fluoradas**. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 195, p. 31-36, 2017.

DA SILVA, E. B. **Desing e síntese de potentes agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, novos derivados de tiazóis que induzem a morte apoptótica do parasita**. *Jornal europeu de química medicinal*, v. 130, p. 39-50, 2017.

DE MORAES, A. R. D. P. **Efeitos de nanoemulsões preparadas com óleos essenciais de copaíba e andiroba contra infecções por *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis***. *Parasitologia experimental*, v. 187, p. 21/12/2018.

DE MELOS, J. L. R. **Novel 3, 4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis***. *European journal of medicinal chemistry*, v. 103, p. 409-417, 2015.

DE OLIVEIRA MORAES, A. D. T. **Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives**. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 26, n. 20, p. 5388-5396, 2018.

CARVALHO, L. P.; MELO, E. J. T. **As Defesas Microbidas Envolvidas na Eliminação da *Toxoplasma Intracelular Gondii*, do *Trypanosoma Cruzi* e da *Leishmania Amazonensis* na Presença de Semicarbazonas, Tiosemicarbazonas e Tiazolidinonas**. *World Journal of Pharmaceutical Research*. v. 7, n 18, 276-295, 2018.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. V. **2-Piridiltiazóis como novos agentes anti-*Trypanosoma cruzi*: Desenho estrutural, síntese e avaliação farmacológica**. *Jornal europeu de química medicinal*, v. 86, p. 48-59, 2014.

DE OLIVEIRA, J. F. **Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities**. *European journal of medicinal chemistry*, v. 104, p. 148-156, 2015.

DIAS, J. C. P. **II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

D'AVILA-LEVY, C. M. **Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, p. 956-965, 2015.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C.F. **Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida)**. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

DE MUYLDER, G. **Um rastreio contra amastigotas intracelulares de Leishmania: comparação com um rastreio de promastigota e identificação de uma célula hospedeira específica**. PLoS Neglected Tropical Diseases , v. 5, n. 7, pág. e1253, 2011.

DE OLIVEIRA, V. V. G. **Estudo da atividade biológica in vitro de tiazóis em Leishmania (Leishmania) infantum**. Jornal de resistência antimicrobiana global , v. 22, p. 414-421, 2020.

DOCAMPO, R. **Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes**. Philophysical Transactions of the Royal Society, London, v. 365, p. 775-784, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 48, p. 151-156, 2006.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. **Trypanosoma cruzi: A review of biological and methodological factors in Mexican strains**. Acta tropica, v. 195, p. 51-57, 2019.

DE SOUZA , L. R. N. **Estratégias in silico para apoiar a otimização de fragmento para lead na descoberta de medicamentos**. Fronteiras na química , v. 8, p. 93, 2020.

DE ARAÚJO NETO, L. N. **Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives**. Chemico-biological interactions, v. 272, p. 172-181, 2017.

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

ECHEVERRIA, L. E .; MORILLO, C. A. **Tripanossomíase americana (doença de Chagas)**. Infectious Disease Clinics , v. 33, n. 1, pág. 119-134, 2019.

ECHAVARRÍA, N. G. **Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy**. Current problems in cardiology, v. 46, n. 3, p. 100507, 2021.

ESPINOZA-MORALES, D. **An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to Leishmania peruviana in the valleys of Ancash-Peru**. Asian Pacific journal of tropical medicine, v. 10, n. 11, p. 1101-1103, 2017.

FARAHAT, A. A. **Indole and benzimidazole bichalcophenes: synthesis, DNA binding and antiparasitic activity**. European journal of medicinal chemistry, v. 143, p. 1590-1596, 2018.

FARHI, D. **Supériorité de l'amphotéricine B liposomale sur le stibogluconate dans le traitement de la leishmaniose cutanée?**. OPTION BIO. v. 19. n 399, p 2008.

FERREIRA, C. **Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis***. *Phytochemistry*, v. 72, n. 17, p. 2155-2164, 2011.

FRANK COLLINS, J. G. **Center for Disease control and prevention-CDC**. Leishmaniasis. 2017. Disponível em: [https://phil.cdc.gov/details\\_linked.aspx?pid=10277](https://phil.cdc.gov/details_linked.aspx?pid=10277) . Acesso em: 22 nov. 2018.

FREITAS, L. A. B. **O aprimoramento estrutural de novos derivados de tiazolil-isatina produz compostos tripanocidas e leishmanicidas potentes e seletivos**. *Chemico-Biological Interactions* , v. 345, p. 109561, 2021.

FAUCHER, J. F. **Serial use of pentamidine and miltefosine for treating *Leishmania infantum*-HIV coinfection**. *Parasitology international*, v. 65, n. 5, p. 444-446, 2016.

FENWICK, A. **A carga global de doenças tropicais negligenciadas**. *Saúde pública* , v. 126, n. 3, pág. 233-236, 2012.

Félix, M. B. **Antileishmanial activity of new thiophene–indole hybrids: Design, synthesis, biological and cytotoxic evaluation, and chemometric studies**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 18, p. 3972-3977, 2016.

GARG, N. J. **Saúde global: doenças negligenciadas e acesso a medicamentos**. *Infectious Disease Clinics* , v. 25, n. 3, pág. 639-651, 2011.

GIRAUD, F. **Desenho, síntese e avaliação de 3- (imidazol-1-ilmetil) indóis como agentes antileishmania**. Parte II. *Jornal de inibição de enzima e química medicinal* , v. 24, n. 5, pág. 1067-1075, 2009.

GARCÍA-HUERTAS, P.; CARDONA-CASTRO, N. **Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, V. 142, p. 1-10. 2021.

GUARNER, J. **Chagas disease as example of a reemerging parasite**. In: *Seminars in diagnostic pathology*. WB Saunders, 2019. p. 164-169.

GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. **Fisiologia do triatomíneo no contexto da infecção por tripanossoma**. *Journal of insect physiology* , v. 97, p. 66-76, 2017.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. **Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi***. *Acta tropica*, v. 151, p. 32-50, 2015.

GOURBIÈRE, S. **Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control**. *Heredity*, v. 108, n. 3, p. 190-202, 2012.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. *Sociedade Brasileira de Zoologia*. p. 289. 2014.

GÓES, M. A. O.; JERALDO, V. L. S.; OLIVEIRA, A. S. **Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil.** Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, v. 9, n. 31, p. 119-126, 2014.

GODINHO, J. L. P. **A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against Leishmania amazonensis.** Experimental parasitology, v. 135, n. 1, p. 153-165, 2013.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. **Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle.** International journal for parasitology, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

G-FINDER. **Global Funding of Innovation for Neglected Diseases.** Policy Cures Research. 2019. Disponível em: <https://www.policycuresresearch.org/analysis>. Acesso em: 22 jul. 2021.

HARHAY, M. O. **Parasitologia urbana: leishmaniose visceral no Brasil.** Tendências em parasitologia, v. 27, n. 9, pág. 403-409, 2011.

HAROON, M. **O projeto, a síntese e as atividades tripanocida e leishmanicida in vitro de derivados de éster de 1,3-tiazol e 4-tiazolidinona.** RSC Advances, v. 11, n. 4, pág. 2487-2500, 2021.

HE, J. **O efeito dos produtos de degradação da lignina na geração de pseudo-lignina durante o pré-tratamento com ácido diluído.** Industrial Crops and Products, v. 146, p. 112205, 2020.

HOLLOWAY, G. A. **A campanha de triagem de alto rendimento da tripanotiona redutase identifica novas classes de inibidores com atividade antiparasitária.** Agentes antimicrobianos e quimioterapia, v. 53, n. 7, pág. 2824-2833, 2009.

HAANSTRA, J. R. **Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1863, n. 5, p. 1038-1048, 2016.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. **Chemoselective approaches to glycoprotein assembly.** Accounts of chemical research, v. 34, n. 9, p. 727-736, 2001.

HARHAY, M. O. **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** Trends in parasitology, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HERNANDES, M. Z. **Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents.** Bioorganic & medicinal chemistry, v. 18, n. 22, p. 7826-7835, 2010a.

HERNANDES, M. Z. **Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design.** Current drug targets, v. 11, n. 3, p. 303-314, 2010b.

HOTT, G. O. **Leishmaniose Tegumentar.** Parasitologia 2: Protozoários de Interesse Médico, 2021.

**IQBAL, H. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review.** Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2016.

**JANSEN, A. M.; XAVIER, S.C. C.; ROQUE, A. L. R. Os múltiplos, complexos e mutáveis cenários do ciclo de transmissão do Trypanosoma cruzi no meio silvestre.** Acta tropica , v. 151, p. 15 de janeiro de 2015.

**JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M.; MOREIRA, F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R.; VALDIR JR, D.; ROCHA, D. S. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil: vetores da doença de Chagas.** Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro 2014.

**JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 75, n. 3, p. 690-696, 2020.

**KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. Uma atualização sobre estratégias de moléculas pequenas visando a leishmaniose.** Revista Europeia de Química Médica , v. 157, p. 339-367, 2018.

**KAUSHIK, N. K. Importância biomédica dos indóis.** Molecules , v. 18, n. 6, pág. 6620-6662, 2013.

**KAUFER, A. The evolution of trypanosomatid taxonomy.** Parasites & vectors, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2017.

**KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface.** Nature Reviews Microbiology, v. 9, n. 8, p. 604, 2011.

**KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites.** Parasites & vectors, v. 4, n. 1, p. 44, 2011.

**KHAN, S. A.; ASIRI, A. M. Synthesis and spectroscopic studies of Ru (II) complexes of steroidal thiosemicarbazones by multi step reaction: As anti-bacterial agents.** Steroids, v. 124, p. 23-28, 2017.

**KOOVITS, Paul J. Relação estrutura-atividade de derivados 4-azaindol-2-piperidina como agentes contra o Trypanosoma cruzi.** Cartas de química bioorgânica e medicinal , v. 30, n. 1, pág. 126779, 2020.

**LIANG, R. Membrana de nanofibra de poli (ε-caprolactona) -lignina antioxidante implantável e degradável para o tratamento eficaz da osteoartrite.** Biomaterials , v. 230, p. 119601, 2020.

**LISBOA, A. R. Leishmaniose visceral: Uma revisão literária.** Revista Brasileira de Educação e Saúde, v. 6, n. 2, p. 35-43, 2016.

**LINCIANO, P. Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections.** European journal of medicinal chemistry, v. 146, p. 423-434, 2018.

LOHANI, M.; MAJRASHI, M.; GOVINDARAJULU, M.; PATEL, M.; RAMESH, S.; BHATTACHARYA, D.; DHANASEKARAN, M. **Immunomodulatory actions of a Polynesian herb Noni (*Morinda citrifolia*) and its clinical applications**. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 47, p. 102206, 2019.

LINCIANO, P. **Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections**. *European journal of medicinal chemistry*, v. 146, p. 423-434, 2018.

LU, Q. **Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin**. *Food Chemistry*, v. 135, p. 63-67, 2012.

LUQUE-ORTEGA, J. R. **New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II**. *Journal of medicinal chemistry*, v. 53, n. 4, p. 1788-1798, 2010.

MANSOURI, N.E.E.; SALVADÓ, J. **Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda- anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins**. *Industrial Crops and Products*, v. 24, p. 8-16, 2006.

MANZANO, J. I. **Ariltiossemicarbazonas como agentes antileishmania**. *Jornal europeu de química medicinal*, v. 123, p. 161-170, 2016.

MENDONÇA, T. A. **Síntese e avaliação das atividades anti-Toxoplasma gondi e antimicrobiana de benzaldeído 4-fenil-3-tiossemicarbazonas e derivados 2 [(fenilmetileno) hidrazono]-3-fenil-4-tiazolidinona-5-substituídos**, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3169>. Acesso em: 22 jul. 2021.

MEYER, H.; MUSACCHIO, M. O.; MENDONCA, I. A. **Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue cultures and of blood-agar forms**. *Parasitology*, v. 48, n. 1-2, p. 1-8, 1958.

MESQUITA, J. T. **Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitaxoxanide via induction of oxidative stress in Leishmania (L.) infantum**. *Acta tropica*, v. 128, n. 3, p. 666-673, 2013.

MEZENCEV, R. **Trypanosoma cruzi: antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes in vitro**. *Experimental parasitology*, v. 122, n. 1, p. 66-69, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Doenças Tropicais Negligenciadas**. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais**. *Bol Epidemiol.* 2019; 50:1-154. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 22 jul. 2021.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P. VICKERMAN, K. **An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new**

- classification of the class Kinetoplastea.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.
- MONZOTE, L.; GILLE, L. **Mitochondria as a promising antiparasitic target.** Current clinical pharmacology, v. 5, n. 1, p. 55-66, 2010.
- MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. **The Role of Acidocalcisomes in Parasitic Protists.** Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.
- MICHELS, P. A. **Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids.** Biochimica et biophysica acta, Amsterdam, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.
- MERIDA-DE-BARROS, D. A. **Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy?.** Parasites & vectors, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.
- MILLS, Roger M. **Chagas disease: epidemiology and barriers to treatment.** The American Journal of Medicine, v. 133, n. 11, p. 1262-1265, 2020.
- MILES, M. A. **The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future.** Parasitology, v. 136, n. 12, p. 1509-1528, 2009.
- MONTEIRO, F. A. **Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease.** Advances in parasitology, v. 99, p. 265-344, 2018.
- MAGALHÃES-SANTOS, I. F. **Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 13, n. 2, p. 226-235, 2014.
- MELO, R. F. P.; GUARNERI, A. A.; SILBER, A. M. **A influência de pistas ambientais no desenvolvimento de Trypanosoma cruzi em vetores triatomíneos.** Fronteiras em microbiologia celular e de infecção , v. 10, p. 27, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas doença de Chagas.** 2018. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio\\_PCDT\\_Doenca\\_de\\_Chagas.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf) . Acesso em : 10 ago. 2021.
- MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. **Actualización en enfermedad de Chagas.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v. 34,n.2, p. 132-138, 2016.
- MAGILL, A. J. **Pentavalent Antimony.** Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease,v. 9, p. 1102–1103, 2013.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. **Leishmaniose visceral no Brasil.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MACHADO, P. R. **Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immuneresponse.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 105, n. 8, p. 438-444, 2011.

- MACHADO, C. M. **Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients: review of the literature and experience of a Brazilian HSCT Center**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 51, n. 6, p. 309-324, 2009.
- MATOSO, L. M. L. ; CRISTINA, C R ; MENEZES, L. M. C. S. ; OLIVEIRA, L.E.C ; OLIVEIRA, K. K. D. **As Características E A Utilização Do Noni (Morinda Citrifolia)**. Revista Ciência & Desenvolvimento , V. 6, P. 42-50, 2013.
- MÜLLER KRATZ, J. **Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease**. Expert Review of Clinical Pharmacology, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.
- MUNSTERMANN, L. E. **Phlebotomine Sand Flies and Moth Flies (Psychodidae)**. In: Medical and Veterinary Entomology. Academic Press, 2019. p. 191-211.
- MANSUETO, P. **Leishmaniasis in travelers: a literature review**. Travel medicine and infectious disease, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.
- MUKHOPADHYAY, D. **Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery**. Trends in parasitology, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2014.
- NASCIMENTO SANTOS, D. K. D., DA SILVA BARROS, B. R., DE SOUZA AGUIAR, L. M., DA CRUZ FILHO, I. J., DE LORENA, V. M. B., DE MELO, C. M. L., & NAPOLEÃO, T. H. **Immunostimulatory and antioxidant activities of a lignin isolated from Conocarpus erectus leaves**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 150, n. 1 p. 169-177 2020.
- NELSON, S.C. **Morinda citrifolia (noni): Rubiaceae (coffee family)**. Tradicional Tree, v. 4, 2006.
- NYLÉN, S.; KUMAR, R. **Immunobiology of visceral leishmaniasis**. Frontiers in immunology, v. 3, p. 251, 2012.
- NO, J. H. **Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries**. Acta tropica, v. 155, p. 113-123, 2016.
- OLIVEIRA, R. G. **Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 23, p. 2291-2302, 2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniose**. 2018. Disponível em : <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 jul. 2021.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **ATLAS INTERATIVO DE LEISHMANIOSES NAS AMÉRICAS: Aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**.2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275721902>. Acesso em: 15 ago. 2021.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA. **Chagas Disease**. 2020. Disponível em <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease / doenca-de-chagas-2020>. Acesso em: 22 jul. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses informe epidemiológico da Américas**. 2020. Disponível em : <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 jul. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniose**. 2018. Disponível em : <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 jul. 2021.

OLIVERA, M. J. **Safety profile of nifurtimox and treatment interruption for chronic Chagas disease in Colombian adults**. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 93, n. 6, p. 1224, 2015.

ORYAN, A.; AKBARI, M. **Worldwide risk factors in leishmaniasis**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 9, n. 10, 2016.

OLIVEIRA, R. G. **Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 23, p. 2291-2302, 2018.

ÖZBILGIN, A. **The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey**. Acta tropica, v. 190, p. 59-67, 2019.

PAIVA, V.C.F.; CARETA, F.P. **Comparação do crescimento de linhagens celulares promastigotas de Leishmania amazonensis pela adaptação sequencial do inseto de Schneider para o meio RPMI 1640**. Arquivos eletrônicos científicos, v. 12, n. 6, pág. 62-68, 2019.

PANDOLFI, F. **Searching for new agents active against Candida albicans biofilm: A series of indole derivatives, design, synthesis and biological evaluation**. European Journal of Medicinal Chemistry, 2019.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C. **IUPAC – Nomenclature of organic compounds**; Blackwell: London, 1993.

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; PÉREZ-SILANES, S. **Challenges in Chagas disease drug discovery: a review**. Current medicinal chemistry, v. 23, n. 28, p. 3154-3170, 2016.

PACHECO, E. S. **Perfil Epidemiológico de Pacientes com Leishmaniose Visceral nas Regiões do Brasil**. Nova Revista Amazônica, v. 9, n. 2, p. 123-131, 2021.

PACCA, C. C. **Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus**. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 87, p. 381-387, 2017.

PACE, D. **Leishmaniasis**. Journal of Infect, V.69, p.1-9, 2014.

PANDEY, S. **Identification of a diverse indole-2-carboxamides as a potent antileishmanial chemotypes**. European journal of medicinal chemistry, v. 110, p. 237-245, 2016.

- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in the Americas**. Washington; 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>. Acesso: 15 ago. 2021.
- PALTRINIERI, S. **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs**. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.
- PEREIRA, G. F. A. **Família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do Alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na Tribo Spermaceae**. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2007.
- POLLACK, K. F., R. ZLOTOFF, B. **Cutaneous Leishmaniasis in a Boy from Belize**. The Journal of Pediatrics, v. 204, p.316-316.e1; 2019.
- QUEIROZ, C. M. **Tiossemicarbazona e tiazol: avaliação in vitro da atividade leishmanicida e ultraestrutural em Leishmania infantum**. Medicinal Chemistry Research , v. 29, n. 11, pág. 2050-2065, 2020.
- RAMÍREZ-MACÍAS, I. **In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis**. Journal of inorganic biochemistry, v. 112, p. 1-9, 2012.
- RATH, S. **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte**. Química nova , v. 26, n. 4, pág. 550-555, 2003.
- RODRIGUES, K. A. F. **Derivados do 2-amino-tiofeno apresentam atividade antileishmania mediada por apoptose e imunomodulação in vitro**. Revista Europeia de Química Médica , v. 106, p. 1-14, 2015.
- RASSI, A. **Clinical phases and forms of Chagas disease**. In: American Trypanosomiasis. Elsevier, 2010. p. 709-741.
- RASSI, A. **American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)**. Elsevier, 2017. p. 653-686.
- REBELLO, K. M. **Participation of Trypanosoma cruzi gp63 molecules on the interaction with Rhodnius prolixus**. Parasitology, v. 146, n. 8, p. 1075-1082, 2019.
- READY, P. D. **Epidemiologia da leishmaniose visceral**. Epidemiologia clínica , v. 6, p. 147, 2014.
- REIS, L. L. **Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, p. 638-645, 2017.
- RISUEÑO, J. **Estudos epidemiológicos e genéticos sugerem um ciclo de transmissão comum de Leishmania infantum em animais selvagens, cães e humanos, associado à abundância de vetores no sudeste da Espanha**. Parasitologia veterinária , v. 259, p. 61-67, 2018.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. **The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis***. *Parasitology*, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. **Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas**. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

REITHINGER, R. **Cutaneous leishmaniasis**. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

SAAD, S. M. **4-Arylamino-6-nitroquinazolines: Synthesis and their activities against neglected disease leishmaniasis**. *European journal of medicinal chemistry*, v. 108, p. 13-20, 2016.

SALSI, F. **Tiossemicarbazonas e tiadiazinas derivadas de benzoiltioureias fluoradas: Síntese, estrutura cristalina e atividade anti-*Trypanosoma cruzi***. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 215, p. 52-61, 2018.

SAVOIA, D. **Activity of an engineered synthetic killer peptide on *Leishmania major* and *Leishmania infantum* promastigotes**. *Experimental parasitology*, v. 113, n. 3, p. 186-192, 2006.

SANSOM, C. **Neglected tropical diseases: securing sustainability**. *The Lancet. Infectious diseases*, v. 18, n. 5, p. 502-503, 2018.

SANTOS, E.F.; SILVA, Â.A.O.; LEONY, L.M.; FREITAS, N.E.M.; DALTRO, R.T. **Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v. 14, n.8, p. 8455, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>. Acesso em: 22 jul. 2021.

SANTOS, T. A. B., YOSHIOKA, M. K., MIYAGUI, M. L.; AL. E. **Leishmaniose visceral**. *PubVet*, 2008.

SANTOS, A. O. **Efeito do elatol, isolado da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, sobre *Leishmania amazonensis***. *Drogas marinhas*, v. 8, n. 11, pág. 2733-2743, 2010.

SHARMA, R. **Triazino indole–quinoline hybrid: A novel approach to antileishmanial agents**. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 24, n. 1, p. 298-301, 2014.

SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. **Single-dose liposomal amphotericin B: an effective treatment for visceral leishmaniasis**. *The Lancet Global Health*, v. 2, n. 1, p. e7-e8, 2014.

SILVA, P. R. **Síntese, determinação estrutural e avaliação da atividade leishmanicida de novos derivados indólicos-tiossemicarbazônicos**. 2017.

STEVEDING, D. **The history of leishmaniasis**. *Parasites & vectors*, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

STEVENS, J. R. **Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes.** Parasite, v. 15, n. 3, p. 226-232, 2008.

SILVA, L.R. **Caracterização do fruto de Morinda citrifolia L. (noni).** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 17, n. 1, p. 93-100, 2012.

SCHLEIN, Y. **Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission.** Parasitology Today, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

SCHNEIDER, A. **Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids.** International journal for parasitology, v. 31, n. 13, p. 1403-1415, 2001.

SCHRÖDER, J. **Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of Leishmania mexicana cysteine protease CPB.** PloS one, v. 8, n. 10, p. e77460, 2013.

SOARES, D. C. **Dolabelladienetriol, um composto da alga Dictyota pfaffii, inibe a infecção por Leishmania amazonensis.** 2012

SOUZA, W. **Electron microscopy of trypanosomes: a historical view.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. 4, p. 313-325, 2008.

SZÖÖR, B. **Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids.** Current opinion in microbiology, v. 22, p. 79-87, 2014.

SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Biogenesis of the reservosomes of Trypanosoma cruzi.** Microscopy and Microanalysis, v. 10, n. 5, p. 637-646, 2004.

SILVA, F.S. **Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina.** Rev Trop Cienc Agr Biol, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SUNTER, J.; GULL, K. **Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding.** Open biology, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.

SANTOS, A. T. O. **Patologia E Patogênese da Leishmaniose Visceral Humana.** Revista Saúde dos Vales, v.1, n.1, p 19-37, 2019.

SIMÕES, M. V. **Cardiomiopatia da doença de Chagas.** International Journal of Cardiovascular Sciences, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

SANTOS, É.; FALCÃO, L. M. **Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment.** Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition), v. 39, n. 5, p. 279-289, 2020.

SALOMON, C. J. **Primeiro século da doença de Chagas: uma visão geral sobre novas abordagens aos sistemas de liberação de nifurtimox e benznidazol.** Journal of Pharmaceutical sciences , v. 101, n. 3, pág. 888-894, 2012.

SHOWLER, A. J. BOGGILD, A. K. **Protozoan Diseases: Leishmaniasis**. International Encyclopedia of Public Health , v 4, p. 367–371, 2017.

SOARES, R. O. A. **Avaliação de tiossemicarbazonas e semicarbazonas como potenciais agentes anti-Trypanosoma cruzi**. Parasitologia experimental , v. 129, n. 4, pág. 381-387, 2011.

SUGIARTO, S. **A que distância está a Lignina de ser um material biomédico ?**. Materiais bioativos , 2021.

SUNDAR, S. **Visceral leishmaniasis**. Trop Parasitol, V. 5, p. 83-85. 2015.

SUNDAR, S. **Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use**. Clinical Infectious Diseases, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SUBHASHREE, G. R. **In vitro antioxidant, antiinflammatory and in silico molecular docking studies of thiosemicarbazones**. Journal of Molecular Structure, v. 1145, p. 160-169, 2017.

TANOWITZ, H. B. **Developments in the management of Chagas cardiomyopathy**. Expert review of cardiovascular therapy, v. 13, n. 12, p. 1393-1409, 2015.

TENÓRIO, R. P. **Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 1030, 2005.

TEMRAZ, M. G. **Tiossemicarbazonas modificáveis por clique anti-leishmania: desenho, síntese, avaliação biológica e estudos in silico**. Revista Européia de Química Médica , v. 151, p. 585-600, 2018.

TEIXEIRA, D. E. **Atlas Didático: Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011.

MORAES GOMES, P. A. T. **Dual Parasiticidal Activities of Phthalimides: Synthesis and Biological Profile against Trypanosoma cruzi and Plasmodium falciparum**. ChemMedChem, v. 15, n. 22, p. 2164-2175, 2020.

TEIXEIRA, D. A. **PATOLOGIA E PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA**. V.1, p 19-37. 2019.

TIRONI, F.C. **Úlcera plantar como manifestação atípica de leishmaniose cutânea**. Anais Brasileiros de Dermatologia (Portuguese), v. 96, n. 3, p. 352-354, 2021.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. **Comparative analysis of megasomes in members of the Leishmania mexicana complex**. Research in Microbiology, Paris, v.158, p.456-462, 2007.

UGARTONDO, V., MITJANS, M., VINARDELL, M. P. **Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources**. Bioresource technology, v. 99, n. 14, p. 6683-6687, 2008.

VASCONCELOS, R. S.; KOVALESKI, D. F.; JUNIOR, Z. C. Tesser. **Doenças negligenciadas: revisão da literatura sobre as intervenções propostas**. Saúde & Transformação Social/Health & Social Change, v. 6, n. 2, p. 114-131, 2015.

VANNIER-SANTOS, M. A.; CASTRO, S. L. **Microscopia eletrônica na quimioterapia antiparasitária: uma visão (próxima) de uma morte**. Alvos de drogas atuais , v. 10, n. 3, pág. 246-260, 2009.

VIEIRA, J. L. **Chagas cardiomyopathy in Latin America review**. Current cardiology reports, v. 21, n. 2, p. 1-8, 2019.

VILAS, V. J. D. R. **Visceral leishmaniasis: a One Health approach**. Veterinary Record, v. 175, n. 2, p. 42-44, 2014.

VIEITES, M. **Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl) acroleine thiosemicarbazones showing anti-Trypanosoma cruzi activity**. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 103, n. 3, p. 411-418, 2009.

VINARDELL, M.P., MITJANS, M. **Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health**. Int. J. Mol. Sci., v.18, p. 1219, 2017.

WANG, G. **Sucessive ethanol-water fraction of enzymatic hydrolysis lignin to concentrate its antimicrobial activity**. Journal of Chemical Technology, v. 93, p. 2977-2987, 2018.

WHO. **Chagas deases**.2021 Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) Acesso em: 05 nov. 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. 2012. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/neglected-tropical-diseases>. Acesso em: 22 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**.2021a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 22 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2019**. 2021b. disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-vl-2019.pdf?sfvrsn=a9c1920e\\_9](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-vl-2019.pdf?sfvrsn=a9c1920e_9). Acesso em: 22 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2019**. 2021b. disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab\\_7](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab_7) . Acesso em: 22 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1). Acesso em: 22 jul. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2). Acesso em: 22 jul. 2021.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. **The limits on trypanosomatid morphological diversity**. PloS one, v. 8, n. 11, p. e79581, 2013.

YAMAMOTO, E. S. **Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of Leishmania sp.** Bioorganic Chemistry, v. 102, p. 104056, 2020.

YU, H. F. **Cage-like monoterpene indole alkaloids with antimicrobial activity from *Alstonia scholaris***. Tetrahedron Letters, 2018.

YI, W. **Refinamento do farmacóforo da ariltiosemicarbazona na inibição da tirosinase do cogumelo**. Jornal europeu de química medicinal , v. 46, n. 9, pág. 4330-4335, 2011.

ZHANG, M. Z.; CHEN, Q.; YANG, G. F. **A review on recent developments of indole-containing antiviral agents**. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 89, p. 421-441, 2015.

ZINGALES, B. **A nomenclatura subespecífica revisada do *Trypanosoma cruzi*: justificativa, relevância epidemiológica e aplicações em pesquisa**. Infecção, genética e evolução , v. 12, n. 2, pág. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZELISKO, N. **Síntese e atividade antitripanossomal de novos tiopirano [2, 3-d] [1,3] tiazóis 6, 6, 7-trissubstituídos**. Cartas de química bioorgânica e medicinal , v. 22, n. 23, pág. 7071-7074, 2012.